

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die SUMOylierung des Transkriptionsfaktors Sp3
reprimiert die Genexpression durch Rekrutierung
Chromatin-modifizierender Enzyme und Ausbildung
lokaler heterochromatischer Strukturen**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Bastian Stielow
aus Marburg

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 28.11.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Guntram Suske

1. Korreferent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	3
2. Einleitung	5
2.1 Eukaryontische Genexpression	5
2.2 Regulation der Transkription	5
2.2.1 Regulation der transkriptionellen Aktivität durch Veränderungen der Chromatinstruktur	5
2.2.2 Transkriptionsfaktoren	8
2.2.3 GC-Box bindende Transkriptionsfaktoren	9
2.2.4 Die Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren	10
2.2.5 Der Transkriptionsfaktor Sp3	11
2.3 Posttranslationale Modifikationen mit SUMO	13
2.3.1 Die SUMO-Familie	13
2.3.2 Die SUMO-Konjugation	14
2.3.3 DeSUMOylierung	15
2.3.4 Regulation der SUMOylierung	16
2.3.5 Funktion der SUMO-Modifikation	17
2.4 Genomweiter RNA-Interferenz Screen zur Identifizierung potentieller Korepressoren von SUMOyliertem Sp3	19
2.5 Zielsetzung der Arbeit	22
3. Material und Methoden	24
3.1 Biologische Sicherheit	24
3.2 Materialien	24
3.2.1 Antibiotika	25
3.2.2 Bakterienstämme und Kulturmedien	25
3.2.3 Zellkulturlinien und Kulturmedien	26
3.2.3.1 Insektenzelllinien	26
3.2.3.2 Säugerzelllinien	26
3.2.3.3 Für diese Arbeit hergestellte stabil transfizierte Zelllinien	27
3.2.3.4 Zellkulturmedien	28
3.2.4 Plasmide	30
3.2.4.1 Bereits beschriebene Plasmide	30
3.2.4.2 Für diese Arbeit hergestellte Plasmide	30
3.2.5 Oligonukleotide und Primer	31
3.2.6 Antikörper und Antiseren	36
3.3 Methoden	38
3.3.1 Zellbiologische Methoden	38
3.3.1.1 Umgang mit Zellen	38
3.3.1.2 Insektenzellen	38
3.3.1.3 Säugerzellen	38
3.3.1.4 Transfektionen	39
3.3.1.5 RNAi-Experimente	41
3.3.1.6 Etablierung stabil transfizierter Zellklone	42

Inhaltsverzeichnis

3.3.2 Molekularbiologische Methoden	42
3.3.2.1 Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	42
3.3.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid DNA	43
3.3.2.3 Präparation von RNA	44
3.3.2.4 Herstellung von dsRNA durch <i>in vitro</i> -Transkription	45
3.3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
3.3.2.6 Quantitative PCR (qPCR)	46
3.3.3 Biochemische Methoden	47
3.3.3.1 Herstellung von SDS-Gesamtzellextrakten	47
3.3.3.2 Herstellung von Kernextrakten	48
3.3.3.3 Proteinbestimmungen	49
3.3.3.4 SDS-PAGE	49
3.3.3.5 Western Blot	50
3.3.3.6 Immunpräzipitationen	52
3.3.3.7 Chromatin Immunpräzipitationen (ChIPs)	53
3.3.3.8 Luciferase Assay	56
3.3.3.9 Dualer Luciferase Assay	57
3.3.3.10 β -Galaktosidase-Assay	58
4. Ergebnisse	59
4.1 Validierung des genomweiten RNAi-Screens in Insektenzellen:	
Identifizierung SUMO-abhängiger Korepressoren	59
4.1.1 Validierung des genomweiten RNAi-Screens durch Re-Screen mit einem alternativen Reportersystem	59
4.1.2 Knockdown mit alternativen dsRNAs	65
4.1.3 Identifizierung von Proteinen, die die SUMOylierungs-Enzymatik oder den SUMO-abhängigen Repressionsmechanismus beeinflussen	67
4.1.4 Potentielle SUMO-abhängige Korepressoren	70
4.1.5 Validierung der RNAi-Phänotypen in einer alternativen Zelllinie	71
4.1.6 Kontrolle der Knockdown Effizienzen	72
4.1.7 Validierung der RNAi-Phänotypen nach Depletion von Mi-2, MEP-1 und Sfmbt durch Rescue-Experimente	74
4.1.8 Kombinatorischer dsRNA-vermittelter Knockdown mehrerer potentieller SUMO-abhängiger Korepressoren	76
4.1.9 Mi-2, MEP-1, Sfmbt, Chd3 und Sbb sind auch an der Repression durch SUMO-modifiziertes Dorsal beteiligt	77
4.1.10 Die mit dem NuRD-Komplex assoziierte Histon-Deacetylase-Aktivität ist nicht an der Sp3-SUMO-abhängigen Repression beteiligt	79
4.1.11 SUMO-abhängige Promotor Rekrutierung von Mi-2, MEP-1 und Sfmbt	80
4.2 Der Mechanismus der SUMO-abhängigen Repression im Säugersystem	83
4.2.1 Etablierung einer Säuger-Zelllinie mit einem stabil integrierten Reportersystem	83
4.2.2 Promotor-Rekrutierung von Gal4-Fusionsproteinen an den stabil integrierten 5xGal4-Luciferase-Reporter	87
4.2.3 SUMO-abhängige Rekrutierung von Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2	88
4.2.4 Assoziation von Gal4-Sp3WT mit Regionen stromabwärts vom Promotorbereich des Reporter-Transgens	91

Inhaltsverzeichnis

4.3 SUMO-abhängige Ausbildung von Heterochromatin auf dem Reporter-Transgen	93
4.3.1 SUMO-abhängige Rekrutierung heterochromatischer Proteine und Ausbildung repressiver Histon-Modifikationen	93
4.3.2 SUMO-abhängige Ausbildung heterochromatischer Eigenschaften auf dem Reporter-Transgen eines alternativen stabil transfizierten Zellklons	95
4.4 SUMO-abhängige Ausbildung von Heterochromatin auf einem endogenen Sp3-regulierten Gen	97
4.4.1 Sp3-abhängige Rekrutierung der Korepressoren und Ausbildung repressiver Histon-Modifikationen auf dem endogenen murinen <i>DHFR</i> -Promotor	97
4.4.2 Rescue des Sp3-Knockout-Phänotyps: Sp3-SUMO-abhängige Ausbildung von Heterochromatin auf dem <i>DHFR</i> -Promotor	101
4.4.3 Promotor-Rekrutierung von Mi-2 und L3MBTL2 in Sp3-SUMOylierungs-defizienten MEFs	104
4.5 Identifizierung endogener Sp3-regulierter Zielgene	105
4.5.1 Induzierbarer Knockdown von Sp3 und Sp1	105
4.5.2 Untersuchung des veränderten Genexpressionsmusters nach Depletion von Sp3 und/oder Sp1 durch <i>Microarray</i> -Analysen	111
5. Diskussion	114
5.1 Validierung des RNAi-Screens zur Identifizierung SUMO-abhängiger Korepressoren	114
5.2 Identifizierung von Proteinen, die die SUMO-Konjugation oder die SUMO-abhängige Repression beeinflussen	116
5.3 SUMO-abhängige Korepressoren	118
5.4 SUMO-modifizierte Transkriptionsfaktoren reprimieren die Transkription durch Ausbildung von lokalem repressiven Heterochromatin	125
5.5 SUMO-abhängige Ausbildung von lokalem Heterochromatin auf dem murinen <i>DHFR</i> -Promotor	130
5.6 Ausblick	132
6. Literaturverzeichnis	134
7. Anhang	147

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Die posttranslationale Modifikation vieler Transkriptionsfaktoren mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) führt oft zur transkriptionellen Repression. Der molekulare Mechanismus, wie die SUMO-Modifikation die Transkription reprimiert, war noch weitgehend unbekannt. Unter Verwendung des SUMOylierten Transkriptionsfaktors Sp3 als Modellsystem wurden in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe eines genomweiten RNA-Interferenz-Screens zahlreiche Proteine identifiziert, die an der SUMO-abhängigen transkriptionellen Repression beteiligt sein könnten.

Ausgehend von Primärdaten des Screens wurde in der vorliegenden Arbeit für insgesamt 120 Proteine verifiziert, dass deren Depletion mittels spezifischer doppelsträngiger RNA (dsRNA) die Repression durch SUMOyliertes Sp3 partiell aufhebt. Dagegen wurde die transkriptionelle Aktivität einer SUMOylierungsdefizienten Mutante von Sp3 nicht beeinflusst. Weitere Validierungs-Experimente zeigten, dass das Chromatin-remodellierende Enzym Mi-2, das *D. melanogaster* Orthologe des *C. elegans* Proteins MEP-1 sowie das Polycomb Protein Sfmbt direkt als SUMO-abhängige transkriptionelle Korepressoren wirken: (1) Der dsRNA-vermittelte Knockdown dieser Proteine verminderte nicht die SUMOylierung von Sp3. Dies zeigt, dass Mi-2, MEP-1 und Sfmbt nicht die SUMOylierungs-Enzymatik, sondern nach der SUMO-Konjugation den Repressionsmechanismus regulieren. (2) Mi-2, MEP-1 und Sfmbt interagierten direkt mit SUMO und mit SUMO-modifiziertem Sp3 und wurden (3) SUMO-abhängig an einen Sp3-regulierten Promotor rekrutiert. (4) Die Depletion von Mi-2, MEP-1 und Sfmbt führte auch zur Aufhebung der Repression durch den SUMOylierten Transkriptionsfaktor Dorsal. Somit scheinen Mi-2, MEP-1 und Sfmbt Teil eines allgemeinen Repressionskomplexes zu sein, der von DNA-gebundenen SUMO-modifizierten Transkriptionsfaktoren rekrutiert wird.

Um die mit der SUMO-abhängigen Repression einhergehenden Veränderungen der Chromatinstruktur im Säugersystem zu analysieren, wurde eine Zelllinie mit einem stabil im Genom integrierten Gal4-abhängigen Reporter gen etabliert. Nach Transfektion

Zusammenfassung

reprimierten die SUMOylierten Gal4-Fusionsproteine von Sp3 und SF-1 (Steroidogenic Factor 1) die Transkription, während die jeweiligen SUMOylierungs-defizienten Mutanten die Transkription des integrierten Transgens aktivierten. Chromatin Immunpräzipitationen ergaben, dass durch Promotor-gebundene SUMOylierte Transkriptionsfaktoren SUMO-abhängig das Chromatin-remodellierende Enzym Mi-2, die MBT-Domänen-Proteine L3MBTL1 und L3MBTL2, die Histon-Methyltransferasen SETDB1 und SUV4-20H, die zu einer Trimethylierung von H3K9 und H4K20 führen, sowie die heterochromatischen Proteine der HP1-Familie rekrutiert werden. Diese heterochromatischen Proteine und repressiven Histon-Modifikationen waren auch auf dem endogenen Sp3-regulierten murinen Dihydrofolat-Reduktase-Promotor in embryonalen Mausfibroblasten vorhanden. Die Ausbildung der heterochromatischen Strukturen erfolgte auch hier Sp3-SUMO-abhängig; sie waren nur in Gegenwart von SUMOyliertem Wildtyp Sp3 nachzuweisen, nicht jedoch wenn eine SUMOylierungs-defiziente Mutante in Sp3^{-/-}-Zellen exprimiert wurde. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass transkriptionell repressorisch wirkende SUMOylierte Transkriptionsfaktoren die Ausbildung einer lokalen repressiven Chromatinstruktur mit typischen Eigenschaften von kompaktiertem Heterochromatin initiieren können, die die DNA für die Komponenten der Transkriptionsmaschinerie unzugänglich macht.

1.2 Abstract

Posttranslational modification of many transcription factors with the small Ubiquitin-like modifier SUMO is associated with transcriptional repression. The molecular mechanisms by which SUMO attachment represses transcription were largely unknown. By a genome-wide RNA interference screen our laboratory has recently identified a number of SUMO-dependent repression components using the SUMOylated transcription factor Sp3 as a paradigm.

Based on the primary data of the screen, the involvement of 120 proteins in SUMO-mediated repression was verified. Knockdown of these proteins by specific double-stranded RNAs (dsRNAs) impaired Sp3-SUMO-dependent transcriptional repression, whereas the activity of a SUMOylation-deficient Sp3 mutant was not affected. A number of validation experiments revealed that the ATP-dependent chromatin remodeler Mi-2, the *D. melanogaster* ortholog of the *C. elegans* protein MEP-1 and the polycomb protein Sfmbt act as direct SUMO-dependent transcriptional corepressors: (1) Knockdown of these proteins did not impair SUMO conjugation demonstrating that they act downstream of SUMO attachment. (2) Mi-2, MEP-1 and Sfmbt interact with SUMO and SUMO-modified Sp3 and (3) are recruited to promoters in a SUMOylation-dependent manner. (4) Knockdown of Mi-2, MEP-1 and Sfmbt relieved also repression mediated by the SUMO-modified transcription factor Dorsal. These results suggest that Mi-2, MEP-1 and Sfmbt are part of a common repression complex established by DNA-bound SUMO-modified transcription factors.

In order to analyze the chromatin changes established by SUMO-modified transcription factors in the mammalian system in detail a cell line with a stably integrated chromatinized Gal4-driven reporter gene was generated. On transfection, SUMOylated transcription factors (Gal4 fusions of wildtype Sp3 or steroidogenic factor 1) repressed transcription whereas the corresponding SUMOylation-deficient mutants activated transcription of the integrated reporter gene. Chromatin-immunoprecipitations revealed that the promoter-bound SUMO-modified transcription factors led to the establishment of local repressive chromatin with characteristics of compacted heterochromatin. SUMO-dependent heterochromatin formation included recruitment of the chromatin remodeler Mi-2, the MBT-domain proteins L3MBTL1 and L3MBTL2 involved in chromatin compaction, the heterochromatin protein HP1, and the histone methyltransferases SETDB1 and SUV4-20H accompanied by the establishment of

Zusammenfassung

repressive histone modifications such as H3K9 and H4K20 trimethylation. These heterochromatic proteins and repressive histone modifications were also present at the endogenous Sp3-regulated murine dihydrofolate-reductase promoter in mouse embryonic fibroblasts. The establishment of heterochromatic structures was Sp3-SUMO-dependent because they were found only in the presence of SUMOylated wildtype Sp3 but not in Sp3^{-/-} cells expressing a SUMOylation-deficient Sp3 mutant. These results indicate that SUMOylation of transcription factors plays a crucial role in regulating gene expression by initiating chromatin structure changes that renders DNA inaccessible to the transcription machinery.

2. Einleitung

2.1 Eukaryontische Genexpression

Obwohl alle Zellen eines eukaryontischen Organismus dieselbe genetische Information besitzen, müssen in verschiedenen Zelltypen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellentwicklung oder als Reaktion auf externe Signale unterschiedliche Gene exprimiert werden. Die kontrollierte Expression spezifischer Gene bildet die Grundlage für die Entstehung komplexer Organismen mit verschiedenen Zelltypen, die über eine jeweils unterschiedliche Ausstattung an Proteinen verfügen. Die Regulation der Genexpression geschieht dabei in erster Linie auf Ebene der Transkription (Levine und Tjian 2003). In eukaryontischen Zellen erfolgt die Transkription unterschiedlicher Genklassen durch drei verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen. Proteinkodierende Gene werden durch die RNA-Polymerase II in mRNA transkribiert. Die Kontrolle der transkriptionellen Aktivität geschieht dabei auf der einen Seite durch das Zusammenspiel von transkriptionellen Regulatorproteinen, den Transkriptionsfaktoren, die an spezifische Signalsequenzen auf der DNA binden. Diese regulatorischen DNA-Sequenzen liegen entweder innerhalb einer charakteristischen Kontrollregion, dem Promotor, der Startpunkt und Richtung der Transkription festlegt, oder innerhalb von distalen Kontrollelementen, die als Enhancer oder Silencer bezeichnet werden. Auf der anderen Seite wird die transkriptionelle Aktivität auch auf der Ebene der Chromatinstruktur reguliert.

2.2 Regulation der Transkription

2.2.1 Regulation der transkriptionellen Aktivität durch Veränderungen der Chromatinstruktur

Eukaryontische DNA liegt im Zellkern assoziiert mit Proteinen in Form von Chromatin vor. Die Grundeinheit des Chromatins ist ein Nukleosom, ein Oktamer von je zwei Untereinheiten der vier Histon-Proteine H2A, H2B, H3 und H4, um die die DNA über eine Länge von 147 bp gewunden ist. Das Histon-Oktamer bildet dabei eine globuläre Struktur, mit der die DNA assoziiert ist, während die N-Termini der Histon-Untereinheiten aus diesem Komplex heraus schauen (Kornberg und Lorch 1999). Die

Einleitung

Nukleosomen sind entlang des DNA-Stranges in Form der so genannten 10 nm Faser perlenkettenartig angeordnet. Die Nukleosomenstruktur ist dabei kein starres Gebilde, sondern kann durch Interaktionen mit bestimmten Proteinkomplexen oder verschiedene Chromatin-Modifikationen verändert werden.

Die Regulation der transkriptionellen Aktivität geschieht auf Chromatinebene durch verschiedene Chromatin-Modifikationen. Zum einen wird die DNA selbst durch Methylierung von Cytosinen innerhalb so genannter CpG-Inseln modifiziert. Dies hat generell eine die Transkription reprimierende Funktion (Bird 2002). Andererseits sind kovalente posttranslationale Modifikationen der Histone, vor allem innerhalb der gut zugänglichen N-terminalen Enden der Histon-Ketten, von entscheidender Bedeutung für die Regulation der transkriptionellen Aktivität. Zu diesen Modifikationen zählen Acetylierung, Phosphorylierung, Lysin- und Arginin-Methylierung, Ribosylierung, Ubiquitinierung und SUMOylierung. Eine Übersicht bieten: Vaquero et al. 2003; Peterson und Laniel 2004; Shilatifard 2006; Berger 2007; Kouzarides 2007.

Histon-Modifikationen können die Nukleosomenstruktur selbst und somit die Zugänglichkeit der DNA für transkriptionelle Regulatoren beeinflussen. So reduziert die **Acetylierung** verschiedener Lysinreste durch die damit verbundene Ladungsveränderung die Interaktion mit der negativ geladenen DNA sowie der Nukleosomen untereinander und führt damit zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur. Somit ist die DNA besser für unterschiedliche Komponenten der Transkriptionsmaschinerie zugänglich. Die Histon-Deacetylierung dagegen bewirkt einen dichteren Verpackungsgrad des Chromatins und damit eine schlechtere Zugänglichkeit. Entsprechend ist die Acetylierung von Histonen mit transkriptioneller Aktivität assoziiert, während Deacetylierung zur transkriptioneller Repression führt (Sterner und Berger 2000).

Die **Phosphorylierung** von Serin- oder Threoninresten vor allem in Histon H3 spielt eine wichtige Rolle während der chromosomalen Kondensation in der Mitose (Johansen und Johansen 2006), scheint aber auch im Kontext von verschiedenen Promotoren mit transkriptioneller Aktivität zu korrelieren (Nowak und Corces 2004).

Die **Methylierung** von **Argininresten** in Histon H3 und H4 durch die Enzyme der PRMT-Proteinfamilie ist generell mit transkriptioneller Aktivität verbunden (Bedford und Richard 2005).

Von besonderer Bedeutung für die Regulation der transkriptionellen Aktivität ist die **Methylierung** von Histonen an **Lysinresten**, insbesondere innerhalb der N-terminalen Arme (Übersichtsartikel: Lachner et al. 2003; Sims et al. 2003; Martin und Zhang 2005;

Einleitung

Shilatifard 2006). Mittlerweile wurden fünf Lysine innerhalb des Histons H3 (K4, K9, K27, K36 und K79) und ein Lysinrest im Histon H4 (K20) als Akzeptorstellen für Methylgruppen identifiziert. Dabei ist vor allem die Methylierung von H3K9, H3K27 und H4K20 mit transkriptioneller Repression verbunden, während die Methylierung der anderen Lysinreste eher in transkriptionell aktiven Bereichen zu finden ist. Die Mono-, Di- oder Trimethylierung der Lysinreste H3K4, K9, K27 und K36 sowie H4K20 wird von spezifischen Histon-Methyltransferasen (HMTs) katalysiert, die zur Familie der SET-Domänen-Proteine gehören. Das Lysin K79 innerhalb der globulären Domäne von Histon H3 wird hingegen von Enzymen der DOT1-Familie methyliert, die keine SET-Domäne enthalten (Zhang und Reinberg 2001; Shilatifard 2006; Allis et al. 2007).

Alle posttranslationalen Modifikationen der Histone sind reversibel, es existieren Histon-Deacetylasen, Phosphatasen und Lysin-Demethylasen, die die entsprechenden funktionellen Gruppen wieder entfernen können (Bannister und Kouzarides 2005).

Die kovalent modifizierten Histone können als Erkennungsmerkmal bzw. Bindungsstelle für bestimmte Effektorproteine dienen, die wiederum Chromatin-Veränderungen vermitteln, um die transkriptionelle Aktivität zu regulieren (Strahl und Allis 2000; Turner 2000; Jenuwein und Allis 2001; Nightingale et al. 2006). Dabei kann die Transkription je nachdem welchen Effektor die Histon-Modifikation rekrutiert und welche regulatorischen Ereignisse initiiert werden, entweder aktiviert oder reprimiert werden. Acetylierte Lysine werden von Proteinen mit einer Bromo-Domäne erkannt (Dhalluin et al. 1999), während Proteine, die Chromo-Domänen enthalten, an methylierte Lysinreste binden. Das bekannteste Chromo-Domänen-Protein ist das Heterochromatin Protein HP1, das an der Ausbildung von transkriptionell repressiven heterochromatischen Bereichen beteiligt ist. Die Methylierung von Histon H3 am Lysin K9 bildet eine Bindungsstelle für die Chromo-Domäne von HP1 (Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001).

Da eine Spezifität der verschiedenen Effektorproteine sowohl für die unterschiedlichen Akzeptorstellen als auch für die verschiedenen Modifikationen besteht und sich weiterhin unterschiedliche Modifikationen auch gegenseitig beeinflussen können, ergeben sich anhand des jeweiligen Histon-Modifikations-Status unterschiedliche Genexpressionsmuster. Man spricht deshalb in der Gesamtheit der epigenetischen Histon-Modifikationen in Analogie zum genetischen Code auch vom Histon-Code (Jenuwein und Allis 2001; Turner 2007).

2.2.2 Transkriptionsfaktoren

Die Transkription wird durch das Zusammenspiel von verschiedenen Komponenten reguliert. Bei der Transkription proteinkodierender Gene durch die RNA-Polymerase II unterscheidet man basale Transkriptionsmaschinerie, sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren (Lemon und Tjian 2000).

Allgemeine oder **basale Transkriptionsfaktoren** bilden zusammen mit der RNA-Polymerase II den so genannten Prä-Initiationskomplex und vermitteln so die Rekrutierung der Polymerase an den Core-Promotor. Man geht davon aus, dass die Polymerase als Holo-Enzym bereits mit verschiedenen allgemeinen Transkriptionsfaktoren assoziiert vorliegt und dass dieser Komplex durch weitere basale Faktoren, die eine Art Plattform am Promotor ausbilden, rekrutiert wird (Verrijzer 2001).

Spezifische Transkriptionsfaktoren binden sequenz-spezifisch an regulatorische Elemente, die sowohl in proximalen Promotor-Bereichen von Genen als auch in distalen Kontrollregionen, wie Enhancer- oder Silencer-Bereichen, vorkommen. Dadurch sind diese Faktoren in der Lage, die Transkription entweder direkt oder vermittelt durch Kofaktoren zu regulieren. Zum einen können spezifische Transkriptionsfaktoren durch Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie die Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes fördern und deren Rekrutierung an den Promotor unterstützen. Zum anderen können sie weitere Kofaktoren, die oftmals durch Modifikation der Histone eine lokale Veränderung der Chromatinstruktur herbeiführen, rekrutieren (Lemon und Tjian 2000; Martinez 2002).

Spezifische Transkriptionsfaktoren sind modular aus mehreren funktionellen Domänen aufgebaut. Anhand der DNA-Bindungsdomäne, die die sequenz-spezifische Rekrutierung an Regulationselemente in Promotoren oder Enhancer-Bereichen vermittelt, erfolgt oftmals eine Klassifizierung. Häufig vorkommende DNA-Bindungsmotive sind das Helix-Turn-Helix- das Helix-Loop-Helix-, das Leucin-Zipper- oder das Zinkfinger-Motiv. Ein weiteres funktionelles Modul von Transkriptionsfaktoren sind Transaktivierungsdomänen. Durch Interaktion mit den Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie oder mit Kofaktoren (siehe unten) vermitteln diese Domänen den regulatorischen Einfluss auf die Transkription. Transaktivierungsdomänen zeichnen sich häufig durch eine charakteristische Aminosäurezusammensetzung aus. So gibt es beispielsweise glutamin- oder prolinreiche Transaktivierungsdomänen. Schließlich besitzen Transkriptionsfaktoren häufig Regulationsdomänen, über die die Aktivität des Faktors vor allem durch

posttranslationale Modifikationen reguliert werden kann. Die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren an Serin- oder Threoninresten stellt beispielsweise einen sehr bedeutenden transkriptionellen Regulationsmechanismus dar. Aber auch andere Modifikationen wie Glykosylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung oder SUMOylierung sind für die Regulation der transkriptionellen Aktivität von großer Bedeutung.

Kofaktoren können entweder als Koaktivatoren oder Korepressoren der Transkription wirken. Die Funktion eines Kofaktors kann dabei die eines Adaptors zwischen verschiedenen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie sein. Oftmals sind Kofaktoren Proteine, die einen Einfluss auf die Chromatinstruktur nehmen und dadurch die Genexpression regulieren (Naar et al. 2001). Bekannte Kofaktoren sind beispielsweise Enzyme, die Histone posttranslational modifizieren, wie die Histon-Acetyl-Transferasen p300 und CBP oder Histon-Deacetylasen (HDACs). Weitere Histon-modifizierende Kofaktoren sind z. B. Methyltransferasen, die spezifische Lysinreste in den Histon-Seitenketten mono-, di- oder tri-methylieren können (Sims et al. 2003; Martin und Zhang 2005). Von entscheidender Bedeutung sind auch Kofaktoren, die die Nukleosomenstruktur durch so genanntes „Remodelling“ verändern und somit die Zugänglichkeit für verschiedene Transkriptionsfaktoren regulieren. Diese Funktion übernehmen oft große Enzymkomplexe, wie die Mi-2/NuRD- und SWI/SNF-Remodelling-Komplexe (Wang 2003; Denslow und Wade 2007).

2.2.3 GC-Box bindende Transkriptionsfaktoren

Transkriptionelle Regulationselemente, die in sehr vielen Promotoren und distalen Kontrollregionen von Säugetiergenen vorkommen, sind die so genannten GC-Boxen (GGGGCGGGG), sowie die verwandten GT/CACC-Boxen (GGTGTGGGG). Diese Regulationselemente finden sich in Promotoren vieler ubiquitär exprimierter Haushaltsgene, regulieren aber auch die Expression gewebsspezifischer oder viraler Gene.

Spezifische Transkriptionsfaktoren, die an diese Regulationselemente binden, gehören zur Familie der Sp/KLF-Proteine (Philipsen und Suske 1999; Suske et al. 2005). Die Namensgebung erfolgte anhand des ersten identifizierten Proteins Sp1 (Specificity Protein 1) bzw. dem *Drosophila* Zinkfinger-Protein Krüppel (KLF: Krüppel-like Factors). Gemeinsames Charakteristikum dieser Familie von Transkriptionsfaktoren ist die hochkonservierte C-terminale DNA-Bindungsdomäne, die aus 3 Zinkfingern des Typs C₂H₂ besteht. Innerhalb dieser Region vermitteln konservierte Aminosäuren den

direkten Kontakt mit der DNA. Zurzeit umfasst diese Familie 25 Faktoren (Suske et al. 2005). Die Familie der Sp/KLF-Transkriptionsfaktoren lässt sich aufgrund struktureller Unterschiede weiter in zwei Untergruppen aufteilen: Die Sp-Familie umfasst die Faktoren Sp1 bis Sp9, die zweite Untergruppe besteht aus den Faktoren KLF1 bis KLF16. Sp1 bis Sp9 besitzen im Gegensatz zu den KLF-Faktoren eine so genannte Sp-Box (SPLALLAATCSR/KI) am N-Terminus sowie eine Buttonhead- (Btd-)Box (CXCPXC) N-terminal der Zinkfinger (Abb. 2.1). Die Funktion dieser konservierten Motive ist unklar (Bouwman und Philipsen 2002).

Im Folgenden wird nur auf die Proteine der Sp-Familie eingegangen, weitere Informationen bezüglich der KLF-Transkriptionsfaktoren sind Philipsen und Suske (1999) sowie Suske et al. (2005) zu entnehmen.

2.2.4 Die Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren

Die Sp-Transkriptionsfaktoren können mittels der charakteristischen C-terminalen Zinkfinger DNA-Bindungsdomäne an GC- und GT-Boxen binden. Die Faktoren Sp1 bis Sp4 verfügen daneben über jeweils zwei glutaminreiche Transaktivierungsdomänen, die für die transkriptionelle Aktivierung essentiell sind. In direkter Nachbarschaft der Aktivierungsdomänen finden sich außerdem serin/threoninreiche Regionen. Dagegen sind Sp5 bis Sp9 durch prolin- und alaninreiche Regionen gekennzeichnet (Abb. 2.1). Darüber hinaus unterscheiden sich die Sp-Faktoren in ihrem Expressionsmuster. Während Sp1, Sp2 und Sp3 ubiquitär und Sp4 vor allem in neuronalem Gewebe vorkommen, werden Sp5-Sp9 gewebs- oder entwicklungspezifisch exprimiert (Suske 1999; Bouwman und Philipsen 2002).

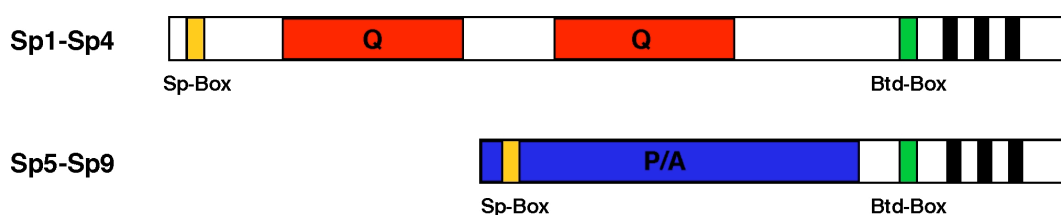


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren

Darstellung der allgemeinen Proteinstruktur von Sp1-Sp4 (oben) und Sp5-Sp9 (unten). Dargestellt ist die konservierte C-terminale DNA-Bindungsdomäne, die aus 3 Zinkfingern besteht (schwarz) sowie die Position der für Sp-Faktoren charakteristischen Sp-Box (gelb) und Buttonhead-(Btd-)Box (grün). In rot sind die glutaminreichen Aktivierungsdomänen (Q), in blau prolin- und alaninreichen Domänen (P/A) dargestellt.

Obwohl Sp1, Sp3 und Sp4 eine sehr ähnliche Proteinstruktur aufweisen und mit gleicher Affinität und Spezifität an GC-Boxen binden, zeigen sich signifikante funktionelle Unterschiede. Dies äußert sich vor allem in deutlich unterschiedlichen biologischen Effekten, die der Knockout des jeweiligen Sp-Faktors im Mausmodell hervorruft. Während der Verlust von Sp1 in der frühen Embryonalentwicklung (Tag E 10,5) letal ist (Marin et al. 1997), entwickeln sich Sp3-defiziente Mäuse bis zur Geburt, sind aber dann aufgrund eines Defizits in der Lungenentwicklung nicht lebensfähig (Bouwman et al. 2000). Weiterhin zeigen sich bei Sp3-Knockout Tieren Störungen in der Ossifikation (Göllner et al. 2001b). Sp4-defiziente Mäuse entwickeln sich normal, zeigen aber eine generelle Wachstums- und Gewichtsreduktion sowie eine hohe postnatale Sterblichkeit gegenüber Wildtyp Tieren (Göllner et al. 2001a). Der Verlust der Sp2-Expression ist im frühen Embryonalstadium letal (Tag E 8,5-9,5) (persönliche Kommunikation G. Suske).

Eine mögliche Erklärung für diese biologische Diversität trotz hoher struktureller Ähnlichkeit der Sp-Faktoren bietet die Regulation auf Proteinebene durch gewebs- oder entwicklungsspezifische posttranslationale Modifikationen. So wird zum Beispiel die transkriptionelle Aktivität von Sp1 durch Phosphorylierung und Glykosylierung reguliert (Bouwman und Philipsen 2002), während die Glykosylierung bei Sp3 keine Rolle zu spielen scheint. Dagegen wird die Aktivität von Sp3 durch Acetylierung (Braun et al. 2001) und SUMOylierung (Sapetschnig et al. 2002) reguliert.

2.2.5 Der Transkriptionsfaktor Sp3

Der Transkriptionsfaktor Sp3 wurde 1992 parallel von Hagen et al. und Kingsley und Winoto kloniert (Hagen et al. 1992; Kingsley und Winoto 1992). Sp3 wird *in vivo* in vier verschiedenen Isoformen exprimiert, die durch die Verwendung alternativer Startcodons entstehen (Sapetschnig et al. 2004) (Abb. 2.2). Während die beiden langen Isoformen, die aus 781 bzw. 769 Aminosäuren bestehen und sich nur in 12 N-terminalen Aminosäuren unterscheiden, über beide glutaminreiche Transaktivierungsdomänen verfügen, besitzen die beiden kurzen Isoformen (496 bzw. 479 Aminosäuren) jeweils nur eine der Aktivierungsdomänen (Abb. 2.2). Alle vier Isoformen werden ubiquitär in allen Geweben exprimiert und binden an GC-Boxen.

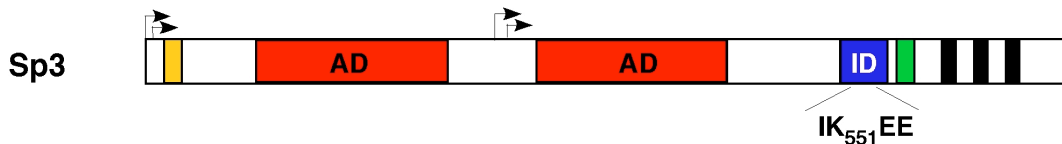


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors Sp3

Dargestellt sind die in Abbildung 2.1 beschriebenen funktionellen Domänen der Sp-Faktoren sowie zusätzlich die für Sp3 charakteristische Inhibitorische Domäne (ID) mit dem SUMOylierungsmotiv IKEE. Die Pfeile geben die unterschiedlichen N-Termini der vier verschiedenen Isoformen von Sp3 an.

Zur Funktion von Sp3 *in vivo* gibt es gegensätzliche Beobachtungen. Zum einen kann Sp3 in einem bestimmten Promotorkontext als ähnlich starker transkriptioneller Aktivator wie Sp1 fungieren (Udvardia et al. 1995; Liang et al. 1996; Ihn und Trojanowska 1997). Auf anderen Promotoren wirkt Sp3 dagegen reprimierend (Majello et al. 1994; Dennig et al. 1995). Dabei scheint die Aktivität von Sp3 im zellulären Kontext auch von der Promotorstruktur abzuhängen. So wirkt Sp3 auf Promotoren mit nur einer Sp-Bindungsstelle als transkriptioneller Aktivator, reprimiert dagegen die Transkription bei mehreren GC-Boxen (Birnbaum et al. 1995; Dennig et al. 1996). Außerdem scheint das Verhältnis der Proteinmengen von Sp1 und Sp3 für die transkriptionelle Aktivität von Bedeutung zu sein. In Reporter-Experimenten ist Sp3 in der Lage durch Konkurrenz die Sp1-vermittelte Aktivierung der Transkription zu reprimieren (Hagen et al. 1994).

Entscheidend für die transkriptionelle Inaktivität von Sp3 ist eine als inhibitorische Domäne beschriebene Region, die sich N-terminal der Zinkfinger-Region befindet (Dennig et al. 1996) (Abb. 2.2). Innerhalb dieser Domäne ist das Aminosäuremotiv IKEE essentiell für die reprimierenden Eigenschaften von Sp3. Der Lysinrest K₅₅₁ innerhalb dieses Motivs dient als Akzeptor für die kovalente posttranslationale Modifikation mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO (siehe unten) (Sapetschnig et al. 2002). Mutationen innerhalb dieses IKEE-Motivs, die die SUMOylierung verhindern, verwandeln Sp3 in einen starken Aktivator der Transkription, während Mutationen, die die SUMO-Konjugation nicht beeinflussen, keinen Einfluss auf das Aktivierungspotential von Sp3 haben (Sapetschnig et al. 2002). Es gibt also eine klare Korrelation zwischen der SUMOylierung von Sp3 und der transkriptionellen Repression. Der molekulare Mechanismus, wie die SUMO-Modifikation die transkriptionelle Repression durch Sp3 vermittelt, ist bisher noch nicht geklärt und sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

2.3 Posttranslationale Modifikationen mit SUMO

Posttranslationale Protein-Modifikationen erlauben einer Zelle die Komplexität und Variabilität ihres Proteinbestandes (Proteoms) entscheidend zu erhöhen. Im Gegensatz zur Regulation auf transkriptioneller Ebene sind durch Sekundärmodifikationen von Proteinen kurzfristig schnelle und reversible Änderungen der Proteinfunktion, z. B. als Reaktion auf externe Signale oder in Abhängigkeit des zellulären Entwicklungsstadiums, möglich. Für Kernproteine wurden mittlerweile eine Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen beschrieben, wie u. a. Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung und SUMOylierung.

Die posttranslationale Modifikation mit dem kleinen Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) erfolgt in Analogie zur Modifikation mit Ubiquitin in einer dreistufigen enzymatischen Reaktion. Dabei wird SUMO durch Ausbildung einer Isopeptidbindung kovalent mit einem Lysinrest eines entsprechenden Substratproteins verknüpft. Mittlerweile sind über hundert SUMO-Substratproteine identifiziert worden, die an vielen verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind. Die Modifikation mit SUMO ist ein essentieller zellulärer Prozess in vielen Organismen. So führt die Zerstörung der SUMOylierungs-Maschinerie in der Hefe *S. cerevisiae* zum Zellzyklus-Arrest (Seufert et al. 1995) und im Mausmodell zur Letalität in der frühen Embryonalphase (Nacerddine et al. 2005). Einen allgemeinen Überblick über SUMO bieten folgende Übersichtsartikel: Melchior 2000; Seeler und Dejean 2003; Johnson 2004; Hay 2005.

2.3.1 Die SUMO-Familie

In humanen Zellen wurden inzwischen vier verschiedene Mitglieder der SUMO-Proteinfamilie identifiziert: SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 und SUMO-4. Das humane SUMO-1 ist gegenüber humanem Ubiquitin auf Aminosäureebene zwar nur zu 18 % identisch, ähnelt diesem aber stark in der räumlichen Struktur (Bayer et al. 1998). Die wichtigsten Unterschiede zwischen SUMO und Ubiquitin bestehen in der unterschiedlichen Ladungsverteilung auf der Proteinoberfläche sowie einer flexiblen N-terminalen Struktur, die nur in SUMO vorkommt, deren Funktion aber noch ungeklärt ist (Bayer et al. 1998; Melchior 2000). SUMO-2 (Smt3a) und SUMO-3 (Smt3b) sind gegenüber SUMO-1 (Smt3c) zu 47 % identisch, weisen aber untereinander eine Identität von 95 % auf und werden daher in eine Untergruppe zusammengefasst. Im Gegensatz zu SUMO-1 kann es bei SUMO-2/3 ähnlich wie bei der Ubiquitinierung zur Ausbildung von Poly-SUMO-Ketten kommen, da SUMO-2/3 über interne

Akzeptorlysine verfügen (Saitoh und Hinchev 2000; Tatham et al. 2001). Inzwischen wurde in Säugern als weiteres Mitglied der SUMO-Familie SUMO-4 beschrieben (Guo et al. 2004); ob dieses allerdings in gleicher Weise wie die anderen SUMO-Proteine an Substratproteine konjugiert wird, ist fraglich (Owerbach et al. 2005). Die SUMO-Proteine werden ubiquitär exprimiert. Sowohl SUMO selbst als auch die Enzyme der SUMO-Konjugations-Kaskade sind in verschiedenen Spezies hoch konserviert. Niedere Eukaryonten wie Hefe, Nematoden und Insekten exprimieren allerdings nur eine SUMO-Variante, während bei Vertebraten mindestens drei SUMO-kodierende Gene vorkommen.

2.3.2 Die SUMO-Konjugation

Die SUMO-Modifikation von Substratproteinen erfolgt durch Ausbildung einer kovalenten Isopeptidbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe eines Glycinrestes von SUMO und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im entsprechenden Zielprotein. Der Akzeptor-Lysinrest liegt dabei in der Regel innerhalb eines charakteristischen SUMOylierungsmotivs der Aminosäure-Konsensussequenz ψ KXE, wobei ψ für eine hydrophobe Aminosäure (meist Valin oder Isoleucin) und X für eine beliebige Aminosäure steht (Melchior 2000; Rodriguez et al. 2001). Allerdings werden bei weitem nicht alle Lysinreste, die sich innerhalb eines SUMO-Konsensus-Motivs befinden, modifiziert. Wahrscheinlich muss sich das Akzeptorlysin an der Oberfläche des nativ gefalteten Proteins befinden, um effizient SUMOyliert werden zu können. Weiterhin werden vereinzelt auch Proteine an Lysinresten modifiziert, die sich nicht innerhalb eines SUMO-Konsensus-Motivs befinden, vermutlich aufgrund der besonders exponierten Position des Akzeptor-Lysins (Pichler et al. 2005).

Die SUMO-Konjugation erfolgt analog der Modifikation mit Ubiquitin (Hershko und Ciechanover 1998) in einer dreistufigen enzymatischen Kaskade (Abb. 2.3) (Gill 2004; Johnson 2004; Hay 2005). Nach der Abspaltung von C-terminalen Aminosäuren durch spezifische SUMO-Peptidasen werden zwei Glycin-Reste am C-Terminus freigelegt und das reife SUMO-Protein wird zunächst ATP-abhängig unter Ausbildung einer Thioester-Bindung auf das SUMO-aktivierende E1-Enzym übertragen. Das E1-Enzym ist ein Heterodimer und besteht aus den beiden Untereinheiten Aos1 und Uba2 (auch SAE1 und SAE2 genannt). Anschließend wird SUMO auf das SUMO-konjugierende E2-Enzym Ubc9 transferiert, bevor es unter Mithilfe eines SUMO-ligierenden E3-Enzyms auf das Akzeptor-Lysin des entsprechenden Zielproteins übertragen wird. Dazu

interagiert Ubc9 direkt mit dem SUMO-Konsensus-Motiv (Bernier-Villamor et al. 2002; Lin et al. 2002).

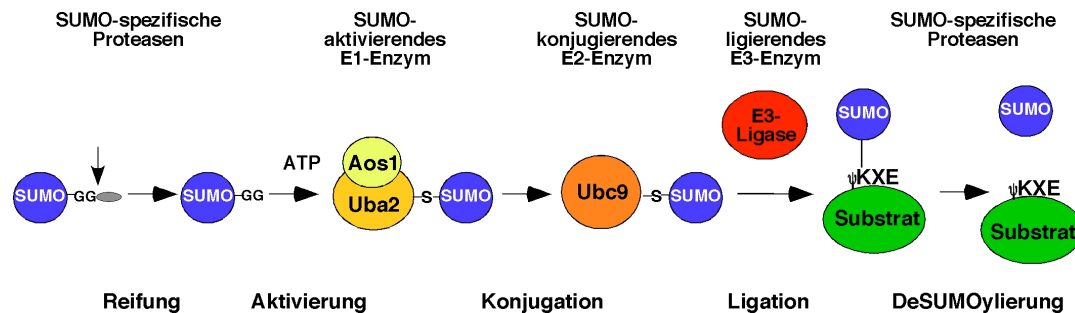


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des SUMO-Konjugationsmechanismus.
Erläuterungen siehe Text.

Für einen effizienten Transfer von SUMO auf ein bestimmtes Substratprotein werden SUMO-ligierende E3-Enzyme benötigt. Diese SUMO E3-Ligasen gewährleisten Substratspezifität und verstärken die Übertragung von SUMO vom E2-Enzym zum Zielprotein, indem sie die Interaktion von Ubc9 und dem entsprechenden Substrat vermitteln. In den letzten Jahren wurden Mitglieder verschiedenster Proteinfamilien als SUMO E3-Enzyme identifiziert. So besitzen sowohl Mitglieder der PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT)-Familie (Johnson und Gupta 2001; Kahyo et al. 2001; Sachdev et al. 2001; Sapetschnig et al. 2002), das Nucleoporin RanBP2 (Pichler et al. 2002) als auch das Polycomb-Protein Pc2 (Kagey et al. 2003) eine SUMO E3-Ligase-Aktivität gegenüber unterschiedlichsten Substratproteinen. Eine eindeutige Substratspezifität für die verschiedenen E3-Ligasen konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Die Mitglieder der PIAS-Proteinfamilie besitzen beispielsweise zum Teil überlappende Substratspezifitäten. RanBP2 dagegen scheint nicht in der Lage zu sein, die SUMOylierung von bekannten PIAS-Substraten zu verstärken (Kirsh et al. 2002; Pichler et al. 2002).

2.3.3 DeSUMOylierung

Die SUMOylierung ist ein reversibler Prozess. SUMO-spezifische Cystein-Proteasen (Isopeptidasen) sind nicht nur an der Abspaltung der äußersten C-terminalen Aminosäuren während des SUMO-Reifungsprozesses beteiligt, sondern sind auch in der Lage den SUMO-Rest nach der Konjugation von dem entsprechenden Substratproteinen wieder abzuspalten (Abb. 2.3). Es liegt also ein dynamisches Gleichgewicht zwischen SUMOylierung und DeSUMOylierung vor, was dazu führt, dass in einer Zelle immer

nur ein relativ geringer Anteil eines Substratproteins in SUMO-modifizierter Form vorliegt. In Säugern existieren mehrere SUMO-Proteasen, SENP1 bis SENP7, die zum Teil eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation aufweisen (Übersichtsartikel: Melchior et al. 2003; Seeler und Dejean 2003; Gong und Yeh 2006; Mukhopadhyay und Dasso 2007). Wahrscheinlich wird eine gewisse Substratspezifität der SUMO-Proteasen durch diese unterschiedliche Lokalisation ermöglicht.

2.3.4 Regulation der SUMOylierung

Innerhalb einer Zelle gibt es nur eine sehr geringe Menge an freiem SUMO-1-Protein, da fast der gesamte Bestand an SUMO-1 in konjugierter Form vorliegt. SUMO2/3 findet man dagegen zum größten Teil in freier, unkonjugierter Form (Saitoh und Hinchey 2000)

Über die Regulation der SUMO-Modifikation ist nur wenig bekannt. Es wurde beschrieben, dass Stressestimuli, wie oxidativer Stress oder Hitzeschock, die generelle Konjugation von SUMO-2/3 verstärken können (Saitoh und Hinchey 2000). Die relativ große Menge an freiem SUMO-2/3 könnte dabei als Reservoir für Stress-induzierte SUMOylierung dienen. Es gibt auch Berichte, dass oxidativer Stress, der durch Behandlung mit H₂O₂ oder durch Entstehung reaktiver Oxygen-Spezies (ROS) hervorgerufen wird, durch Inaktivierung der SUMOylierungs-Enzymkaskade zu einer globalen Reduktion der SUMOylierung führt. Erst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen von ROS wurde durch Inhibierung der SUMO-Proteasen eine Zunahme der SUMO-Konjugation beobachtet (Bossis und Melchior 2006).

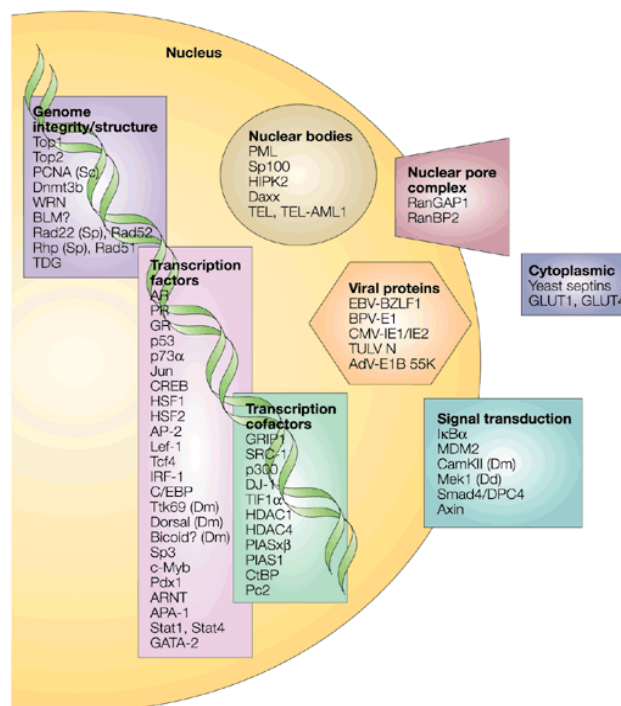
Bei bestimmten SUMO-Substratproteinen erfolgt die Regulation der SUMOylierung durch weitere posttranslationale Modifikationen. So führt die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren c-jun und c-fos an bestimmten Serin- bzw. Threoninresten zu einer reduzierten SUMOylierung (Bossis et al. 2005). Diese negative Regulation der SUMO-Modifikation durch Phosphorylierung stimmt mit dem gegensätzlichen Effekt der Modifikationen auf die transkriptionellen Aktivität von c-jun/c-fos überein: Phosphorylierung aktiviert die Transkription, während die SUMOylierung zu einer Repression der transkriptionellen Aktivität führt (Müller et al. 2000; Bossis et al. 2005). In gleicher Weise wird auch die SUMOylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 negativ durch dessen Phosphorylierung reguliert (Yang et al. 2003). Im Gegensatz dazu ist die Phosphorylierung von HSF1 Voraussetzung für dessen Konjugation mit SUMO (Hietakangas et al. 2003).

Einleitung

Die Tatsache, dass Lysinreste in SUMO-Substratproteinen neben SUMO auch Akzeptorstellen für weitere posttranslationale Modifikationen, wie Methylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung, sind, bietet zusätzliche Regulationsmöglichkeiten, indem verschiedene Modifikationen um denselben Lysinrest konkurrieren. So ist beispielsweise die Deacetylierung des transkriptionellen Koaktivators p300 notwendig, um eine effiziente SUMOylierung zu gewährleisten (Bouras et al. 2005). Im Falle von $\text{I}\kappa\text{B}$, dem Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κB , konkurrieren SUMO und Ubiquitin um denselben Lysinrest (Desterro et al. 1998).

2.3.5 Funktion der SUMO-Modifikation

Die SUMO-Modifikation spielt eine entscheidende Rolle bei vielen zellulären Prozessen, wie Kerntransport, DNA-Reparatur, Signaltransduktion, Genomstabilität und Zellzyklus sowie transkriptioneller Regulation (Übersichtsartikel: Seeler und Dejean 2003; Verger et al. 2003; Gill 2004; Müller et al. 2004; Hay 2005; Zhao 2007); entsprechend vielfältig sind auch die Substratproteine, die durch SUMO modifiziert werden können. Einen groben Überblick über bekannte SUMO-Substrate sowie deren zelluläre Lokalisation bietet Abbildung 2.4.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abbildung 2.4: Bekannte SUMO-Substratproteine in der Zelle
(aus Seeler und Dejean 2003).

Die Funktion der SUMO-Modifikation scheint dabei in Abhängigkeit vom jeweiligen Substrat sehr unterschiedlich zu sein. So wird der SUMOylierung unter anderem zugeschrieben die zelluläre Lokalisation von Zielproteinen zu verändern, Protein-Protein- Wechselwirkungen zu vermitteln oder als Antagonist von anderen posttranslationalen Modifikationen zu fungieren.

Die SUMOylierung scheint essentiell für die genomische Stabilität einer Zelle zu sein. So ist die SUMO-Modifikation unverzichtbar bei Prozessen, die eine korrekte Zellteilung gewährleisten, wie der Ausbildung der Chromosomenstruktur während der Mitose, Etablierung der Kinetochor-Strukturen und des Spindelapparates sowie der Zytokinese (aktueller Übersichtsartikel: Dasso 2008). Auch in der Hefe *S. cerevisiae* ist die SUMOylierung der Septine essentiell für die Zellteilung (Johnson und Blobel 1999; Takahashi et al. 1999). Die SUMO-Modifikation spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der DNA-Replikation und der Reparatur von DNA-Schäden, vor allem durch SUMOylierung von PCNA, einem Kofaktor der DNA-Polymerase (Moldovan et al. 2007). Auch hier steht die SUMOylierung zum Teil in Konkurrenz zu anderen posttranslationalen Modifikationen. SUMO reguliert auch wichtige Signaltransduktionsprozesse, wie z. B. den NF κ B- oder Wnt-Signaltransduktionsweg, indem verschiedene Komponenten dieser Prozesse SUMOyliert werden. Beispiele sind u a. I κ B (Desterro et al. 1998), LEF-1 (Sachdev et al. 2001) oder Tcf-4 (Yamamoto et al. 2003).

Die meisten bisher beschriebenen SUMO-modifizierten Proteine sind Kernproteine, die die transkriptionelle Aktivität regulieren, vor allem sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren oder Kofaktoren (Abb. 2.4) (Seeler und Dejean 2003; Gill 2005; Hay 2005). In vielen Fällen befindet sich das Akzeptor-Lysin innerhalb einer Domäne der Substratproteine, die transkriptionell inhibitorisch wirkt. Eine Mutation der SUMO-Akzeptor-Stelle führt in der Regel zu einem Anstieg der transkriptionellen Aktivität. Die SUMO-Modifikation von Transkriptionsfaktoren ist somit mit transkriptioneller Repression verbunden. Mittlerweile wurde für zahlreiche Transkriptionsfaktoren nachgewiesen, dass deren SUMO-Modifikation mit transkriptioneller Repression assoziiert ist, so z. B. bei Steroidhormonrezeptoren (Kotaja et al. 2002; Nishida und Yasuda 2002; Holmstrom et al. 2003), LEF-1 (Sachdev et al. 2001), c-jun (Schmidt und Müller 2002), c-Myb (Bies et al. 2002), C/EBPs (Kim et al. 2002; Subramanian et al. 2003), Elk-1 (Yang et al. 2003), SF-1 (Lee et al. 2005) und Sp3 (Ross et al. 2002; Sapetschnig et al. 2002).

Der molekulare Mechanismus, wie die SUMO-Modifikation reprimierend auf die Transkription wirkt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Ein Modell der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression beinhaltet, dass die SUMO-Modifikation die nukleare oder subnukleare Lokalisation des Substratproteins verändert. Für einzelne SUMOylierte Transkriptionsfaktoren wurde beispielsweise gezeigt, dass es zu einer Anreicherung in PML-Kernkörpern (PML nuclear bodies) kommt (Sachdev et al. 2001). Die Funktion der PML-Kernkörper ist noch nicht vollständig geklärt, sie scheinen aber eine Rolle in der transkriptionellen Regulation zu spielen (Zhong et al. 2000). Ein weiteres Modell für die durch SUMO vermittelte transkriptionelle Inaktivität ist die SUMO-abhängige Promotor-Rekrutierung von Korepressoren, die dann wiederum Chromatin-Veränderungen induzieren, um eine stabile transkriptionelle Repression hervorzurufen (Hay 2005). Einhergehend mit dieser Hypothese wurde gezeigt, dass es bei dem Transkriptionsfaktor Elk1 (Yang und Sharrocks 2004) und dem transkriptionellen Kofaktor p300 (Girdwood et al. 2003) zu einer SUMO-abhängigen Rekrutierung der Histon-Deacetylasen HDAC2 bzw. HDAC6 kommt. Für andere SUMOylierte Transkriptionsfaktoren und Regulatoren, wie dem Androgen- und Glucocorticoid-Rezeptor, Smad4 oder CBP, wiederum ist eine SUMO-abhängige Assoziation mit dem transkriptionellen Korepressor Daxx beschrieben (Lin et al. 2004; Chang et al. 2005; Kuo et al. 2005; Lin et al. 2006). Trotzdem könnten noch weitere Proteine am SUMO-abhängigen transkriptionellen Repressionsmechanismus beteiligt sein.

2.4. Genomweiter RNA-Interferenz Screen zur Identifizierung potentieller Korepressoren von SUMOyliertem Sp3

Um Proteine zu identifizieren, die an der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression beteiligt sind, wurde von Frau Alexandra Sapetschnig in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Boutros am DKFZ in Heidelberg ein genomweiter RNA-Interferenz (RNAi) Screen in *Drosophila melanogaster* Zellen durchgeführt. Als Modell für diese Untersuchung diente der humane Transkriptionsfaktor Sp3, der wie beschrieben am Lysinrest K₅₅₁ mit SUMO modifiziert wird. In Reporter-gen-Experimenten ist SUMO-modifiziertes Wildtyp-Sp3 nur schwach transkriptionell aktiv, während die SUMOylierungs-defiziente Mutante von Sp3 ein starker transkriptioneller Aktivator ist (Dennig et al. 1996; Sapetschnig et al. 2002; 2004). Der SUMO-vermittelte transkriptionelle Repressionsmechanismus scheint dabei zwischen Insekten- und Säugerzellen evolutionär konserviert (Abb. 2.5).

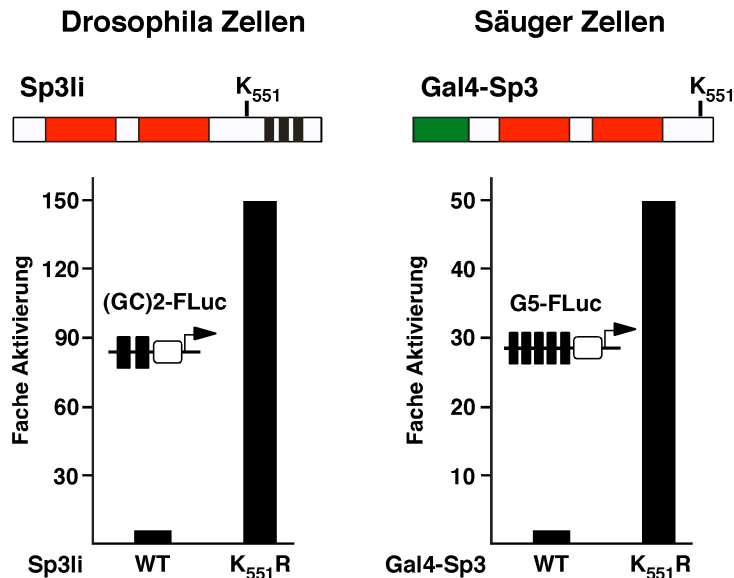


Abbildung 2.5: Evolutionäre Konservierung der transkriptionellen Repression durch SUMO-modifiziertes Sp3

Oben: Schematische Darstellung der in Reporter-Experimenten eingesetzten Sp3-Proteine. Links: Lange Isoform von Sp3 (Sp3li) mit der C-terminalen DNA-bindenden Zinkfinger-Domäne (schwarz). Rechts: Sp3-Fusionsprotein mit der Gal4-DNA-bindenden Domäne (grün) ohne Zinkfinger-Domäne. In rot sind die beiden glutaminreichen Transaktivierungsdomänen dargestellt. Die Position des SUMO-Akzeptor-Lysinrestes K₅₅₁ ist angegeben.

Unten: Repräsentative Darstellung von Reporter-Experimenten in *Drosophila* Zellen (links) und Säugerzellen (rechts). Angegeben sind die jeweiligen Reporterkonstrukte; in Insektenzellen steht die Expression des Firefly-Luciferase (FLuc) Reportergens unter der Kontrolle eines Minimalpromotors mit zwei Sp-Bindungsstellen, in Säugerzellen wird das Luciferase-Reportergen von 5 Gal4-Bindungsstellen (G5) getrieben. Dargestellt ist die transkriptionelle Aktivität der angegebenen Reporterkonstrukte nach Transfektion von SUMO-modifiziertem Wildtyp-Sp3 (WT) sowie der entsprechenden SUMOylierungs-defizienten Mutante (K₅₅₁R).

Geht man davon aus, dass die transkriptionell reprimierende Funktion von SUMOyliertem Sp3 durch einen Korepressor-Komplex, der SUMO-abhängig an Promotoren rekrutiert wird, vermittelt wird, so können diese Faktoren mittels eines genomweiten RNAi-Screens identifiziert werden (Abb 2.6).

Transfiziert man in *Drosophila melanogaster* Zellen ein Sp3-abhängiges Reporter-Gen-Plasmid zusammen mit einem Expressionskonstrukt für Wildtyp-Sp3, so findet keine transkriptionelle Aktivierung des Reporters statt, da Sp3 mit endogenem dSUMO modifiziert wird. Der RNAi-vermittelte Knockdown eines am SUMO-Repressionsmechanismus beteiligten Proteins sollte zu einer Aktivierung des Reportergens und damit zu einem Anstieg der Firefly-Luciferase-Aktivität führen (Abb. 2.6). Zum Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen sowie unterschiedlicher Zellzahlen, die in Folge der RNAi-Behandlung auftreten, wurde ein konstitutiv aktiver

Einleitung

Koreporter mit transfiziert, in diesem Fall ein Renilla-Luciferase Reportergen unter der Kontrolle des *Drosophila* Aktin 5C-Promotors (Abb. 2.6).

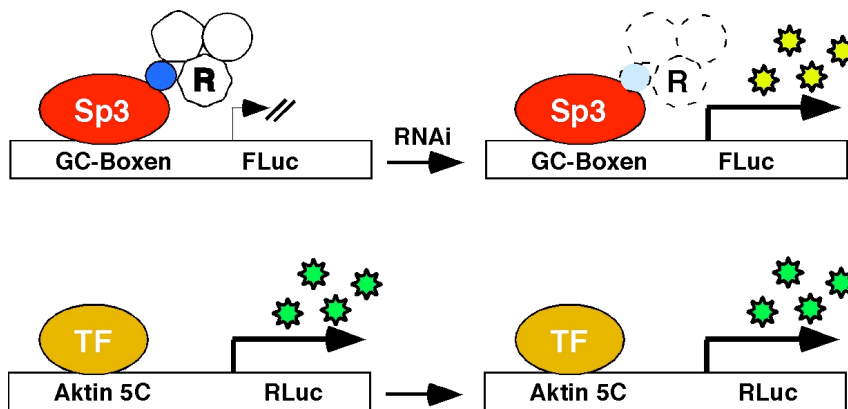


Abbildung 2.6: Prinzip des genomweiten RNAi-Screens zur Identifizierung SUMO-abhängiger Korepressoren

Oben: Ein Firefly-Luciferase (FLuc) Reportergen mit zwei GC-Boxen als Bindungsstellen für Sp-Faktoren wird in Gegenwart von SUMO-modifiziertem Sp3 nicht aktiviert. Nach RNAi-vermitteltem Knockdown von potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren (R) wird die transkriptionelle Repression aufgehoben.

Unten: Darstellung des konstitutiv aktiven Renilla-Luciferase (RLuc) Koreportergens unter der Kontrolle des *Drosophila* Aktin 5C Promotors.

Neben potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren wurden mit Hilfe des RNAi-Screens auch Proteine identifiziert, die den SUMO-Konjugationsmechanismus direkt beeinflussen. Nach RNAi-vermitteltem Depletion eines Proteins, das an der SUMOylierungs-Enzymatik selbst beteiligt ist oder diese reguliert, kommt es zu einer Reduktion der Menge von SUMO-modifiziertem Sp3, was ebenfalls zu einer Aufhebung der transkriptionellen Repression führt.

Der RNAi-vermittelte Knockdown von Zielgenen wird in *Drosophila* Zellen mit Hilfe doppelsträngiger RNA (dsRNA) erreicht. Die Zellen nehmen diese dsRNA-Moleküle auf und prozessieren sie in 21-23 bp lange small interfering RNA (siRNA). Durch Translationsinhibition oder Abbau der entsprechenden komplementären mRNA kommt es durch die Vielzahl an entstehenden siRNA-Molekülen zum fast vollständigen Verlust der Expression des jeweiligen Zielgens (Kavi et al. 2005).

Es wurde eine dsRNA-Bibliothek verwendet, die mit über 21000 verschiedenen dsRNAs etwa 91% des *Drosophila melanogaster* Genoms abdeckte (Boutros et al. 2004; Müller et al. 2005). Der Ablauf des RNAi-Screens ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Es konnten auf diesem Weg insgesamt 185 Proteine identifiziert werden, deren dsRNA-vermittelter Knockdown zu einem partiellen Verlust der

transkriptionellen Repression durch SUMO-modifiziertes Sp3 führte; die also entweder direkten Einfluss auf die SUMOylierungs-Enzymatik nehmen oder am SUMO-vermittelten transkriptionellen Repressionsmechanismus beteiligt sind. Detaillierte Angaben bezüglich des Screening-Verfahrens sowie der Selektion der Kandidaten finden sich in der Dissertation von Frau Alexandra Sapetschnig (2007) sowie in Stielow et al. 2008a.

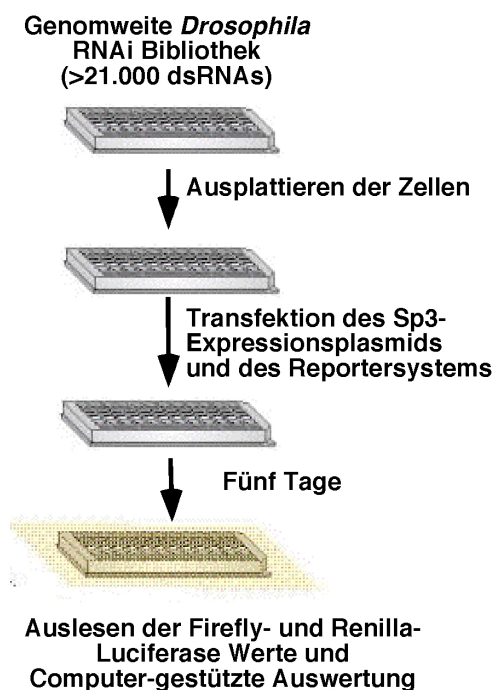


Abbildung 2.7: Ablauf des genomweiten RNAi-Screens.

Drosophila Kc₁₆₇ Zellen wurden auf 384well Platten, die etwa 21000 verschiedene dsRNAs enthielten, ausplattiert und anschließend mit einem Expressionskonstrukt für Wildtyp Sp3 sowie einem Sp-abhängigem Firefly-Luciferase Reporterplasmid und einem konstitutiv aktiven Renilla-Luciferase Koreporter transfiziert (siehe Abb. 2.6). Fünf Tage nach Transfektion wurden die Luciferase-Aktivitäten ausgelesen und ausgewertet.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von dem in Abschnitt 2.4 beschriebenen genomweiten RNAi-Screen in *Drosophila* Zellen sollte im Rahmen dieser Arbeit verifiziert werden, ob die dsRNA-vermittelte Depletion der 185 identifizierten Proteine zu einer Aktivierung der Sp3-vermittelten Transkription in Abhängigkeit der SUMO-Modifikation führt, oder ob manche dsRNAs die Transkription auch unabhängig vom SUMOylierungsstatus von Sp3 aktivieren. Durch weitere Validierungs-Experimente sollten falsch-positive Kandidaten ausgeschlossen werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob die

Einleitung

identifizierten Proteine die SUMOylierung selbst beeinflussen oder nach der SUMO-Konjugation den SUMO-abhängigen transkriptionellen Repressionsmechanismus regulieren. Nach der Identifizierung potentieller SUMO-abhängigen Korepressoren sollte untersucht werden, ob diese Proteine auch an der transkriptionellen Repression anderer SUMOylierter Transkriptionsfaktoren beteiligt sind und es sich somit um allgemeine Regulatoren der SUMO-vermittelten Repression handelt.

Nach Etablierung einer mit einem Reportersystem stabil transfizierten humanen Zelllinie sollte in Chromatin-Immunpräzipitationen untersucht werden, ob die Säuger-Homologen der im Insekten-Zellsystem identifizierten potentiellen Korepressoren SUMO-abhängig an Promotoren rekrutiert werden. Die Promotor-Rekrutierung von potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren und die damit einhergehenden Veränderungen der Chromatinstruktur sollten auch auf endogenen Sp3-regulierten Promotoren untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit betraf die Suche nach Sp3-abhängig regulierten Zielgenen. Zu diesem Zweck sollte eine stabile Zelllinie zum induzierbaren Knockdown von Sp3 etabliert und deregulierte Gene in Microarray-Experimenten identifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Biologische Sicherheit

Alle Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen erfolgten gemäß der Richtlinien des Gentechnikgesetzes vom 01.07.1990. Entsprechend kontaminierte Materialien und Lösungen wurden getrennt gesammelt und autoklaviert.

3.2 Materialien

Chemikalien und Reagenzien sowie Geräte und Verbrauchsmaterialien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von folgenden Firmen bezogen:

Abcam, Abgene, Alexis, Ambion, Amersham Biosciences/GE Healthcare, Bayer, BD Biosciences, Beckmann, Berthold, Biometra, Bioline, Biorad, Biozym, Boehringer Ingelheim, Calbiochem, Cambrex, Chemicon, Covance, Dharmacon, Diagenode, Eppendorf, Eurogentec, Gibco, Gilson, Greiner, Heraeus, Hettich, Invitrogen, Kobe, Kodak, Licor, LP Bio, Merck, Millipore, MWG Biotech, New England Biolabs, Nunc, PAA, PeqLab, Perbio, Promega, Qiagen, Riedel-de-Haen, Roche, Roth, Santa Cruz Biotechnology, Stratagene, Sigma, Starlab, Upstate, Whatman, Zymed.

Material und Methoden

3.2.1 Antibiotika

Zur Selektion von transformierten Bakterien sowie von transfizierten Zellkulturlinien wurden die folgenden Antibiotika eingesetzt:

Antibiotika:	Konzentration der Stocklösung:	Hersteller:
Ampicillin	50 mg/ml	Bayer
Kanamycin	50 mg/ml	Bayer
Puromycin	1 mg/ml	BD Biosciences
Blasticidin	10 mg/ml	Invitrogen
Zeocin	100 mg/ml	Invitrogen
Hygromycin	50 mg/ml	Calbiochem
Doxycyclin	1 mg/ml	Sigma

Tabelle 3.1: Verwendete Antibiotika

3.2.2 Bakterienstämme und Kulturmedien

DH5 α : Dieser *Escherichia coli*-Bakterienstamm wurde zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA genutzt.

LB-Medium: 10 g/l Select Peptone 140
5 g/l Select Yeast Extrakt
10 g/l NaCl

LB-Agarplatten: 15 g Agar/l LB-Medium

LB-Agarplatten plus Antibiotika: 15 g Agar/l LB-Medium
50 μ g/ml Ampicillin bzw. Kanamycin

SOB-Medium: 20 g/l Select Peptone 140
5 g/l Select Yeast Extrakt
584 mg/l NaCl
186 mg/l KCl

SOC-Medium: 10 ml SOB-Medium
100 μ l 2M Mg²⁺ (1M MgCl₂, 1M MgSO₄)
100 μ l 2M Glucose

3.2.3 Zellkulturlinien und Kulturmedien

3.2.3.1 Insektenzelllinien

SL2: *Drosophila melanogaster* Zelllinie. Diese Zellen wurden aus *Drosophila* Embryonen im späten Embryonalstadium gewonnen (Schneider 1972).

Kc₁₆₇: Diese *Drosophila melanogaster* Zellen wurden aus 6-12 Stunden alten *Drosophila* Embryonen isoliert (Echalier und Ohanessian 1970).

Beide *Drosophila* Zelllinien wurden in Schneiders *Drosophila* Medium kultiviert.

SL2 pRm-HA-Flag-Sp3/Sp3SD: SL2 Zellen wurden stabil mit einem Plasmid zur Expression von Wildtyp Sp3 bzw. einer Deletionsmutante, bei der 13 Aminosäuren innerhalb der Inhibitorischen Domäne deletiert sind, (SD, Small Deletion) unter der Kontrolle des Kupfer-induzierbaren Metallothionin-Promotors transfiziert (Braun und Suske 1999). Die Zellen besitzen eine Hygromycin-Resistenz und wurden in Schneiders *Drosophila* Medium mit 150 µg/ml Hygromycin kultiviert.

3.2.3.2 Säugerzelllinien

HEK 293: Es handelt sich hierbei um eine transformierte Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenepithelzellen (Graham et al. 1977). HEK Zellen wurden in DMEM/F-12-Medium kultiviert.

SaOsTR: Hierbei handelt es sich um eine humane Osteosarkoma Zelllinie (SaOs-2), die stabil mit einem Expressionsplasmid für den Tetracyclin-Repressor (pcDNA6-TR; Invitrogen) transfiziert wurden. Diese Zellen wurden in SaOs-Medium mit 5 µg/ml Blastocidin kultiviert. Die stabil transfizierten Zellen wurden von Frau Lisa Osterloh in der Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Gaubatz etabliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

MEF WT, MEF Sp3^{-/-}: Die Etablierung von primären murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) aus Wildtyp (WT) bzw. Sp3-defizienten (Sp3^{-/-}) Mäusen ist in (Bouwman et al. 2000) und Göllner (2002) beschrieben. Für diese Arbeit wurden Wildtyp MEFs aus Embryo Nr. 2 bzw. Sp3^{-/-}-MEFs aus Embryo Nr. 6 verwendet (Göllner, 2002), die durch wiederholtes Passagieren (Passagenzahl 20-35) ungerichtet immortalisiert worden waren. Die Zellen wurden in MEF-Medium kultiviert.

MEF Sp3^{-/-} pUbi-HA-Flag-Sp3W/Sp3WSD/Sp3long/Sp3longSD: Sp3-defiziente MEFs wurden zur Re-Expression der verschiedenen Sp3-Isoformen stabil mit Expressionskonstrukten unter der Kontrolle des Ubiquitin Promotors für die kurze (Sp3W) bzw. lange Isoform von Sp3 (Sp3long) bzw. der jeweiligen SUMOylierungs-defizienten Mutante (Sp3WSD bzw. Sp3longSD) zusammen mit einem Plasmid, das

eine Hygromycin-Resistenz vermittelt (pX343), transfiziert (Göllner, 2002). Die Zellen wurden in MEF-Medium mit 150 µg/ml Hygromycin kultiviert.

MEF Sp3-SUMO-KI: Aus Sp3-SUMO-*Knockin* Mäusen, die eine SUMOylierungsdefiziente Mutante von Sp3 (Sp3 E₅₅₃D) exprimieren (Krüger, 2007), wurden von Frau Kerstin Nau primäre MEFs etabliert. Jeweils zwei primäre MEF-Zelllinien aus Embryonen eines Wurfes mit Wildtyp (WT/WT), heterozygoten (WT/KI) und homozygoten (KI/KI) Genotypen wurden durch wiederholtes Passagieren ungerichtet immortalisiert. Die Sp3-SUMO-KI MEFs wurden in MEF-Medium kultiviert.

3.2.3.3 Für diese Arbeit hergestellte stabil transfizierte Zelllinien

HEK pGAWG5E1b, pBabe-Puro: Zur Etablierung einer Zelllinie mit einem stabil integrierten Gal4-abhängigen Luciferase-Reporterplasmid wurden HEK 293-Zellen auf 10 cm-Schalen mit 20 µg des Reporterplasmids pGAWG5E1b sowie 1 µg des Puromycin-Resistenzplasmids pBabe-Puro mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode transfiziert (siehe auch 3.3.1.4/6). Nach Selektion mit 1 µg/ml Puromycin wurden Einzelzellklone isoliert und nach transienter Expression von Gal4-Fusionsproteinen in Reporterassays die Funktionalität des Reporters getestet (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Zellen wurden in DMEM/F-12 mit 1 µg/ml Puromycin kultiviert.

SaOsTR pTER-Sp3siRNA/Sp1siRNA: Zum induzierbaren Knockdown von Sp3 und Sp1 wurden SaOs-2-Zellen, die stabil den Tetracyclin-Repressor exprimieren (SaOsTR, siehe oben), auf 10 cm-Schalen mit je 20 µg an Konstrukten zur induzierbaren Expression von short hairpin RNA (shRNA) gegen Sp3 bzw. Sp1 (pTER-Sp3siRNA bzw. pTER-Sp1siRNA) mittels der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Nach Selektion mit 300 µg/ml Zeocin wurden Einzelzellklone isoliert und nach Induktion mit Doxycyclin die Depletion von Sp3 bzw. Sp1 in Immunoblot-Analysen untersucht (siehe Ergebnisteil). Die Zellen wurden in SaOs-Medium mit 5 µg/ml Blasticidin und 300 µg/ml Zeocin kultiviert.

SaOsTR pTER-Sp3siRNA, pBabe-Sp1siRNA: Zur gleichzeitigen induzierbaren Depletion von Sp3 und Sp1 wurde ein Sp3-Knockdown-Einzelzellklon (SaOsTR pTER-Sp3siRNA Klon 1) zusätzlich mit einem Konstrukt zur Expression von shRNA gegen Sp1 wie zuvor beschrieben stabil transfiziert. Dieses Konstrukt (pBabe-Sp1siRNA, siehe unten) vermittelt eine zusätzliche Resistenz gegenüber Puromycin, so dass diese Zellen in SaOs-Medium mit 5 µg/ml Blasticidin, 300 µg/ml Zeocin und 1 µg/ml Puromycin kultiviert werden konnten.

SL2 pRm-HA-Flag Sp3/Sp3SD, (GC)₂-FLuc, pPac-RLuc, pBS-Puro: *Drosophila* SL2 Zellen, die stabil entweder Wildtyp Sp3 oder die SUMOylierungs-defiziente SD-Mutante unter der Kontrolle des Kupfer-induzierbaren Metallothionin-Promotors exprimieren (siehe oben), wurden mit einem Sp-abhängigen Reporterplasmid (GC)₂-FLuc, einem konstitutiv aktiven Koreporter unter der Kontrolle des Aktin 5C-Promotors (pPac-RLuc) sowie einem Plasmid mit einem Puromycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des *Drosophila* Heat-shock-Promotors (pBS-Puro), stabil transfiziert. Nach Selektion mit 2 µg/ml Puromycin wurden Einzelzellklone isoliert und nach Kupfer-Induktion in dualen Luciferase-Assays die Funktionalität der Reporter überprüft (siehe Abschnitt 4.1.11). Die Zellen wurden in Schneiders *Drosophila* Medium mit 150 µg/ml Hygromycin und 1 µg/ml Puromycin weiter kultiviert.

3.2.3.4 Zellkulturmedien

Schneiders *Drosophila* Medium: Insektenzellen wurden in Schneiders *Drosophila* Medium (mit L-Glutamin) (Gibco) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum Gold, PAA) und 1% Penicillin/Streptomycin (Cambrex) inkubiert.

DMEM/F-12: HEK-Zellen wurden in DMEM/Nut.Mix F12 (mit stabilem L-Glutamin) (PAA) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum Gold, PAA) und 1% Penicillin/Streptomycin (Cambrex) inkubiert.

SaOs-Medium: SaOs-Zellen wurden in DMEM High Glucose (mit stabilem L-Glutamin) der Firma PAA supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (Tet System Approved FBS, BD Biosciences) und 1% Penicillin/Streptomycin (Cambrex) inkubiert.

MEF-Medium: MEFs wurden in DMEM High Glucose (mit stabilem L-Glutamin) (PAA) und Ham's F10 (PAA) im Verhältnis 1:1 supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum Gold, PAA) und 1% Penicillin/Streptomycin (Cambrex) inkubiert.

3.2.4 Plasmide

3.2.4.1 Bereits beschriebene Plasmide

Expressionsplasmide für Insektenzellen

pPac: Grundvektor für die Klonierung von *Drosophila* Expressionskonstrukten. Enthält den konstitutiv aktiven 5C-Promotor.

pPac-Sp3/Sp3K₅₅₁D: Plasmide zur Expression der kleinen Isoform von Wildtyp Sp3 bzw. einer SUMOylierungs-defizienten Mutante, bei der ein Lysinrest (K₅₅₁) durch einen Aspartatrest (D) ausgetauscht wurde (Hagen et al. 1994; Sapetschnig et al. 2004).

pPac-USp3/Sp3K₅₅₁R: Plasmide zur Expression der langen Isoform von Sp3 bzw. einer entsprechenden SUMOylierungs-defizienten Mutante, bei der der Lysinrest K₅₅₁ durch einen Argininrest ausgetauscht wurde. Die Konstrukte enthalten eine Ubx-Leader Sequenz (Dennig et al. 1996).

pPac-Flag-Dorsal/DorsalK₃₈₂R: Diese Expressionsplasmide für den *Drosophila* Transkriptionsfaktor Dorsal bzw. eine SUMOylierungs-defizienten Mutante von Dorsal, bei der der Lysinrest K₃₈₂ durch einen Argininrest ausgetauscht wurde, wurden freundlicherweise von Albert Courey zur Verfügung gestellt (Bhaskar et al. 2002).

pPac-Twist: Plasmid zur Expression des *Drosophila* Transkriptionsfaktors Twist. Das Konstrukt wurde von A. Courey zur Verfügung gestellt. (Shirokawa und Courey 1997).

pPac-dMi-2-Flag/dMi-2-Flag Δ ATPase: Plasmide zur Expression von C-terminal mit dem Flag-Epitop markiertem *Drosophila* Mi-2 bzw. einer Deletionsmutante von Mi-2, der die ATPase/Helikase-Domäne fehlt. Diese Konstrukte wurden freundlicherweise von Alexander Brehm zur Verfügung gestellt (Bouazoune und Brehm 2005).

pBS-Puro: Dieses Konstrukt enthält ein Resistenzgen für Puromycin unter der Kontrolle des *Drosophila* Heat-Shock Promotors (Benting et al. 2000).

Expressionsplasmide für Säugerzellen

pSG-Gal4-DBD: Vektor zur Expression der DNA-bindenden Domäne des Hefespezifischen Transkriptionsfaktors Gal4 (Aminosäuren 1-147) unter der Kontrolle des SV40-Promotors.

pSG-Gal4-Sp3/Sp3KEEm: Plasmide zur Expression von Gal4-Fusionsproteinen mit entweder Wildtyp Sp3 oder einer SUMOylierungs-defiziente Mutante von Sp3, bei der die Aminosäuren KEE innerhalb des SUMOylierungsmotivs gegen Alanine ausgetauscht sind (Dennig et al. 1996).

pGal4-SF-1/SF-1-2KR: Expressionskonstrukte für (HA-Epitop-markierte) Gal4-Fusionsproteine mit Wildtyp SF-1 bzw. einer SUMOylierungs-defiziente Mutante von SF-1, bei der die Lysinreste K₁₁₉ und K₁₉₄ jeweils gegen Argininreste ausgetauscht wurden. Diese Konstrukte wurden freundlicherweise von Holly Ingraham zur Verfügung gestellt (Lee et al. 2005).

pBabe-Puro: Ein retroviraler Expressionsvektor, der ein Puromycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des SV40-Promotors enthält (Addgene) (Morgenstern und Land 1990).

pTER: Konstrukt zur Doxycyclin-induzierbaren Expression von shRNAs unter der Kontrolle des H1 Promotors. Das Plasmid enthält zusätzlich ein Zeocin-Resistenzgen (van de Wetering et al. 2003). Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Werner Lutz zur Verfügung gestellt.

Reporterplasmide

(GC)₂-FLuc: Das Konstrukt enthält ein Firefly-Luciferase (FLuc) Reportergen unter der Kontrolle eines Minimalpromotors mit der TATA-Box des adenoviralen E1b-Gens und zweier GC-Boxen aus dem HTLV-Promotor (Stielow et al. 2008a).

pGL3-Control (SV40-FLuc): Die Expression der Firefly-Luciferase steht unter der Kontrolle des SV40-Promotors mit fünf GC-Boxen (Promega).

pPac-RLuc: Die Expression der Renilla-Luciferase (RLuc) Reportergens steht unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *Drosophila* Aktin 5C-Promotors. Das Plasmid wurde freundlicherweise von C. Thomas zur Verfügung gestellt.

pDE5: Dieses Konstrukt enthält das Firefly-Luciferase Reportergen unter der Kontrolle eines Promotors mit jeweils fünf Bindungsstellen für die *Drosophila* Transkriptionsfaktoren Dorsal und Twist. Das Plasmid wurde freundlicherweise von A. Courey zur Verfügung gestellt (Shirokawa und Courey 1997).

pGAWG5E1b: Reporterkonstrukt, bei dem die Expression der Firefly-Luciferase unter der Kontrolle eines Minimalpromotors mit der TATA-Box des adenoviralen E1b-Gens und fünf Gal4-Bindungsstellen steht.

RSV-β-Gal: Expressionskonstrukt für β-Galaktosidase unter der Kontrolle des RSV-Promotors zur Normalisierung unterschiedlicher Transfektionseffizienzen.

3.2.4.2 Für diese Arbeit hergestellte Plasmide

Expressionsplasmide für Insektenzellen

pPac-HA-Flag-dMEP-1: Expressionsplasmid für HA- und Flag-Epitop-markiertes *Drosophila* MEP-1. Das Konstrukt wurde durch PCR-Amplifikation der MEP-1-cDNA mittels entsprechenden Primern, die in Überhängen Schnittstellen für *XbaI* bzw. *Sall* enthielten, und anschließender Ligation in den *XbaI/Sall*-geschnittenen *Drosophila* Expressionsvektor pPac-HA-Flag (Braun et al. 2001) hergestellt. Als Template für die PCR diente das Plasmid pFlc1-dMEP-1, das freundlicherweise von A. Brehm zur Verfügung gestellt wurde.

pPac-HA-Flag-dSfmbt: Dieses Konstrukt zur Expression von HA-Flag-markiertem *Drosophila* Sfmbt wurde durch PCR-Amplifikation der Sfmbt-cDNA mittels Primern,

Material und Methoden

die in Überhängen Schnittstellen für *XbaI* enthielten, und nachfolgende Ligation mit dem *XbaI*-geschnittenen pPac-HA-Flag-Expressionsplasmid (Braun et al. 2001) hergestellt. Als PCR-Template wurde das Plasmid pBS-KS(-)-dSfmbt verwendet, das freundlicherweise von Jürg Müller zur Verfügung gestellt wurde.

Plasmide zum induzierbaren Knockdown von Sp1 und Sp3

Zum Vektor-basierten Knockdown von Sp1 und Sp3 wurden folgende Konstrukte zur induzierbaren Expression von genspezifischen shRNAs hergestellt:

pTER-Sp3siRNA A/B/1/2; pTER-Sp1siRNA 1/2/3/4: Die entsprechenden wie unter Abschnitt 3.2.5 beschriebenen hybridisierten Oligonukleotide wurden mit dem *BglIII/HindIII*-geschnittenen pTER-Vektor ligiert.

pBabe-Sp1siRNA 1/3/4: Durch Verdau mit *EcoRI* wurde der H1-Promotor gemeinsam mit den entsprechenden Sp1-Zielsequenzen aus den jeweiligen pTER-Sp1siRNA-Konstrukten ausgeschnitten und mit dem *EcoRI*-geschnittenen pBabe-Puro-Plasmid ligiert.

3.2.5 Oligonukleotide und Primer

Einzelstrang-Oligonukleotide wurden über die Firmen Eurogentec oder MWG Biotech bezogen. Lyophilisierte DNA wurde in 10/1 TE gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt.

Oligonukleotide zur Herstellung von dsRNA

Die genspezifischen Primer zur Amplifikation entsprechender Genfragmente und Herstellung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) (siehe 3.3.2.4) sind nachfolgender Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Primer	Sequenz
5'-T7-EGFP	gaattaatacgactcactatagggGAGCTGGACGGCGACGTAA
3'-T7-EGFP	gaattaatacgactcactatagggagACTTGTACAGCTCGTCCATG
5'-T7-FLuc	taatacgactcactatagggGGAAGAACGCCAAAAAC
3'-T7-FLuc	taatacgactcactatagggCTCTGGCACAAAATCG
5'-T7-Smt3	gaattaatacgactcactatagggAGACCACTTAGCAGCTTCAAC
3'-T7-Smt3	gaattaatacgactcactatagggAGACGCATTTAGAATCTACAGT
5'-T7-Ubc9	gaattaatacgactcactatagggAGAAATCCAGGACTCGAGGAC
3'-T7-Ubc9	gaattaatacgactcactatagggAGATCGTACTCCAGTCGGTTCTG
5'-T7-dPIAS	gaattaatacgactcactatagggCATGCCATTTCCGTCTCTT
3'-T7-dPIAS	gaattaatacgactcactatagggGTAGAAAGGCACCTCTTGGGA
5'-T7-Mi-2(2)	taatacgactcactatagggTTAACTCGCTGACCAAGGCT
3'-T7-Mi-2(2)	taatacgactcactatagggATATCGTTGTGGGATTCCA

Material und Methoden

5'-T7-Mi-2(3U)	gaattaatacactactatagggGATATCAAGAAACAAAAAATGG
3'-T7-Mi-2(3U)	gaattaatacactactatagggTCCTTTGCAATGGAATTAATAC
5'-T7-MEP-1(2)	taatacactactatagggAGCAGAGAACGGACCTCAA
3'-T7-MEP-1(2)	taatacactactatagggCCTGGGCAACATCCTCTTA
5'-T7-MEP-1(5U)	gaattaatacactactatagggCTTATCGACATTTGTGG
3'-T7-MEP-1(5U)	gaattaatacactactatagggAATCGCTGACGCTTGG
5'-T7-MEP-1(3U)	gaattaatacactactatagggGTGAGGAAAAGCAGAGTGG
3'-T7-MEP-1(3U)	gaattaatacactactatagggAAGCGAGGCACGTCATCTAT
5'-T7-dSfmbt(2)	taatacactactatagggTTCTACACAAAATCGCGACG
3'-T7-dSfmbt(2)	taatacactactatagggTTCGCCGAAGCTATTCAACT
5'-T7-dSfmbt(3U)	taatacactactatagggCGAAACACAAACGTTGCCTA
3'-T7-dSfmbt(3U)	taatacactactatagggGAGCGGCTAGTTAATCGTGG
5'-T7-Sbb(2)	taatacactactatagggATATTGGCGGCATACCAGAG
3'-T7-Sbb(2)	taatacactactatagggCGATTTATGCGACGATGATG
5'-T7-CHD3(2)	taatacactactatagggGATTTACGTCAGAAGGCCATTGACA
3'-T7-CHD3(2)	taatacactactatagggAGCGACCTTAAAGGACGAAAGATAC
5'-T7-CAP(2)	taatacactactatagggCCGCTAATTCTGCTGCTTTC
3'-T7-CAP(2)	taatacactactatagggTTGGTTTCGGACACGACAATA
5'-T7-CG10616(2)	taatacactactatagggGTGTTCTTCAGCCTGCCTTC
3'-T7-CG10616(2)	taatacactactatagggTGGCATCGAACTGGTCATAA
5'-T7-CG13088(2)	taatacactactatagggTGCCTCCTTGAAAATCTCCT
3'-T7-CG13088(2)	taatacactactatagggCCCTTGCAAAGGGTACAACA
5'-T7-CG14852(2)	taatacactactatagggTTCTGGTCCTGTGCTTTTCC
3'-T7-CG14852(2)	taatacactactatagggGTGCTATCTGGCGATCCTGT
5'-T7-CG14972(2)	taatacactactatagggCCTGTTTGAGGAAAACGG
3'-T7-CG14972(2)	taatacactactatagggGCAGCTTGGCGATGTTGAAG
5'-T7-CG1513(2)	taatacactactatagggACCACCACTTACGCGTTTTTC
3'-T7-CG1513(2)	taatacactactatagggAGAGCTAGTCACCTCTGCCG
5'-T7-CG15269(2)	taatacactactatagggACCGAGGAACCAAGGAGTTT
3'-T7-CG15269(2)	taatacactactatagggTTTTCCCGTACTGGAAGTG
5'-T7-CG15422(2)	taatacactactatagggATGCGGTAATGAAGATCC
3'-T7-CG15422(2)	taatacactactatagggCCGTAGGGTTGCGGCATTAT
5'-T7-CG15654(2)	taatacactactatagggACTTGAATTCGAGGGTCAGG
3'-T7-CG15654(2)	taatacactactatagggTCACCTATGGTCGTGTAATCG
5'-T7-CG16954(2)	taatacactactatagggGCTTTCACCGATGTGGAAC
3'-T7-CG16954(2)	taatacactactatagggTTTTCGGAATCTTCGGTTTG
5'-T7-CG1814(2)	taatacactactatagggGAACTGGCTGTGGGTGTTTT
3'-T7-CG1814(2)	taatacactactatagggAAGTGGGAGGCATATTCGTG
5'-T7-CG2865(2)	taatacactactatagggACGGATGAAGCTGAATGACC
3'-T7-CG2865(2)	taatacactactatagggAATCTTTGTCTGCTGCTCGG
5'-T7-CG30387(2)	taatacactactatagggACAAGGATGGAATGACTGCC
3'-T7-CG30387(2)	taatacactactatagggTTTCTCCAGCTTTGTTGGCT
5'-T7-CG31302(2)	taatacactactatagggTCACTGGAGCCACATCTCTG
3'-T7-CG31302(2)	taatacactactatagggCGGTTATGCATCATGGAGAC
5'-T7-CG31814(2)	taatacactactatagggAGGAAGGGCTATTTGCAGGT
3'-T7-CG31814(2)	taatacactactatagggTTGCTAATCGAAGGTGGGAC
5'-T7-CG3213(2)	taatacactactatagggGCTGGAGTTCAAGTGCATCA

Material und Methoden

3'-T7-CG3213(2)	taatacgactcactatagggAGACCACCACCAGTTTCGTC
5'-T7-CG3964(2)	taatacgactcactatagggATCTTCACCACCTGCCTGAC
3'-T7-CG3964(2)	taatacgactcactatagggTGCCCATTTCCCTATTCTTG
5'-T7-CG3996(2)	taatacgactcactatagggAACTGCGGAAACCAAAAATG
3'-T7-CG3996(2)	taatacgactcactatagggCCTCCACCTCAACTCTGCTC
5'-T7-CG5554(2)	taatacgactcactatagggCTGCGGATCTTCAGCCTTAG
3'-T7-CG5554(2)	taatacgactcactatagggCAAAAATGCTTGGCAAAAGG
5'-T7-CG6969(2)	taatacgactcactatagggGGTTGGGGACCCAAGATAGT
3'-T7-CG6969(2)	taatacgactcactatagggGTGGCTGTGATGTCATGGTC
5'-T7-CG7945(2)	taatacgactcactatagggAACCGACATGTGACAGACCA
3'-T7-CG7945(2)	taatacgactcactatagggTCTGCATCATTTTCGTTGCTC
5'-T7-CG8191(2)	taatacgactcactatagggTGCCTACCTAATCGACCATTG
3'-T7-CG8191(2)	taatacgactcactatagggAAATGTGTCCAGGAATTGGG
5'-T7-CG9067(2)	taatacgactcactatagggGACCAACACTCGGGTCAAAT
3'-T7-CG9067(2)	taatacgactcactatagggCCGGGAATGTAAAAGGGATT
5'-T7-CG9432(2)	taatacgactcactatagggAGAGTACAGTCCGCGGAAAA
3'-T7-CG9432(2)	taatacgactcactatagggCGATCGGTTACGGTTCTGAT
5'-T7-eIF4AIII(2)	taatacgactcactatagggGACACTGGAAGGCATCAAGC
3'-T7-eIF4AIII(2)	taatacgactcactatagggATGGGCATCTCGTCGATTTG
5'-T7-GstD3(2)	taatacgactcactatagggACACATTCCTGGAGGGTCAG
3'-T7-GstD3(2)	taatacgactcactatagggCAGCATTCTGTTTCTCCTCG
5'-T7-hoe1(2)	taatacgactcactatagggTGATGTCCAACAACGAGCAT
3'-T7-hoe1(2)	taatacgactcactatagggGGACTCAGCTCGAAGGTACG
5'-T7-Jra(2)	taatacgactcactatagggAGACTGAAACCCCTCGAAT
3'-T7-Jra(2)	taatacgactcactatagggACCAAAGAAAGGCACAAAGC
5'-T7-Kay(2)	taatacgactcactatagggAACCGCGAAGCACTTTTCTA
3'-T7-Kay(2)	taatacgactcactatagggATCCTGCAAATCTACACGCC
5'-T7-MAP205(2)	taatacgactcactatagggCGGCTTCAAAGGAGAACTG
3'-T7-MAP205(2)	taatacgactcactatagggGGCCCCTAAAGTTACCTTGC
5'-T7-MTA1-like(2)	taatacgactcactatagggCAGAACGCGAGACAACAAAA
3'-T7-MTA1-like(2)	taatacgactcactatagggTGGAACCTTAGAGCGCGATT
5'-T7-Ocho(2)	taatacgactcactatagggAACTGGCAAAACAAACCCAG
3'-T7-Ocho(2)	taatacgactcactatagggGTTGAGGGTCTTCTGCTTGC
5'-T7-Patj(2)	taatacgactcactatagggGACTACGCTCAGATCCAGGC
3'-T7-Patj(2)	taatacgactcactatagggGCATCCTTCTTCAGCTCCAC
5'-T7-Pcp(2)	taatacgactcactatagggTTAGGACGCATCCCTACCAG
3'-T7-Pcp(2)	taatacgactcactatagggGCCAAAGAATCACGTCCATC
5'-T7-Pdm-2(2)	taatacgactcactatagggCAACATTCCACATGCCAGAC
3'-T7-Pdm-2(2)	taatacgactcactatagggGGGCACAACAGATACACACG
5'-T7-Rep3(2)	taatacgactcactatagggAATGCATTTTTTCCCTCAACG
3'-T7-Rep3(2)	taatacgactcactatagggTCCGCTGAGTGAGGTTAGGT

Tabelle 3.2: Oligonukleotide zur Herstellung von dsRNA

Die Bindungsstellen der T7 RNA-Polymerase sind in Kleinbuchstaben, die genspezifischen Sequenzen in Großbuchstaben dargestellt.

Primer für die PCR nach ChIP-Experimenten

Nach Chromatin Immunpräzipitationen auf dem stabil in HEK-Zellen integrierten 5xGal4-Reporter (pGAWG5E1b) wurden zur Amplifikation des Promotorbereiches bzw. von Regionen 1,2 kb, 2 kb und 3 kb downstream des Promotors die folgenden Primer in PCR-Reaktionen eingesetzt:

pGAWG5E1b fw2: CCAGTGCAAGTGCAGGTG
pGAWG5E1b rv2: GCTGGTACCGAGCTCTTAC

pGAW insLuc fw2: GGTTGTGGATCTGGATACCG
pGAW insLuc rv2: GGTGTTGGAGCAAGATGGAT

pGAW dsLuc fw1: TGAGAGCCTTCAACCCAGTC
NCOA5 rv1: AGGTGTTGCCCTATTCTAGAG

NCOA5 fw2: ACCACCACTTGGACACTATAG
NCOA5 rv2: AACGGTACTTCTTCCCCTTC

Zur Amplifikation des murinen *DHFR*-Promotorbereiches bzw. einer DNA-Region ungefähr 1 kb oberhalb des Promotors wurden die folgenden Primer verwendet:

DHFR Prom fw2: CACGCCTCAACCTGTGGGGGA
DHFR Prom rv2: GCGGGGATAAAATCCTACCAGCC

US DHFR Prom fw: CTAAACTGATTTGCAACTGCAG
US DHFR Prom rv: CGTTTTACTGTACAGATTTCCAG

Oligonukleotide zur Herstellung von Konstrukten zur Expression von shRNA

Zur Klonierung von Konstrukten zur Expression von Sp3- und Sp1-spezifischer shRNA (siehe oben) wurden die folgenden Oligonukleotide in OliGold-Qualität bei der Firma Eurogentec bestellt:

Sp3siRNA A fw:
gatccccGCAACACATTTGTCATATAttcaagagaTATATGACAAATGTGTTGCttttta
Sp3siRNA A rv:
agcttaaaaaGCAACACATTTGTCATATAtctcttgaaTATATGACAAATGTGTTGCggg
Sp3siRNA B fw:
gatccccGCCAGTGGTCAAAATATATttcaagagaATATATTTTGACCACTGGCttttta
Sp3siRNA B rv:
agcttaaaaaGCCAGTGGTCAAAATATAtctcttgaaATATATTTTGACCACTGGCggg
Sp3siRNA 1 fw:
gatccATTATATCCAGTCGCCTGTtcaagagaACAGGCGACTGGATATAAttttttgaaa
Sp3siRNA 1 rv:
agcttttcaaaaaATTATATCCAGTCGCCTGTtctcttgaaACAGGCGACTGGATATAATg

Material und Methoden

Sp3siRNA 2 fw:

gatccGCTATGGATAGTTCAGACAttcaagagaTGTCTGAACTATCCATAGCtttttggaaa

Sp3siRNA 2 rv:

agcttttccaaaaaGCTATGGATAGTTCAGACAtctcttgaaTGTCTGAACTATCCATAGCg

Sp1siRNA 1 fw:

gatcccGGATGGTTCTGGTCAAATAttcaagagaTATTTGACCAGAACCATCCttttta

Sp1siRNA 1 rv:

agcttaaaaaGGATGGTTCTGGTCAAATAtctcttgaaTATTTGACCAGAACCATCCgg

Sp1siRNA 2 fw:

gatcccCATCATGCCTTGATAAATAttcaagagaTATTTATCAAGGCATGATGttttta

Sp1siRNA 2 rv:

agcttaaaaaCATCATGCCTTGATAAATAtctcttgaaTATTTATCAAGGCATGATGgg

Sp1siRNA 3 fw:

gatcccGATCACTCCATGGATGAAAttcaagagaTTTCATCCATGGAGTGATCttttta

Sp1siRNA 3 rv:

agcttaaaaaGATCACTCCATGGATGAAAtctcttgaaTTTCATCCATGGAGTGATCgg

Sp1siRNA 4 fw:

gatcccGACTCAGTATGTGACCAATtcaagagaATTGGTCACATACTGAGTCttttta

Sp1siRNA 4 rv:

agcttaaaaaGACTCAGTATGTGACCAATtctcttgaaATTGGTCACATACTGAGTCgg

Die jeweiligen Zielsequenzen zum Vektor-basierten RNAi-induzierten Knockdown von Sp3 bzw. Sp1 sind in Großbuchstaben angegeben. Die Zielsequenzen wurden entsprechend der Hinweise in den folgenden Publikationen entworfen (Reynolds et al. 2004; Ui-Tei et al. 2004).

Zum Annealing wurden jeweils 3 µg der entsprechenden komplementären Oligonukleotide in einem Gesamtvolumen von 50 µl Annealing-Puffer (50 mM HEPES/KOH pH 7,4; 100 mM NaCl) für 5 Minuten auf 90°C erhitzt, dann für 15 Minuten bei 70°C inkubiert und schließlich langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Diese doppelsträngigen Oligonukleotide wurden in Ligations-Reaktionen mit dem *BglIII/HindIII*-geschnittenen pTER-Vektor eingesetzt (siehe 3.2.4.1).

3.2.6 Antikörper und Antiseren

Die folgenden kommerziell erhältlichen Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit wie in Tabelle 3.3. angegeben in Immunoblot-Analysen und Chromatin Immunpräzipitationen (ChIPs) verwendet.

Antikörper	Firma	Katalog-Nr.	Verdünnung Western Blot	ChIP^(*)
αSp1	Upstate/Millipore	07-645	1:2000	2 µg
αSp3	Santa Cruz	sc-644	1:2000	2 µg
αSp4	Santa Cruz	sc-645	-	2 µg
αGal4	Covance	PRB-255C	1:1000	2-3 µl
αMi-2α/β	Santa Cruz	sc-11378	1:1000	3-4 µg
αL3MBTL1	LP Bio	AR-0160	1:2000	8-10 µl
αL3MBTL2	LP Bio	AR-0161	1:2000	8-10 µl
αHP1α	Upstate/Millipore	05-689	-	3-4 µg
αHP1β	Abcam	ab49938	-	2 µg
αHP1γ	Upstate/Millipore	05-690	-	3 µg
αSETDB1	Upstate/Millipore	07-378	1:1000	10 µl
αSuv39H	Abcam	ab12405	-	4 µg
αSuv4-20H1/2	Abcam	ab18186	1:1000	10-12 µl
αH3K9me2	Upstate/Millipore	07-441	-	3 µg
αH3K9me3	Upstate/Millipore	07-442	-	2-3 µg
αH3K27me3	Abcam	ab6002	-	2-3 µg
αH4K20me1	Abcam	ab9051	-	2 µg
αH4K20me2	Upstate/Millipore	07-367	-	5 µl
αH4K20me3	Upstate/Millipore	07-463	-	5-8 µl
αHDAC1	Santa Cruz	sc-7872	-	3 µg
αSUMO-1	Zymed	33-2400	-	2 µg
αSUMO-1	Alexis	210-1743	-	5 µl
αFlag	Sigma	F3165	1:1000	-
αTubulin	Chemicon	MAB-3408	1:15000	-

Tabelle 3.3: Verwendete kommerzielle Antikörper

Mit Ausnahme der Antikörper gegen Flag und Tubulin, die murinen Ursprungs sind, handelt es sich ausschließlich um polyklonale Antikörper aus Kaninchen. (*) Bei gereinigten Immunglobulinen ist die in ChIPs eingesetzte Proteinmenge, bei Antiseren das verwendete Volumen angegeben.

Material und Methoden

An nicht-kommerziellen Antisera wurden wie folgt eingesetzt:

Antikörper	Literatur	Verdünnung Western Blot	ChIP ^(*)
αSp1	(Hagen et al. 1994)	1:1000	-
αSp2	F. Baur et al. unpubliziertes Kaninchen Serum	-	2 µg
αdMi-2(N) αdMi-2(C)	(Kehle et al. 1998)	1:10000 1:10000	2 µl 2 µl
αdMEP-1	N. Kunert, A. Brehm unpubliziertes Kaninchen Serum	1:5000	5 µl
αdSfmbt	(Klymenko et al. 2006)	1:1000	5-7 µl
αSbb/Bks	(Senti et al. 2000)	1:1000	-
αRPD3	(Brehm et al. 2000)	1:1000	-
αSUMO-2/3	(Saitoh und Hinchev 2000)	-	3 µl
αPol II	(Thompson et al. 1989)	-	5 µg
αp66	M. Bartkuhn, R. Renkawitz unpubliziertes Kaninchen Serum	-	5 µl

Tabelle 3.4: Verwendete nicht-kommerzielle Antikörper und Antisera

Bei dem Antikörper gegen die RNA-Polymerase handelt es sich um einen monoklonalen murinen Antikörper, die αSbb-Antisera wurden durch Immunisieren von Mäusen gewonnen, alle anderen sind polyklonale Antikörper aus Kaninchen. (*) Bei gereinigten Immunglobulinen ist die in ChIPs verwendete Proteinmenge, bei Antisera das eingesetzte Volumen angegeben.

Die Antikörper gegen dMi-2 und dSfmbt wurden von J. Müller, gegen dMEP-1 und RPD3 von A. Brehm, gegen Sbb von B. Dickson, gegen SUMO2/3 von H. Saitoh, gegen p66 von R. Renkawitz und gegen die RNA-Polymerase II von D. Eick freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Sekundärantikörper

Die folgenden HRP (Horseradish Peroxidase)-gekoppelten sekundären Antikörper wurden in Immunoblots wie angegeben eingesetzt. Zur Immundetektion mittels Fluoreszenz wurden Alexa680-gelabelte Zweitantikörper verwendet.

Antikörper	Firma	Katalog-Nr.	Verdünnung Western Blot
Donkey α-rabbit-HRP	Amersham	NA934V	1:20000-1:30000
Sheep α-mouse-HRP	Amersham	NA931V	1:20000-1:30000
α-rabbit-Alexa680	Mol. Probes/Invitrogen	A21076	1:5000-1:10000

Tabelle 3.5: Verwendete Sekundärantikörper

3.3 Methoden

3.3.1 Zellbiologische Methoden

3.3.1.1 Umgang mit Zellen

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter einer Sterilwerkbank statt. Soweit möglich wurden sterile Einwegmaterialien benutzt, Glaspipetten und andere Glasgefäße wurden für 12 Stunden bei 180°C inkubiert. Lösungen und andere Chemikalien wurden autoklaviert oder steril filtriert.

Zur Lagerung und Sicherung wurden Zellen in einem Volumen von 1,5 ml in Kryoröhrchen mit 10% DMSO kurzfristig bei -80°C, für längere Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zum Auftauen wurden diese Zellen möglichst rasch auf Raumtemperatur gebracht, das DMSO durch Zentrifugation bei 1000 UpM entfernt und die Zellen schließlich in frischem Medium aufgenommen.

3.3.1.2 Insektenzellen

Aus *Drosophila melanogaster* stammende Insektenzelllinien wurden bei 25-27°C ohne CO₂-Begasung kultiviert. Die adhärent wachsenden SL2 Zellen sowie die teilweise in Suspension wachsenden Kc₁₆₇ Zellen können beide durch Abschlagen abgelöst werden. Für Transfektionen (siehe unten) wurden folgende Zellzahlen an Insektenzellen ausplattiert:

96well Platte:	5x10 ⁴ Zellen/well
24well Platte:	3x10 ⁵ Zellen/well
6well Platte:	2x10 ⁶ Zellen/well
6 cm Schale:	3x10 ⁶ Zellen
10 cm Schale:	8x10 ⁶ Zellen

3.3.1.3 Säugerzellen

Die Kultivierung von Säugerzelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Zum Umsetzen und Ausplattieren wurden die konfluenten Zellen mit PBS gewaschen, mittels Trypsin/EDTA abgelöst und in der gewünschten Verdünnung ausplattiert. Das Zählen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

Material und Methoden

Für Transfektionen (siehe unten) wurden folgende Zellzahlen von Säugerzellen auf den angegebenen Kulturgefäßen ausplattiert:

96well Platte:	2×10^4 Zellen/well
24well Platte:	6×10^4 Zellen/well
6well Platte:	3×10^5 Zellen/well
6 cm Schale:	5×10^5 Zellen
10 cm Schale:	1×10^6 Zellen

3.3.1.4 Transfektionen

Calciumphosphat

Zur Etablierung von stabil transfizierten Zelllinien (siehe unten) wurden Säuger- und Insektenzellen nach der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Dazu wurden die Zellen auf einer 10 cm-Schale ausplattiert und nach 24 h mit 20-40 μg DNA transfiziert. Die DNA wurde in sterile Reaktionsgefäße vorgelegt und in 350 μl Calciumchloridlösung aufgenommen. Dieses Gemisch wurde anschließend langsam unter Vortexen zu 350 μl HeBS-Lösung getropft. Während der nachfolgenden 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur bilden sich feine Calciumphosphat-DNA-Kristalle. Diese Präzipitate wurden nun tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch Schwenken verteilt. Bei Insektenzellen wurde nach 24 Stunden das Medium gewechselt, bei Säugerzellen bereits nach 6 Stunden.

Calciumchlorid-Lösung	250 mM CaCl_2 1 mM HEPES/KOH, pH 7,1 steril filtriert
2x HeBS	16 g NaCl 0,7 g KCl 0,4 g Na_2HPO_4 1 g Saccharose 5 g HEPES mit 1 M HCl exakt auf pH 7,1 eingestellt steril filtriert

FuGENE

Für die Transfektion von Plasmiden, die stark exprimiert werden sollten, wurden die Transfektionsreagenzien FuGENE6 und FugeneHD der Firma Roche verwendet. Dabei wurden Säuger- und Insektenzelllinien mit den in Tabelle 3.6 angegebenen DNA-Mengen transfiziert. Die entsprechende DNA-Menge wurde in sterile Reaktionsgefäße vorgelegt und wie angegeben Optimum (Invitrogen), ein serumfreies Medium besonders geeignet für Transfektionen, zugegeben. Anschließend wurde die entsprechende Menge

Material und Methoden

(Verhältnis $\mu\text{g DNA} : \mu\text{l Fugene } 1:3$) Fugene zupipettiert, gemischt oder gevortext, für 15-30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend der Transfektionsansatz auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden frühestens 36 Stunden nach Transfektion geerntet.

	DNA-Menge	Volumen Optimem	Volumen Fugene
24well Platte	0,2-0,5 μg	50 μl	0.6-1,5 μl
6 cm Schale	1-2 μg	200 μl	3-6 μl
10 cm Schale	3-5 μg	500 μl	9-15 μl

Tabelle 3.6: Transfektionen mit FuGENE

Effectene

Insektenzellen wurden für Reporterassays nach RNAi-Experimenten (siehe unten) mit dem Transfektionsreagenz Effectene der Firma Qiagen transfiziert. Dazu wurden Kc₁₆₇ Zellen auf 96well Platten nach 24 Stunden Inkubation mit dsRNA mit insgesamt 110 ng Plasmid-DNA (100 ng SV40-FLuc, 0,1 ng pPac-RLuc, 10 ng pPac-Sp3si bzw. pPac-Sp3siK₅₅₁D) je well transfiziert. Die vorgelegte DNA wurde in 10 μl Puffer EC aufgenommen, anschließend 1,3 μl Enhancerlösung zugegeben, kurz gevortext und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden 0,9 μl Effectene zugegeben, für 10 Sekunden gevortext und für weitere 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 30 μl serumhaltigen Mediums wurde der komplette Ansatz auf die Zellen getropft. Die Platten wurden mit Hilfe von Aluminium-Klebefolien fest verschlossen. Bei Transfektion von mehreren wells wurden entsprechende Master-Mixe angesetzt. Fünf Tage nach Transfektion (insgesamt 6 Tage Inkubation mit dsRNA) wurden die Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivitäten im dualen Luciferase Assay (siehe 3.3.3.9) bestimmt.

Für den Reporteragen-Assay mit dem Transkriptionsfaktor Dorsal wurden in 24well Platten insgesamt 570 ng DNA (500 ng pDE5 Reporter, 0,5 ng pPac-RLuc, 50 ng pPac-Dorsal bzw. pPac-DorsalK₃₈₂R, 20 ng pPac-Twist) transfiziert. Dazu wurde entsprechend obigem Protokoll 500 μl Puffer EC, 7 μl Enhancer und 5 μl Effectene verwendet.

Für die Untersuchung der relativen SUMOylierung von Sp3 in quantitativen Western-Blot-Analysen wurden in 24well Platten ebenfalls 24 Stunden nach dem Ausplattieren auf dsRNA (siehe unten) jeweils 500 ng pPac-USp3 entsprechend des Effectene-Protokolls transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurden die Zellen in Form von SDS-Gesamtzellextrakten geerntet und die Sp3-SUMOylierung im Western-Blot mit fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern untersucht (siehe 3.3.3.5).

3.3.1.5 RNAi-Experimente

RNAi in Insektenzellen

Um in *Drosophila* Zellen die Expression eines bestimmten Gens herunterzuregulieren, wurden doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNAs) verwendet. Diese dsRNA wird unter Serumentzug durch Insektenzellen aufgenommen und in 21-23 bp lange small interfering RNA (siRNA) Moleküle prozessiert. Die Herstellung der dsRNA ist in Abschnitt 3.3.2.4 beschrieben.

Zum gezielten Knockdown eines bestimmten Gens wurden bei 96well Platten 1 µg dsRNA je well verwendet, bei 24well Platten 6 µg dsRNA. Die entsprechende dsRNA wurde zunächst vorgelegt, die Zellen gemäß Abschnitt 3.3.1.3 in serumfreiem Medium ausplattiert (96well: 30 µl, 24well: 200 µl). Nach 30-minütiger Inkubation bei 25°C wurden 50 µl bzw. 400 µl serumhaltiges Medium zugegeben und 24 Stunden später entsprechend Abschnitt 3.3.1.4 transfiziert.

RNAi in Säugerzellen

Zum gezielten siRNA-vermittelten Knockdown von bestimmten Genen in Säugerzellen wurden ON-TARGETplus siRNA SMARTpools der Firma Dharmacon verwendet. Diese Pools enthalten 4 verschiedene spezifische siRNAs, die alle gegen ein Zielgen gerichtet sind.

Die Transfektion der siRNAs wurde auf 24well Platten oder für ChIP-Experimente auf 10 cm Schalen mit Hilfe des DharmaFECT Transfektionsreagenz (Dharmacon) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Für eine 24well Platte wurden dabei 50 pmol siRNA je well eingesetzt, auf einer 10 cm Schale wurden 600 pmol siRNA verwendet. Als Negativ-Kontrolle wurde die gleiche Menge einer unspezifischen siRNA (Non-Targeting siRNA#1; Dharmacon) eingesetzt. Das entsprechende Volumen der siRNA-Stocklösung (2 µM) wurde mit dem gleichen Volumen an serumfreiem Medium (Optimem, Invitrogen) versetzt und in einem zweiten Reaktionsgefäß 2 µl bzw. 20 µl DharmaFECT Transfektionsreagenz in serumfreiem Medium aufgenommen, so dass in beiden Gefäßen die gleichen Gesamtvolumina vorlagen. Die beiden Ansätze wurden kurz gevortext, für 5 Minuten bei RT inkubiert, anschließend vereinigt und für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl bzw. 9 ml des entsprechenden Mediums (mit 10% FCS, allerdings ohne Antibiotika) wurden diese Ansätze auf die 24 Stunden zuvor ausplattierten Zellen gegeben. Drei bis fünf Tage nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und Extrakte bzw. Chromatin präpariert.

3.3.1.6 Etablierung stabil transfizierter Zellklone

Zur Etablierung von stabil transfizierten Zelllinien wurden sowohl Säuger als auch Insektenzelllinien auf 10 cm Platten mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode (siehe 3.3.1.4) transfiziert. Dabei wurden pro Platte 20-40 µg DNA eingesetzt. Bei Kotransfektion des Plasmids, das die Antibiotika-Resistenz vermittelt, wurde dieses Plasmid in 20-fach geringerer Menge eingesetzt.

Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mindestens 1:3 gesplittet und sogleich mit der Antibiotika-Selektion begonnen. Die transfizierten Zellen wurden mit Antibiotika in den folgenden Konzentrationen selektioniert:

Antibiotika	Antibiotika-Konzentration	Resistenz-Plasmid (Säuger)	Resistenz-Plasmid (Insekten)
Puromycin	1-2 µg/ml	pBabe-Puro	pBS-Puro
Blasticidin	5 µg/ml	pcDNA6-TR	-
Zeocin	300 µg/ml	pTER	-
Hygromycin	150 µg/ml	pX343	pLTR-Hygro

Tabelle 3.7: Antibiotika-Selektion stabil transfizierter Zelllinien

Nach Selektion für mindestens 10 Tage, sobald sich deutliche, makroskopisch sichtbare Einzelzell-Kolonien ausgebildet haben, wurde mit der Isolierung der Einzelklone begonnen. Dazu wurden die Klone entweder durch vorsichtiges Abschaben unter dem Mikroskop oder bei Säugerzellen mit Hilfe von kleinen Metallringen, die mit Trypsin gefüllt und mit Vaseline abgedichtet wurden, isoliert und zunächst in 24well Platten überführt. Es wurden jeweils 25-30 Einzelklone gepickt und expandiert.

Eine Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit hergestellten stabil transfizierten Zelllinien ist in Abschnitt 3.2.3.3 zu finden.

3.3.2 Molekularbiologische Methoden

Die Standardmethoden der Molekularbiologie, wie Fällung von Nukleinsäuren, Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation von DNA sowie Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA, wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Diese können entsprechenden Methodenbüchern entnommen werden.

3.3.2.1 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Zur Mini-Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli* wurde das Nucleobond AX System der Firma Macherey Nagel entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden je 1,5 ml einer 3 ml DH5α Bakterien-Übernachtskultur durch Zentrifugation

Material und Methoden

pelletiert und nach Abnahme des Überstandes in 100 µl S1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden zur Denaturierung der Proteine 100 µl S2-Puffer zugegeben, gemischt, und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl S3-Puffer zur Neutralisation der Proben und anschließende 10-minütige Inkubation auf Eis wurden die präzipitierten Proteine durch zweimalige Zentrifugation bei 13000 UpM entfernt. Der Überstand wurde jeweils in neue Reaktionsgefäße überführt. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 450 µl Isopropanol gefällt, zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 50 µl 10/1 TE aufgenommen.

Die Plasmid-DNA-Präparation im quantitativen Maßstab (Maxi-Präp) erfolgte ebenfalls entsprechend des Nucleobond AX Protokolls. Dazu wurde eine 500 ml Kultur mit 1-3 ml einer Vorkultur des entsprechenden Bakterienklons angeimpft und nach Wachstum über Nacht die Bakterien durch Zentrifugation bei 4000 UpM pelletiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die von der Säule eluierte DNA wurde durch zweimaliges Fällern mit Isopropanol und Ethanol weiter gereinigt, schließlich getrocknet und in 50-300 µl 10/1 TE aufgenommen. Abschließend erfolgte eine photometrische Konzentrations-Bestimmung sowie Qualitätskontrolle durch Agarose-Gelelektrophorese.

3.3.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid DNA

Die Transformation des Bakterienstammes DH5 α mit Plasmid-DNA erfolgte nach einem vereinfachten Protokoll von Hanahan (1983). Dabei werden Bakterien, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, durch Resuspension in TFB-Puffer und anschließender Zugabe von DMSO und DTT sowie einem Hitzeschock chemisch kompetent gemacht. Die Bakterien wurden mit 100-200 ng Plasmid DNA transformiert und auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. Das exakte Protokoll ist Methodenbüchern oder Diplom- und Doktorarbeiten der Arbeitsgruppe Suske zu entnehmen.

TFB-Puffer	10 mM MES, pH 6,3 100 mM KCl 45 mM MnCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 3 mM Hexaminkobalt(III)Chlorid
------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.3.2.3 Präparation von RNA

Beim Umgang mit RNA ist besondere Aufmerksamkeit auf RNase-freies Arbeiten zu legen. So wurden bei RNA-Arbeiten neben dem ständigen Tragen von Handschuhen auch spezielle RNase-freie Filter-Pipettenspitzen und Plastik-Reaktionsgefäße verwendet. Glasmaterialien wurden durch Backen bei 180°C über Nacht von RNasen befreit, H₂O und andere Lösungen wurden mit 0,1% DEPC behandelt. Arbeitsplatzoberflächen und Pipetten wurden mit der RNase Dekontaminationslösung RNaseZap (Ambion) behandelt.

RiboPure RNA Isolation (Ambion)

Zur Präparation von hochreiner RNA, die nach reverser Transkription und Markierung mit Fluorochromen in Microarray Experimenten nach Depletion von Sp3 und/oder Sp1 (siehe Abschnitt 4.5) eingesetzt wurde, wurde das RiboPure RNA Isolation Kit der Firma Ambion verwendet. Dabei wurde RNA aus stabil transfizierten SaOs-Zellen (siehe 3.2.3.3), die zum Knockdown von Sp3 bzw. Sp1 für 5 Tage mit 1 µg/ml Doxycyclin inkubiert worden waren, präpariert. Die Zellen einer 6 cm Platte wurden durch direkte Zugabe von 2,2 ml (1 ml je 10cm²) TRI Reagenz lysiert. Das Lysat wurde durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und nach 5-minütiger Inkubation anschließend zu je 1 ml aliquotiert. Nach Zugabe von 100 µl BCP (je 1 ml Homogenisat), 15-sekündigem Vortexen und erneuter Inkubation für 5 Minuten bei RT wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert. Dabei reichert sich die RNA in der oberen, wässrigen Phase an, während sich DNA und Proteine in der Interphase und in der unteren organischen Phase befinden. Es wurden jeweils 400 µl der wässrigen Phase abgenommen und nach Zugabe von 200 µl absolutem Ethanol und sofortigem Vortexen der gesamte Ansatz zur weiteren Aufreinigung der RNA auf Filter-Säulen aufgetragen. Es wurden also für eine 6 cm Platte jeweils 2 Filter-Säulen verwendet. Die Säulen wurden bei 13000 UpM für 30 Sekunden zentrifugiert, der Filter zweimalig mit je 500 µl Waschlösung gewaschen und nach einem erneutem Zentrifugationsschritt, um den Filter zu trocknen, mit jeweils 100 µl Elutionspuffer eluiert. Die eluierte RNA wurde durch Zugabe von Ethanol umgefällt, photometrisch im NanoDrop quantitiert und nach Qualitätskontrolle mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese bei -80°C gelagert. Es ergaben sich mit dieser Aufreinigungsmethode RNA-Ausbeuten von 15-25 µg RNA pro 6 cm Schale, die vollständig für eine Microarray-Analyse eingesetzt wurden.

RNeasy Mini (Qiagen)

Zur RNA-Präparation mit Hilfe des RNeasy Mini Systems von Qiagen wurden bis zu 1×10^7 Zellen verwendet. Die Zellen wurden direkt auf 10 cm oder 15 cm Platten durch Zugabe von 600 μ l RLT Puffer lysiert, abgeschabt und anschließend durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 20 G Kanüle homogenisiert. Nach Zugabe von 600 μ l absolutem Ethanol und vorsichtigem Mischen wurde das Homogenisat auf eine RNeasy Mini-Säule aufgetragen und bei 13000 UpM für 15 Sekunden zentrifugiert. Um genomische DNA komplett zu entfernen wurde anschließend ein DNase Verdau auf der Säule durchgeführt. Dazu wurde die Säule mit 350 μ l RW1 Puffer gewaschen, 10 μ l DNase I (in 70 μ l RDD Puffer) zugegeben und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde erneut mit 350 μ l RW1 sowie zweimalig mit 500 μ l RPE Puffer gewaschen. Die RNA wurde schließlich mit 30 μ l RNase-freiem H₂O eluiert, quantitiert und bei -80°C gelagert.

3.3.2.4 Herstellung von dsRNA durch *in vitro*-Transkription

Zur Herstellung von doppelsträngiger RNA für RNAi Experimente in *Drosophila* Zellen (siehe 3.3.1.5) wurden entsprechende Genfragmente mittels PCR (siehe unten) von genomischer DNA aus *Drosophila* SL2 Zellen mit genspezifischen Primern (siehe 3.2.5) amplifiziert. Die PCR-Fragmente enthielten am 5'-Ende Bindungsstellen für die T7-RNA-Polymerase. Diese PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kits von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend ca. 500 ng DNA als Template in einer *in vitro*-Transkription eingesetzt. Zur *in vitro*-Transkription wurde das T7 MEGAScript System der Firma Ambion entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend die DNA durch Zugabe von 1 μ l DNaseI (2U/ μ l) für 15 Minuten bei 37°C verdaut und die RNA durch Ammoniumacetat/Ethanol-Fällung präzipitiert. Die RNA wurde schließlich in RNase-freiem H₂O aufgenommen und die komplementären Einzelstränge zur Herstellung von doppelsträngiger RNA durch Erhitzen auf 65°C für 30 Minuten und langsames Abkühlen auf RT hybridisiert. Abschließend erfolgte eine photometrische Quantifizierung sowie Qualitätskontrolle durch Agarose-Gelelektrophorese.

3.3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA Fragmente, die in Ligationen oder als Template-DNA bei *in vitro*-Transkriptionen (siehe oben) eingesetzt wurden, wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert. Dabei wurde

Material und Methoden

die Phusion High Fidelity Polymerase (Finnzymes) verwendet, eine DNA-Polymerase mit Proofreading-Funktion, die den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden verhindert. Als Template dienten entweder Plasmide mit der entsprechenden zu amplifizierenden Sequenz oder genomische DNA aus *Drosophila* SL2 Zellen. Entsprechend den Herstellerangaben wurden für einen 25 µl PCR-Reaktionsansatz wie folgt vereinigt: 5 µl Puffer HF, 0,5 µl 10 mM dNTP-Mix, jeweils 12,5 pmol sense bzw. antisense Primer (Endkonzentration jeweils 500 nM) sowie 0,25 µl der Phusion Polymerase (2 U/µl). Als Template wurden entweder 50 pg Plasmid DNA oder ca. 100 ng genomische DNA eingesetzt. Das entsprechende Reaktionsvolumen wurde mit Nuklease-freiem H₂O aufgefüllt. Als Negativkontrolle verblieb eine Probe ohne Template DNA. Die eigentliche PCR erfolgte nach folgendem Schema, wobei die Annealingtemperatur den jeweiligen Primern, die Elongationszeit der Größe des jeweiligen PCR-Produktes angepasst wurde.

Initiale Denaturierung	98°C	2 min	
Denaturierung	98°C	10 sec	
Primer-Annealing	60-65°C	20 sec	
Elongation	72°C	15-30 sec/kb	35 Zyklen
Terminale Elongation	72°C	10 min	
Lagerung	4°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden durch Auftragen von jeweils 1 µl des Ansatzes auf ein Agarosegel und nachfolgende Gelelektrophorese analysiert.

3.3.2.6 Quantitative PCR (qPCR)

Zur Analyse von Chromatin-Immunpräzipitationen (siehe 3.3.3.7) wurde das präzipitierte Material als Template in einer quantitativen real-time PCR (qPCR) eingesetzt.

Bei einer quantitativen PCR kann durch Zugabe von SYBR Green, einem in doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoff, mit Hilfe eines geeigneten PCR-Cyclers die Amplifikation des PCR-Produktes durch Detektion des Fluoreszenz-Signals nach jedem Zyklus direkt (in „real-time“) verfolgt werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu.

Für qPCR-Ansätze wurde das ImmoMix System der Firma Bioline entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden für einen einzelnen PCR-Ansatz im 25 µl Gesamtvolumen jeweils 12,5 µl 2xImmoMix, 0,5 µl SYBRGreen (50x) und jeweils 2,5 pmol sense bzw. antisense Primer (Endkonzentration jeweils 100 nM) sowie das

Material und Methoden

entsprechende Volumen an nuklease-freiem H₂O in einer lichtundurchlässigen 96well Platte (Abgene) vereinigt. In der Regel wurden Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt und entsprechende Master-Mixe angesetzt und aliquotiert. Als Template wurde anschließend jeweils 1 µl der in ChIP-Experimenten präzipitierten und aufgereinigten DNA zugegeben. Die Platten mit einer lichtdurchlässigen Klebefolie (Abgene) fest verschlossen und kurz zentrifugiert. Die qPCR-Reaktionen wurden im Mx3000P Cycler der Firma Stratagene nach folgendem Schema durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95°C	7 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primer-Annealing	58-68°C	1 min	
Elongation	72°C	30 sec	40 Zyklen
Denaturierung	95°C		
Dissoziationskurve	60→...→95°C (Temperaturgradient)		

Nach Abschluss der PCR wurde eine Dissoziationskurve, bei der die Fluoreszenz bei graduell ansteigender Temperatur gemessen wird, erstellt, um sicherzustellen, dass keine unspezifischen PCR-Produkte zum Fluoreszenzsignal beitragen.

Im Anschluss an den Annealing-Schritt wurde in jedem Zyklus die SYBRGreen Fluoreszenz der einzelnen Proben gemessen und in Amplifikation Plots in Abhängigkeit der Zykluszahl dargestellt. Entscheidend ist dabei der Ct-Wert (Cycle Treshold value), die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über einen bestimmten Schwellenwert ansteigt. Zum Vergleich zweier PCR-Reaktionen wurde die Differenz der beiden Ct-Werte (ΔCt) gebildet.

Zur Auswertung der ChIP-Experimente wurden die Ct-Werte der immunpräzipitierten Proben auf den jeweiligen Ct-Wert der Input-Probe normalisiert und anschließend mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001) die x-fache Anreicherung gegenüber einer Probe mit einem unspezifischen Antikörper oder der prozentuale Anteil an präzipitiertem Material gegenüber der Input-Probe berechnet.

3.3.3 Biochemische Methoden

3.3.3.1 Herstellung von SDS-Gesamtzellextrakten

Gesamtzellextrakte aus Säuger- und Insektzelllinien wurden unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe von SDS-haltigem Lysis-Puffer hergestellt. Dazu wurden Zellen auf 24well Platten, 6 cm oder 10 cm Schalen zweimal mit PBS gewaschen und

Material und Methoden

anschließend durch Zugabe von 50 µl, 150 µl bzw. 250 µl SDS-Lysis-Puffer direkt lysiert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers geerntet, in Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten gekocht. Zur Entfernung von unlöslichen Bestandteilen wurden die Extrakte für 5 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert, anschließend in frische Gefäße überführt und bei -80°C gelagert. Eine Proteinbestimmung erfolgte mit dem Biorad DC Protein Assay.

SDS-Lysis-Puffer	Lysis I : Lysis II (1:2) 1 mM PMSF 0,5x Protease Inhibitor Cocktail (PIC) (Roche)
Lysis I:	150 mM Tris/Cl, pH 6,7 5 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerin
Lysis II:	25 mM Tris/Cl, pH 8,2 50 mM NaCl 0,5 % (v/v) NP-40 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Na-Azid

3.3.3.2 Herstellung von Kernextrakten

Hochsalz-Kernextrakte wurden nach (Andrews und Faller 1991) präpariert. Dazu wurden Zellen von 24well Platten, 6 cm oder 10 cm Schalen zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers in kaltem PBS in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und danach in 100 µl, 400 µl bzw. 800 µl hypotonem Puffer B resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 10 Sekunden bei 13000 UpM zentrifugiert und die noch intakten Zellkerne in 20 µl, 80 µl bzw. 200 µl Puffer C aufgenommen. Durch 20-minütige Inkubation auf Eis wurden die Kerne aufgeschlossen und an DNA gebundene Proteine abgelöst. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen wurde abschließend für 2 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert und die Kernextrakte in Aliquots bei -80°C gelagert. Eine Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford.

Puffer B	10 mM HEPES/KOH, pH 7,9 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,5 mM DTT 1 mM PMSF 0,5x PIC
----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------

Puffer C	20 mM HEPES/KOH, pH 7,9
	1,5 mM MgCl ₂
	420 mM KCl
	0,2 mM EDTA
	25 % (v/v) Glycerin
	0,5 mM DTT
	1 mM PMSF
	0,5x PIC

3.3.3.3 Proteinbestimmungen

Proteinbestimmung nach Lowry

Diese Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung ist für Proben geeignet, die in Detergenzien-haltigem Puffer gelöst sind. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem DC Protein Assay der Firma Biorad. Es wurden dabei 20 µl Lösung S mit 1 ml Lösung A gemischt (Lösung A') und zur Konzentrationsbestimmung einer unbekanntes Proteinprobe 20 µl Probenvolumen mit 100 µl Lösung A' vereinigt. Nach Zugabe von 800 µl Lösung B wurden die Ansätze für 15 Minuten bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung der Proteinproben erfolgte anhand einer Kalibrationsgeraden, die mit Hilfe von BSA-Standards von bekannter Proteinkonzentration erstellt wurde.

Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Bestimmung der Proteinkonzentration basiert auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250. Diese Bindung verändert das Absorptionsmaximum und kann somit photometrisch erfasst werden. Es wurden 2-5 µl Probenvolumen mit 1 ml Bradford-Reagenz der Firma Biorad (5x Stocklösung, 1:5 mit H₂O verdünnt) gemischt und für 5-10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration durch Vergleich mit einer BSA-Standardgeraden bestimmt.

3.3.3.4 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Standardprotokollen. Im Trenngel wurden Acrylamid-Konzentrationen von 6 bis 12 % eingestellt. Die Proteinproben wurden mit gleichem Volumen an SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten auf 100°C erhitzt und in die Taschen des Sammelgels (5% Acrylamid)

Material und Methoden

appliziert. Zusätzlich wurden in einer Spur 3 µl eines Protein-Größenstandards mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel.

30 % Acrylamidlösung	(Acrylamid : Bisacrylamid 37,5 : 1) (Roth)
Sammelgelpuffer	1 M Tris/Cl, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/Cl, pH 8,8
10 % (w/v) SDS	
10 % (w/v) APS	
TEMED	
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/Cl; pH 8,3 250 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
2x SDS-Probenpuffer	100 mM Tris/Cl, pH 6,8 4 % (w/v) SDS 0,001 (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) Glycerin 5% (v/v) β-Mercaptoethanol

Protein-Größenstandard: PAGE-Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas)

3.3.3.5 Western Blot

Immundetektion durch Chemolumineszenz

Nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden Proteine zur Immundetektion im Western Blot Verfahren aus dem Gel auf eine PVDF Membran transferiert. Der Elektrotransfer erfolgte dabei im Semidry-Verfahren mit diskontinuierlichen Puffer-Bedingungen mittels einer Fastblot-Apparatur der Firma Biometra. Der Transfer erfolgte für 75 Minuten bei konstanter Stromstärke von 2,5 mA/cm². Nach Beendigung des Blottens wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Blockierungslösung (über Nacht bei 4°C) abgesättigt. Anschließend wurde die PVDF-Membran zunächst zweimal kurz gewaschen und nachfolgend mit dem entsprechenden Primärantikörper (Verdünnung 1:1000 bis 1:15000; siehe 3.2.6) für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen für jeweils mindestens 5 Minuten mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden HRP-markierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20000-1:30000, siehe 3.2.6) für eine Stunde bei RT. Danach wurde erneut mehrmals gewaschen und die Proteine schließlich mit Hilfe des Immobilon HRP-Substrat Western Detection Kits (Millipore) nach Herstellerangaben detektiert.

Material und Methoden

Sollte die Membran für weitere Immundetektionen mit anderen Antikörpern verwendet werden, so wurden sie zweimal kurz in TBST gewaschen und die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper durch einstündige Inkubation bei RT (bei besonders affinen Erstantikörpern bei 65°C) in Stripping-Puffer entfernt. Anschließend wurde mindestens fünf Mal für jeweils 5 Minuten gewaschen und vor der Inkubation mit weiteren Antikörpern unspezifische Bindungsstellen erneut in Blockierungslösung abgesättigt.

Whatman 3MM-Filterpapier

Immobilon-P PVDF-Membran (Millipore)

Methanol

Anodenpuffer I 300 mM Tris/Cl, pH 10,4
10 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer II 25 mM Tris/Cl, pH 10,4
10 % (v/v) Methanol

Kathodenpuffer 25 mM Tris/Cl, pH 9,4
40 mM Glycin
10 % (v/v) Methanol

TBS 20 mM Tris/Cl, pH 7,6
137 mM NaCl

TBST TBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20

Blockierungslösung TBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver

Antikörperlösung TBST mit 1 % (w/v) Magermilchpulver

Stripping Puffer I 62,5 mM Tris/Cl, pH 6,8
100 mM β -Mercaptoethanol
2 % SDS

Stripping Puffer II 25 mM Glycin, pH 2,0
2 % SDS

Immobilon HRP-Substrat Western Detection Kits (Millipore)

Fuji Medical X-Ray Film (Fujifilm)

Immundetektion durch Fluoreszenz

Zur Immundetektion mittels Fluoreszenz-markierter Zweitantikörper wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Western Blot entweder auf Nitrocellulose-Membranen oder spezielle für Fluoreszenz-Detektion geeignete PVDF-Membranen (Immobilon-F, Millipore) immobilisiert. Der Transfer erfolgte auch hier im Semidry-

Verfahren bei 2,5 mA/cm², auf Nitrocellulose-Membranen allerdings im kontinuierlichen Puffersystem, auf PVDF-Membranen wie oben beschrieben unter diskontinuierlichen Pufferbedingungen. Nach dem Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen in Blockierungslösung wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper in 2-3-fach höherer Konzentration im Vergleich zur Chemolumineszenz inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Alexa680-markierter Antikörper in der Verdünnung 1:5000-1:10000 eingesetzt. Nach den jeweils einstündigen Antikörperinkubationen wurde jeweils zweimal mit TBST sowie zweimal mit TBS gewaschen. Die Detektion der immobilisierten Proteine sowie die Quantifizierung der Fluoreszenz-Signale erfolgten mit Hilfe des Licor Odyssey Imaging Systems.

Hybond Nitrocellulose (Amersham)
Immobilon-F PVDF-Membran (Millipore)

Western Transfer Puffer	25 mM Tris/Cl, pH 8,5 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
-------------------------	---------------------------------------------------------------

3.3.3.6 Immunpräzipitationen

Zur Immunpräzipitation von Proteinen aus Hochsalz-Kernextrakten (siehe 3.3.3.2) wurden diese zunächst durch Zugabe des entsprechenden Puffers C ohne NaCl auf eine physiologische Salzkonzentration (150 mM NaCl) verdünnt. Die verdünnten Extrakte wurden zur Entfernung von unspezifisch bindenden Proteinen zunächst mit Matrixmaterial vorinkubiert (Preclearing). Dazu wurden die Extrakte mit einer Mischung aus gleichen Teilen Protein A- und Protein G-Sepharose, die zuvor mit TBS gewaschen und in Puffer C (150 mM NaCl) äquilibriert worden war, für 2 Stunden bei 4°C auf einem Rotationsrad inkubiert. Das Matrixmaterial wurde durch Zentrifugation entfernt, der Überstand mit entsprechenden spezifischen Antikörpern (1-3 µg IgGs, 2-5 µl Serum) versetzt und für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Immunpräzipitation erfolgte durch Zugabe von 20-40 µl äquilibrierter ProteinA/G-Sepharose zu je 1 ml verdünntem Extrakt. Die Matrix mit den präzipitierten Antigen-Antikörper-Komplexen wurde anschließend abzentrifugiert (3000 UpM, 3 min), zweimal mit Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II für jeweils 5 Minuten gewaschen und schließlich im gleichen Volumen an 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Ansätze wurden für 5 Minuten aufgekocht und direkt für SDS-Gelelektrophorese und Immundetektion mittels Western-Blotting eingesetzt.

Material und Methoden

Puffer C (ohne NaCl)	20 mM HEPES/KOH, pH 7,9 1,5 mM KCl 2 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerin 1 mM PMSF 0,5x PIC
Puffer C (150 mM NaCl)	20 mM HEPES/KOH, pH 7,9 150 mM NaCl 1,5 mM KCl 2 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerin 1 mM PMSF 0,5x PIC
ProteinA Sepharose FF (Amersham) ProteinG Sepharose FF (Amersham) Waschpuffer I	10 mM Tris/Cl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,5% (v/v) NP-40 1 mM PMSF 0,5x PIC
Waschpuffer II	10 mM Tris/Cl, pH 7,5 250 mM NaCl 0,5% (v/v) NP-40 1 mM PMSF 0,5x PIC

3.3.3.7 Chromatin Immunpräzipitationen (ChIPs)

Zum Nachweis, dass bestimmte Proteine *in vivo* mit spezifischen DNA-Sequenzen assoziiert sind, wurden Chromatin Immunpräzipitationen (ChIPs) durchgeführt. Dazu werden an DNA gebundene Proteine durch Cross-Linking mit Formaldehyd auf der DNA fixiert und die DNA anschließend mittels Ultraschallbehandlung in Fragmente von einigen hundert Basenpaaren geschert. Nach Immunpräzipitation der DNA-Protein-Komplexe und nachfolgender Aufreinigung der DNA kann mittels PCR mit sequenzspezifischen Primern die Assoziation eines Proteins mit einem bestimmten DNA Bereich nachgewiesen werden. Es wurden sowohl DNA-Sequenzen von stabil integrierten Reporterkonstrukten als auch endogene Promotoren in ChIP-Analysen untersucht. Bei ChIPs von transient transfizierten Zellen wurden diese 24 Stunden nach Transfektion geerntet.

Die ChIP-Experimente wurden mit Hilfe des Chromatin IP-Kits der Firma Upstate durchgeführt. Es wurden pro Immunpräzipitation $1-2 \times 10^6$ Zellen auf 10 cm Platten eingesetzt. Zum **Cross-Linking** von DNA und assoziierten Proteinen wurde 1%

Material und Methoden

Formaldehyd direkt zum Medium zugegeben und unter leichtem Schwenken für 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Fixierung durch Zugabe von 125 mM Glycin abgestoppt. Die Zellen wurden zweimal gründlich mit eiskaltem PBS gewaschen, danach in 1 ml PBS (mit Protease-Inhibitoren) mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Gleichbehandelte Zellen wurden dabei gepoolt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 2000 UpM wurde das Zellpellet in 200 µl SDS-Lysispuffer je 1×10^6 Zellen aufgenommen und die Zellen durch Inkubation für 10 Minuten auf Eis lysiert. Anschließend erfolgte das **Shearing der DNA** in Fragmente von 200-1000 bp durch Ultraschallbehandlung mit Hilfe des Bioruptor Systems der Firma Diagenode. Die Proben wurden in 15 ml Gefäßen in einem Volumen von 500 bis maximal 2000 µl für 30 Sekunden mit anschließender 30-sekündiger Pause für insgesamt 16-18 Minuten bei 4°C sonifiziert. Um die Temperatur konstant zu halten, wurde nach 8-9 Minuten frisches Eis in die Ultraschallwanne zugegeben. Das Chromatin wurde schließlich in frische Mikroreaktionsgefäße überführt und bei 13000 UpM und 4°C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Zur Überprüfung der Fragmentierung der DNA wurde an dieser Stelle das Cross-Linking eines Aliquots durch Zugabe von 200 mM NaCl und Inkubation über Nacht bei 65°C aufgehoben. Die Qualität der gescherten DNA kann anhand dieser Probe durch reguläre Agarose-Gelelektrophorese dokumentiert werden.

Pro Immunpräzipitation wurden 200 µl Extrakt mit 1800 µl ChIP Dilution Puffer 1:10 verdünnt und jeweils 1% des verdünnten Extraktes als Input-Probe abgenommen und bei 4°C gelagert. Durch Vorinkubation der Extrakte mit 70 µl ProteinA-Agarose für 2-6 Stunden bei 4°C auf einem Rotationsrad wurden nachfolgend unspezifisch an die Matrix bindende Proteine entfernt (**Preclearing**). Zur Entfernung des Matrixmaterials wurden die Proben danach zweimal bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand jeweils in frische Gefäße überführt. Im Folgenden wurde den vorgereinigten Extrakten der entsprechende spezifische **Antikörper** (2-5 µg IgGs, 10-12 µl Serum, siehe 3.2.6) zugegeben. Als Kontrolle dienten unspezifische Antikörper. Nach Inkubation über Nacht auf einem Rotationsrad bei 4°C erfolgte die **Immunpräzipitation** der DNA-Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe von 70 µl ProteinA-Agarose und einstündigem Rotieren bei 4°C. Das Matrixmaterial wurde durch Zentrifugation bei 3000 UpM pelletiert und danach mit jeweils 1 ml für jeweils 5-10 Minuten mit 3 verschiedenen Waschpuffern von steigender Stringenz (siehe unten) sowie zweimal kurz mit TE Puffer **gewaschen**. Anschließend erfolgte die **Elution** der präzipitierten Komplexe von der Matrix durch zweimalige Zugabe von 250 µl Elutionspuffer und 15-

Material und Methoden

30-minütige Inkubation bei RT unter ständigem Rütteln. Die ProteinA-Agarose wurde durch Zentrifugation pelletiert und jeweils 200 µl Überstand abgenommen und gepoolt. Den 400 µl Eluat wurden zum **Aufheben des Cross-Linking** 16 µl 5M NaCl zugegeben und für 4h-üN bei 65°C inkubiert. In gleicher Weise wurde durch Zugabe von 200 mM NaCl das Cross-Linking der Input-Probe aufgehoben. Nach dem Trennen der DNA-Protein-Fixierung wurden die Proteine proteolytisch abgebaut. Dies geschah durch Zugabe von 8 µl 0,5 M EDTA, 16 µl 1 M Tris/Cl, pH 6,5 und 2 µl **Proteinase K** (10 mg/ml) und einstündiger Inkubation bei 45°C. Abschließend erfolgte die **Aufreinigung der DNA** mittels des PeqGold Cycle Pure DNA Purification Kits der Firma PeqLab entsprechend den Herstellerangaben. Es wurde die doppelte Probenvolumenmenge an Puffer XP1 zu den Ansätzen gegeben, durch Vortexen gründlich gemischt und die Proben auf die Säule aufgetragen. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13000 UpM wurde das Säulenmaterial zweimal mit je 600 µl Puffer SPW gewaschen, durch erneute Zentrifugation getrocknet und die DNA schließlich mit 30 µl Tris-Puffer eluiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert. Zur Analyse mittels regulärer **PCR** oder **qPCR** (siehe 3.3.2.6) mit entsprechenden für den zu untersuchenden DNA Bereich spezifischen Primern wurde jeweils 1 µl als Template eingesetzt.

37 % Formaldehyd
PBS (1 mM PMSF, 0,5x PIC frisch zugegeben)
1 M Glycin

Chromatin IP Kit (Upstate/Millipore):

SDS-Lysis Puffer

50 mM Tris/Cl, pH 8,1
10 mM EDTA
1% (w/v) SDS
1 mM PMSF (frisch zugegeben)
0,5x PIC (frisch zugegeben)

ChIP Dilution Puffer

16,7 mM Tris/Cl, pH 8,1
167 mM NaCl
1,2 mM EDTA
1,1% (v/v) Triton X-100
0,01% (w/v) SDS
1 mM PMSF (frisch zugegeben)
0,5x PIC (frisch zugegeben)

Material und Methoden

Low Salt Wash Buffer	20 mM Tris/Cl, pH 8,1 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% (v/v) Triton X-100 0,1% (w/v) SDS
High Salt Wash Buffer	20 mM Tris/Cl, pH 8,1 500 mM NaCl 2 mM EDTA 1% (v/v) Triton X-100 0,1% (w/v) SDS
LiCl Wash Buffer	10 mM Tris/Cl, pH 8,1 250 mM LiCl 1 mM EDTA 1% (v/v) NP-40 1% (w/v) Deoxycholat
TE Puffer	10 mM Tris/Cl, pH 8,0 1 mM EDTA
Elutionspuffer (frisch angesetzt)	100 mM NaHCO ₃ 1% (w/v) SDS

0,5 M EDTA, pH 8,0
1 M Tris/Cl, pH 6,5
10 mg/ml Proteinase K

PeqGold Cycle Pure DNA Purification Kit (PeqLab)

3.3.3.8 Luciferase Assay

Für Reporteragen-Analysen in transient oder stabil transfizierten Zelllinien wurden Luciferase-Assays durchgeführt. Als Reporteragen diente die cDNA des Enzyms Firefly-Luciferase (aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*). Die Luciferase setzt ihr Substrat D-Luciferin in Oxy-Luciferin um, wobei Licht emittiert wird, das in entsprechenden Luminometern gemessen werden kann. Das entstehende Lichtsignal ist der Enzymmenge und damit der Aktivität des Reporters proportional.

Mit entsprechenden Luciferase-Reporterkonstrukten transfizierte Zellen wurden auf 6 cm Zellkulturschalen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 µl Kaliumphosphatpuffer aufgenommen und die Zellen durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C aufgeschlossen. Zum Entfernen von unlöslichen Zellbestandteilen wurde der so gewonnene zytoplasmatische Extrakt bei 13000 UpM zentrifugiert und anschließend 50 µl Extrakt

Material und Methoden

mit 360 µl Assay-Puffer in Sarstedt-Röhrchen gemischt. Als Leerwert dienten 50 µl Kaliumphosphatpuffer. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte in einem Berthold Auto-Luminometer mit Injektionseinrichtung. Den Proben wurde dabei automatisch jeweils 100 µl Luciferin-Substratlösung zugegeben und die Lichtemission über ein Intervall von 10 Sekunden gemessen. Zum Abgleich der Transfektionseffizienzen und Bestimmung von relativen Luciferase-Werten wurden β -Galaktosidase-Reporterplasmide ko-transfiziert und zeitgleich ein Galaktosidase-Assay durchgeführt (siehe unten).

Kaliumphosphatpuffer	100 mM K ₃ PO ₄ , pH 7,8 1 mM DTT
Assay-Puffer	25 mM Glycylglycin, pH 7,8 15 mM K ₃ PO ₄ , pH 7,8 15 mM MgSO ₄ 4 mM EGTA 2 mM ATP 1 mM DTT
Luciferin-Lösung	25 mM Glycylglycin, pH 7,8 200 µM D-Luciferin 2 mM DTT

3.3.3.9 Dualer Luciferase Assay

Nach Kotransfektion eines Firefly-Luciferase Reporterkonstruktes mit einem Reporterplasmid, das die cDNA der Renilla- (*Renilla reniformis*) Luciferase unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors trägt, wurden zum Abgleich duale Luciferase Assays durchgeführt. Firefly- und Renilla-Luciferase weisen aufgrund ihres unterschiedlichen evolutionären Ursprungs verschiedene Substratspezifitäten auf. Die Renilla-Luciferase katalysiert die Oxidation ihres Substrates Coelenterazin, wobei Photonen emittiert werden. Das entstehende Lichtsignal ist auch hier zu der Enzymmenge und damit der Aktivität des Reporters proportional.

Es wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System der Firma Promega verwendet. Bei diesem System können die Enzymaktivitäten von Firefly- und Renilla-Luciferase nacheinander in einem Reaktionsansatz gemessen werden, da die Lichtemission der Firefly-Luciferase durch Zugabe des Renilla-Luciferase-Substrats im so genannten Stop&Glo-Puffer gequencht wird.

Transfizierte Zellen auf 24well- oder 96well-Zellkulturplatten wurden zweimal mit PBS gewaschen, anschließend 200 µl bzw. 40-50 µl Passiver Lysis-Puffer zugegeben und für

15 Minuten bei RT unter Schwenken inkubiert. Jeweils 20 µl Zellextrakt wurden in Sarstedt-Röhrchen vorgelegt, als Leerwert diente das gleiche Volumen an Lysis-Puffer. Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurde ein Berthold Auto-Luminometer mit Injektionsvorrichtung genutzt. Nach Injektion von 100 µl des Luciferase Assay Reagent II wurde die Firefly-Luciferase-Aktivität über einen Zeitraum von 10 Sekunden gemessen. Im Anschluss wurde die Injektionsvorrichtung gründlich gespült und nach Injektion von jeweils 100 µl der Stop&Glo-Reagenz die Lichtemission der Renilla-Luciferase ebenfalls über ein Intervall von 10 Sekunden gemessen. Zum Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen sowie unterschiedlicher Zellzahlen, die vor allem in Folge von RNAi-Experimenten auftraten, wurden die Firefly-Luciferase-Werte auf die Renilla-Luciferase-Aktivität normalisiert.

3.3.3.10 β -Galaktosidase-Assay

Zur Kontrolle und zum Abgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen in Säugerzellen wurden β -Galaktosidase-Assays nach Kotransfektion des Koreporter-Plasmids RSV- β -Gal durchgeführt. Dazu wurden jeweils 40 µl zytoplasmatischer Extrakt mit 250 µl Puffer Z gemischt. Als Leerwert wurden 40 µl Kaliumphosphatpuffer eingesetzt. Anschließend wurden jeweils 60 µl einer ONPG-Substratlösung zugegeben. Das Enzym β -Galaktosidase wandelt das farblose Substrat ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) in Galaktose und ortho-Nitrophenol (gelb) um. Die Proben wurden für mehrere Stunden bis zum Eintritt einer deutlichen Gelbfärbung bei 37°C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 M Na₂CO₃ abgestoppt und schließlich die Extinktion bei 420 nm gegen den Leerwert gemessen.

Puffer Z	60 mM Na ₂ HPO ₄ 40 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 50 mM β -Mercaptoethanol
ONPG-Substratlösung	4 mg/ml ONPG in Natriumphosphatpuffer, pH 7,0

4. Ergebnisse

4.1 Validierung des genomweiten RNAi-Screens in Insektenzellen: Identifizierung SUMO-abhängiger Korepressoren

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden durch einen genomweiten RNAi-Screen in *Drosophila melanogaster* Zellen insgesamt 185 Proteine identifiziert, deren dsRNA-vermittelte Depletion zu einer Aufhebung der Sp3-SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression führte, die also entweder die SUMOylierungs-Enzymatik regulieren oder am SUMO-abhängigen transkriptionellen Repressionsmechanismus beteiligt sind.

4.1.1 Validierung des genomweiten RNAi-Screens durch Re-Screen mit einem alternativen Reportersystem

Zunächst sollte untersucht werden, ob der dsRNA-vermittelte Knockdown dieser 185 Proteine zu einer Aktivierung der Sp3-vermittelten Transkription in Abhängigkeit von SUMO führt, oder ob manche dsRNAs die Transkription auch unabhängig vom SUMOylierungsstatus von Sp3 aktivieren. Aus diesem Grund wurden weitere Re-Screening-Verfahren durchgeführt, bei denen Expressionskonstrukte für Wildtyp-Sp3 als auch für eine SUMOylierungs-defiziente Mutante, bei der der Akzeptor-Lysinrest in einen Aspartatrest ausgetauscht wurde, eingesetzt wurden. Während die initialen Screens mit der großen Isoform von Sp3 durchgeführt wurden, wurden hier Expressionskonstrukte für die kleine Isoform von Sp3, die nur über eine Transaktivierungsdomäne verfügt, verwendet (Abb. 4.1). Um außerdem sicher zu stellen, dass die Ergebnisse unabhängig vom Promotorkontext sind, wurden die Experimente mit einem alternativen Reportersystem, bei dem ein SV40-Promotor mit fünf GC-Boxen die Firefly-Luciferase treibt, durchgeführt (Abb. 4.1). Zum Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen sowie unterschiedlicher Zellzahlen wurde ein konstitutiv aktiver Renilla-Luciferase Koreporter mit transfiziert.

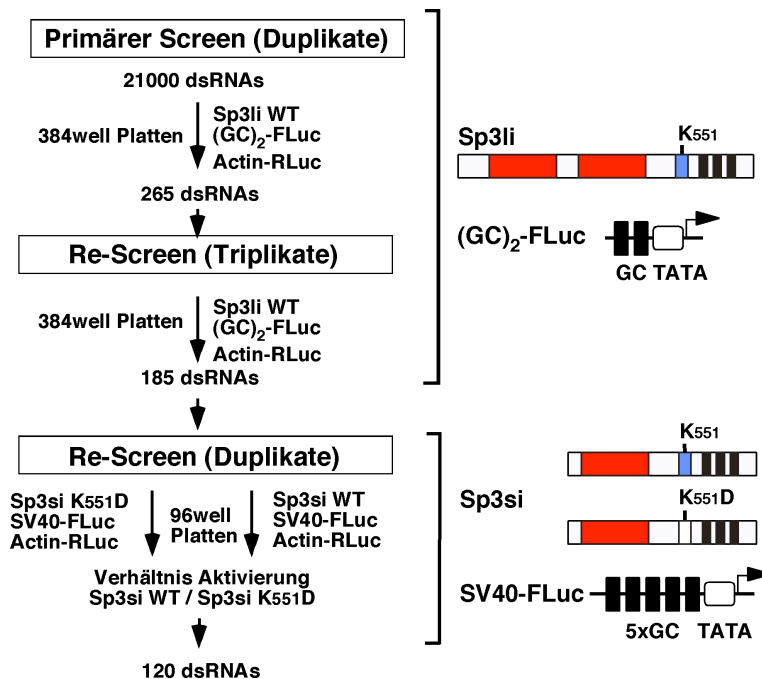


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes mit verschiedenen RNAi-abhängigen Screening-Verfahren in *Drosophila melanogaster* Zellen zur Identifizierung von am SUMO-abhängigen Repressionsmechanismus beteiligten Faktoren

Im initialen Screen wurden nach Transfektion eines Sp-abhängigen Reporterkonstruktes mit zwei GC-Boxen ((GC)₂-FLuc) sowie eines Plasmids zur Expression der großen Isoform von Sp3 (Sp3li) insgesamt 185 dsRNAs identifiziert, die zu einer Aktivierung der Sp3-vermittelten Transkription führten (oben). In dieser Arbeit beschriebenen Re-Screen-Verfahren wurde ein alternatives Reportersystem, bei dem das Firefly-Luciferase (FLuc) Reportergen durch den SV-40-Promotor mit 5 GC-Boxen getrieben wird, sowie Expressionskonstrukte für die kleine Isoform von Sp3 (Sp3si) verwendet, wobei sowohl Wildtyp Sp3 als auch eine SUMOylierungsdefiziente K₅₅₁D-Mutante exprimiert wurden (unten). Ein konstitutiv aktiver Aktin-Promotor getriebener Renilla-Luciferase (RLuc) Koreporter wurde jeweils mit transfiziert. Im Rahmen dieser Experimente wurden insgesamt 120 Proteine, deren dsRNA-vermittelter Knockdown zu einer spezifischen Aktivierung von SUMOyliertem Wildtyp Sp3 führte, identifiziert.

Nach Neusynthese aller 185 dsRNAs durch *in vitro*-Transkription wurde der Re-Screen auf 96well Platten in Duplikaten sowohl für Wildtyp-Sp3 als auch die SUMOylierungsdefiziente Mutante durchgeführt. Die Zellen wurden dazu auf der entsprechenden dsRNA ausplattiert, nach 24 Stunden die Reporterplasmide (SV40-FLuc, pPac-RLuc) sowie Expressionskonstrukte für die kurze Isoform von Sp3 (Sp3siWT) bzw. deren SUMOylierungs-defiziente Mutante (Sp3siK₅₅₁D) transfiziert und nach insgesamt 6 Tagen die Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen (siehe auch 3.3.1.4). Die gemessenen Firefly-Luciferase-Werte wurden auf die jeweilige Renilla-Luciferase-Aktivität normalisiert und anschließend durch Vergleich mit den Werten einer unspezifischen dsRNA gegen GFP der Effekt der spezifischen dsRNA auf die Aktivität von Wildtyp-Sp3 berechnet. Es wurde die x-fache Aktivierung des Reporters durch den

Ergebnisse

jeweiligen dsRNA-vermittelten Knockdown berechnet. Durch Vergleich der Aktivierung bei Wildtyp-Sp3 und der SUMOylierungs-defizienten Mutante konnte bestimmt werden, ob die Aktivierung der Sp3-vermittelten Transkription durch die dsRNAs in Abhängigkeit der SUMO-Modifikation von Sp3 erfolgte (siehe Tabelle 4.1). Auf diese Weise konnten 120 Proteine unter den untersuchten 185 identifiziert werden, deren Depletion die Sp3-vermittelte transkriptionelle Aktivität SUMO-abhängig mindestens um den Faktor 1,5 verstärkte; die also entweder die SUMO-Konjugation selbst oder die SUMO-vermittelte transkriptionelle Repression regulieren. Die Ergebnisse der durchgeführten Reporter-gen-Experimente sowie zusätzliche Informationen zu den molekularen und biologischen Funktionen der 120 Proteine und möglichen orthologen Säuger-Proteinen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Name	Screen Fache Aktivierung (GC) ₂ -FLuc Sp3li	Re-Screen Fache Aktivierung SV40-FLuc Sp3si	Re-Screen Fache Aktivierung SV40-FLuc Sp3si-K/D	Verhältnis Sp3si WT/KD SV40-FLuc	Molekulare und biologische Funktion	Säuger Orthologe
His4R (CG3379)	12.88	24.15	0.53	45.72	Nukleosom Assemblierung	Histon H4
His3	40.69	27.64	0.62	44.93	Nucleosome Assemblierung	Histon H3
His3.3A	33.42	23.78	0.65	36.79	Nukleosom Assemblierung	Histon H3.3
CG31302	13.75	13.11	0.66	19.88	Signaltransduktion	RIMBP2
His3.3B	29.73	13.81	0.87	15.84	Nucleosome Assemblierung	Histon H3.3
Kay	4.94	4.39	0.28	15.40	Transkriptionsfaktor	Fos
His4 (CG33885)	7.11	12.27	0.83	14.70	Nukleosom Assemblierung	Histon H4
Mi-2	6.59	10.14	1.39	7.30	ATP-abhängige DNA-Helikase	Mi-2β
Su(var)2-10	4.66	7.89	1.09	7.24	DNA-bindend, RNA-Helikase - bindend	PIAS1
Jra	5.63	1.97	0.29	6.80	Transkriptionsfaktor JNK-Kaskade	Jun-D
Lwr	13.27	5.28	0.78	6.73	SUMO-konjugierendes E2-Enzym	Ubc9
CAP	3.73	7.26	1.10	6.61	MAPKK Kaskade,	Unbekannt
CG2865	3.77	4.34	0.72	6.00	Unbekannt	Unbekannt
Sbb	7.92	5.51	1.06	5.18	Transkriptionsfaktor	ZNF608/609
CG1244	13.25	5.58	1.15	4.84	DNA-bindendes Zinkfinger-protein	Unbekannt (Ortholog von <i>C.elegans</i> MEP-1)
CG30387	17.67	10.51	2.19	4.79	Signaltransduktion	Kidins220
CG15654	4.33	6.68	1.42	4.70	Unbekannt	Unbekannt
CG14972	9.07	4.14	0.90	4.61	Unbekannt	Unbekannt
CG10616	11.39	4.86	1.09	4.46	Unbekannt	C1orf27
CG15422	4.87	4.45	1.04	4.30	Unbekannt	Unbekannt
Hoe1	8.59	3.60	0.86	4.17	Transporter-Aktivität	OCA2
Rep3	7.47	4.05	1.04	3.90	Apoptose	CIDEA
Pdm-2	7.95	3.18	0.82	3.89	Transkriptionsfaktor	Oct2
CG9432	6.52	3.19	0.83	3.84	Elektronentransport	Unbekannt
CG3996	9.52	2.37	0.63	3.75	DNA-bindend	Unbekannt
MAP205	8.44	3.72	1.00	3.72	Mikrotubuli-bindend	Unbekannt
GstD3	9.07	3.73	1.02	3.66	Glutathion-Transferase	GSTT2

Ergebnisse

Pcp	5.43	4.87	1.37	3.54	Strukturprotein	Unbekannt
CG5554	3.47	2.55	0.74	3.46	Elektronentransport	TXNDC
CG1513	6.65	3.98	1.17	3.40	Oxysterol-bindend	ORP-9
CG30463	3.77	3.62	1.08	3.34	Polypeptide N-acetylgalaktosaminyltransferase	GALNT11
CG15269	5.24	3.75	1.13	3.33	Transkriptionsfaktor	ZNF658B
CG9067	4.38	2.28	0.71	3.20	Unbekannt	HSPC176
CG7945 (CG17014)	8.87	3.88	1.22	3.17	Proteinfaltung (Chaperon)	BAG2
CG12379	9.17	2.55	0.82	3.12	Unbekannt	RP11-413M3.2
CG1814	9.50	5.85	1.88	3.10	Nukleinsäure Metabolismus	5'-Nucleotidase Domäne 3
CG14852	4.17	1.68	0.55	3.08	Unbekannt	Unbekannt
CG3964	4.68	2.97	1.00	2.97	Tubulin-Tyrosin Ligase-Aktivität	TTL4
CG3213	3.42	4.32	1.49	2.89	Ribosomales Protein	Unbekannt
CG13088	4.05	1.95	0.69	2.84	Unbekannt	Unbekannt
MTA1-like	5.14	2.93	1.04	2.82	NuRD-Komplex Untereinheit	MTA2
CG31814	3.54	5.25	1.87	2.81	Signaltransduktion	Unbekannt
CG6969	4.50	2.51	0.93	2.69	Peroxidase-Aktivität	PXDN
EIF4AIII	7.81	1.16	0.43	2.69	ATP-abhängige RNA-Helikase Aktivität	DDX48
HSP60D (CG16954)	4.99	2.98	1.12	2.65	Proteinfaltung (Chaperon)	HSP60
Ocho	4.60	3.59	1.37	2.62	Unbekannt	Unbekannt
PGRP-SC2	5.00	2.68	1.03	2.60	Peptidoglycan-bindend	PGRP-S
Patj	5.78	3.21	1.26	2.55	Protein-bindend	MPDZ
Ef1gamma	6.61	3.07	1.20	2.55	Translations-Elongations Faktor	EF-1-gamma
CG2010	6.90	2.58	1.01	2.54	Unbekannt	FBXL7
Taf5	3.66	3.37	1.34	2.51	Basaler Transkriptionsfaktor	Taf5
CG13966	6.70	4.40	1.77	2.49	Unbekannt	Unbekannt
Yem-alpha	3.71	2.53	1.02	2.48	DNA-bindend	Ubinuklein
CG14145	6.46	1.70	0.69	2.47	Unbekannt	BLOC1S2
CG30053	3.68	5.98	2.43	2.47	Unbekannt	Unbekannt
Sh	6.35	2.26	0.92	2.45	K-Kanal Protein	KCNA2
CG8515	8.72	2.18	0.89	2.45	Strukturprotein	Unbekannt
MRpL40	4.86	2.30	0.94	2.44	Ribosomales Protein	MRPL40
CG17189	5.84	2.48	1.02	2.43	Unbekannt	Unbekannt
Zfh-1	4.05	9.32	3.84	2.43	Transkriptionsfaktor	TCF8
CG12856	3.92	2.56	1.07	2.40	Unbekannt	Unbekannt
CG9426	5.89	3.60	1.53	2.35	Aktin-bindend	MIPP Protein
Toll-9	3.64	1.65	0.71	2.34	Transmembran Rezeptor	TLR1
EEF1delta	7.77	3.94	1.69	2.33	Translations-Elongations Faktor	EF-1-delta
LysC	5.44	1.66	0.72	2.30	Lysozym-Aktivität	Lysozym C
CG14656	4.49	1.54	0.67	2.29	Unbekannt	Unbekannt
CG10659	4.77	1.91	0.84	2.27	Unbekannt	Unbekannt
CG7685	5.44	2.05	0.91	2.25	Alpha-Glukosidase Aktivität	Unbekannt
Pros26	3.82	1.81	0.81	2.22	Ubiquitin-abhängiger Protein Katabolismus	PSMB1
Tsp42Eo	4.71	2.39	1.09	2.20	Unbekannt	Unbekannt
Gukh	3.79	1.53	0.71	2.16	Protein-bindend	NHS
CG13084	3.82	1.51	0.73	2.08	Unbekannt	Unbekannt
CG4567	5.36	2.04	1.00	2.03	Translations-Elongations Faktor	Elongation factor G1 (GFM1)
Pkg21D	14.96	2.86	1.46	1.97	cGMP-abhängige Protein-Kinase	cGKII
CG7056	7.03	1.79	0.92	1.94	Transkriptionsfaktor	Unbekannt
CG16975 (Sfmbt)	5.14	1.65	0.85	1.94	Chromatin-bindend	L3MBTL2
CG6762	5.32	2.16	1.12	1.93	DNA-bindend	SRXN1

Ergebnisse

CG13033	4.16	1.31	0.68	1.91	Unbekannt	Unbekannt
GlyP	4.28	2.71	1.42	1.91	Phosphorylase Aktivität	PYGM
Rpn5	7.70	1.96	1.04	1.89	Ubiquitin-abhängiger Protein Katabolismus	PSMD12
CG14770	10.09	1.88	1.03	1.83	Unbekannt	Unbekannt
CG32686	4.47	2.74	1.50	1.83	ATP Synthese	Unbekannt
Vir-1	4.35	1.21	0.66	1.82	Unbekannt	Unbekannt
Tsp29Fb	4.66	1.57	0.87	1.81	Rezeptor-bindend	TSPAN6
RdgA	6.78	2.58	1.43	1.80	Diacylglycerol-Kinase	DGKI
CG6020	5.33	2.17	1.20	1.80	NADH Dehydrogenase Aktivität	NDUFA9
CG4500	5.91	3.33	1.85	1.80	Fettsäure-CoA Ligase Aktivität	ACSBG2
ast	7.78	1.78	1.00	1.78	EGFR-Signaltransduktion	ASTE1
sd	5.23	1.86	1.05	1.78	Transkription Faktor	TEAD4 (TEF3)
Chd64	13.26	2.16	1.23	1.76	Aktin-bindend	TAGLN3
TRAF1	8.03	1.73	0.99	1.75	Toll-Rezeptor-Signaltransduktion	TRAF4
CG11050	3.73	4.40	2.52	1.75	Unbekannt	HDDC2
CG32150	4.32	1.49	0.85	1.74	Unbekannt	Unbekannt
And	6.66	1.94	1.12	1.74	Calmodulin-bindend	CALM2
CG5414	3.84	0.93	0.54	1.74	Isoleucine-tRNA Ligase Aktivität	IARS2
Chd3	4.06	1.82	1.05	1.74	ATP-abhängige DNA Helikase	CHD3
Hsp67Ba	6.07	2.84	1.64	1.73	Proteinfaltung, Stress-Antwort	HSPB1
CG5641	9.88	1.69	0.98	1.72	Transkriptions-Kofaktor Aktivität	ILF2 (NFAT Untereinheit)
CG14958	3.67	2.00	1.17	1.70	Unbekannt	Unbekannt
CG31872	3.46	1.63	0.96	1.70	Triacylglycerol Lipase Aktivität	Unbekannt
CG15636	3.78	1.86	1.10	1.69	Chromatin-bindend	CBX5 (HP1)
Esg	4.29	1.99	1.19	1.67	Transkriptionsfaktor	SNAI2 (SLUG)
CG7408	4.76	1.40	0.84	1.67	N-acetylgalactosamine-4-sulfatase	ARSB
CG10710	3.92	1.14	0.69	1.66	Unbekannt	Unbekannt
CG32066	8.72	1.95	1.17	1.66	Unbekannt	FAM49B
CG14053	4.00	1.19	0.72	1.65	Unbekannt	Unbekannt
CG6962	8.34	1.68	1.02	1.64	Unbekannt	FLJ20297
Nrx-1	7.62	6.17	3.77	1.64	Signaltransduktion	NRXN3
Or7a	5.67	1.51	0.94	1.60	G-Protein-vermittelte Signaltransduktion	Unbekannt
VhaSFD	5.92	2.17	1.37	1.59	ATPase Aktivität	ATP6V1H
CG13027	4.28	1.11	0.71	1.58	Unbekannt	Unbekannt
Dlp	4.90	2.14	1.36	1.57	Wnt-Rezeptor Signaltransduktion	GPC4
CG13937	5.55	1.99	1.27	1.57	HNK-1 sulfotransferase Aktivität	CHST11
Osi5	5.09	1.31	0.85	1.54	Unbekannt	Unbekannt
CG1973	6.69	1.64	1.07	1.53	Protein-Kinase	SCYL1
ERCC1	4.75	1.83	1.20	1.52	Endodesoxyribonuclease-Aktivität, DNA-Reparatur	ERCC1
Lk6	3.92	2.86	1.88	1.52	Protein-Kinase	MKNK2
Hsp70Bbb	4.24	1.63	1.08	1.51	Proteinfaltung (Chaperon)	Hsp70
CG14365	4.85	1.81	1.20	1.51	Unbekannt	Unbekannt
CG12753	6.06	2.11	1.40	1.51	Unbekannt	KIAA0350

Ergebnisse

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Reportergergen-Experimente nach dsRNA-vermitteltem Knockdown.

Der initiale Screen wurde mit Expressionskonstrukten für die lange Isoform von Sp3 (Sp3li) sowie dem GC₂-Fluc-Reporter durchgeführt. 185 dsRNAs, die den GC₂-FLuc-Reporter mindestens 3-fach aktivierten, wurden nach Neusynthese der dsRNAs in Duplikaten im einem Re-Screening-Verfahren erneut eingesetzt. Dabei wurde die Aktivierung eines SV40-FLuc-Reporters in Gegenwart der kleinem Isoform von Sp3 (Sp3si) bzw. der SUMOylierungs-defizienten Mutante (Sp3K₅₅₁D) nach dsRNA-vermitteltem Knockdown bestimmt. Das Verhältnis der Aktivierung in Gegenwart von Wildtyp Sp3 gegenüber der K₅₅₁D-Mutante gibt Aufschluss, ob die Reportergergen-Aktivierung in Abhängigkeit der SUMO-Modifikation von Sp3 erfolgte. Die angegebenen 120 dsRNAs aktivierten die Sp3-vermittelte Transkription SUMO-abhängig mindestens um den Faktor 1,5. Es sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden, dargestellt. Die Informationen über mögliche molekulare und biologische Funktionen basieren auf Datenbank-Annotationen (<http://www.flybase.org>) und/oder BLAST-Analysen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Säuger-Orthologe wurden ebenfalls über Flybase und/oder BLAST-Analysen identifiziert.

Diese 120 Proteine wurden basierend auf Datenbank-Annotationen (<http://flybase.bio.indiana.edu/>), dem Vorkommen bestimmter funktioneller Proteindomänen oder anhand von bereits vorhandener Literatur in funktionelle Klassen eingeteilt. Eine Übersicht bietet Abbildung 4.2.

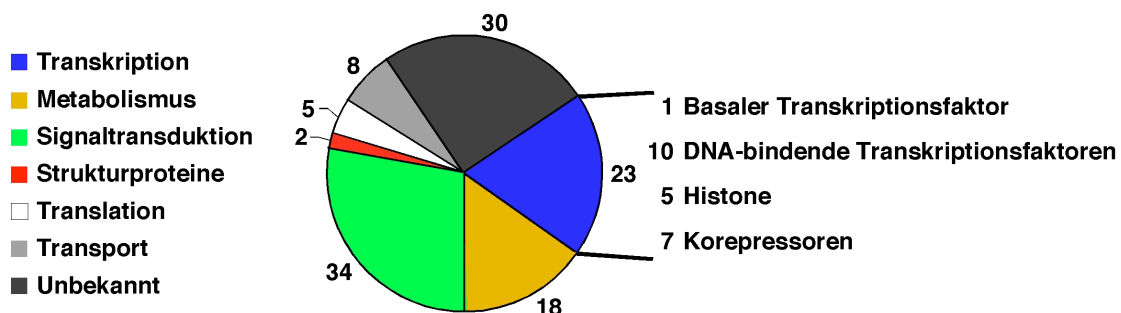


Abbildung 4.2: Funktionelle Einteilung der 120 identifizierten Proteine

Unter den identifizierten Genen befinden sich auch zwei bekannte Komponenten der SUMOylierungs-Maschinerie: Zum einen *Lwr*, das für das SUMO-E2-Enzym dUbc9 codiert, zum anderen *Su(var)2-10*, das für das *Drosophila* PIAS-Protein (dPIAS oder auch ZIMP) codiert. Das Säuger-Orthologe PIAS1 besitzt eine SUMO-E3-Ligase-Aktivität gegenüber Sp3 *in vitro* (Sapetschnig et al. 2002). Es liegt somit nahe, dass auch *Drosophila* PIAS die Funktion einer SUMO-E3-Ligase übernehmen kann. Die Identifizierung von Enzymen der SUMO-Konjugations-Kaskade bestätigt die Effektivität des durchgeführten RNAi-Screens.

4.1.2 Knockdown mit alternativen dsRNAs

Beim dsRNA-vermittelten gezielten Knockdown von bestimmten Genen kann es vorkommen, dass durch die Vielzahl an entstehenden siRNA-Molekülen neben der eigentlichen Zielsequenz auch andere mRNAs erkannt und somit unspezifische Proteine depletiert werden (Kulkarni et al. 2006; Ma et al. 2006). Um diese so genannten Off-Target-Effekte zu minimieren und um weitere falsch-positive Kandidaten auszuschließen, wurden für 40 Kandidaten, deren Depletion die stärkste De-Repression von Sp3-SUMO zeigte, alternative, sofern möglich nicht überlappende dsRNAs synthetisiert und parallel zu den dsRNAs der RNAi Bibliothek (HFA dsRNA) in Reportergergen-Experimenten eingesetzt. Das Design der alternativen dsRNAs erfolgte dabei mit Hilfe der GenomeRNAi Database (DKFZ, Heidelberg) (www.dkfz.de/signaling2/rnai/).

Drosophila Kc₁₆₇ Zellen wurden in Duplikaten auf 96well Platten mit den entsprechenden dsRNAs inkubiert und nach Transfektion von Expressionskonstrukten für die kleine Isoform von Wildtyp Sp3 bzw. der SUMOylierungs-defizienten Mutante sowie des Sp3-abhängigen SV40-FLuc Reporterplasmids die Reportergergenaktivität bestimmt. Zur Normalisierung wurde wieder ein konstitutiv aktiver Renilla-Luciferase Reporter kotransfiziert. Auch hier wurde die Aufhebung der Repression durch den dsRNA-vermittelten Knockdown im Vergleich zu einer Probe mit unspezifischer dsRNA in Anwesenheit von SUMO-modifiziertem Wildtyp Sp3 bestimmt. Dazu wurde die x-fache Reportergergen-Aktivierung, die durch die Depletion des jeweiligen Proteins hervorgerufen wurde, bestimmt. Durch Vergleich der jeweiligen Aktivierung in Gegenwart der SUMOylierungs-defizienten Mutante (Verhältnis x-fache Aktivierung: Sp3siWT/Sp3siK₅₅₁D) konnte die SUMO-abhängige Aufhebung der transkriptionellen Repression dargestellt werden.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse bietet Abbildung 4.3. Während alle HFA dsRNAs aus der RNAi Bibliothek zu einer deutlichen SUMO-abhängigen Aktivierung der Sp3-vermittelten Transkription führten, verstärkten nur etwa die Hälfte (19 von 40) der alternativen dsRNAs die transkriptionelle Aktivität von SUMO-modifiziertem Sp3 mehr als 1,5-fach (in Abb. 4.3 in blau dargestellt). Die entsprechenden Proteine spielen also offenbar eine entscheidende Rolle entweder bei Regulation der SUMO-Konjugation selbst oder aber bei der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression. Ob es bei den „inaktiven“ 21 alternativen dsRNAs (in Abb. 4.3 in rot dargestellt) aufgrund eines ineffektiven Knockdowns der entsprechenden Zielproteine zu keiner Aktivierung des Reporters gekommen ist, oder ob die jeweiligen HFA dsRNAs nur

Ergebnisse

aufgrund von Off-Target-Effekten die Sp3-SUMO-abhängige Transkription aktivierten, ist unklar und wurde nicht weiter verfolgt.

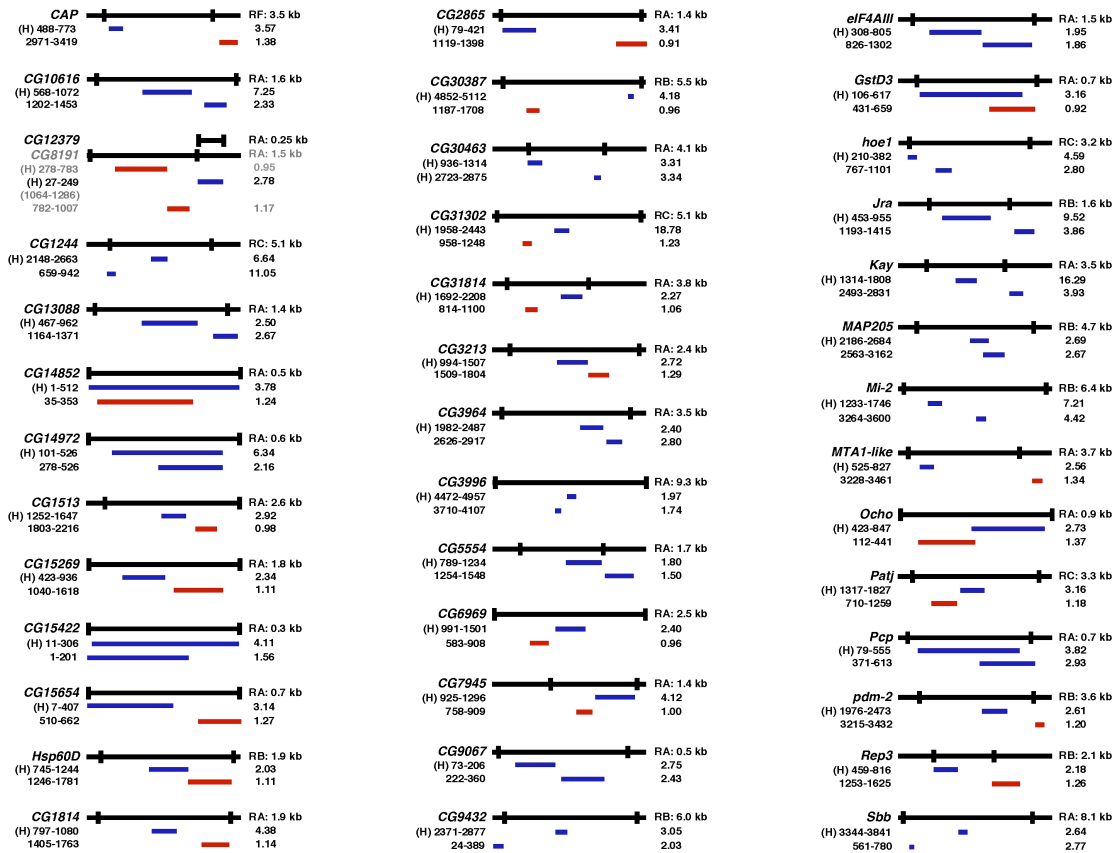


Abbildung 4.3: Aufhebung der Sp3-SUMO-abhängigen Repression durch alternative dsRNAs gegen 40 Proteine

Reporter-Experimente nach Depletion von 40 Proteinen mittels zwei verschiedener dsRNAs. *Drosophila* *Kc167* Zellen wurden auf 96well Platten mit jeweils 1 µg dsRNA ausplattiert und nach 24 Stunden mit dem SV40-FLuc Reporter, dem pPac-RLuc Koreporter sowie Konstrukten zur Expression der kleinen Isoform von Sp3 bzw. einer SUMOylierungs-defizienten Mutante (Sp3siK₅₅₁D) transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurden die Reporter-Gen-Aktivitäten im dualen Luciferase Assay bestimmt und die SV40-FLuc-Reporteraktivität auf die Aktivität des konstitutiven RLuc-Reporters normalisiert.

Die mRNAs der 40 untersuchten Zielproteine sind schematisch mit den jeweiligen Start- und Stopcodons dargestellt (nach Flybase). Bei mehreren annotierten Transkripten wurde die jeweils längste mRNA angegeben. Blaue und rote Linien repräsentieren Größe und Position der verwendeten dsRNAs im Bezug auf die jeweilige mRNA (Zahlen links in Basenpaaren). Die obere Linie unter der mRNA stellt die in der RNAi-Bibliothek verwendete HFA dsRNA (H) dar, die untere die neue alternative dsRNA. Die Zahlen rechts der dsRNAs geben die normalisierte Sp3-SUMO-abhängige x-fache Aktivierung (Verhältnis Aktivierung Sp3siWT/Sp3siK₅₅₁D) des SV40-Reporters nach Depletion des Proteins durch die jeweilige dsRNA bezogen auf eine unspezifische dsRNA gegen GFP an. Es ist der durchschnittliche Wert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils im Duplikat durchgeführt wurden, angegeben. Zur besseren Unterscheidung sind dsRNAs, die die transkriptionelle Aktivität von SUMOyliertem Wildtyp Sp3 mindestens um den Faktor 1,5 erhöhten in blau dargestellt, diejenigen, die die Sp3-SUMO-vermittelte Repression nicht signifikant aufhoben, sind in rot dargestellt.

4.1.3 Identifizierung von Proteinen, die die SUMOylierungs-Enzymatik oder den SUMO-abhängigen Repressionsmechanismus beeinflussen

Der durchgeführte RNAi-Screen erlaubte keine Unterscheidung, ob die identifizierten Faktoren die SUMO-Konjugations-Maschinerie beeinflussen oder ob sie nach der SUMOylierung die SUMO-abhängige transkriptionelle Repression vermitteln (Abb. 4.4). Der dsRNA-vermittelte Knockdown eines Proteins, das an der SUMOylierungs-Enzymatik selbst beteiligt ist oder diese reguliert, führt zu einer verminderten SUMO-Modifikation von Sp3. Dagegen sollte es bei der Depletion eines Proteins, das nach der SUMO-Konjugation am SUMO-vermittelten Repressions-Mechanismus beteiligt ist, zu keiner Änderung der relativen Menge an SUMO-modifiziertem Sp3 kommen. In beiden Fällen führt der Knockdown der entsprechenden Proteine zu einer Aufhebung der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression.

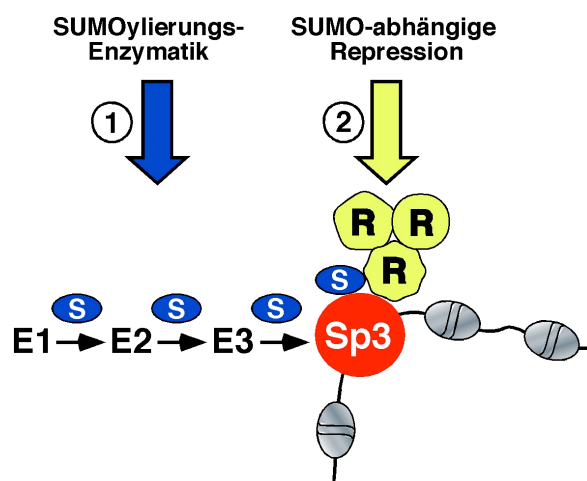


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der SUMO-Konjugations-Maschinerie sowie des SUMO-vermittelten transkriptionellen Repressionsmechanismus

Zu einer Aufhebung der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression kommt es 1. wenn Proteine der SUMOylierungs-Enzymatik (E1, E2, E3) bzw. deren Regulatoren depletiert werden oder 2. wenn SUMO-abhängige Korepressoren (R) oder deren Regulatoren entfernt werden.

Um zwischen Faktoren zu unterscheiden, die die SUMOylierungs-Enzymatik selbst beeinflussen oder aber als SUMO-abhängige Korepressoren fungieren, wurde die relative SUMOylierung von Sp3 nach Inkubation mit verschiedenen dsRNAs in quantitativen Immunoblot-Experimenten bestimmt. Aufgrund der gegebenen experimentellen Ungenauigkeiten der quantitativen Western-Blot Analysen, wurden dabei nur dsRNAs eingesetzt, die die Sp3-vermittelte Transkription mindestens um den Faktor 2,5 aktivierten. Darüber hinaus wurden nur Kandidaten untersucht, deren RNAi-

Ergebnisse

vermittelter Knockdown mit mindestens zwei alternativen dsRNAs zu einer Aufhebung der transkriptionellen Repression durch Sp3-SUMO führte.

Zur Analyse der relativen SUMOylierung von Sp3 nach dsRNA-vermittelterm Knockdown wurden *Drosophila melanogaster* Zellen für mindestens 6 Tage mit der entsprechenden dsRNA inkubiert und ein Expressionsplasmid für die Expression der langen Isoform von Sp3 transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, SDS-Gesamtzellextrakte präpariert und mittels quantitativer Western-Blot-Analyse mit fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern die relative SUMOylierung von Sp3 bestimmt.

Insgesamt wurden auf diese Weise 20 verschiedene dsRNAs, die zu einer deutlichen Aktivierung der Transkription durch Sp3-SUMO führten, analysiert. Ein repräsentativer chemo-lumineszenter Western-Blot ist in Abbildung 4.5A. dargestellt. Die Depletion von SUMO selbst führte zu einem vollständigen Verlust der SUMO-modifizierte Form von Sp3. Darüber hinaus war auch nach dsRNA-vermittelterm Knockdown des SUMO-E2-Enzyms Ubc9 aber auch von *Drosophila* PIAS eine Reduktion der SUMOylierung von Sp3 um etwa 50 % zu beobachten. Dieses Ergebnis legt nahe, dass auch *Drosophila* PIAS die Funktion einer SUMO-E3-Ligase gegenüber Sp3 übernehmen kann. Dagegen führte die Depletion der potentiellen Korepressoren Mi-2 und MEP-1 zu keiner Reduktion der SUMOylierung von Sp3. Mi-2 und MEP-1 beeinflussen also nicht die SUMOylierungs-Enzymatik selbst, sondern scheinen die transkriptionelle Repression zu vermitteln.

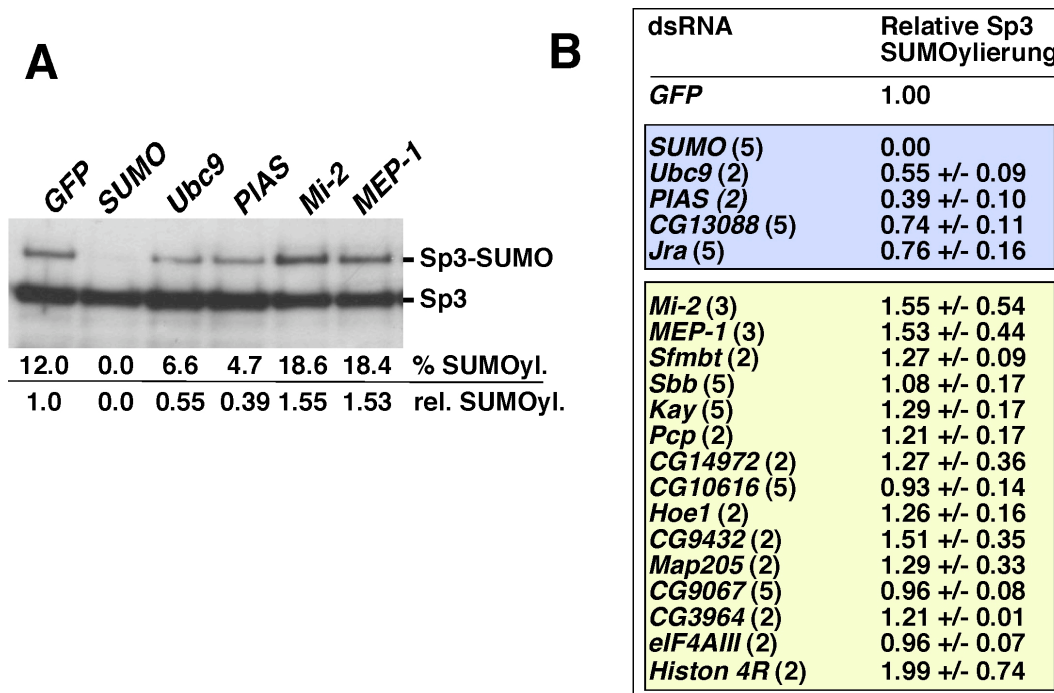


Abbildung 4.5: Immunoblot-Analysen zur Bestimmung der relativen SUMOylierung von Sp3 nach dsRNA-vermitteltem Knockdown

A: Repräsentativer chemo-lumineszenter Immunoblot. *Drosophila* Kc₁₆₇ Zellen wurden auf 24well Platten mit 6 µg der angegebenen dsRNAs ausplattiert und nach 24 Stunden mit einem Expressionskonstrukt für Wildtyp Sp3 (pPac-USp3) transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurden SDS-Gesamtzellextrakte präpariert und im Western-Blot mit α-Sp3 Antikörpern analysiert. Die angegebenen Werte (Prozent SUMOylierung und relative SUMOylierung von Sp3) wurden mittels quantitativer Immunoblots mit Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern ermittelt.

B: Zusammenfassung der Ergebnisse der quantitativen Western-Blot Analysen. Angegeben ist die durchschnittliche relative SUMOylierung von transient exprimiertem Sp3 nach dsRNA-vermitteltem Knockdown. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der jeweils durchgeführten unabhängigen Experimente an. Die dsRNA-vermittelte Depletion aller angegebenen Proteine führte zu einer deutlichen Aktivierung der Sp3-SUMO-abhängigen Transkription. Nur die Depletion von 5 Proteinen geht mit einer Reduktion der relativen SUMOylierung von Sp3 einher, während die restlichen 15 die Menge an SUMOylierten Sp3 nicht vermindern.

Neben den Faktoren der SUMOylierungs-Enzym-Kaskade wurde in zusätzlichen quantitativen Western-Blot-Analysen nur noch zwei weitere Proteine identifiziert, deren Depletion zu einer signifikanten Reduktion der Sp3-SUMOylierung führte (Abb. 4.5B) und somit direkt oder indirekt die SUMOylierungs-Maschinerie regulieren. Es handelt sich um den Transkriptionsfaktor Jra (Insekten-Orthologes des Säuger Transkriptionsfaktors Jun) sowie ein bisher uncharakterisiertes Protein (CG 13088). Beide reduzieren die SUMO-Modifikation von Sp3 um etwa 25%. Auf welche Weise diese Proteine die SUMOylierungs-Enzymatik regulieren ist nicht bekannt; möglicherweise reguliert Jra die Expression der Enzyme der SUMOylierungs-Kaskade. Interessanterweise hatte allerdings der Knockdown von Kay (Fos), Partner von Jra im heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1, keine Reduktion der relativen SUMOylierung von Sp3 zur Folge (Abb. 4.5B).

Die Depletion von weiteren fünfzehn Proteinen mittels dsRNA führte zu keiner Reduktion der SUMO-Modifikation von Sp3, im Gegenteil in den meisten Fällen ist eine leichte Verstärkung der SUMO-Konjugation zu beobachten (Abb. 4.5B). Dies legt nahe, dass diese Proteine nach der SUMO-Konjugation den SUMO-abhängigen Repressionsmechanismus regulieren. Durch den Knockdown der Proteine, die an der Repression beteiligt sind, kommt es möglicherweise zu der beobachteten Verstärkung der Sp3-SUMOylierung. Man könnte spekulieren, dass die DeSUMOylierung durch entsprechende Isopeptidasen ein mit dem Repressionsvorgang gekoppeltes Ereignis ist.

4.1.4 Potentielle SUMO-abhängige Korepressoren

Proteine, die direkt als SUMO-abhängige Korepressoren fungieren, sollten die folgenden Kriterien erfüllen: 1. die dsRNA-vermittelte Depletion des Proteins sollte SUMO-abhängig zu einer Aufhebung der transkriptionellen Repression führen; 2. der Knockdown des Proteins sollte nicht die SUMO-Konjugation selbst reduzieren; 3. es sollte sich um im Zellkern lokalisierte Proteine handeln, die aber 4. wahrscheinlich keine DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren sind. Proteine, die diese Kriterien erfüllen, sind: Mi-2 (CG8103), Chd3 (CG9594), CG1244, Sfmbt (CG16975) und Scribbler (Sbb, Bks, CG5580) (Abb. 4.6).

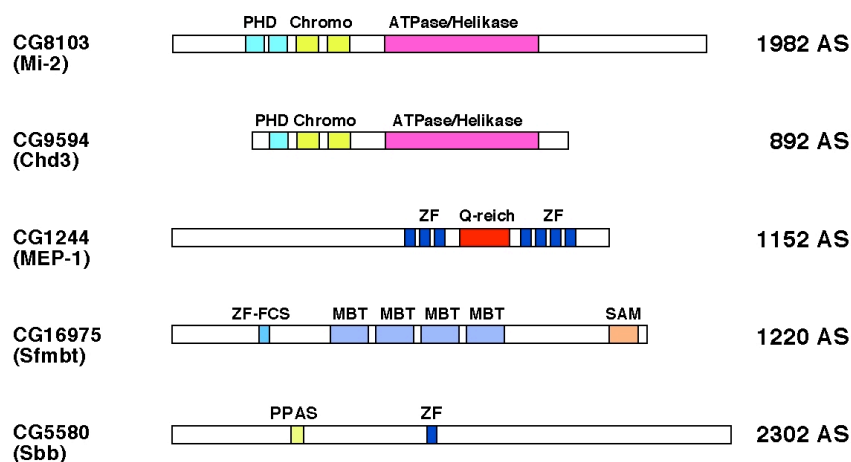


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung potentieller SUMO-abhängiger Korepressoren

PHD: Plant Homeodomain Finger, Chromo: Chromatin Organization Modifier Domain, ATPase/Helikase: DEAD-ähnliche Helikase Domäne, ZF: C₂H₂ Zinkfinger, Q-reich: Domäne reich an Glutaminresten, ZF-FCS: FCS Zinkfinger, MBT: Malignant Brain Tumor, SAM: Sterile Alpha Motif, PPAS: Phosphopantethein-bindende Domäne, AS: Aminosäuren.

Drosophila **Mi-2** (CG8103) gehört zur CHD (Chromodomain Helicase DNA-binding)-Familie der ATP-abhängigen Chromatin remodellierenden Enzyme. Mi-2 bildet assoziiert mit anderen Proteinen die katalytische Untereinheit des Multiprotein-Korepressor-Komplexes NuRD (Nucleosome Remodelling and Deacetylase) (Bowen et al. 2004; Bouazoune und Brehm 2006). Mi-2 besitzt verschiedene funktionelle Proteindomänen: Zwei für die Remodelling-Funktion essentielle Chromo-Domänen (Bouazoune et al. 2002), zwei PHD-Finger sowie eine DEAD-Helikase-ähnliche ATPase-Domäne (Abb. 4.6).

Chd3 (CG9594) ist ein weiteres Mitglied der CHD-Familie von Chromatinremodellierenden Faktoren. Es ist ein paraloges Protein von Mi-2, verfügt ebenfalls über zwei Chromo-Domänen und über eine ATPase/Helikase-Domäne; allerdings nur

über einen PHD-Finger. Außerdem fehlen gegenüber Mi-2 N- und C-terminale Abschnitte (Abb. 4.6). Ähnlich wie dMi-2 ist dChd3 in der Lage, die Nukleosomenstruktur durch Remodelling ATP-abhängig sowie in Abhängigkeit der Chromo-Domänen *in vitro* zu verändern. Im Gegensatz zu Mi-2 liegt Chd3 *in vivo* in monomerer Form vor (Murawska et al. 2008).

CG1244 ist ein *Drosophila melanogaster* Orthologes des *C. elegans* Proteins MEP-1 und wird daher im Folgenden als *Drosophila* **MEP-1** bezeichnet. Es handelt sich um ein Protein mit sieben Zinkfingern (Abb. 4.6). In *C. elegans* ist eine Assoziation von MEP-1 mit Mi-2 (LET-418, CHD4) beschrieben (Unhavaithaya et al. 2002) und auch in *Drosophila* liegt dMEP-1 assoziiert mit einer dMi-2-Fraktion außerhalb des dNuRD-Komplexes vor (A. Brehm, persönliche Kommunikation).

Drosophila **Sfmbt** (CG16975), ein Protein mit vier so genannten MBT-Domänen, interagiert mit dem Polycomb-Protein Pho und bildet so einen neuartigen Polycomb-Repressor-Komplex (PhoRC, Pho-repressive complex) neben den klassischen Polycomb-Komplexen PRC1 und PRC2 (Klymenko et al. 2006). Sfmbt bindet über die MBT-Domänen an mono- und dimethylierte Lysinreste K9 und K20 in den Histonen H3 bzw. H4 und vermittelt so die transkriptionelle Repression durch den Polycomb-Komplex (Klymenko et al. 2006).

Scribbler (Sbb, CG5580) ist ein auch unter dem Namen Brakeless (Bks) als Transkriptionsfaktor in Flybase annotiertes Zinkfinger-Protein. Mittlerweile ist bekannt, dass Sbb als transkriptioneller Korepressor fungiert (Wehn und Campbell 2006; Haecker et al. 2007).

4.1.5 Validierung der RNAi-Phänotypen in einer alternativen Zelllinie

Alle Experimente zur Identifizierung der potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren erfolgten in *Drosophila* Kc₁₆₇-Zellen. Um auszuschließen, dass die Effekte durch den RNAi-vermittelten Knockdown Zelltyp-spezifisch sind, wurden die Reportergergen-Experimente nach Depletion der verschiedenen potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren in einer alternativen *Drosophila melanogaster* Zelllinie wiederholt. Dazu wurden *Drosophila* SL-2 Zellen mit den jeweiligen dsRNAs inkubiert und die entsprechenden Reporterkonstrukte sowie die Expressionskonstrukte für Sp3siWT bzw. Sp3siK₅₅₁D wie zuvor transfiziert. Die Analyse der Reportergergenaktivität nach dsRNA-Knockdown zeigte auch hier eine partielle Aufhebung der transkriptionellen Repression in Anwesenheit von SUMO-modifiziertem Wildtyp Sp3 durch die Depletion der verschiedenen Korepressoren, während die Aktivität der

SUMOylierungs-defizienten Mutante nicht beeinflusst wurde (Abb. 4.7). Einzig beim Knockdown von Sbb wurde die Sp3-SUMO-vermittelten Transkription nicht signifikant aktiviert. Ob dies auf eine ineffiziente Depletion von Sbb in SL-2 Zellen zurückzuführen ist, oder ob Sbb spezifisch nur in Kc₁₆₇-Zellen an der SUMO-abhängigen Repression beteiligt ist, ist momentan unbekannt.

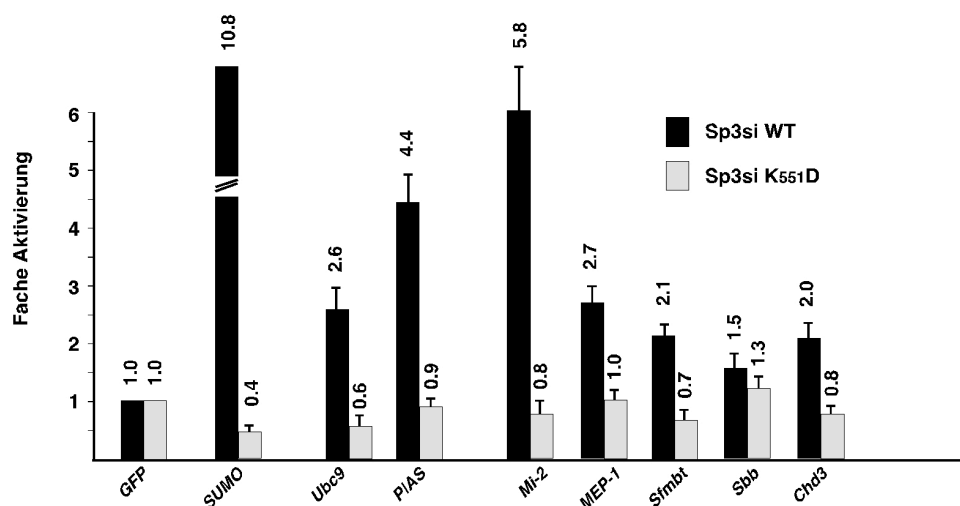


Abbildung 4.7: RNAi Experimente in *Drosophila* SL2 Zellen

Drosophila SL2 Zellen wurden auf 96well Platten mit jeweils 1 µg dsRNA gegen die angegebenen Gene ausplattiert und nach 24 Stunden mit Reporterplasmiden (SV40-FLuc und pPac-RLuc Kontrollreporter) sowie Expressionskonstrukten für die kleine Isoform von Sp3 (pPac-Sp3si) bzw. deren SUMOylierungs-defizienter Mutante (pPac-Sp3siK₅₅₁D) transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurden im dualen Luciferase-Assay die FLuc- und RLuc-Reporteraktivität bestimmt. Die Aktivität des Sp3-abhängigen SV40-FLuc-Reporters wurde bezogen auf die Aktivität des konstitutiv aktiven pPac-RLuc-Koreporters normalisiert und die x-fache Reporteraktivierung nach dsRNA-vermitteltem Knockdown bezogen auf eine unspezifische dsRNA gegen GFP berechnet. Der Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (+/- SD) ist dargestellt.

4.1.6 Kontrolle der Knockdown Effizienzen

Um sicherzustellen, dass die Aufhebung der SUMO-abhängigen Repression durch RNAi gegen die verschiedenen potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren auch mit einer Depletion der entsprechenden Proteine einhergeht, wurde der Knockdown von Mi-2, MEP-1, Smbt und Sbb in Immunoblot-Analysen untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Proteine in *Drosophila* Zellen mit bis zu vier verschiedenen alternativen dsRNAs depletiert (Abb. 4.8A) und parallel die Knockdown-Effizienz im Western-Blot (Abb. 4.8B) sowie der Effekt auf die Sp3-abhängige Transkription in Reporter-Experimenten untersucht (Abb. 4.8C).

Ergebnisse

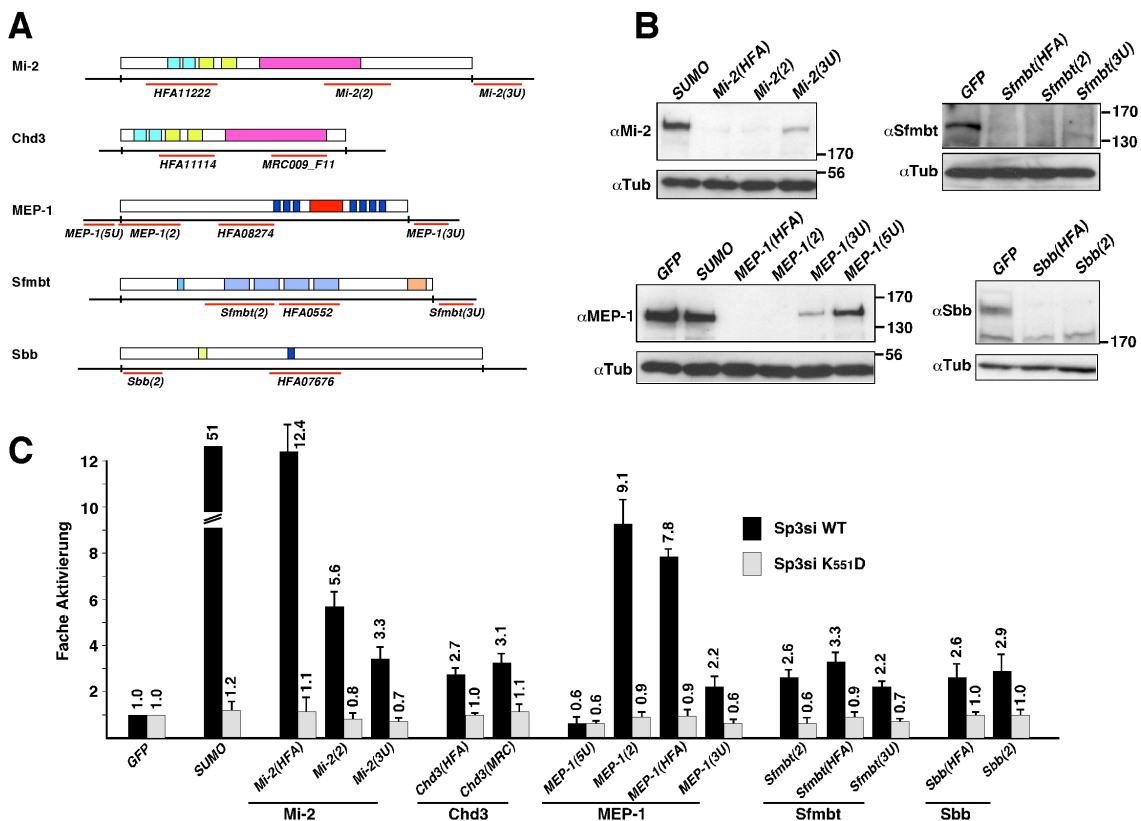


Abbildung 4.8: Depletion potentieller SUMO-abhängiger Korepressoren mit alternativen dsRNAs

A: Position der verschiedenen eingesetzten dsRNAs zum RNAi-vermittelten Knockdown der angegebenen Proteine relativ zum jeweiligen Transkript bzw. Protein

B: Immunoblot-Analyse zur Kontrolle der Depletion von Mi-2, MEP-1, Sfmtb und Sbb durch die in (A) angegebenen dsRNAs. *Drosophila* Kc₁₆₇ Zellen wurden auf 24well Platten mit jeweils 6 µg der unterschiedlichen dsRNAs inkubiert, nach 6 Tagen Gesamtzell- oder Kernextrakte präpariert und diese in Immunoblot-Analysen mit den entsprechenden Antikörpern analysiert.

C: Partielle Aufhebung der transkriptionellen Repression durch SUMOyliertes Sp3 nach dsRNA-vermitteltem Knockdown von Mi-2, Chd3, MEP-1, Sfmtb und Sbb. Kc₁₆₇ Zellen wurden auf 96well Platten in Duplikaten mit jeweils 1 µg der in (A) angegebenen dsRNAs ausplattiert und nach 24 Stunden mit dem SV40-FLuc Reporter, dem pPac-RLuc Koreporter sowie Konstrukten zur Expression der kleinen Isoform von Sp3 (Sp3si) bzw. der SUMOylierungs-defizienten Mutante (Sp3siK_{551D}) transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurden die Reporter-Gen-Aktivitäten im dualen Luciferase Assay bestimmt und die SV40-FLuc-Reporteraktivität auf die Aktivität des konstitutiven RLuc-Reporters normalisiert. Schließlich wurde die x-fache normalisierte Reporter-Gen-Aktivierung nach Knockdown durch die jeweilige dsRNA bezogen auf eine unspezifische dsRNA gegen GFP berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (+/- SD).

Alle bis auf eine der eingesetzten dsRNAs waren in der Lage, die Repression in Anwesenheit von SUMO-modifiziertem Sp3 partiell aufzuheben; hatten dabei aber keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität der SUMOylierungs-defizienten Sp3-

Mutante (Abb. 4.8C). Wie die parallel durchgeführten Immunoblots zeigten, war diejenige dsRNA, die zu keiner Aktivierung der Sp3-SUMO-vermittelten Transkription führte (MEP-1(5U)), nicht in der Lage, die Expression von MEP-1 entscheidend zu reduzieren (Abb. 4.8B). Die Inkubation mit allen anderen dsRNAs führte dagegen zu einer deutlichen Depletion der entsprechenden Proteine.

Es zeigte sich also eine eindeutige Korrelation zwischen der Fähigkeit der dsRNAs die Sp3-SUMO-vermittelte transkriptionelle Repression aufzuheben und deren Effizienz, die entsprechenden Proteine zu depletieren. Dies legt nahe, dass der spezifische dsRNA-vermittelte Knockdown des jeweiligen Korepressors dafür verantwortlich ist, dass es zu einer Aktivierung der Sp3-SUMO-abhängigen Transkription kommt. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die alternative dsRNA gegen Chd3 (MRC009_F11) zu einem spezifischen Knockdown von Chd3 führte, während die Expression des Paralogen Mi-2 nicht beeinflusst war (Murawska et al. 2008). Dies lässt vermuten, dass beide sehr eng verwandte Proteine eine entscheidende Rolle bei der SUMO-vermittelten Repression spielen.

4.1.7 Validierung der RNAi-Phänotypen nach Depletion von Mi-2, MEP-1 und Sfmbt durch Rescue-Experimente

Um die Bedeutung von Mi-2, MEP-1 und Sfmbt in der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression weiter zu validieren, wurden so genannte Rescue-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die endogenen Proteine durch dsRNAs gegen das offene Leseraster (HFS dsRNA) sowie gegen den 3'-nicht-translatierten Bereich (3U) der jeweiligen mRNA depletiert (Abb. 4.9A-C). Nach Re-Expression von Mi-2, MEP-1 bzw. Sfmbt durch Expressionskonstrukte, die nur das jeweilige offene Leseraster (ohne die 3'-nicht-translatierten Bereiche) der jeweiligen mRNA enthielten (Rescue mRNA), konnte die Aktivierung der Sp3-SUMO-vermittelten Repression durch die HFA dsRNA teilweise aufgehoben werden (Abb. 4.9A-C). Zu einer vollständigen Aufhebung (Rescue) der dsRNA-vermittelten transkriptionellen Aktivierung nach Re-Expression der Korepressoren kam es bei der Verwendung von dsRNAs gegen den 3'-nicht-translatierten Bereich. In diesem Fall wird die Rescue-mRNA nicht durch die jeweilige dsRNA erkannt und das re-exprimierte Protein kann den RNAi-vermittelten Phänotyp aufheben (Abb. 4.9A-C).

Ergebnisse

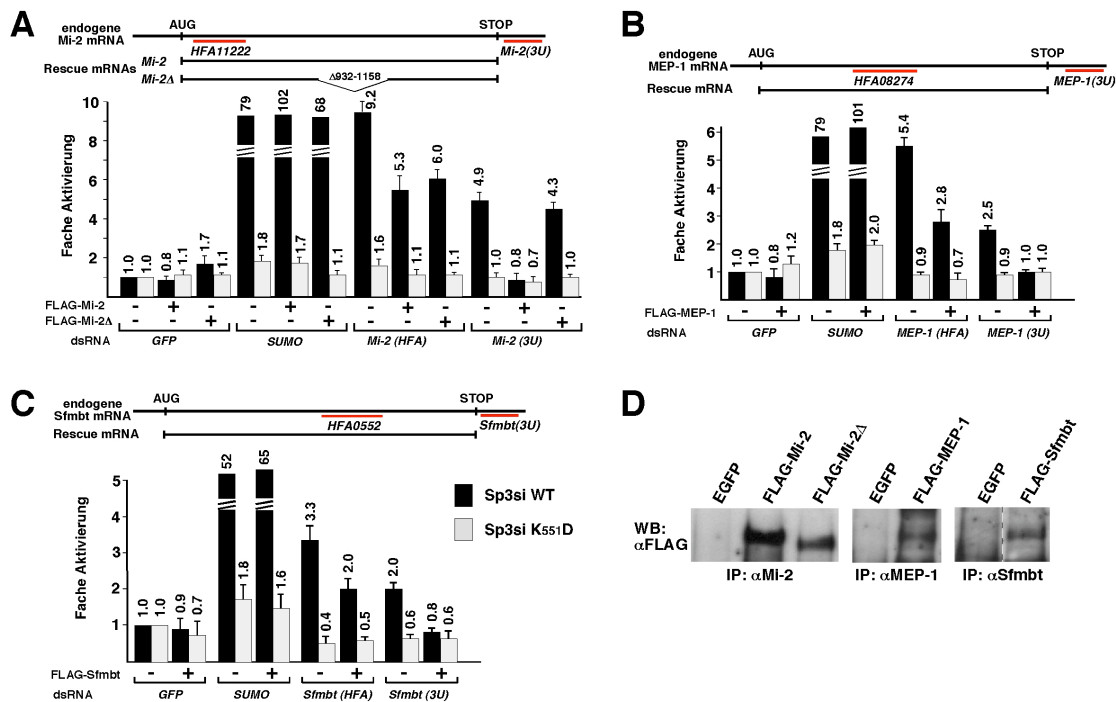


Abbildung 4.9: Validierung der RNAi-Phänotypen durch Rescue des dsRNA-vermittelten Knockdowns

A-C: In *Drosophila* Kc₁₆₇ Zellen wurden endogenes Mi-2 (A), MEP-1 (B) und Sfmbl (C) durch jeweils zwei verschiedene dsRNAs (rot) depletiert. Anschließend wurden die jeweiligen Proteine durch Transfektion von Expressionskonstrukten, die nur das offene Leseraster der jeweiligen mRNA enthielten (Rescue mRNA), als Flag-markiertes Fusionsprotein re-exprimiert. In (A) wurde zudem eine Deletionsmutante von Mi-2, der die ATPase-Domäne fehlt (Mi-2Δ) re-exprimiert. Nach Transfektion von Reporter- und Expressionskonstrukten für Sp3si bzw. Sp3siK₅₅₁D wurde wie zuvor (siehe Abb. 4.8C) die Reporteragenaktivität untersucht. Es ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden, dargestellt (+/-SD).

D: Nach Immunpräzipitation von Flag-markierten Mi-2, MEP-1 und Sfmbl wurde deren Expression in einem Anti-Flag Immunoblot überprüft.

Diese Experimente zeigen sehr deutlich, dass der dsRNA-vermittelte Knockdown der Korepressoren für die Aufhebung der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression verantwortlich ist. Führt man in Zellen, in denen man zuvor den endogenen Korepressor depletiert hat, das jeweilige Protein wieder ein, so kann die Aktivierung der Sp3-SUMO-vermittelten Transkription wieder aufgehoben werden, SUMO-modifiziertes Sp3 fungiert also wieder als transkriptioneller Repressor.

Im Fall von Mi-2 wurde neben der Wildtyp-Form zusätzlich eine Deletionsmutante, der die katalytisch aktive ATPase/Helikase-Domäne fehlte, re-exprimiert. Diese wurde in ähnlicher Weise wie das Wildtyp-Protein exprimiert (Abb. 4.9D), war aber nicht in der Lage, den dsRNA-vermittelten Phänotyp aufzuheben (Abb. 4.9A). Dieser Befund legt

nahe, dass die ATPase-Domäne von Mi-2 für die SUMO-abhängige transkriptionelle Repression essentiell ist.

4.1.8 Kombinatorischer dsRNA-vermittelter Knockdown mehrerer potentieller SUMO-abhängiger Korepressoren

Der dsRNA-vermittelte Knockdown der potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren Mi-2, MEP-1, Sfmbt und Sbb führte zur partiellen Aufhebung der transkriptionellen Repression durch Sp3-SUMO. Um zu überprüfen, ob diese Faktoren auf verschiedene Weise zum Repressionsmechanismus beitragen oder zum Teil redundante Funktionen übernehmen, wurden nach gleichzeitiger Depletion von mehreren dieser Faktoren Reportergen-Experimente durchgeführt und überprüft, ob die Sp3-abhängige Transkription nach kombinatorischem Knockdown verstärkt aktiviert wird. Nach gleichzeitigem dsRNA-Knockdown von Mi-2 gemeinsam mit MEP-1, Sfmbt oder Sbb war keine zusätzliche transkriptionelle Aktivierung von SUMOyliertem Sp3 zu beobachten (Abb. 4.10). Ob dies auf eine weniger effiziente Depletion beim kombinatorischen Einsatz von dsRNA oder auf redundante Funktionen, die die SUMO-abhängigen Korepressoren übernehmen können, zurückzuführen ist, wurde nicht weiter untersucht. Kombiniert man dagegen dsRNAs gegen Mi-2 und beispielsweise dPIAS, inhibiert also gleichzeitig auf der einen Seite den SUMO-vermittelten transkriptionellen Repressionsmechanismus und auf der anderen die SUMO-Konjugations-Enzymatik, war ein additiver Effekt der verschiedenen dsRNAs bei der Aufhebung der SUMO-vermittelten Repression zu beobachten (Abb. 4.10).

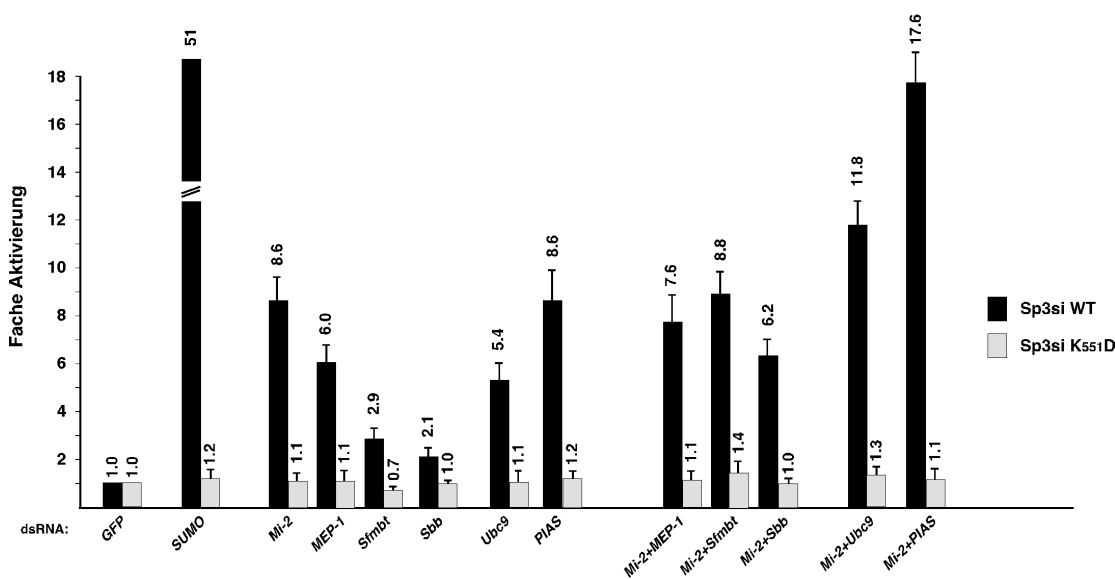


Abbildung 4.10: Kombinatorischer dsRNA-vermittelter Knockdown potentieller SUMO-abhängiger Korepressoren

Drosophila Kc₁₆₇ Zellen wurden in Duplikaten auf 96well Platten mit den angegebenen dsRNAs inkubiert und nach 24 Stunden wie beschrieben (siehe Abb. 4.8C) mit Reporterkonstrukten sowie Expressionskonstrukten für die kleine Isoform von Sp3 (Sp3si) bzw. deren SUMOylierungs-defizienter Mutante (Sp3siK₅₅₁D) transfiziert. Unterschiedliche dsRNA-Mengen wurden mit unspezifischer dsRNA gegen GFP ausgeglichen, je well wurden jeweils insgesamt 2 µg dsRNA eingesetzt. Fünf Tage nach Transfektion wurden die FLuc- und RLuc-Reportergergen-Aktivitäten im dualen Luciferase-Assay bestimmt und die x-fache normalisierte Reportergergen-Aktivierung nach Knockdown durch die jeweilige dsRNA bezogen auf eine unspezifische dsRNA gegen GFP berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (+/- SD).

4.1.9 Mi-2, MEP-1, Sfmbt, Chd3 und Sbb sind auch an der Repression durch SUMO-modifiziertes Dorsal beteiligt

Neben Sp3 ist die SUMOylierung von vielen anderen Transkriptionsfaktoren ebenfalls mit transkriptioneller Repression verbunden. Um zu überprüfen, ob die identifizierten Korepressoren auch am transkriptionellen Repressionsmechanismus anderer SUMO-modifizierter Transkriptionsfaktoren beteiligt sind, wurden RNAi-Experimente mit dem *Drosophila* Transkriptionsfaktor Dorsal durchgeführt.

Nach transienter Expression in Insektenzellen ist Dorsal, ein orthologes Protein des Säuger Transkriptionsfaktors NF-κB, konstitutiv im Zellkern lokalisiert (Bhaskar et al. 2000). Dorsal und der transkriptionelle Aktivator Twist können synergistisch die Transkription eines Promotors mit Bindungsstellen für beide Transkriptionsfaktoren aktivieren (Shirokawa und Courey 1997). Die SUMO-Modifikation von Dorsal erfolgt am Lysinrest K₃₈₂ (Abb. 4.11A). In Reportergergen-Experimenten ist die SUMOylierungs-defiziente Mutante (Dorsal K₃₈₂R) ein bis zu 10-fach stärkerer transkriptioneller Aktivator als Wildtyp Dorsal (Abb. 4.11B) (Bhaskar et al. 2002).

Der dsRNA-vermittelte Knockdown der potentiellen Korepressoren Mi-2, MEP-1, Sfmbt, Chd3 und Sbb führte auch hier zu einer spezifischen transkriptionellen Aktivierung in Gegenwart von SUMO-modifiziertem Wildtyp Dorsal, hatte aber keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität der SUMOylierungs-defizienten Mutante (Dorsal K₃₈₂R) (Abb. 4.11C). Dies zeigt, dass die identifizierten Faktoren auch am Repressionsmechanismus von SUMO-modifiziertem Dorsal beteiligt sind und legt nahe, dass es sich um allgemeine Korepressoren der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression handelt.

Ergebnisse

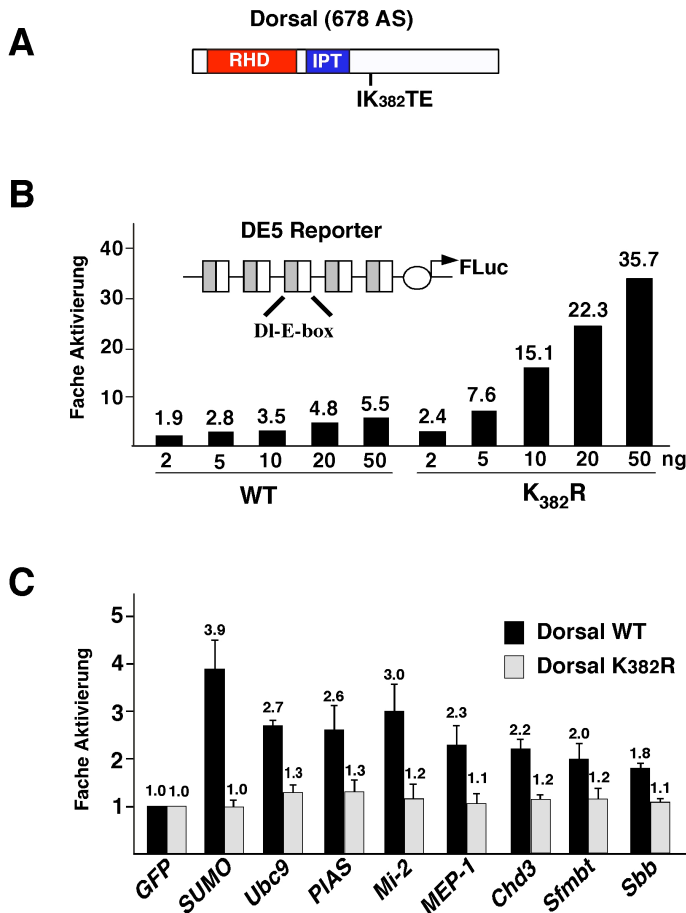


Abbildung 4.11: Mi-2, MEP-1, Chd3, Sfmbt und Sbb vermitteln auch die transkriptionelle Repression des SUMO-modifizierten *Drosophila* Transkriptionsfaktors Dorsal

A: Schematische Darstellung des *Drosophila melanogaster* Transkriptionsfaktors Dorsal. Die SUMOylierung von Dorsal erfolgt innerhalb des SUMO-Konsensus-Motivs ψ KXE am Lysinrest K₃₈₂ (Bhaskar et al. 2002).

B: SUMOylierung von Dorsal reprimiert dessen transkriptionelle Aktivität. Repräsentative Darstellung von Reporter-Gen-Analysen. *Drosophila* Kc₁₆₇ Zellen wurden auf 24well Platten mit dem Dorsal-abhängigen Reporterplasmid DE5 mit fünf Bindungsstellen für Dorsal (DI) und dem Koaktivator Twist (E-Box), einem Expressionskonstrukt für den Transkriptionsfaktor Twist (pPac-Twist) sowie ansteigenden Mengen an Expressionskonstrukt für Wildtyp Dorsal bzw. die SUMOylierungs-defiziente K₃₈₂R Mutante wie angegeben transfiziert. Die Reporter-Genaktivität wurde normalisiert auf einen ebenfalls kotransfizierten konstitutiv aktiven Renilla-Luciferase Koreporter (pPac-RLuc) und die x-fache Aktivierung des DE5-Reporters berechnet.

C: Depletion der potentiellen Korepressoren führt SUMO-abhängig zur Aktivierung der Dorsal-vermittelten Transkription. *Drosophila* Kc₁₆₇ Zellen wurde auf 24well Platten in Duplikaten mit je 6 μ g dsRNA gegen die angegebenen Gene inkubiert und nach 24 Stunden mit dem Dorsal-abhängigen DE5-Reporter, dem pPac-RLuc Koreporter, einem Expressionsplasmid für Twist (pPac-Twist) sowie 50 ng von Expressionskonstrukten für entweder Wildtyp Dorsal oder der SUMOylierungs-defiziente K₃₈₂R Mutante transfiziert (siehe auch 3.3.1.4). Fünf Tage nach Transfektion wurden die FLuc- und RLuc-Aktivitäten im dualen Luciferase-Assay bestimmt, die DE5-Fluc-Aktivität auf die RLuc-Koreporter-Aktivität normalisiert und schließlich die x-fache Aktivierung nach dsRNA-vermitteltem Knockdown bezogen auf eine unspezifische dsRNA gegen GFP berechnet. Es wurden mindestens zwei unabhängige Experimente durchgeführt, dargestellt ist der Mittelwert (+/-SD).

4.1.10 Die mit dem NuRD-Komplex assoziierte Histon-Deacetylase-Aktivität ist nicht an der Sp3-SUMO-abhängigen Repression beteiligt

Es gibt verschiedene Hinweise, dass *Drosophila* Mi-2 assoziiert mit der Histon-Deacetylase RPD3 sowie weiteren Proteinen Bestandteil eines Multi-Proteinkomplexes ähnlich des NuRD (Nucleosome Remodelling and Deacetylase)-Komplexes in Vertebraten ist (Abb. 4.12A) (Bouazoune und Brehm 2006). Man nimmt an, dass vor allem die HDAC-Aktivität die transkriptionelle Repression durch den NuRD-Komplex vermittelt. Allerdings hatte die Inkubation mit zwei unterschiedlichen RPD3-spezifischen dsRNAs keine Aufhebung der Sp3-SUMO-vermittelten Repression zur Folge (Abb. 4.12B), obwohl in Kontroll-Immunoblots eine fast vollständige dsRNA-vermittelte Depletion von RPD3 nachzuweisen war (Abb. 4.12C). Darüber hinaus führte auch die Inhibition von Histon-Deacetylasen durch die HDAC-Inhibitoren Trichostatin A (TSA) und Nicotinamid (NAM) zu keiner Aktivierung der Sp3-SUMO-abhängigen Transkription (Abb. 4.12D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die transkriptionelle Repression durch SUMOyliertes Sp3 unabhängig von einer Histon-Deacetylase-Aktivität erfolgt.

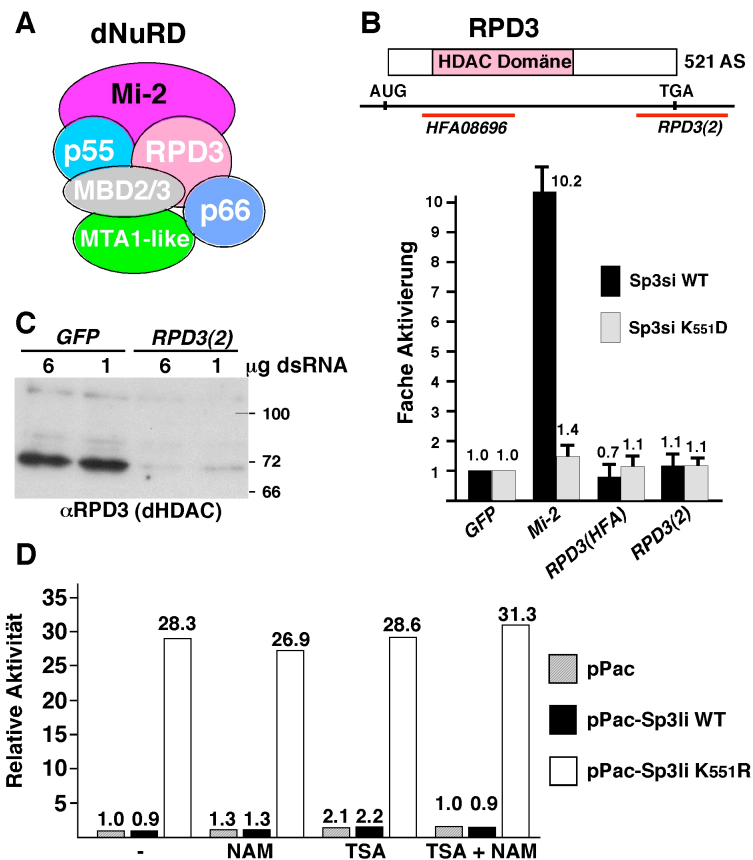


Abbildung 4.12: HDACs sind nicht an der Sp3-SUMO-anhängigen Repression beteiligt

A: Schematische Darstellung des *Drosophila* NuRD-Komplexes (nach (Bouazoune und Brehm 2006)).

B: Der dsRNA-vermittelte Knockdown der *Drosophila* Histon-Deacetylase RPD3 hebt nicht die transkriptionelle Repression durch SUMOyliertes Sp3 auf. *Drosophila* Kc₁₆₇ Zellen wurden in Duplikaten auf 96well Platten mit dsRNAs gegen GFP, Mi-2 sowie gegen zwei unterschiedliche Bereiche von RPD3 wie angegeben inkubiert und nach 24 Stunden wie beschrieben (siehe Abb. 4.8C) mit Reporterkonstrukten sowie Expressionskonstrukten für die kleine Isoform von Sp3 (Sp3si) bzw. deren SUMOylierungs-defizienter Mutante (Sp3siK₅₅₁D) transfiziert. Fünf Tage nach Transfektion wurden wie beschrieben die Reporter-Gen-Aktivitäten bestimmt und die x-fache Aktivierung nach dsRNA-vermitteltem Knockdown bezogen auf die unspezifische dsRNA gegen GFP berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten (+/- SD).

C: Immunoblot-Analyse zur Kontrolle der Depletion von RPD3. Kc₁₆₇ Zellen wurden auf 24well Platten mit dsRNAs wie angegeben inkubiert und nach 6 Tagen Gesamtzellextrakte im Western Blot mit α RPD3-Antikörpern analysiert.

D: HDAC-Inhibitoren verstärken nicht die transkriptionelle Aktivität von Sp3. *Drosophila* SL2 Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für die lange Isoform von Sp3 (Sp3li) bzw. deren SUMOylierungs-defiziente Mutante (Sp3liK₅₅₁R) sowie entsprechenden Reporterplasmiden transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit 5 mM Nicotinamid (NAM), 1 μ M Trichostatin A (TSA) bzw. beiden Inhibitoren inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Lösungsmittel inkubiert (-). Dargestellt ist die relative normalisierte Sp3-abhängige Reporter-Genaktivität bezogen auf die Aktivität von unbehandelten Zellen, die mit dem Leervektor pPac transfiziert wurden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Wiederholungsexperimenten.

4.1.11 SUMO-abhängige Promotor Rekrutierung von Mi-2, MEP-1 und Sfmbt

In Protein-Interaktionsstudien wurde von Frau Alexandra Sapetschnig gezeigt, dass Mi-2, MEP-1 und Sfmbt *in vitro* mit SUMO selbst sowie mit Sp3 und präferentiell mit SUMO-modifiziertem Sp3 interagieren (Stielow et al. 2008a). Um zu untersuchen ob es zu einer SUMO-abhängigen Rekrutierung der Korepressoren an Sp3-regulierte Promotoren kommt, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIPs) durchgeführt.

Dazu wurden *Drosophila* SL-2 Zellen verwendet, die stabil mit dem Sp-abhängigen (GC)₂-FLuc Reporter, einem konstitutiv aktiven Koreporter (pPac-RLuc) sowie mit Konstrukten zur induzierbaren Expression von entweder Wildtyp Sp3 oder einer SUMOylierungs-defiziente Mutante (Sp3SD) transfiziert worden waren (siehe auch 3.2.3.3). Nach Induktion der Expression durch Zugabe von Cu²⁺-Ionen wurden sowohl Sp3WT als auch Sp3SD in gleicher Weise exprimiert (Abb. 4.13A). Während Wildtyp Sp3 reprimierend wirkte, zeigte die SUMOylierungs-defiziente Mutante nach Induktion eine starke Aktivierung des (GC)₂-FLuc Reporters (Abb. 4.13A). Dass der stabil integrierte (GC)₂-FLuc Reporter auch in Zellen, die stabil Sp3WT exprimieren, zugänglich und aktivierbar ist, zeigte die transkriptionelle Aktivierung des Reporters nach transienter Transfektion eines Expressionsplasmides für eine aktivierende SUMOylierungs-defiziente Mutante von Sp3 (pPac-USp3K₅₅₁R) (Abb. 4.13B).

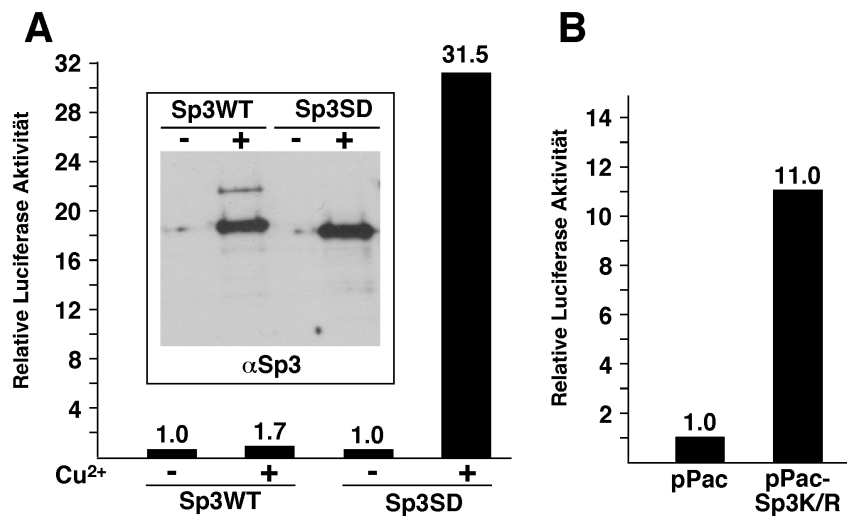


Abbildung 4.13: Induzierbare Aktivierung eines stabil integrierten Sp3-abhängigen Reporters

A: *Drosophila* SL2 Zellen wurden stabil mit dem Sp3-abhängigen (GC)₂-Fluc-Reporter, dem konstitutiv aktiven pPac-RLuc Koreporter und Kupfer-induzierbaren Expressionskonstrukten für entweder (HA-Flag-markiertes) Wildtyp Sp3 (pMET-HA-Flag-Sp3) oder der entsprechenden SUMOylierungs-defizienten Mutante Sp3SD (pMET-HA-Flag-Sp3SD) (Braun und Suske 1999) transfiziert. 24 Stunden nach Induktion mit 0,5 mM CuCl₂ wurden die Reporter-Gen-Aktivitäten mittels dualen Luciferase-Assay bestimmt und durch Abgleich auf die RLuc-Aktivität die relative Firefly-Luciferase-Aktivität berechnet. Außerdem wurden nach 6-stündiger Induktion SDS-Gesamtzellextrakte präpariert und die Expression von Wildtyp Sp3 und der Sp3SD-Mutante vor und nach Induktion in Immunoblot-Analysen untersucht.

B: SL2 Zellen, die stabil neben den beiden Luciferase-Reportern den Expressionsvektor für Wildtyp Sp3 enthielten, wurden transient mit einem Expressionsplasmid für eine transkriptionell aktive SUMOylierungs-defiziente Sp3-Mutante (pPac-USp3K₅₅₁R) transfiziert und 36 Stunden nach Transfektion die Reporter-Gen-Aktivitäten wie zuvor bestimmt. Die Aktivierung der Transkription nach Transfektion zeigt, dass der stabil integrierte (GC)₂-Fluc-Reporter für Sp3 zugänglich ist.

In Chromatin-Immunpräzipitationen wurden nach Induktion sowohl Wildtyp Sp3 als auch Sp3SD an den Promotor des stabil integrierten (GC)₂-FLuc Reporters rekrutiert (Abb. 4.14). MEP-1 und Sfm1 sind nur in Gegenwart von SUMO-modifiziertem Sp3 mit dem Promotorbereich assoziiert und sind weder in Abwesenheit von Sp3WT noch nach Induktion der Expression des SUMOylierungs-defizienten Sp3SD am (GC)₂-FLuc Promotor zu finden (Abb. 4.14). Mi-2 war auch im uninduzierten Zustand in gewissem Maße mit dem Promotor assoziiert, wurde allerdings nach Induktion der Expression von SUMO-modifiziertem Sp3WT verstärkt an den (GC)₂-FLuc Promotor rekrutiert (Abb. 4.14).

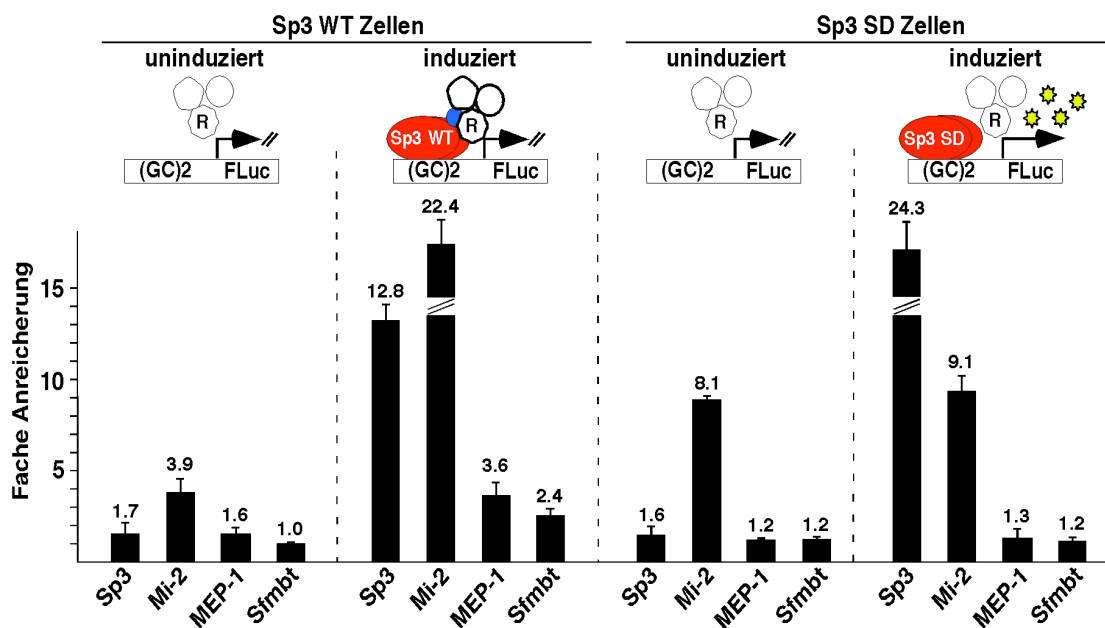


Abbildung 4.14: SUMO-abhängige Promotor-Rekrutierung von Mi-2, MEP-1 und Sfmbt durch Wildtyp Sp3

Chromatin-Immünpräzipitationen. Vernetztes Chromatin wurde aus stabil transfizierten *Drosophila* SL2 Zellen, die unbehandelt oder zur Expression von entweder Wildtyp Sp3 oder der SUMOylierungs-defizienten Mutante Sp3SD für 6 Stunden mit CuCl_2 induziert worden waren (siehe auch Abb. oben), präpariert und in Immunpräzipitationen mit den angegebenen Antikörpern eingesetzt. Das präzipitierte Material wurde als Template in qPCR-Reaktionen mit Primern spezifisch für den Promotorbereich des stabil integrierten $(\text{GC})_2$ -FLuc-Reporters eingesetzt und die x-fache Anreicherung auf dem Promotor gegenüber einer Probe mit unspezifischem Antikörper (αGal4 -Antikörper) berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (+/- SD).

Diese Chromatin-Immünpräzipitationen zeigen, dass Mi-2, MEP-1 und Sfmbt durch repressives Wildtyp Sp3 SUMO-abhängig an Promotoren rekrutiert werden und legen nahe, dass alle drei Proteine an der SUMO-vermittelten Repression beteiligt sind.

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass Frau Alexandra Sapetschnig in nachfolgend durchgeführten Protein-Protein-Interaktionsstudien nachweisen konnte, dass Mi-2, MEP-1 und Sfmbt *in vitro* miteinander interagieren und Mi-2 und MEP-1 auch *in vivo* assoziiert sind (Stielow et al. 2008a). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass diese Proteine Teil eines Korepressor-Komplexes sind, der von SUMO-modifiziertem Sp3 auf dem $(\text{GC})_2$ -FLuc Promotor etabliert wird.

4.2 Der Mechanismus der SUMO-abhängigen Repression im Säugersystem

4.2.1 Etablierung einer Säuger-Zelllinie mit einem stabil integrierten Reportersystem

Die bisherigen Arbeiten zur Identifizierung von potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren wurden in *Drosophila melanogaster* Zellen durchgeführt. Da Sp3 ein Säuger-Transkriptionsfaktor ist, wurde in nachfolgenden Experimenten untersucht, inwieweit die Säuger-Orthologen der beschriebenen Korepressoren am Mechanismus der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression beteiligt sind und ob es zu einer SUMO-abhängigen Promotor-Rekrutierung der orthologen Proteine kommt.

Die im *Drosophila* System identifizierten Korepressoren Mi-2, MEP-1 und Sfmtb deuten darauf hin, dass die Chromatinstruktur bei der Repression durch SUMOylierte Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle spielt. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass der stärkste Anstieg der Sp3-SUMO-abhängigen transkriptionellen Aktivität nach Depletion von Histonen zu beobachten war (siehe Tabelle 4.1). Um die Mechanismen der SUMO-abhängigen transkriptionellen Repression im Kontext der Chromatinstruktur im Säugersystem zu untersuchen, wurde eine Säugerzelllinie mit einem stabil ins Genom integrierten Luciferase-Reportergen, das von fünf Gal4-Bindungsstellen getrieben wird, etabliert. Dieser Gal4-regulierte Reporter wurde gewählt, da alle Säugerzelllinien über endogene Sp-Faktoren verfügen und diese ein GC-Box-abhängiges Reportersystem beeinflussen würden.

HEK 293-Zellen wurden mit dem 5xGal4-Reporter (pGAWG5E1b) sowie einem Plasmid, das eine Resistenz gegenüber Puromycin (pBabe-Puro) vermittelt, transfiziert. Nach Selektion mit Puromycin wurden insgesamt 23 Einzelklone isoliert (siehe auch 3.3.1.6) und zunächst 8 davon durch transiente Transfektion von Expressionskonstrukten für Wildtyp Gal4-Sp3 und der SUMOylierungs-defizienten Mutante Gal4-Sp3KEEm, bei der der SUMO-Akzeptor-Lysinrest K₅₅₁ mutiert ist (Abb. 4.15A), in Reportergen-Experimenten getestet (Abb. 4.15B).

Zellklon 1 zeigte nur basale Reportergenaktivität auf Hintergrundniveau, die sich auch nach Expression von SUMO-modifizierten Gal4-Sp3WT kaum veränderte. Dagegen führte die Expression der SUMO-defizienten Mutante Gal4-Sp3KEEm zu einer 40- bis 50-fachen Aktivierung der Transkription (Abb. 4.15B, Abb. 4.16B).

Ergebnisse

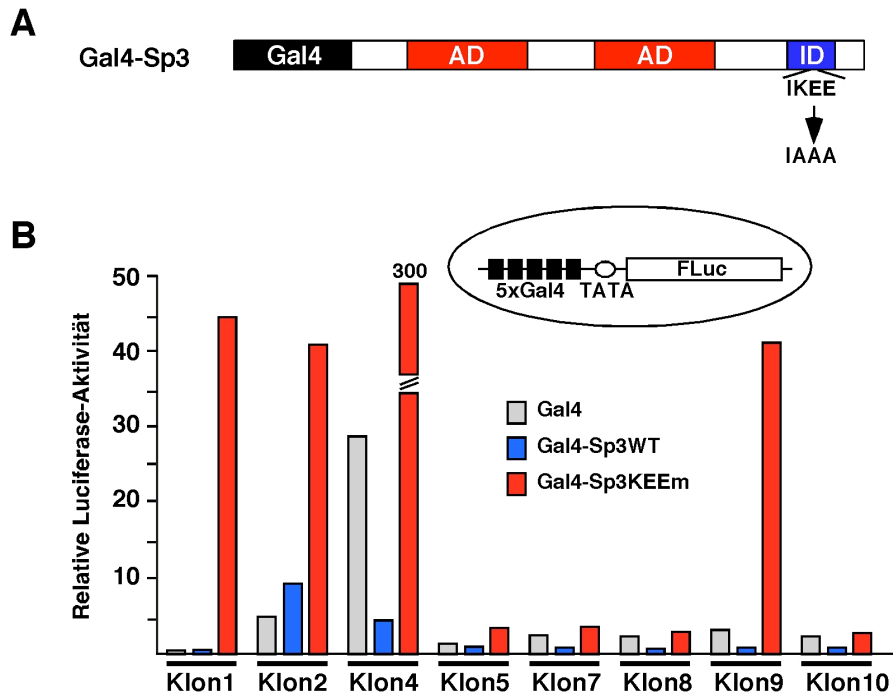


Abbildung 4.15: Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie mit einem integrierten Gal4-regulierten Luciferase-Reporter

A: Schematische Darstellung des Gal4-Sp3-Fusionsproteins. In schwarz dargestellt die Gal4-DNA-bindende Domäne, in rot die glutaminreichen Transaktivierungsdomänen (AD), in blau die so genannte Inhibitorische Domäne (ID) mit dem SUMOylierungsmotiv IKEE sowie der Sequenz der entsprechenden SUMOylierungs-defizienten Mutante Gal4-Sp3KEEm.

B: Einzelzellklone von HEK 293-Zellen, die stabil mit einem von 5 Gal4-Bindungsstellen getriebenen Firefly-Luciferase Reporter transfiziert wurden, wurden transient auf 6 cm-Schalen mit jeweils 1 µg eines Expressionskonstruktes für entweder die Gal4-DNA-bindende Domäne (Gal4) oder Gal4-Fusionproteine mit Wildtyp Sp3 (Gal4-Sp3WT) bzw. der SUMOylierungs-defizienten Mutante (Gal4-Sp3KEEm) transfiziert. Zum Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen wurden 0,5 µg des konstitutiv aktiven Koreporters (RSV-β-Gal) mit transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden zytoplasmatische Extrakte präpariert, die Firefly-Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt und die relative Luciferase-Reporteraktivität durch Abgleich auf die jeweilige β-Galaktosidase-Aktivität berechnet.

Um die SUMO-abhängige Repression des stabil integrierten Reporter-Transgens zu bestätigen, wurden Reporter-Experimente nach transienter Expression von Gal4-Fusionsproteinen des Orphan-Rezeptors Steroidogenic Factor 1 (SF-1) durchgeführt. SF-1 wird an zwei Lysinresten mit SUMO modifiziert (Lee et al. 2005) (Abb. 4.16A). Ähnlich wie Sp3 wirkte die SUMOylierte Wildtyp-Form von Gal4-SF-1 transkriptionell reprimierend, während die SUMOylierungs-defiziente Mutante Gal4-SF-1-2K/R, bei der beide SUMO-Akzeptor-Motive mutiert wurden, zu einer starken, bis zu 500-fachen transkriptionellen Aktivierung des integrierten Reportergens führte (Abb. 4.16C).

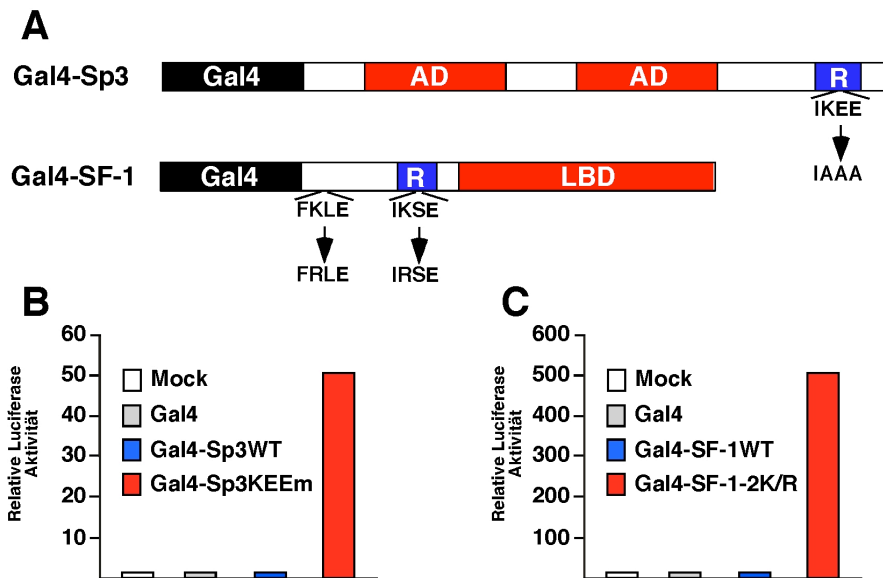


Abbildung 4.16: SUMO-abhängige transkriptionelle Repression des stabil integrierten Reporter-Transgens

A: Schematische Darstellung der Gal4-Sp3 und Gal4-SF-1-Fusionsproteine. Darstellung von Gal4-Sp3 wie in Abb. 4.15A beschrieben. Angegeben sind die beiden SUMO-Akzeptor-Motive von Gal4-SF-1 (FKLE und IKSE) sowie die jeweiligen SUMOylierungs-defizienten Mutanten. R: Repressions-Domäne, LBD: Liganden-bindende Domäne.

B: HEK 293-Zellen mit dem stabil integrierten 5xGal4-Luciferase-Reporter (Klon 1) wurden transient mit Expressionskonstrukten für die Gal4-DNA-bindende Domäne (Gal4) oder für Gal4-Fusionsproteine von Wildtyp Sp3 (Gal4-Sp3WT) bzw. der SUMOylierungs-defizienten Mutante (Gal4-Sp3KEEm) zusammen mit einem konstitutiv aktiven β -Galaktosidase-Koreporter (RSV- β -Gal) transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion geerntet, die Luciferase- und Galaktosidase-Aktivität bestimmt und die relative Luciferase-Aktivität bezogen auf Zellen, die mit unspezifischer DNA transfiziert wurden (mock), berechnet.

C: Die Transfektionen wurden wie in (B) beschrieben mit Expressionskonstrukten für Gal4-SF-1-Fusionsproteine durchgeführt.

Eine nähere Untersuchung dieses Zellklons mittels Southern Blot Analyse und Kartierung des Integrationsortes des Luciferase Reporters mit Hilfe von inverser PCR ergab, dass das Transgen als einzelne Kopie innerhalb des ersten Introns des *NCOA5*-Gens auf Chromosom 20 integriert ist (Abb. 4.17).

Ergebnisse

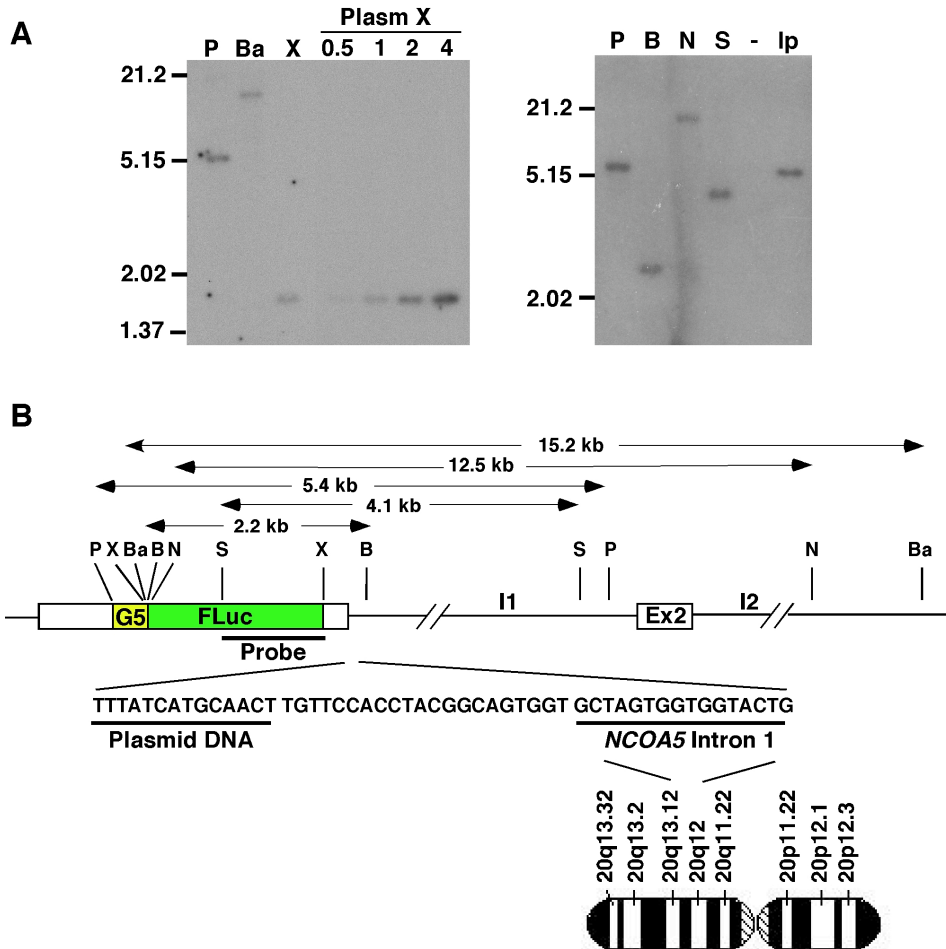


Abbildung 4.17: Southern Blot Analyse und Kartierung des Integrationsortes des Luciferase-Reporter Transgens

A: Southern Blot Analyse des stabil integrierten 5xGal4-Luciferase-Transgens im Zellklon 1. Genomische DNA aus dem stabil transfizierten Zellklon 1 bzw. Plasmid-DNA des Reporterkonstruktes pGAWG5E1b wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und mit einer Sonde komplementär zur Firefly-Luciferase-(FLuc) cDNA wie in Abbildung (B) dargestellt detektiert. Abkürzungen: P: *PstI*; Ba: *BamHI*; X: *XbaI*; B: *BglIII*; N: *NcoI*; S: *SphI*; lp: linearisiertes Plasmid. Auf dem linken Gel wurden zur Bestimmung der Kopienzahl des integrierten Reporterkonstruktes zum Vergleich 0,5, 1, 2 und 4 Kopien des mit *XbaI* linearisierten Reporterplasmids pGAWG5E1b aufgetragen (Plasm X). Das Transgen ist als einzelne Kopie im Genom integriert. Der Southern Blot wurde von Frau Alexandra Sapetschnig freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

B: Schematische Darstellung des Integrationsortes des 5xGal4-Firefly-Luciferase-Transgens im ersten Intron (I1) des *NCOA5*-Gens auf Chromosom 20. Der Integrationsort wurde durch inverse PCR eines religierten *BglIII*-geschnittenen genomischen DNA-Fragments bestimmt. Die dargestellte Nukleotidsequenz gibt den Übergang zwischen der Plasmid DNA und der genomischen *NCOA5* Sequenz auf Chromosom 20 an.

Dieser Zellklon 1 ist somit ein geeignetes Modell, um die SUMO-abhängige Promotor-Rekrutierung von potentiellen Korepressoren sowie die damit einhergehenden Chromatinveränderungen zu untersuchen.

Ergebnisse

4.2.2 Promotor-Rekrutierung von Gal4-Fusionsproteinen an den stabil integrierten 5xGal4-Luciferase-Reporter

Nach transienter Transfektion wurden sowohl Gal4-Sp3WT als auch die SUMOylierungs-defiziente Mutante Gal4-Sp3KEEm in vergleichbarer Weise exprimiert (Abb. 4.18A). Chromatin Immunpräzipitationen (ChIPs) mit α Gal4-Antikörpern und nachfolgender regulärer PCR (Abb. 4.18B) sowie quantitativer PCR (Abb. 4.18C) zeigten, dass beide mit ähnlicher Effizienz an den stabil integrierten 5xGal4-Promotor rekrutiert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch nach Expression der Gal4-SF-1-Fusionsproteine (Daten nicht gezeigt).

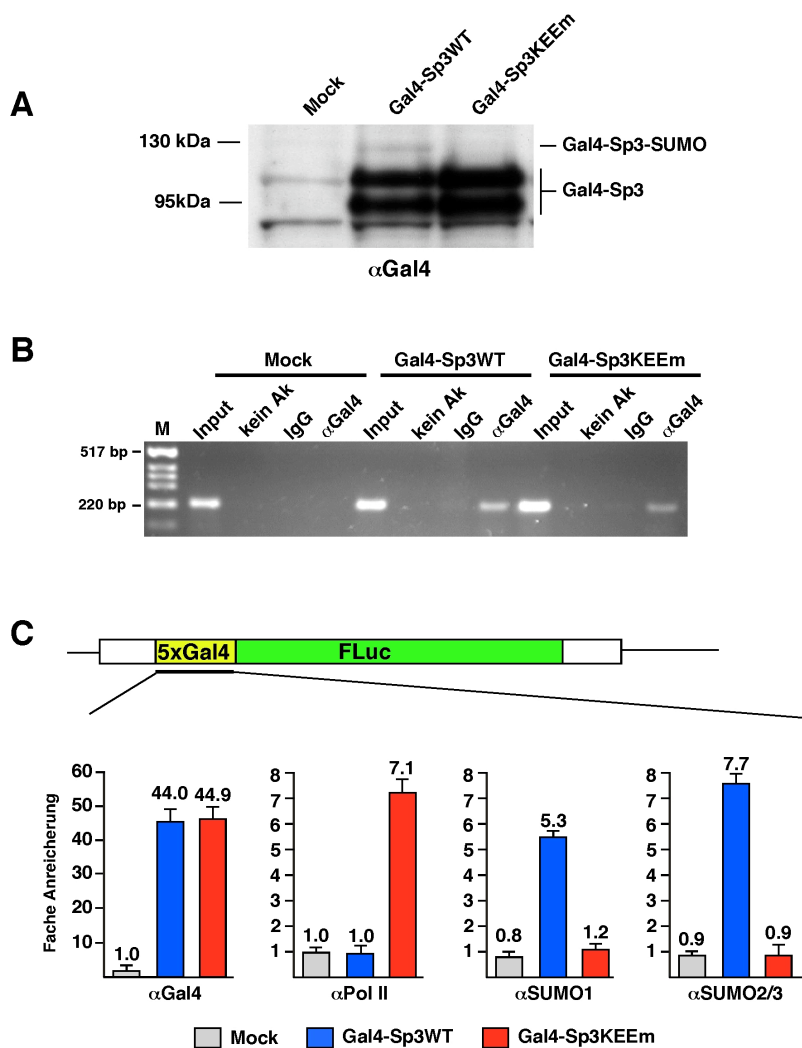


Abbildung 4.18: Gal4-Sp3-Fusionsproteine werden an den Promotor des stabil integrierten Reporters rekrutiert

A: Stabil mit dem 5xGal4-Reporter transfizierte HEK 293-Zellen wurden transient mit Expressionskonstrukten für entweder Wildtyp Gal4-Sp3 oder die SUMOylierungs-defiziente Mutante Gal4-Sp3KEEm transfiziert und Gesamtzellextrakte in Immunoblot-Analysen mit α Gal4-Antikörpern untersucht. Nach transienter Transfektion werden Gal4-Sp3WT und Gal4-Sp3KEEm in gleicher Weise in den stabil transfizierten HEK-Zellen exprimiert.

B und C: Chromatin Immunpräzipitation (ChIPs). Vernetztes Chromatin wurde aus den stabil transfizierten HEK-Zellen (Klon 1), die transient mit Expressionskonstrukten für entweder Gal-Sp3WT oder Gal3Sp3KEEm transfiziert worden waren, präpariert und in Immunpräzipitationen mit den angegebenen Antikörpern bzw. unspezifischen Antikörpern (Präimmun-Serum IgGs) eingesetzt. Präzipitiertes Material wurde als Template in regulären PCR-Reaktionen (B) bzw. in quantitativen PCRs (C) mit Primern spezifisch für den Promotorbereich des stabil integrierten 5xGal4-Reporters eingesetzt. In (C) ist die x-fache Anreicherung auf dem Promotorbereich durch den spezifischen Antikörper verglichen mit dem unspezifischen Antikörper dargestellt. Angegeben ist der Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (+/- SD).

Die RNA-Polymerase II wurde nur in Anwesenheit des transkriptionell aktiven SUMO-defizienten Gal4-Sp3KEEm an den Promotor rekrutiert (Abb. 4.18C). Dies zeigt, dass die SUMOylierung von Sp3 die Rekrutierung der RNA-Polymerase II verhindert. ChIPs mit Antikörpern gegen SUMO-1 und SUMO-2 präzipitierten den Gal4-Promotorbereich nur in Anwesenheit von Gal4-Sp3WT, nicht aber nach Expression der SUMOylierungsdefizienten KEE-Mutante (Abb. 4.18C). Dies könnte einerseits bedeuten, dass Sp3 *in vivo* mit beiden SUMO-Varianten modifiziert wird. Andererseits könnte dieses Ergebnis auch die SUMOylierung von anderen ebenfalls rekrutierten Proteinen widerspiegeln. Da die verwendeten α SUMO-Antikörper SUMOyliertes Sp3 in Ko-Immunpräzipitationen nicht präzipitieren konnten, ist eher letzteres wahrscheinlich.

4.2.3 SUMO-abhängige Rekrutierung von Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2

In den unter Abschnitt 4.1 beschriebenen Experimenten wurden in *Drosophila melanogaster* Zellen unter anderem der Chromatin Remodeler Mi-2 und das Polycomb-Protein Sfmbt als am SUMO-abhängigen Repressionsmechanismus beteiligte Faktoren identifiziert. Die entsprechenden Orthologen dieser *Drosophila* Proteine im Säugersystem sind Mi-2 α/β bzw. L3MBTL1 und L3MBTL2 (Abb. 4.19A). Mi-2 ist ein Mitglied der CHD (Chromodomain Helicase DNA-binding)-Proteinfamilie, die ATP-abhängig die Chromatinstruktur verändern können (Marfella und Imbalzano 2007). Humanes L3MBTL1 ist ein Protein mit drei MBT-Domänen, das als transkriptioneller Korepressor beschrieben ist (Boccuni et al. 2003). Die MBT-Domänen von L3MBTL1 sind in der Lage in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus von Histon H4K20 und H1bK26 *in vitro* die Nukleosomenstruktur zu kompaktieren (Trojer et al. 2007). L3MBTL2 ist ein bisher uncharakterisiertes Mitglied der MBT-Domänen Proteinfamilie, das wie *Drosophila* Sfmbt vier MBT-Domänen enthält. Für das ebenfalls als SUMO-abhängigen Korepressor identifizierte *Drosophila* MEP-1 ist kein Säuger-Orthologes bekannt.

Ergebnisse

Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2 werden in HEK 293-Zellen exprimiert (Abb. 4.19B). Chromatin Immunpräzipitationen in den stabil transfizierten HEK-Zellen zeigten, dass alle drei Proteine nur in Gegenwart von SUMO-modifiziertem Wildtyp Gal4-Sp3 an den integrierten 5xGal4-Promotor rekrutiert werden, während sie nach Expression der transkriptionell aktiven SUMOylierungs-defizienten Mutante Gal4-Sp3KEEm nicht mit dem Promotorbereich assoziiert sind (Abb. 4.19C).

In gleicher Weise waren Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2 nur in Anwesenheit von transkriptionell reprimierendem Gal4-SF-1WT mit dem 5xGal4-Promotor assoziiert, während die Expression der SUMOylierungs-defizienten Mutante Gal4-SF-1-2K/R, obwohl mit gleicher Effizienz wie das Wildtyp Gal4-Fusionsprotein an den Promotor rekrutiert (Daten nicht gezeigt), zu keiner Rekrutierung der drei Korepressoren führte (Abb. 4.19D). Es zeigte sich also bei Gal4-Sp3 und Gal4-SF-1 eine SUMO-abhängige Promotor-Rekrutierung von Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2 durch die transkriptionell reprimierend wirkende SUMOylierte Wildtyp Form.

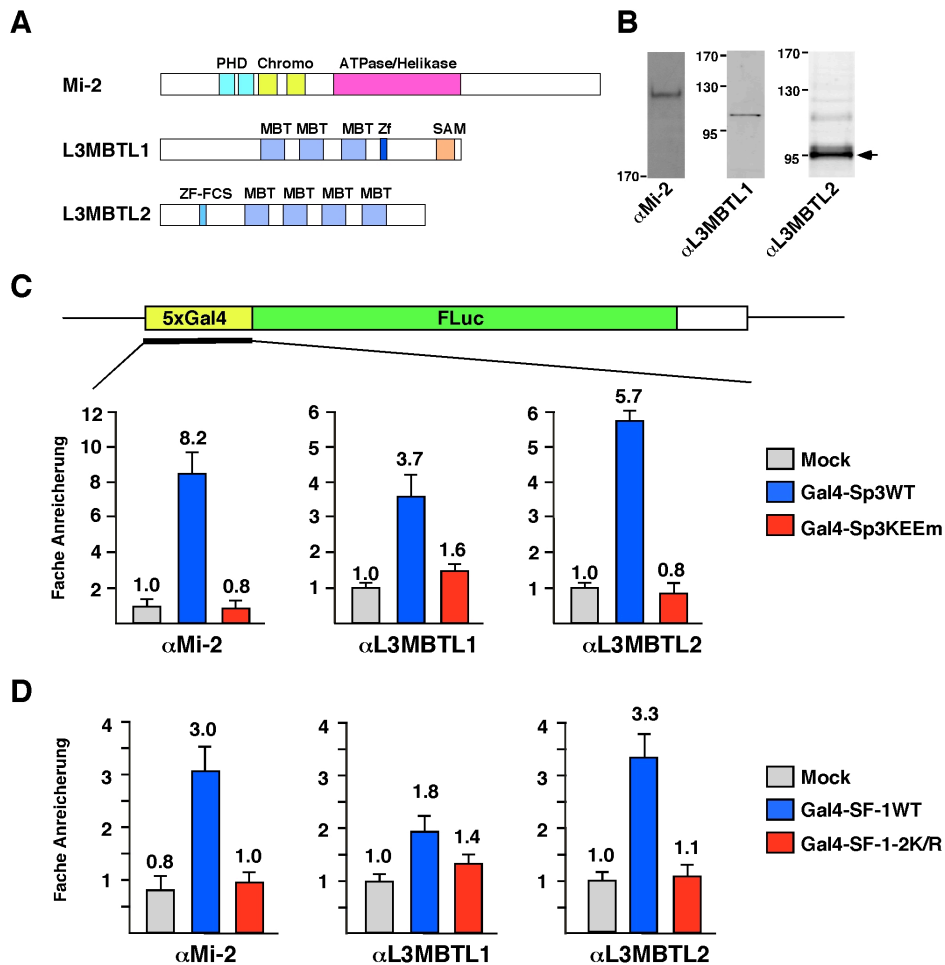


Abbildung 4.19: SUMO-abhängige Promotor-Rekrutierung von Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2 durch Wildtyp Gal4-Sp3 und Gal4-SF-1

A: Schematische Darstellung von Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2. Abkürzungen: PHD: Plant Homeodomain Finger, Chromo: Chromatin Organization Modifier Domain, ATPase/Helikase: DEAD-ähnliche Helikase Domäne, MBT: Malignant Brain Tumor, ZF: C₂H₂ Zinkfinger, ZF-FCS: FCS Zinkfinger, SAM: Sterile Alpha Motif.

B: Immunoblot-Analyse zur Expression von Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2 in den verwendeten stabil transfizierten HEK 293-Zellen

C und D: Chromatin Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen Mi-2 α/β , L3MBTL1 und L3MBTL2. HEK 293-Zellen mit dem stabil integrierten 5xGal4-Reporter (Klon 1) wurden transient mit Expressionskonstrukten für entweder Wildtyp Gal4-Sp3 (C) bzw. Gal4-SF-1 (D) sowie der jeweiligen SUMOylierungs-defizienten Mutante transfiziert und 24 Stunden nach Transfektion vernetztes Chromatin in Immunpräzipitationen eingesetzt. Präzipitiertes Material wurde in quantitativen PCR-Reaktionen mit Primern spezifisch für den Promotorbereich des stabil integrierten 5xGal4-Reporters eingesetzt. Dargestellt ist die x-fache Anreicherung der jeweiligen Proteine auf dem Promotor bezogen auf eine Immunpräzipitation mit unspezifischem Antikörper. Der Mittelwert (+/- SD) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ist angegeben.

Mi-2 ist die katalytisch aktive Untereinheit des Multiprotein-Komplexes NuRD (Nucleosome Remodelling and Deacetylase). Der Mi-2/NuRD-Komplex besteht aus mindestens sechs assoziierten Proteinen, darunter unter anderem die Histon-Deacetylasen HDAC1/2, die mit methylierter DNA interagierenden Proteine MBD2/3, Mitglieder der MTA (metastasis-associated)-Familie sowie den Proteinen p66 und p70 (Feng und Zhang 2003; Bowen et al. 2004). Chromatin Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen HDAC1 und p66 zeigten allerdings keine SUMO-abhängige Promotor-Rekrutierung dieser beiden Proteine durch Gal4-Sp3WT. (Abb. 4.20A). Beide Proteine wurden dagegen an den Promotorbereich des p21-Gens, der als Positivkontrolle untersucht wurde, rekrutiert (Abb. 4.20B). Dies legt nahe, dass Mi-2 die Funktion eines SUMO-abhängigen Korepressors außerhalb seiner Funktion als Bestandteil des klassischen NuRD-Komplexes übernimmt. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Beobachtung, dass auch die Sp3-SUMO-regulierte transkriptionelle Repression in Insektenzellen nicht durch Histon-Deacetylasen (HDACs) vermittelt wird und mit Ausnahme von Mi-2 unabhängig von weiteren Untereinheiten des *Drosophila* NuRD-Komplexes ist (Abb. 4.12) (Stielow et al. 2008a).

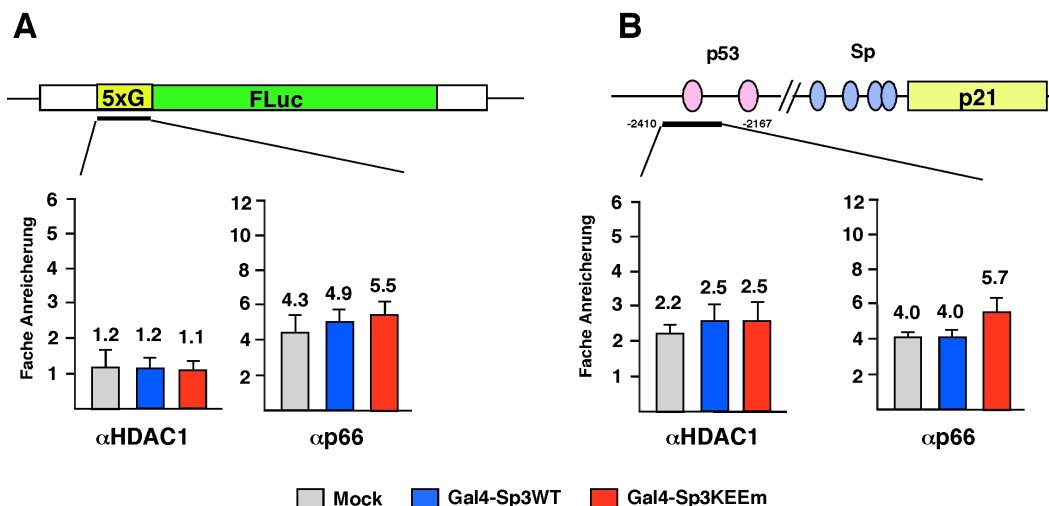


Abbildung 4.20: HDAC1 und p66 werden nicht in SUMO-abhängiger Weise an den integrierten 5xGal4-Reporter rekrutiert

Chromatin Immunpräzipitationen. HEK 293-Zellen mit dem stabil integrierten 5xGal4-Reportersystem (Klon 1) wurden transient mit Expressionskonstrukten für entweder Wildtyp Gal4-Sp3 oder der SUMOylierungs-defizienten Mutante Gal4-Sp3KEEm transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde Chromatin präpariert und in Immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen HDAC1 und p66, zwei Untereinheiten des NuRD-Komplexes, eingesetzt. Präzipitiertes Material wurde in qPCR-Reaktionen mit Primern spezifisch für den Gal4-Promotorbereich (A) bzw. für den Promotorbereich des p21-Gens (B) eingesetzt und anschließend die jeweilige relative Anreicherung gegenüber einer Immunpräzipitation mit unspezifischen Antikörpern berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert (+/- SD) aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

4.2.4 Assoziation von Gal4-Sp3WT mit Regionen stromabwärts vom Promotorbereich des Reporter-Transgens

Im Zuge der ChIP-Analysen wurden auch Sequenzen 1,2, 2 und 3 kb abwärts des Transkriptionsstartes innerhalb der Luciferase-cDNA, am Übergang zwischen Transgen und genomischer DNA sowie innerhalb des ersten Introns des *NCOA5*-Gens in qPCR-Reaktionen analysiert (Abb. 4.21). Diese Untersuchungen ergaben, dass Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2 und überraschenderweise auch SUMOyliertes Wildtyp Gal4-Sp3 selbst mit Regionen 1,2 und 2 kb stromabwärts des Transkriptionsstartes des Transgens assoziiert sind. Die SUMOylierungs-defiziente Mutante Gal4-Sp3KEEm war dagegen ausschließlich am Promotorbereich zu finden (Abb. 4.21). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch nach Expression von Gal4-SF-1 bzw. Gal4-SF-1-2K/R (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

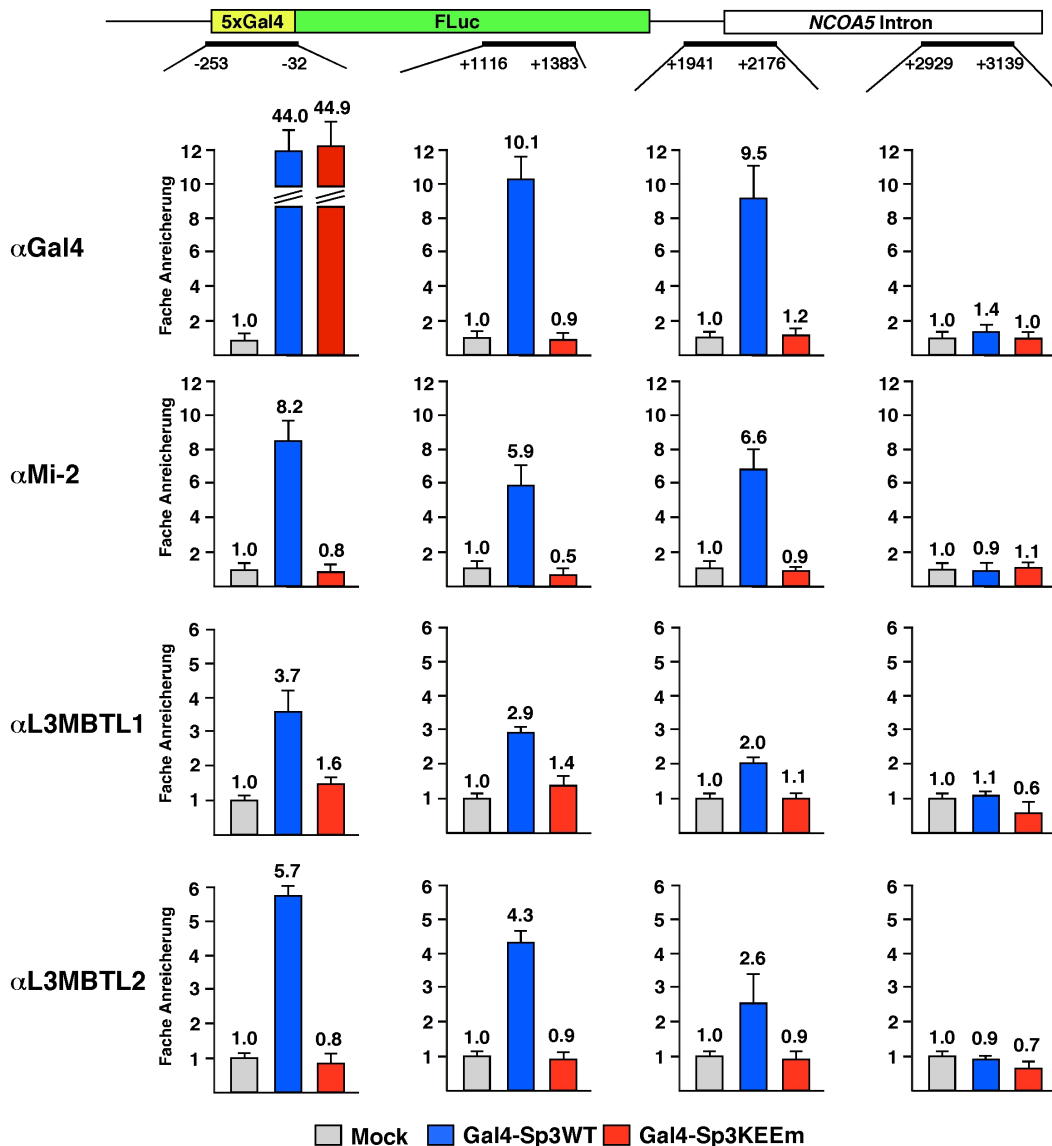


Abbildung 4.21: SUMO-abhängige Rekrutierung von Gal4-Sp3, Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2 an verschiedene Regionen innerhalb und außerhalb des integrierten Transgens

Chromatin Immunpräzipitationen wurden wie zuvor in stabil transfizierten HEK 293-Zellen, die transient mit Expressionskonstrukten für Gal4-Sp3WT bzw. Gal4-Sp3KEEm transfiziert worden waren, mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Präzipitiertes Material wurde in qPCR-Reaktionen mit Primern spezifisch für den 5xGal4-Promotor, eine Region innerhalb der Luciferase-cDNA, den Übergang zwischen Plasmid- und genomischer DNA sowie innerhalb des NCOA5-Introns wie angegeben eingesetzt. Die Zahlen geben die Position der Primer relativ zum Transkriptionsstart des Luciferase-Gens an. Dargestellt ist die Anreicherung auf dem jeweiligen Bereich durch den spezifischen Antikörper gegenüber einer IP mit unspezifischem Antikörper. Angegeben ist der Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (+/-SD).

In gleicher Weise wurden auch frühere ChIP-Experimente in stabil transfizierten *Drosophila* Zellen, die einen Sp3-abhängigen Luciferase-Reporter enthielten und entweder Wildtyp Sp3 oder die SUMOylierungs-defiziente Mutante exprimierten (siehe Abschnitt 4.1.11) analysiert. In diesem Fall wird Sp3 über seine endogene DNA-

bindende Zinkfinger-Domäne an den Promotor rekrutiert. Auch hier war SUMO-modifiziertes Wildtyp Sp3 auch mit Regionen innerhalb des kodierenden Bereichs des Luciferase-Gens assoziiert (Daten nicht gezeigt).

Die Assoziation von SUMOyliertem Sp3 oder SF-1 mit Regionen, die sich entfernt vom Promotor befinden, könnte durch eine Kompaktierung des Chromatins erklärt werden. In diesem Fall würden entfernte DNA-Sequenzen durch die Verdichtung der Chromatinstruktur in relative Nähe zur Promotorregion kommen und in ChIP-Experimenten präzipitiert werden. Diese Vorstellung der Veränderung der Chromatinstruktur durch SUMO-abhängig rekrutierte Korepressoren ist konsistent mit der beschriebenen Funktion der MBT-Domänen, die Nukleosomen *in vitro* kompaktieren können (Trojer et al. 2007).

4.3 SUMO-abhängige Ausbildung von Heterochromatin auf dem Reporter-Transgen

4.3.1 SUMO-abhängige Rekrutierung heterochromatischer Proteine und Ausbildung repressiver Histon-Modifikationen

Kompaktiertes Chromatin kommt charakteristischerweise in heterochromatischen Bereichen vor. Aus diesem Grund wurde in weiteren ChIP-Experimenten untersucht, ob andere heterochromatische Proteine oder repressive Histon-Modifikationen SUMO-abhängig an dem stabil integrierten Reporter nachzuweisen sind.

Die Heterochromatin Proteine HP1 α , HP1 β und HP1 γ wurden nur in Anwesenheit von SUMOyliertem Gal4-SpWT an den 5xGal4-Promotor rekrutiert (Abb. 4.22A). Dabei waren HP1 β und HP1 γ , aber nicht HP1 α auch mit Regionen 2 und 3 kb stromabwärts des Transkriptionsstartes des Luciferase-Gens assoziiert (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung könnte auf unterschiedliche Rekrutierungs- und Funktionsweisen der verschiedenen HP1-Isoformen hindeuten (Hediger und Gasser 2006).

Mit spezifischen Antikörpern wurden der Methylierungsstatus von Histon H3K9, H3K27 und H4K20 untersucht (Abb. 4.22B). H3K9me2 und besonders H3K9me3 waren in Anwesenheit von SUMO-modifiziertem Wildtyp Gal4-Sp3 auf dem 5xGal4-Promotor angereichert. Trimethylierung von H3K27 war bereits in Abwesenheit von Gal4-Fusionsproteinen detektierbar und änderte sich auch nicht signifikant nach Expression von Gal4-Sp3WT. Es kam allerdings zu einer etwa dreifachen Reduktion dieser repressiven Histon-Modifikation in Gegenwart von transkriptionell aktiven Gal4-Sp3KEEm. Monomethyliertes H4K20 war bereits an dem unbesetzten Gal4-Promotor

Ergebnisse

nachzuweisen und wurde nach Expression von Gal4-Sp3WT oder Gal4-Sp3KEEm nur geringfügig reduziert. H4K20me2 war in Anwesenheit von Gal4-Sp3WT etwa zweifach weniger auf dem Gal4-Promotor vorhanden als in Gegenwart von Gal4-Sp3KEEm oder in Abwesenheit von Gal4-Fusionsproteinen. Die Trimethylierung von H4K20 war nach Expression von Wildtyp Gal4-Sp3 deutlich stärker nachzuweisen, während sie in Gegenwart der SUMOylierungs-defizienten Mutante Gal4-Sp3KEEm vollständig fehlte (Abb. 4.22B).

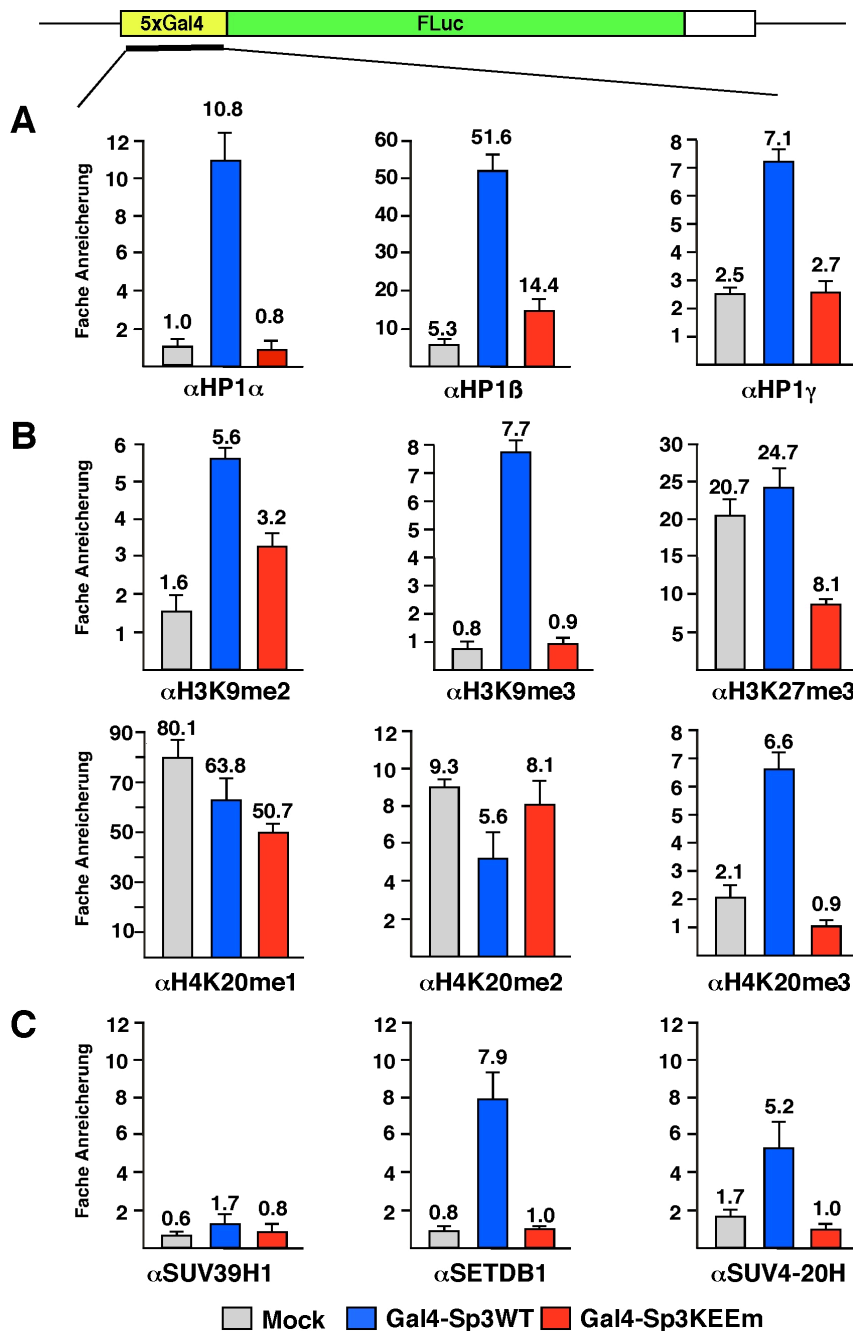


Abbildung 4.22: SUMOylierungs-abhängige Ausbildung von lokalem Heterochromatin

Chromatin Immunpräzipitationen wie zuvor beschrieben in den stabil transfizierten HEK 293-Zellen (Klon 1) nach transients Expression von Gal4-Sp3WT oder Gal4-Sp3KEEm. Dargestellt ist die x-fache Anreicherung auf dem 5xGal4-Promotor gegenüber einer IP mit unspezifischem Antikörper. Der Mittelwert (+/- SD) aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten ist angegeben.

A: SUMO-abhängige Rekrutierung verschiedener HP1 Isoformen. **B:** Ausbildung von repressiven Histon-Modifikationen auf den 5xGal4-Promotor. **C:** SUMOylierungs-abhängige Rekrutierung der Histon-Methyltransferasen SETDB1 und SUV4-20H1/2.

Da es in Anwesenheit von SUMO-modifiziertem Wildtyp Gal4-Sp3 vor allem zu einer Anreicherung der Trimethylierung von H3K9 und H4K20 kam, wurde nachfolgend untersucht, ob Histon-Methyltransferasen (HMTs), die diese Trimethylierungen katalysieren, SUMO-abhängig rekrutiert werden. Die Trimethylierung von Lysin K9 in Histon H3 wird unter anderem von SUV39H1/2 (KMT1A/B) (Rea et al. 2000; Peters et al. 2003) und von SETDB1/ESET (KMT1E) (Schultz et al. 2002; Wang et al. 2003) katalysiert. Während SUV39H in ChIP-Experimenten auf dem Gal4-Promotor kaum detektierbar war (an einen parallel analysierten heterochromatischen Bereich allerdings deutlich rekrutiert wurde; Daten nicht gezeigt), wurde SETDB1 SUMO-abhängig in Gegenwart von Gal4-Sp3WT rekrutiert (Abb. 4.22C). Die Trimethylierung von H4K20 wird durch die HMTs SUV4-20H1 (KMT5B) und SUV4-20H2 (KMT5C) katalysiert (Schotta et al. 2004). ChIP-Experimente mit einem Antikörper, der beide Proteine erkennt, zeigten eine Rekrutierung an den Gal4-Promotor ebenfalls nur in Anwesenheit von SUMOyliertem Wildtyp Gal4-Sp3 (Abb. 4.22C). Diese Daten legen nahe, dass die im Rahmen der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression auftretende Trimethylierung von H3K9 und H4K20 durch die SUMO-abhängig rekrutierten Histon-Methyltransferasen SETDB1 bzw. SUV4-20H1/2 katalysiert wird.

4.3.2 SUMO-abhängige Ausbildung heterochromatischer Eigenschaften auf dem Reporter-Transgen eines alternativen stabil transfizierten Zellklons

Die bisher dargestellten ChIP-Experimente wurden mit dem stabil transfizierten Zellklon 1 durchgeführt. Um auszuschließen, dass die beschriebenen Beobachtungen spezifisch für den Integrationsort des 5xGal4-Reporters in diesem Zellklon sind, wurden analoge ChIP-Experimente auch mit einem anderen Zellklon durchgeführt. Für diese Experimente wurde der Zellklon 4 verwendet (siehe Abb. 4.15).

Auch in Zellklon 4 war eine SUMO-abhängige Rekrutierung von Mi-2, L3MBTL2 und HP1 α sowie der HMTs zusammen mit der Ausbildung der repressiven Histon-Modifikationen durch Gal4-Sp3WT zu finden (Abb. 4.23). Diese Ergebnisse zeigen,

Ergebnisse

dass die beobachteten Chromatin-Veränderungen nicht auf besondere Eigenheiten des Integrationsortes des Reportergens im Zellklon 1 zurückzuführen sind, sondern dass es sich um generell auftretende Ereignisse bei der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression handelt.

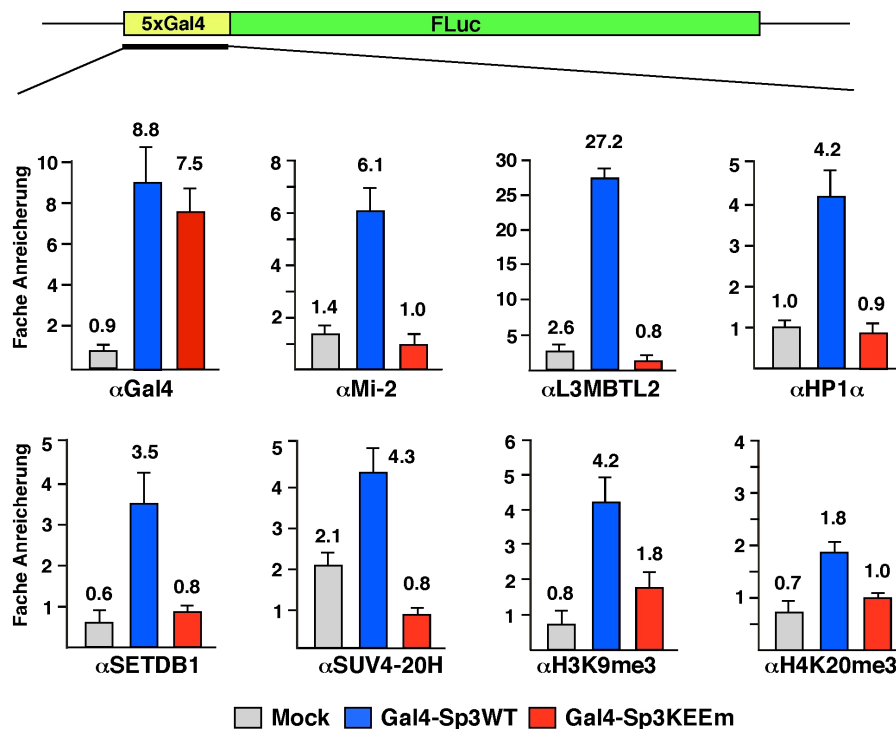


Abbildung 4.23: SUMO-abhängige Rekrutierung der Korepressoren und Ausbildung repressiver Histon-Modifikationen in einem alternativen Zellklon

Chromatin Immunpräzipitationen mit einem alternativen stabil mit dem 5xGal4-Reporter transfizierten HEK 293-Zellklon (Klon 4) nach transienter Transfektion von Gal4-Sp3WT bzw. Gal4-Sp3KEEm. Präzipitiertes Material wurde als Template in qPCRs mit Primern spezifisch für den Gal4-Promotor eingesetzt und die x-fache Anreicherung auf dem Promotor gegenüber einer IP mit unspezifischen Antikörpern berechnet. Der Mittelwert (+/- SD) aus zwei unabhängigen Experimenten ist angegeben.

Die Chromatin Immunpräzipitationen zeigten, dass die Promotor-gebundenen SUMO-modifizierte Transkriptionsfaktoren Sp3 und SF-1 SUMO-abhängig das Chromatin remodelierende Enzym Mi-2, die MBT-Domänen-Proteine L3MBTL1 und L3MBTL2, heterochromatische Proteine der HP1-Familie sowie die Histon-Methyltransferasen SETDB1 und SUV4-20H, die die Trimethylierung von H3K9 bzw. H4K20 katalysieren, rekrutieren. Letztendlich führt die Promotor-Rekrutierung von transkriptionell repressorisch wirkenden SUMOylierten Transkriptionsfaktoren zu der Ausbildung einer lokalen repressiven Chromatinstruktur, die typische Eigenschaften von kompaktiertem Heterochromatin zeigt.

4.4 SUMO-abhängige Ausbildung von Heterochromatin auf einem endogenen Sp3-regulierten Gen

4.4.1 Sp3-abhängige Rekrutierung von Korepressoren und Ausbildung repressiver Histon-Modifikationen auf dem endogenen murinen *DHFR*-Promotor

Um zu untersuchen, ob die beschriebenen Ereignisse, die während der transkriptionellen Repression durch SUMOylierte Transkriptionsfaktoren auf dem Promotor des stabil integrierten Reporter-Transgens stattfinden, auch an endogenen Sp3-regulierten Zielgenen zu beobachten sind, wurden Chromatin Immunpräzipitationen auf dem Promotor der murinen Dihydrofolat-Reduktase (*DHFR*) durchgeführt.

Der murine *DHFR*-Promotor enthält vier Bindungsstellen für Sp-Faktoren (Abb. 4.24A). Chromatin Immunpräzipitationen in embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) zeigten, dass der *DHFR*-Promotor neben Sp3 auch mit den anderen Mitgliedern der Sp-Transkriptionsfaktor-Familie Sp1, Sp2 und Sp4 okkupiert ist (Abb. 4.24B). In Sp3-defizienten MEFs, die aus Sp3 Knockout Mäusen etabliert wurden (Bouwman et al. 2000) (Göllner, 2002), sind mit Ausnahme von Sp3 alle anderen Sp-Faktoren mit dem Promotor assoziiert (Abb. 4.24C). Die Sp-Faktoren waren dagegen nicht auf einer DNA-Region ungefähr 1 kb oberhalb des Transkriptionsstartes des *DHFR*-Gens detektierbar (Abb. 4.24B/C). Dies zeigt die Spezifität der Chromatin Immunpräzipitationen.

Inwieweit die Sp-Faktoren zur gleichen Zeit in einer Zelle an einem Promotor mit mehreren Bindungsstellen gebunden vorliegen, oder ob in verschiedenen Zellpopulationen ausschließlich der eine oder andere Sp-Faktor an den Promotor bindet, ist derzeit nicht bekannt. Für Sp3 und Sp1 wurde allerdings gezeigt, dass sie sich in humanen MCF7 Zellen nicht in denselben nukleären Kompartimenten befinden und nicht zeitgleich auf einem Östrogen-reguliertem Promotor gebunden vorliegen (He et al. 2005).

Ergebnisse

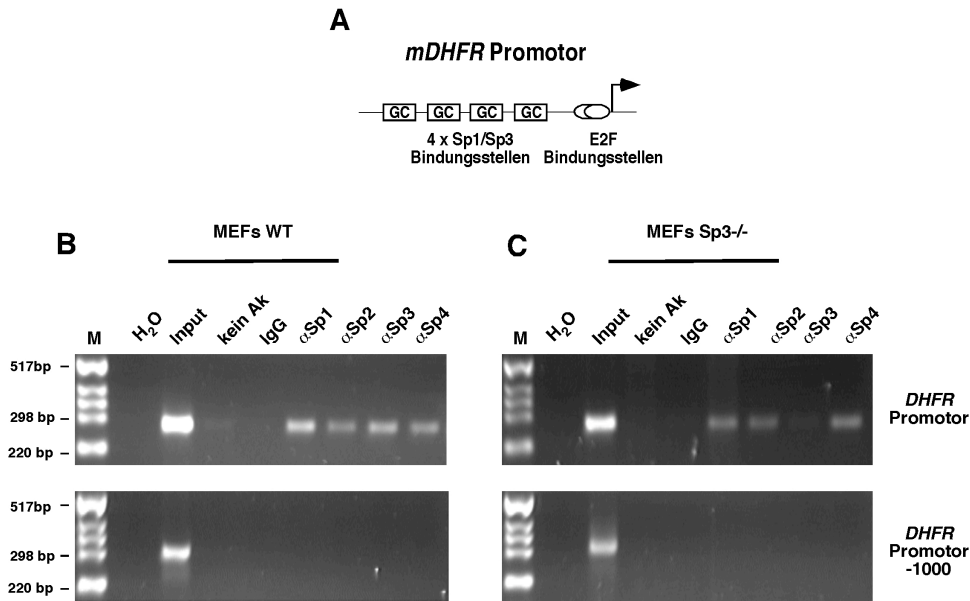


Abbildung 4.24: Assoziation von Sp-Faktoren mit dem murinen *DHFR*-Promotor

A: Schematische Darstellung des murinen *DHFR*-Promotors mit vier GC-Boxen als Bindungsstellen für Sp-Faktoren sowie zwei Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie.

B und C: Chromatin Immunpräzipitationen in Wildtyp (WT) (B) und Sp3-defizienten (Sp3^{-/-}) MEFs (C) mit Antikörpern gegen Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4. Als Kontrolle wurde kein bzw. ein unspezifischer Antikörper (Präimmuns Serum IgG) verwendet. Präzipitiertes Material wurde in PCR-Reaktionen mit Primern spezifisch für den *DHFR*-Promotor (oben) und für eine Region 1000 bp oberhalb des *DHFR*-Promotors (unten) eingesetzt.

Sp3 wird eine transkriptionell repressive Funktion bei der Expression des *DHFR*-Gens zugeschrieben (Birnbaum et al. 1995; Kennett et al. 1997). Entsprechend zeigte sich eine verstärkte *DHFR*-Expression in Sp3-defizienten MEFs (Abb. 4.25A). In Immunoblot-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass Mi-2 und L3MBTL2 in gleicher Weise in Wildtyp und Sp3^{-/-}-MEFs exprimiert werden (Abb. 4.25B). In Chromatin Immunpräzipitationen waren nur in Wildtyp MEFs in Anwesenheit von Sp3 Mi-2, L3MBTL2, HP1 α und die HMTs SETDB1 und SUV4-20H sowie eine Anreicherung der Trimethylierung von H3K9 und H4K20 auf dem *DHFR*-Promotor nachweisbar, während diese Proteine und Modifikationen in Sp3 Knockout MEFs nicht auf der Promotorregion detektiert wurden (Abb. 4.25C). Wiederum zeigte die Amplifikation einer unspezifischen DNA-Region in Kontroll-PCRs, dass die Rekrutierung der Korepressoren spezifisch an den Promotorbereich des *DHFR*-Gens erfolgte (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich also auch auf einem endogenen Sp-regulierten Promotor eine Rekrutierung der Korepressoren und Etablierung der heterochromatischen Merkmale in Abhängigkeit von Sp3.

Ergebnisse

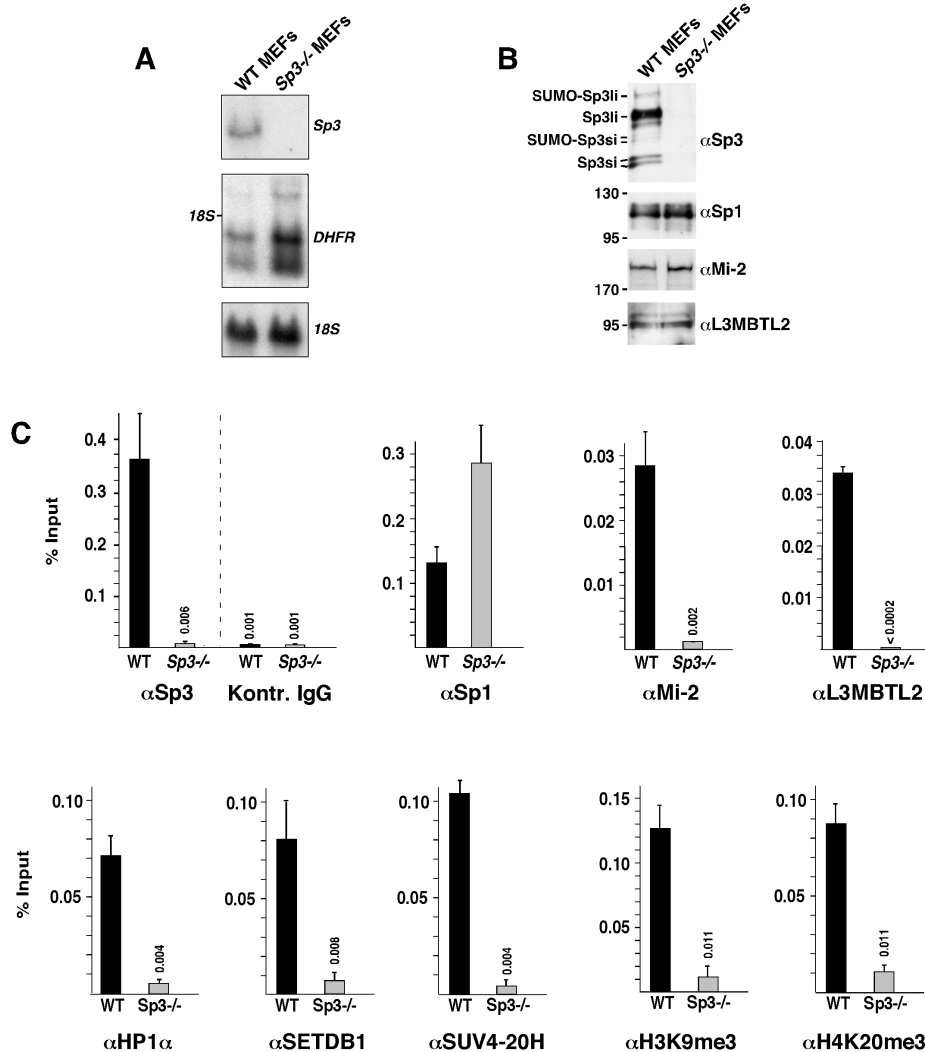


Abbildung 4.25: Rekrutierung von Korepressoren und Ausbildung repressiver Histon-Modifikationen auf dem murinen *DHFR*-Promotor in Wildtyp und Sp3-defizienten MEFs

A: Northern Blot Analyse der *DHFR*-Expression in Wildtyp (WT) und Sp3-defizienten (Sp3^{-/-}) MEFs. Der Northern Blot wurde freundlicherweise von Frau Imme Krüger zu Verfügung gestellt.

B: Immunoblot-Analyse der Expression von Sp3, Sp1, Mi-2 und L3MBTL2 mit Gesamtzell-extrakten aus Wildtyp und Sp3-defizienten MEFs.

C: Chromatin Immunpräzipitationen. Vernetztes Chromatin aus Wildtyp und Sp3-defizienten MEFs (Nr. 2 bzw. 6) wurde in Immunpräzipitationen mit den angegebenen Antikörpern eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein unspezifischer αGal4-Antikörper (Kontr. IgG) eingesetzt. Präzipitierte DNA wurde in quantitativen PCR-Reaktionen mit Primern spezifisch für den Promotorbereich des murinen *DHFR*-Promotors eingesetzt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an präzipitiertem Material gegenüber einer Input-Probe (1 % des Ausgangsmaterials). Angegeben ist der Mittelwert (+/- SD) aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Histon-Methyltransferasen SETDB1 und SUV4-20H die Trimethylierung von H3K9 bzw. H4K20 auf dem *DHFR*-Promotor katalysieren. Dies wird dadurch bestätigt, dass es nach RNAi-vermitteltem Knockdown

Ergebnisse

von SETDB1 bzw. in SUV4-20H1/2-defizienten MEFs (Benetti et al. 2007) zu einer Reduktion der Trimethylierung von H3K9 bzw. H4K20 auf dem *DHFR*-Promotor kommt (Abb. 4.26 bzw. Abb. 4.27). In beiden Fällen hat die Depletion bzw. der Knockout der jeweiligen HMT allerdings keinen Einfluss auf die Promotor-Rekrutierung von anderen Korepressoren, wie Mi-2, L3MBTL1/L2 oder HP1 γ (Abb. 4.26 bzw. Abb. 4.27). Dies legt nahe, dass diese Komponenten der SUMO-vermittelten Repression unabhängig voneinander rekrutiert werden.

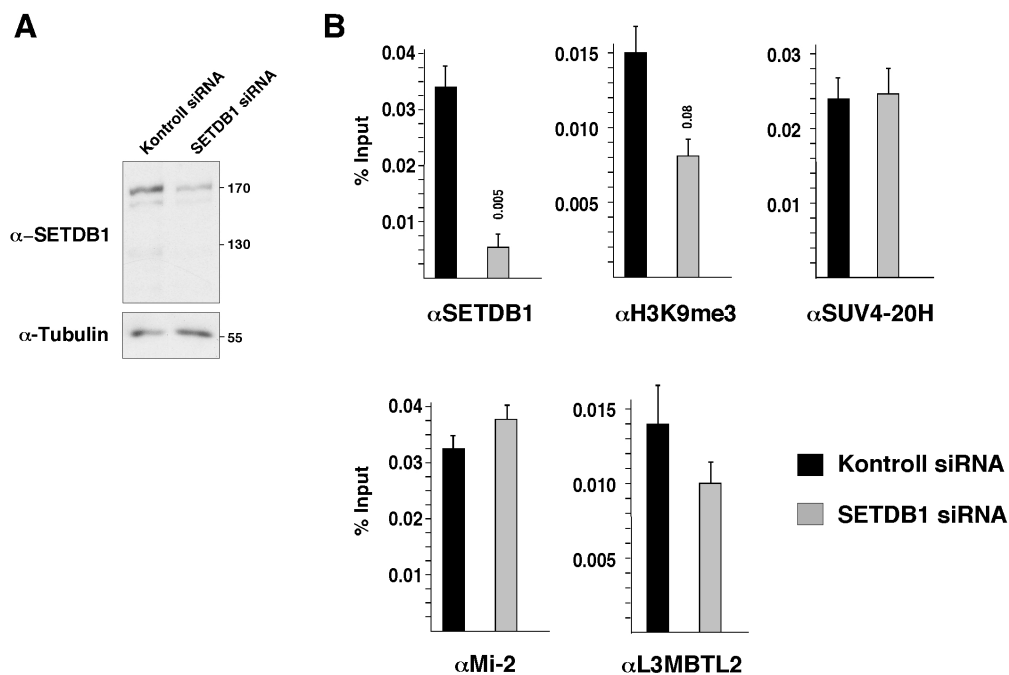


Abbildung 4.26: Reduzierte Trimethylierung von H3K9 auf dem murinen *DHFR*-Promotor nach RNAi-vermitteltem Knockdown von SETDB1

A: Immunoblot-Analyse der SETDB1-Expression nach siRNA-vermitteltem Knockdown. Wildtyp MEFs wurden mit SMARTpool siRNA gegen murines SETDB1 (Dharmacon M-040815) transfiziert und drei Tage nach Transfektion Extrakte im Western Blot mit α SETDB1 Antikörpern analysiert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische siRNA (Non-Targeting #1; Dharmacon D-001210-01) eingesetzt.

B: ChIP nach siRNA-vermitteltem Knockdown von SETDB1 in Wildtyp MEFs. Drei Tage nach Transfektion wurde Chromatin in Immunpräzipitationen mit den angegebenen Antikörpern eingesetzt und präzipitierte DNA als Template in qPCRs mit Primern spezifisch für den murinen *DHFR*-Promotor verwendet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an präzipitiertem Material gegenüber der Input-Probe. Der Mittelwert (+/- SD) von zwei unabhängigen PCR-Ansätzen ist angegeben.

Ergebnisse

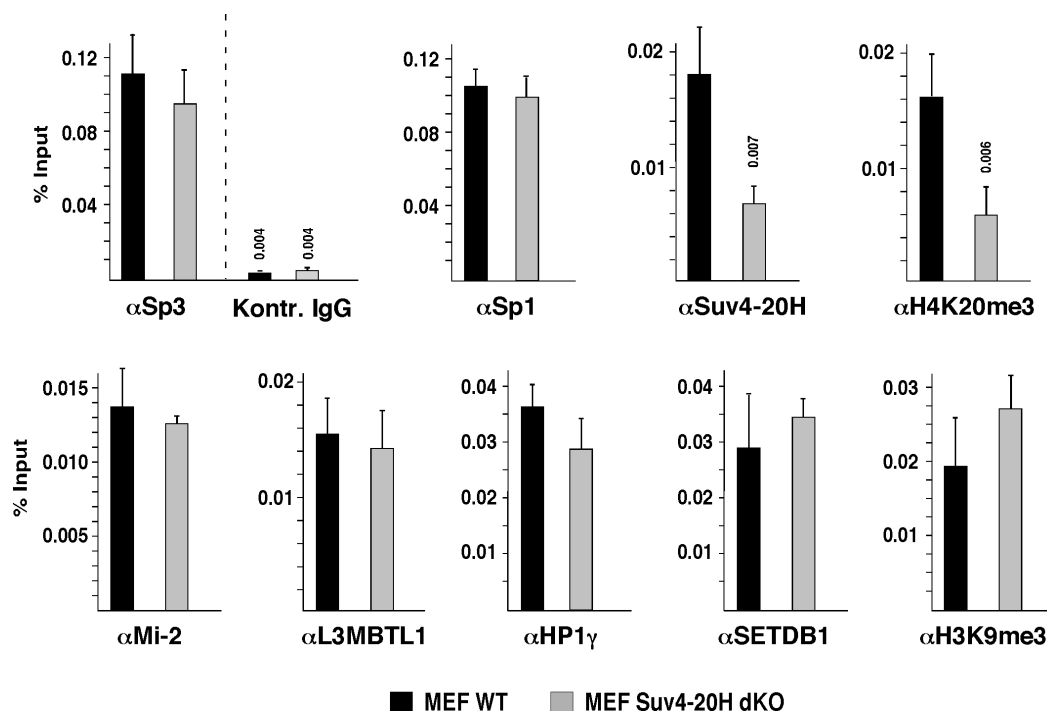


Abbildung 4.27: Korepressoren und repressive Histon-Modifikationen auf dem *DHFR*-Promotor in SUV4-20H1/2-defizienten MEFs

Chromatin Immunpräzipitationen mit den angegebenen Antikörpern in SUV4-20H1/2 Doppel-Knockout (SUV4-20H dKO) MEFs (Benetti et al. 2007) sowie den entsprechenden Wildtyp MEFs. Präzipitiertes Material wurde in qPCRs mit Primern spezifisch für den *DHFR*-Promotor eingesetzt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an präzipitierter DNA gegenüber der Input-Probe. Der Mittelwert (+/- SD) aus zwei unabhängigen Experimenten ist angegeben.

4.4.2 Rescue des Sp3-Knockout-Phänotyps: Sp3-SUMO-abhängige Ausbildung von Heterochromatin auf dem *DHFR*-Promotor

Um zu validieren, dass die SUMO-Modifikation von Sp3 für die Rekrutierung der Korepressoren und die Ausbildung repressiver Histon-Modifikationen auf dem *DHFR*-Promotor verantwortlich ist, wurden ChIP-Experimente in Sp3-defizienten MEFs, die entweder die kurze oder die lange Isoform von Sp3 (Sp3si bzw. Sp3li) bzw. die jeweilige SUMOylierungs-defiziente Mutante stabil re-exprimieren (siehe 3.2.3.2), durchgeführt. Bei der SUMOylierungs-defiziente Mutante handelt es sich um eine Deletionsmutante (SD, Small Deletion), der 13 Aminosäuren einschließlich des SUMO-Akzeptor-Lysinrestes fehlen (Sapetschnig et al. 2002; 2004).

Alle Sp3 Varianten wurden ähnlich stark exprimiert (Abb. 4.28A, 4.29A) und in ChIPs in ähnlicher Art und Weise an den *DHFR*-Promotor rekrutiert (Abb. 4.28B, 4.29B). Die *DHFR*-Expression war in Sp3^{-/-} MEFs, die die SUMOylierungs-defizienten Mutanten re-exprimieren, gegenüber Zellen, die die jeweilige Wildtyp-Form von Sp3 exprimieren, nur leicht erhöht (Abb. 4.28C, 4.29C). Dieser relativ geringe Effekt auf die

Ergebnisse

DHFR-Expression könnte durch stochastische Konkurrenz von transkriptionell stark aktivem Sp1, das ebenfalls an den *DHFR*-Promotor rekrutiert wird (Abb. 4.28D, 4.29B), mit repressivem SUMOyliertem Wildtyp Sp3 um Bindung an die GC-Boxen des *DHFR*-Promotors erklärt werden. Mi-2, L3MBTL2, HP1 α , SETDB1 und SUV4-20H sowie die Trimethylierung von H3K9 und H4K20 waren am *DHFR*-Promotor nur in Anwesenheit der SUMOylierten Wildtyp-Formen von Sp3 zu detektieren, nicht dagegen wenn die SUMOylierungs-defizienten Mutanten exprimiert wurden (Abb. 4.28D, 4.29D). Diese Ergebnisse zeigen, dass die SUMO-Modifikation von Sp3 für die Rekrutierung der Korepressoren und die Etablierung der heterochromatischen Strukturen auf dem endogenen *DHFR*-Promotor verantwortlich ist.

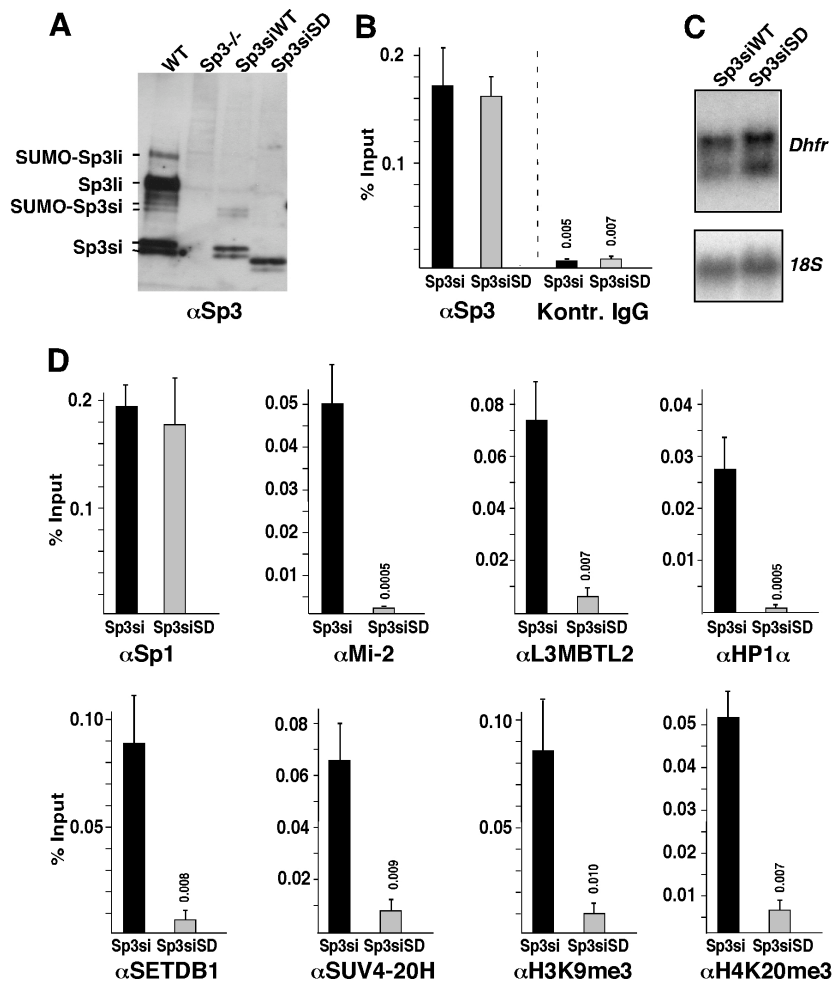


Abbildung 4.28: Korepressoren und heterochromatische Merkmale am *DHFR*-Promotor in Sp3-defizienten MEFs, die die kurzen Isoformen von Sp3 re-exprimieren

A: Immunoblot-Analyse von Gesamtzell-extrakten aus Wildtyp (WT) und Sp3-defizienten MEFs sowie aus Sp3^{-/-} MEFs, bei denen die kurzen Isoformen von Sp3 (Sp3si) bzw. die SUMOylierungs-defiziente Deletionsmutante Sp3siSD stabil re-exprimiert wurden. Angegeben sind die unmodifizierten und SUMO-modifizierten kurzen (si) und langen (li) Sp3-Isoformen.

Ergebnisse

B und D: Chromatin Immunpräzipitationen mit Antikörpern wie angegeben. Immunopräzipitiertes Material aus Sp3^{-/-} MEFs, bei denen entweder Sp3siWT oder Sp3siSD re-exprimiert wurde, wurden in qPCRs mit Primern spezifisch für den *DHFR*-Promotor eingesetzt. Als Kontrolle diente ein unspezifischer α Gal4-Antikörper (Kontr. IgG). Dargestellt ist der prozentuale Anteil an präzipitiertem Material gegenüber der Input-Probe. Der Mittelwert (+/- SD) aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten ist angegeben.

C: Northern Blot Analyse der Expression von *DHFR* in Sp3^{-/-} MEFs nach Rescue mit entweder Sp3siWT bzw. Sp3siSD. Der Northern Blot wurde freundlicherweise von Frau Imme Krüger zur Verfügung gestellt.

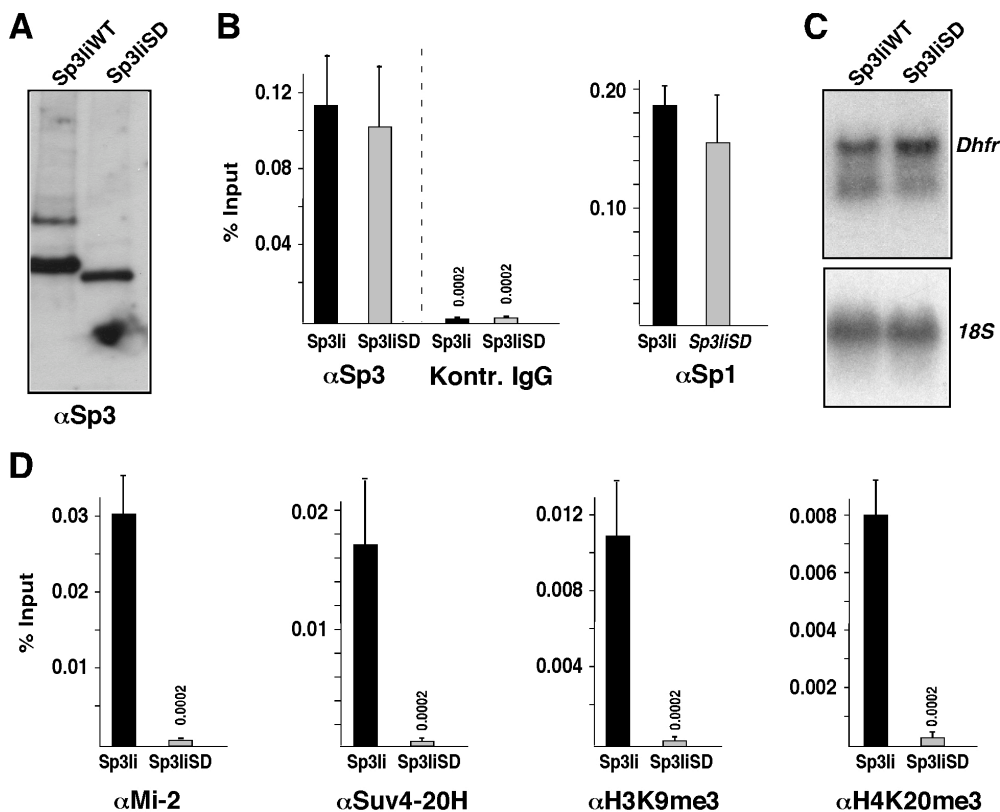


Abbildung 4.29: Rescue des Sp3 Knockout Phänotyps durch Re-Expression der langen Isoform von Sp3

A: Immunoblot von SDS-Gesamtzellextrakten aus Sp3^{-/-} MEFs, die stabil die lange Sp3-Isoform Sp3liWT bzw. die SUMOylierungs-defiziente Deletionsmutante Sp3liSD exprimieren.

B und D: ChIP-Analysen des murinen *DHFR*-Promotors in Sp3-defizienten MEFs, bei denen Sp3liWT bzw. Sp3liSD re-exprimiert wurden. Der prozentuale Anteil an präzipitiertem Material gegenüber der Input-Probe ist dargestellt. Der Mittelwert (+/- SD) aus zwei unabhängigen Experimenten ist angegeben.

D: Northern Blot Analyse der *DHFR*-Expression in Sp3^{-/-}MEFs nach Re-Expression von Sp3liWT bzw. Sp3liSD. Der Northern Blot wurde freundlicherweise von Frau Imme Krüger zur Verfügung gestellt.

4.4.3 Promotor-Rekrutierung von Mi-2 und L3MBTL2 in Sp3-SUMOylierungs-defizienten MEFs

Um weiter zu bestätigen, dass die Korepressoren in Abhängigkeit der SUMO-Modifikation von Sp3 an Promotoren rekrutiert werden, wurden Chromatin Immunpräzipitationen in Sp3-SUMOylierungs-defizienten MEFs durchgeführt. Diese Zellen stammen aus Sp3-SUMO-*Knockin* (KI) Mäusen, die eine Sp3-Variante exprimieren, bei der das SUMOylierungsmotiv IKEE zu IKED mutiert wurde (Krüger, 2007). Immunoblot-Analysen zeigten, dass Sp3 in MEFs von heterozygoten (WT/KI) Mäusen vermindert bzw. von homozygoten (KI/KI) Mäusen nicht mehr SUMOyliert wird (Abb. 4.30A). ChIP-Experimente ergaben, dass die SUMOylierungs-defiziente Mutante von Sp3 in gleicher Weise wie das Wildtyp Protein an den *DHFR*-Promotor rekrutiert wird. Mi-2 und L3MBTL2 waren in Sp3-SUMO-KI MEFs gegenüber entsprechenden Wildtyp MEFs in deutlich reduziertem Ausmaß mit dem Promotor assoziiert (Abb. 4.30B). Auch in diesen Zelllinien zeigte sich somit eine Promotor-Rekrutierung der Korepressoren in Abhängigkeit der SUMO-Modifikation von Sp3.

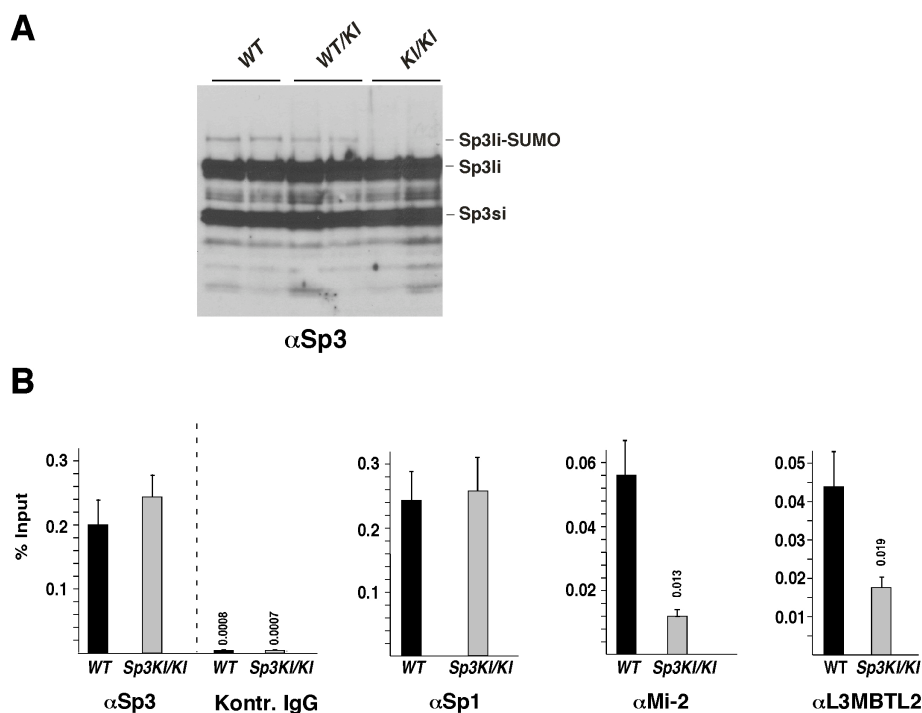


Abbildung 4.30: Reduzierte Rekrutierung von Mi-2 und L3MBTL2 an den *DHFR*-Promotor in Sp3-SUMO-defizienten MEFs

A: Immunoblot-Analyse von Gesamtzell-extrakten aus primären MEFs, die aus Wildtyp (WT), heterozygoten (WT/KI) und homozygoten Sp3-SUMO-*Knockin* (KI/KI) Mäusen gewonnen wurden. Mäuse des Sp3-SUMO-KI-Genotyps exprimieren eine SUMOylierungs-defiziente Mutante von Sp3 (Sp3 E₅₅₃D). Die primären MEFs wurden von jeweils zwei Embryonen des gleichen Genotyps eines Wurfes etabliert (WT: 3/2, 3/3; WT/KI: 3/1, 3/7; KI/KI: 3/5, 3/8).

B: ChIP mit Chromatin aus immortalisierten Wildtyp (WT) und Sp3-SUMO-defizienten (Sp3KI/KI) MEFs (3/2 bzw. 3/5) mit den angegebenen Antikörpern. Präzipitiertes Material wurde als Template in qPCR-Reaktionen mit Primern spezifisch für den *DHFR*-Promotorbereich eingesetzt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an präzipitiertem Material gegenüber einer Input-Probe. Angegeben ist der Mittelwert (+/- SD) aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

4.5 Identifizierung endogener Sp3-regulierter Zielgene

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Genen, deren Expression durch Sp3 reguliert wird. Die Bindungssequenz für Sp-Faktoren, die GC-Box, ist in einer großen Anzahl von Promotoren von Haushaltsgenen, aber auch zell- und entwicklungsspezifischen Genen sowie viralen Genen zu finden. Diese Sequenz wird allerdings nicht nur von Sp3, sondern auch von Sp1 sowie eventuell auch von anderen Mitgliedern der Sp-Transkriptionsfaktor-Familie gebunden.

Um direkte Zielgene von Sp3 zu identifizieren, wurde nicht auf bereits etablierte embryonale Fibroblasten aus Sp3-defizienten Mäusen zurückgegriffen, da möglicherweise aufgrund bereits vielfach stattgefundenen Differenzierungsprozesse während der Embryonalentwicklung primäre Effekte des Sp3-*Knockouts* auf die Genexpression nur schwer nachzuweisen und damit direkte Sp3-regulierte Zielgene kaum zu identifizieren sind. Außerdem bedingen biologische Variabilitäten auch unter Mäusen eines Wurfes natürliche Schwankungen des Genexpressionsmusters unabhängig vom Sp3-Genotyp. Um unmittelbare Effekte des Verlustes von Sp3 auf die Genexpression nachzuweisen und damit direkte Zielgene von Sp3 zu identifizieren, wurde daher eine stabile Zelllinie zum induzierbaren RNAi-vermittelten Knockdown von Sp3 etabliert. Zusätzlich wurde parallel eine stabil transfizierte Zelllinie zur induzierbaren Depletion von Sp1 hergestellt, um ausschließlich von Sp1 oder möglicherweise durch beide Sp-Faktoren regulierte Zielgene zu identifizieren.

4.5.1 Induzierbarer Knockdown von Sp3 und Sp1

Es wurden SaOs-2 Zellen (eine humane Osteosarkoma Zelllinie) mit Konstrukten zur induzierbaren Expression von short hairpin RNA (shRNA) mit Sp3- bzw. Sp1-spezifischen Zielsequenzen stabil transfiziert. Diese Osteosarkoma Zelllinie wurde - neben rein praktischen Erwägungen – verwendet, da es in Sp3-defizienten Mäusen zu Störungen der Ossifikation kommt; Sp3 also in der Knochen- und Zahnentwicklung eine besondere Rolle zu spielen scheint (Göllner et al. 2001b). Die Expression der shRNA-Moleküle steht unter der Kontrolle des RNA-PolymeraseIII-abhängigen H1-

Promotors. Diese doppelsträngigen RNA-Moleküle werden im RISC-Komplex zu einzelsträngigen siRNAs abgebaut, die dann zu einer verminderten Expression des jeweiligen Zielproteins führen, da die Transkription inhibiert und die entsprechende mRNA beschleunigt abgebaut wird (Dykhhoorn et al. 2003; Meister und Tuschl 2004; Sontheimer 2005). Die Transkription der shRNAs wird durch eine Tet-Operator-Sequenz innerhalb des H1-Promotors reguliert. Expressieren die stabil transfizierten Zellen zusätzlich den Tetracyclin-Repressor, so kann die Expression der shRNA und damit der Knockdown der Zielgene Sp3 bzw. Sp1 durch Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin induziert werden (Abb. 4.31) (van de Wetering et al. 2003).

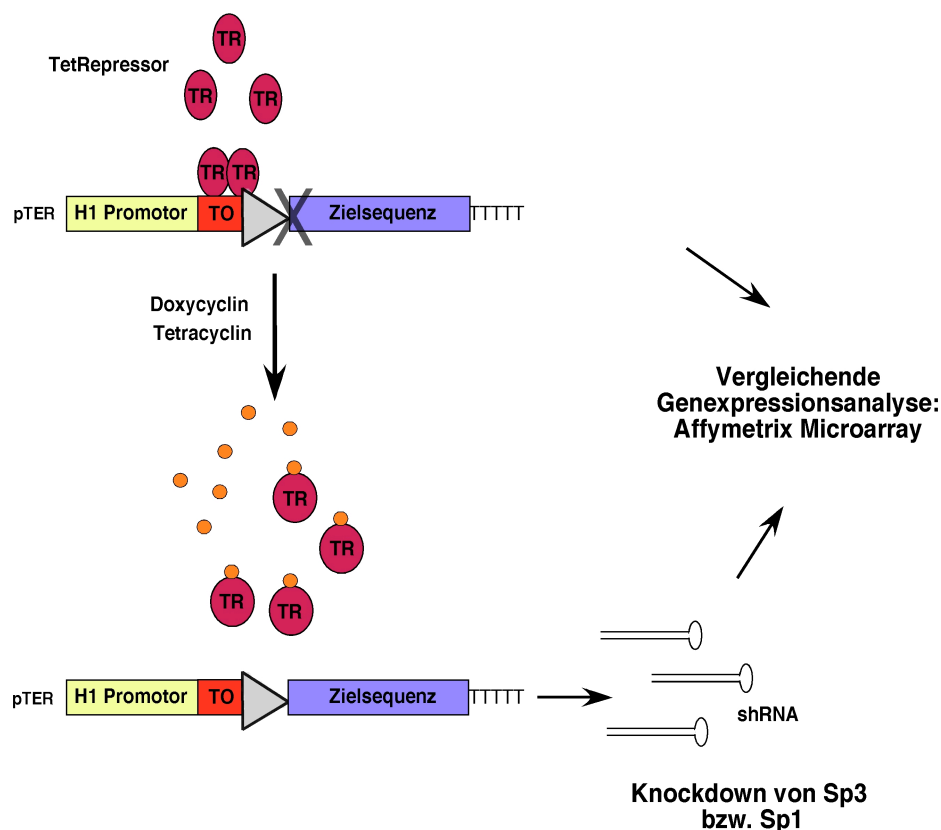


Abbildung 4.31: Prinzip des induzierbaren Knockdowns und experimenteller Ansatz zur Identifizierung potentieller Zielgenen von Sp3 und Sp1

Zellen, die stabil den Tetracyclin-Repressor (TetRepressor) exprimieren, werden mit Expressionskonstrukten für short hairpin RNAs (shRNAs) unter der Kontrolle des RNA-PolymeraseIII-abhängigen H1-Promotors, der zusätzlich eine Tet-Operator-Sequenz (TO) als Bindungsstelle für den TetRepressor enthält, transfiziert. Im uninduzierten Zustand bindet der TetRepressor an die Operator-Sequenz und blockiert die Transkription durch den H1-Promotor (oben). Durch Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin, die an den TetRepressor binden, dessen Konformation verändern und dadurch dessen Bindung an die Operator-Sequenz verhindern, wird die Transkription der spezifischen shRNAs und damit der Knockdown der entsprechenden Zielgene induziert (unten) (van de Wetering et al. 2003).

Durch eine genomweite vergleichende Expressionsanalyse von uninduzierten und induzierten Zellen sollten potentielle Zielgene der depletierten Sp-Faktoren identifiziert werden.

Ergebnisse

Gegenüber der transienten Transfektion von siRNAs bietet dieses Zellsystem den Vorteil, dass bei wiederholter Durchführung der Experimente eine konstante Depletion der entsprechenden Zielproteine unabhängig von unterschiedlichen Transfektionseffizienzen erreicht wird.

Durch eine vergleichende genomweite Genexpressionsanalyse von uninduzierten und induzierten Zellen sollten mit Hilfe der GeneChip Microarray Technologie der Firma Affymetrix potentielle Zielgene von Sp3 und Sp1 identifiziert werden.

SaOs-2 Zellen, die den Tetracyclin Repressor stabil exprimierten (SaOsTR), wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Gaubatz zu Verfügung gestellt. Die Zellen tragen eine von dem Plasmid pcDNA6-TR (Invitrogen) vermittelte Resistenz gegenüber Blasticidin. Diese Zellen wurden zusätzlich mit zwei Konstrukten zur induzierbaren Expression von shRNAs, die gegen unterschiedliche Zielbereiche der Sp3 mRNA gerichtet waren (pTER-Sp3siRNA A und pTER-Sp3siRNA 2; siehe 3.2.4.2), stabil transfiziert. Nach Selektion mit Zeocin und Isolierung von Einzelzellklonen wurde in insgesamt 22 Einzelklonen die Induzierbarkeit der Depletion von Sp3 durch Zugabe von Doxycyclin getestet. Lediglich drei Einzelklone zeigten dabei in Immunoblot-Analysen eine signifikante Reduktion der Sp3-Expression nach Doxycyclin-Induktion (Daten nicht gezeigt).

Der zeitliche Verlauf des Sp3 Knockdowns wurde in Immunoblot-Analysen bei einem Einzelklon (SaOsTR pTER-Sp3siRNA, Klon 1) in Form einer Zeitkurve der Doxycyclin-Induktion genauer untersucht. Die stärkste Depletion von Sp3 zeigte sich nach einer Induktion über 4 Tage, während die Expression von Sp1 nicht beeinflusst wurde (Abb. 4.32A). In gleicher Weise war nach viertägiger Inkubation mit Doxycyclin eine deutliche Reduktion der Sp3-mRNA nachzuweisen (Abb. 4.32B). Parallel wurden Zellen, die stabil mit dem Leervektor pTER transfiziert worden waren, untersucht. In diesen Zellen war die Expression von Sp3 nach viertägiger Induktion mit Doxycyclin nicht beeinflusst (Abb. 4.32C).

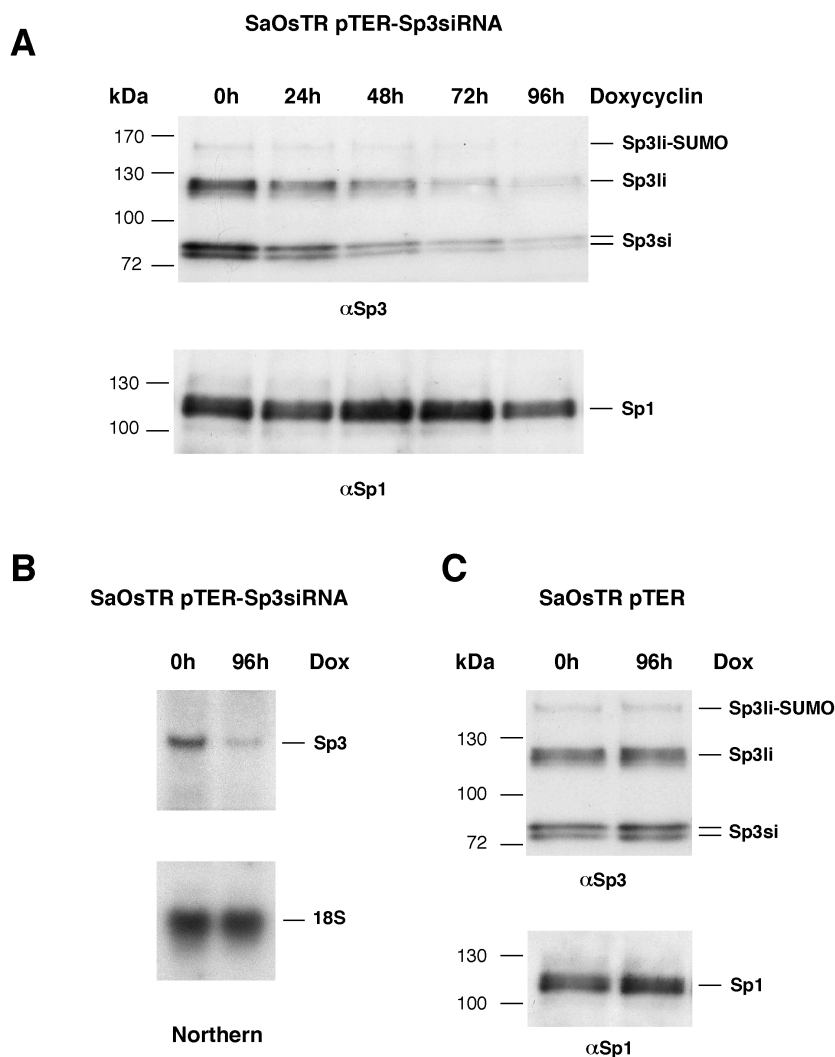


Abbildung 4.32: Induzierbarer Knockdown von Sp3

A: Immunoblot-Analyse. Ein stabil transfizierter Einzelzellklon zum induzierbaren Knockdown von Sp3 (SaOsTR pTER-Sp3siRNA, Klon 1) wurde mit 1 µg/ml Doxycyclin wie angegeben inkubiert und anschließend SDS-Gesamtzellextrakte elektrophoretisch aufgetrennt und in Immunoblot-Analysen untersucht. Angegeben sind die kurzen (si) und langen (li) Isoformen von Sp3 sowie die SUMO-modifizierte lange Isoform (Sp3li-SUMO).

B: Northern Blot Analyse der Sp3-Expression von Gesamt-RNA aus besagtem Einzelzellklon (SaOsTR pTER-Sp3siRNA, Klon 1) nach 96-stündiger Induktion mit 1 µg/ml Doxycyclin.

C: Immunoblot-Analyse von Gesamtzellextrakten aus SaOsTR-Zellen, die stabil mit dem Leervektor pTER transfiziert worden waren, nach 96-stündiger Induktion mit 1 µg/ml Doxycyclin.

In gleicher Weise wurden auch stabile Zellklone zum induzierbaren Knockdown von Sp1 hergestellt. Die SaOsTR-Zellen wurden gleichzeitig mit drei Konstrukten zur Expression von Sp1-spezifischer shRNA (pTER-Sp1siRNA 1, 2 und 4) transfiziert, ebenfalls mit Zeocin selektioniert und Einzelzellklone isoliert. Anschließend wurden die insgesamt 17 Einzelklone auf Induzierbarkeit des Sp1-Knockdowns getestet, wobei sich bei zweien ein deutliche Depletion von Sp1 nach Inkubation mit Doxycyclin zeigte

Ergebnisse

(Daten nicht gezeigt). In Abbildung 4.33 ist die Kinetik der Depletion von Sp1 nach Induktion mit Doxycyclin bei einem Einzelzellklon (SaOsTR pTER-Sp1siRNA Klon 9) dargestellt. Nach fünftägiger Induktion mit Doxycyclin war die stärkste Reduktion der Sp1 Expression nachzuweisen, während das Sp3-Level nicht beeinflusst wurde (Abb.4.33).

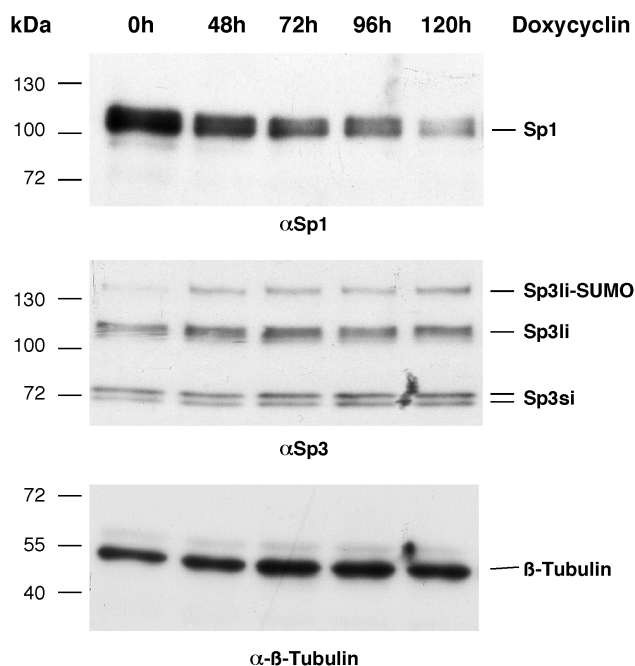


Abbildung 4.33: Induzierbarer Knockdown von Sp1

Immunoblot-Analysen. Ein zum induzierbaren Knockdown von Sp1 stabil transfizierter Einzelzellklon (SaOsTR pTER-Sp1siRNA Klon 9) wurde wie angegeben mit 1 μ g/ml Doxycyclin inkubiert und anschließend Gesamtzellextrakte in Western Blot Analysen und Immundetektion mit den angegebenen Antikörpern untersucht.

Weiterhin wurden Zellen etabliert, bei denen sowohl die Sp3- als auch die Sp1-Expression reduziert werden konnte. Dazu wurde der Sp3-Knockdown-Einzelklon (SaOsTR pTER-Sp3siRNA, Klon 1) zusätzlich mit Konstrukten zum induzierbaren Expression von shRNA gegen Sp1 (pBabe-Sp1siRNA 1, 2 und 3, siehe 3.2.4.2) transfiziert. Diese Plasmide vermitteln eine zusätzliche Resistenz gegenüber Puromycin, so dass die transfizierten Zellen - neben den bereits vorhandenen Resistenzen gegen Blastocidin und Zeocin - mit Puromycin selektioniert werden konnten. Hier wurden 28 Einzelklone auf Induzierbarkeit des Knockdowns von Sp1 getestet, von denen nur einer eine signifikante Reduktion der Sp1 Expression nach Doxycyclin-Induktion zeigte. Der induzierbare Knockdown von Sp3 war hingegen weiterhin bei allen Einzelklonen auch nach der zusätzlichen Selektion durch Puromycin nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

Die Kinetik der gleichzeitigen Depletion von Sp3 und Sp1 nach Induktion ist in einem Zellklon (SaOsTR pTER-Sp3siRNA, pBabe-Sp1siRNA, Klon 28) in Abbildung 4.34 dargestellt. Nach fünftägiger Induktion wurden sowohl Sp1 als auch Sp3 depletiert. Allerdings zeigte sich ein deutlich ineffizienterer Knockdown von Sp1 im Vergleich zu den Zellen, bei denen nur Sp1 depletiert wurde (vgl. Abb. 4.33). Eventuell ist eine stärkere gleichzeitige Reduktion dieser beiden essentiellen Sp-Faktoren nicht möglich. Auch *in vivo* führt in Sp1^{+/-}Sp3^{+/-} Compound-Heterozygoten Mäusen die gleichzeitige verminderte Expression beider Sp-Faktoren zu embryonaler Letalität (Krüger et al. 2007).

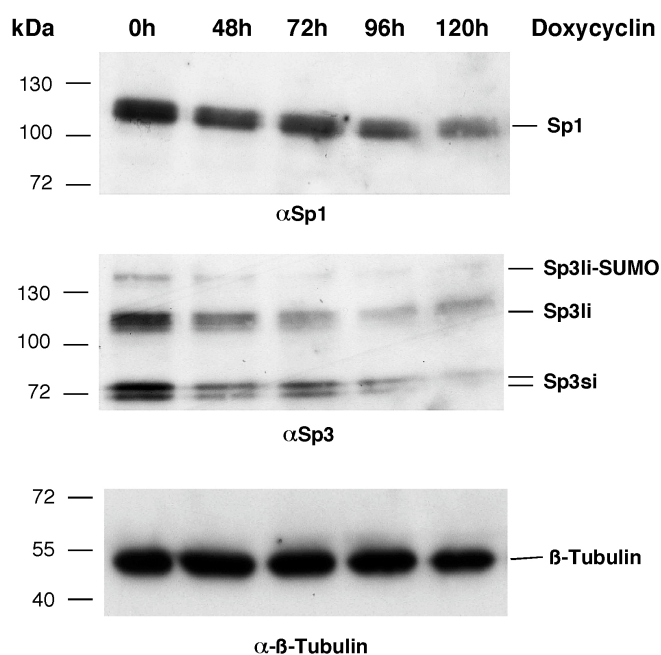


Abbildung 4.34: Gleichzeitige induzierbare Depletion von Sp1 und Sp3

Immunoblot-Analysen eines zum induzierbaren gleichzeitigen Knockdown von Sp1 und Sp3 stabil transfizierten SaOs-Einzelzellklons (SaOsTR pTER-Sp3siRNA, pBabe-Sp1siRNA, Klon 28). Die Zellen wurden wie angegeben mit 1 μ g/ml Doxycyclin behandelt und anschließend Gesamtzellextrakte in Western Blot Analysen untersucht.

Die dargestellte Induzierbarkeit der Depletion von Sp3 bzw. Sp1 in den isolierten Einzelzellklonen war auch nach mehreren Passagen mit gleicher Effizienz nachzuweisen (Mack, 2007 und Daten nicht gezeigt). Die etablierten hier beschriebenen Zelllinien zum induzierbaren Knockdown von Sp3 und/oder Sp1 bieten somit ein geeignetes Zellsystem, um in mehreren biologisch unabhängigen Experimenten direkt regulierte Zielgene von Sp3 bzw. Sp1 zu identifizieren sowie deren Einfluss auf die jeweilige Genaktivität zu untersuchen.

4.5.2 Untersuchung des veränderten Genexpressionsmusters nach Depletion von Sp3 und/oder Sp1 durch *Microarray*-Analysen

Die von der Firma Affymetrix entwickelte *Microarray* GeneChip-Technologie erlaubt die genomweite Analyse von veränderten Genexpressionsmustern. Dazu wird fluoreszenzmarkierte cDNA zweier zu untersuchender Zellpopulationen mit für jedes Gen charakteristischen Oligonukleotid-Sonden, die in Form so genannter Spots auf einem festen Träger immobilisiert wurden (*Microarray*), hybridisiert.

Die differenzielle Genexpression von unbehandelten und Sp3 bzw. Sp1-depletierten Zellen wurden auf einem Human Genome U133 Plus 2.0 *Microarray* analysiert. Dieser Array enthielt Oligonukleotid-Sonden für über 47000 humane Transkripte, einschließlich 38500 gut charakterisierter menschlicher Gene. Zur Depletion von Sp3 bzw. Sp1 wurden die entsprechenden stabil transfizierten Einzelzellklone (s.o.) für fünf Tage mit Doxycyclin induziert und anschließend Gesamt-RNA aus unbehandelten und induzierten Zellen isoliert (siehe 3.3.2.3). In Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Böttger vom MPI in Bad Nauheim wurde diese RNA in unterschiedlich fluoreszenzmarkierte cDNA umgeschrieben und auf jeweils einem Array hybridisiert. Diese Experimente wurden mit jeweils drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt und lieferten letztendlich eine Liste von deregulierten Genen, die nach Knockdown von Sp3 bzw. Sp1 verändert exprimiert wurden. Eine Auswahl der deregulierten Gene ist in den Tabellen A1-A3 im Anhang dargestellt.

Nach Knockdown von Sp3 wurden auf diese Weise insgesamt 705 mindestens zweifach deregulierte Gene identifiziert, davon 445 Gene, die nach Depletion von Sp3 gesteigert exprimiert wurden, während die Expression bei 260 Genen reduziert war (Abb. 4.35). Nach Sp3-Knockdown mindestens 3-fach deregulierte Gene sind in Tabelle A1 im Anhang dargestellt. Bei der Mehrzahl der identifizierten Gene scheint Sp3 die Funktion eines negativen Regulators der Transkription zu übernehmen, während Sp3 nur bei ungefähr einem Drittel der Gene die Rolle eines transkriptionellen Aktivators einnimmt. Unter den Genen, die vermindert exprimiert wurden, befand sich auch Sp3 selbst, das durchschnittlich in allen drei unabhängigen Experimenten 4,2-fach-reduziert nachweisbar war. Dieses Ergebnis bestätigt die erfolgreiche Depletion von Sp3 und entspricht auch den Immunoblot-Analysen, die nach fünftägiger Induktion mit Doxycyclin ebenfalls eine Reduzierung der Expression von Sp3 um etwa 80% anzeigten.

Die *Microarray*-Analysen nach induziertem Knockdown von Sp1 lieferten insgesamt 393 mindestens 2-fach dereguliert exprimierte Gene, darunter nur 46, die nach

Ergebnisse

Depletion von Sp1 verstärkt, und 347, die vermindert exprimiert wurden (Tabelle A2; Abb. 4.35). Sp1 scheint also bei der weitaus größten Anzahl der identifizierten potentiellen Zielgene die Funktion eines transkriptionellen Aktivators zu übernehmen. Die erfolgreiche Depletion von Sp1 konnte auch innerhalb dieser Microarray-Analyse bestätigt werden; es zeigte sich durchschnittlich in allen drei unabhängigen Experimenten eine 2,2-fache Reduzierung der Expression von Sp1.

Abbildung 4.35 stellt die Ergebnisse der Microarray-Analysen nach Depletion von Sp3 bzw. Sp1 nochmals zusammenfassend dar. Generell ist nur eine sehr geringe Überlappung im Spektrum der deregulierten Gene zu beobachten. Nur insgesamt 10 Gene wurden sowohl nach Sp3- als auch nach Sp1-Knockdown verändert exprimiert, könnten also potentielle Zielgene beider Sp-Faktoren darstellen. Darunter befindet sich eins, das in beiden Fällen verstärkt exprimiert wurde, drei, die jeweils reduziert nachweisbar waren, und sechs, die nach Sp3-Depletion verstärkt und nach Sp1-Depletion vermindert exprimiert wurden. Es handelt sich dabei in erster Linie um Gene mit unbekanntem oder hypothetischen Genprodukten. Die 10 Gene wurden in den Tabellen A1 und A2 im Anhang markiert.

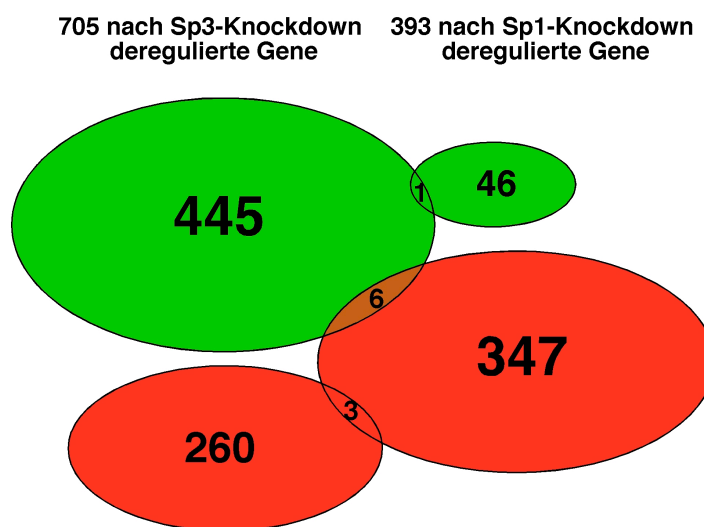


Abbildung 4.35: Zusammenfassung der nach Sp3- bzw. Sp1-Depletion deregulierten Gene
Nach siRNA-vermitteltem Knockdown von Sp3 wurden in genomweiten Microarray-Analysen insgesamt 705 mindestens 2-fach deregulierte Gene identifiziert (linke Seite), davon 445 verstärkt (grün) und 260 vermindert (rot) exprimiert. Die Depletion von Sp1 führte zu einer veränderten Expression von insgesamt 393 Genen (rechte Seite), wobei 46 vermehrt und 347 reduziert nach Sp1-Knockdown exprimiert wurden. Die jeweiligen Schnittmengen geben die insgesamt 10 sowohl nach Sp3- als auch nach Sp1-Knockdown deregulierten Gene an.

Nach gleichzeitigem Knockdown von Sp3 und Sp1 wurden in Microarray-Analysen schließlich insgesamt 657 mindestens 2-fach deregulierte Gene identifiziert, wovon 453

Ergebnisse

Gene verstärkt und 204 vermindert exprimiert wurden. Eine Auswahl von mindestens 4-fach deregulierten Genen ist in Tabelle A3 im Anhang dargestellt. Unter den reduziert exprimierten Genen befand sich auch Sp3 (2,9-fach geringer exprimiert), allerdings nicht Sp1, dessen Expression nur um den Faktor 1,3 reduziert wurde. Die geringe Effizienz des Sp1-Knockdowns (siehe Abb. 4.34) konnte also auch in den Microarray-Analysen bestätigt werden. Diese Ergebnisse erlauben somit keine Rückschlüsse auf gemeinsam regulierte Zielgene von Sp3 und Sp1.

Unter den im Rahmen der durchgeführten Microarray-Analysen nach Sp3 bzw. Sp1-Depletion identifizierten deregulierten Genen befanden sich keine der klassischen Haushaltsgene. Deren Expression scheint, obwohl Bindungsstellen für Sp-Faktoren in fast allen Promotoren vorkommen, nicht durch eine vermindertes Proteinlevel an Sp3 oder Sp1 beeinflusst zu sein. Auffallend war außerdem, dass insbesondere diejenigen potentiellen Zielgene, deren Expression nach Sp3-Depletion verstärkt wurde, auf sehr niedrigem Niveau exprimiert wurden. Möglicherweise übernimmt (SUMO-modifiziertes) Sp3 hier die Funktion eines Repressors, der die Expression von nicht benötigten Genen in diesem speziellen Zelltyp verhindert.

Die durchgeführten genomweiten Microarray-Analysen nach Depletion von Sp3 und Sp1 lieferten erste Hinweise auf potentielle direkt regulierte Zielgene der Sp-Transkriptionsfaktoren. Allerdings bedürfen diese Ergebnisse der Validierung durch unabhängige alternative Genexpressionsstudien in Form von RT-PCR- oder Northern Blot-Analysen.

5. Diskussion

Der größte Gruppe von Proteinen, die posttranslational mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO modifiziert werden, sind transkriptionelle Regulatoren, wie sequenz-spezifische Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren oder Chromatin-modifizierende Enzyme. In den meisten Fällen führt die SUMO-Modifikation eines Transkriptionsfaktors zu einer Reduktion der transkriptionellen Aktivität.

Der relative Anteil eines SUMOylierten Transkriptionsfaktors ist gegenüber der Gesamtmenge an Protein stets relativ gering. In vielen Fällen hat die Modifikation mit SUMO trotzdem eine vollständige Repression der transkriptionellen Aktivität zur Folge und die Mutation der SUMO-Akzeptorstelle führt zur Aufhebung der transkriptionellen Repression. Diese Beobachtung legt ein Modell der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression nahe, bei dem ein transient modifizierter Transkriptionsfaktor SUMO-abhängig repressorische Proteine an den Promotor rekrutiert, die dann stabile Veränderungen der Chromatinstruktur verbunden mit transkriptioneller Repression hervorrufen (Hay 2005). In diesem Fall wird SUMO benötigt, um die Repression zu initiieren, nicht aber um sie aufrecht zu erhalten. Somit finden wahrscheinlich nur schwache, transiente Interaktionen zwischen einem SUMOylierten Transkriptionsfaktor und einem potentiellen SUMO-abhängigen Korepressor statt, die in biochemischen Verfahren nur schwierig nachzuweisen sind. Mit Hilfe eines genomweiten RNAi-Screens konnten diese Probleme gelöst und SUMO-abhängige transkriptionelle Repressionskomponenten identifiziert werden.

5.1 Validierung des RNAi-Screens zur Identifizierung SUMO-abhängiger Korepressoren

In einem genomweiten RNAi-Screen mit *Drosophila melanogaster* Zellen wurden von Frau Alexandra Sapetschnig insgesamt 185 Proteine identifiziert, deren Knockdown durch spezifische dsRNAs zu einer partiellen Aufhebung der transkriptionellen Repression durch SUMOyliertes Sp3 führte. Ausgehend von diesem RNAi-Screen wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Kontroll-Screens durchgeführt, die letztendlich zur Identifizierung von 120 Proteinen führte, deren dsRNA-vermittelte Depletion die Repression durch SUMO-modifiziertes Wildtyp Sp3 aufhob, während die

transkriptionelle Aktivität einer SUMOylierungs-defizienten Mutante von Sp3 nicht beeinflusst wurde. Diese 120 Proteine stellen somit potentielle Regulatoren der SUMOylierungs-Enzymatik oder des SUMO-abhängigen Repressionsmechanismus dar. Eine Problematik beim Einsatz von dsRNAs besteht darin, dass durch die Vielzahl an entstehenden siRNA-Molekülen gelegentlich neben dem eigentlichen Zielprotein auch andere Proteine depletiert werden (Kulkarni et al. 2006; Ma et al. 2006). Um diese so genannten Off-Target-Effekte zu minimieren und falsch-positive Kandidaten auszuschließen, wurden diverse Validierungs-Experimente durchgeführt. Es wurden 40 Proteine, deren Knockdown durch die im RNAi-Screen eingesetzte dsRNA die stärkste De-Repression von Sp3-SUMO zeigte, mit alternativen, sofern möglich nicht überlappenden dsRNAs depletiert. Bei etwa der Hälfte der untersuchten Proteine führte auch die Depletion durch alternative dsRNAs zu einer Aufhebung der transkriptionellen Repression durch SUMOyliertes Sp3 (Abb. 4.3). Dieser durch mehrere unabhängige dsRNAs reproduzierbare Phänotyp bestätigt die Spezifität der gewählten dsRNA gegen das jeweilige Zielgen. Dagegen hatte der Knockdown durch alternative dsRNAs von 21 der untersuchten 40 Proteine keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von Sp3. Ob dies auf einen ineffizienten Knockdown durch die alternative dsRNA zurückzuführen ist, oder ob die im RNAi-Screen verwendete dsRNA aufgrund von Off-Target-Effekten die Sp3-SUMO-abhängige Transkription aktivierten, ist unklar. Es ist allerdings davon auszugehen, dass auch einige der übrigen 80 dsRNAs die Sp3-SUMO-abhängige Transkription aufgrund von unspezifischen Off-Target-Effekten aktivierten. Für ausgewählte Proteine wurden weitere Validierungs-Experimente durchgeführt. Die Effizienz der dsRNA-vermittelten Depletion der potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren Mi-2, MEP-1, Sfm1b und Sbb (siehe unten) wurde in Immunoblot-Analysen untersucht. Die effiziente Depletion dieser Proteine durch verschiedene dsRNAs ging dabei mit der Aktivierung der Sp3-SUMO-vermittelten Transkription einher (Abb. 4.8). Diese eindeutige Korrelation bestätigt den Zusammenhang zwischen Aufhebung der transkriptionellen Repression und dsRNA-vermitteltem Knockdown des jeweiligen Proteins. Als zusätzliche Kontrolle für die Validität des RNAi-Phänotyps wurden Rescue-Experimente durchgeführt. Nach dsRNA-vermitteltem Knockdown wurden Mi-2, MEP-1 und Sfm1b durch Transfektion von Expressionskonstrukten re-exprimiert, wodurch der jeweilige RNAi-Phänotyp aufgehoben werden konnte (Abb. 4.9). Zudem konnten die RNAi-Phänotypen nach Knockdown der potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren in einer alternativen *Drosophila* Zelllinie bestätigt werden

(Abb. 4.7). Diese Validierungs-Experimente bestätigen die bedeutende Rolle dieser Proteine in der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression.

Es ist allerdings nicht zu erwarten, dass alle am SUMO-abhängigen Repressionsmechanismus beteiligten Proteine durch den RNAi-Screen identifiziert worden sind. Einerseits könnten zu geringe Knockdown-Effizienzen der verwendeten dsRNAs die Aufhebung der transkriptionellen Repression durch SUMOyliertes Sp3 verhindern. Andererseits könnten funktionelle Redundanzen unter den am Repressionsmechanismus beteiligten Proteinen existieren, die den RNAi-Phänotyp nach Depletion eines einzelnen Proteins überdecken. Es könnten also durchaus noch weitere Proteine am SUMO-abhängigen Repressionsprozess beteiligt sein. In diesem Zusammenhang ist auch anzumerken, dass es sich bei dem durchgeführten RNAi-Screen um einen Plasmid-basierten Assay handelt, bei dem nach transienter Transfektion eines Reporterkonstruktes die Sp3-abhängige Transkription untersucht wurde. Sehr wahrscheinlich wurden Proteine, die im Kontext der endogenen Chromatinstruktur die SUMO-abhängige Repression regulieren, durch den RNAi-Screen nicht erfasst. Dies wurde durch nachfolgende Experimente im Säugersystem bestätigt, bei denen gezeigt wurde, dass beispielsweise Histon-modifizierende Enzyme, die nicht im RNAi-Screen identifiziert wurden, an der SUMO-abhängigen Repression beteiligt sind.

5.2 Identifizierung von Proteinen, die die SUMO-Konjugation oder die SUMO-abhängige Repression beeinflussen

Um zu unterscheiden, ob die identifizierten Proteine den SUMO-abhängigen Repressionsmechanismus oder die SUMOylierungs-Enzymatik beeinflussen, wurde die relative SUMOylierung von Sp3 in quantitativen Western-Blot-Analysen nach dsRNA-vermittelter Depletion von 20 Kandidaten untersucht. Dabei kam es nach Depletion von dUbc9 und dPIAS zu einer deutlichen Reduktion der SUMO-Modifikation von Sp3 (Abb. 4.5) als auch der generellen SUMOylierung (Daten nicht gezeigt). *Drosophila* Ubc9 übernimmt in gleicher Weise wie die Orthologen im Säugersystem die Funktion eines SUMO-konjugierenden E2-Enzyms (Lehembre et al. 2000). *Drosophila* PIAS (ZIMP) scheint essentielle Funktionen bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der korrekten Chromosomen-Struktur während der Interphase zu übernehmen (Hari et al. 2001). Die orthologen Säuger-Proteine der PIAS-Familie sind als E3-Ligasen gegenüber Sp3 (Sapetschnig et al. 2002) und vielen anderen SUMO-Substratproteinen beschrieben (Sachdev et al. 2001; Kotaja et al. 2002; Nishida und Yasuda 2002;

Schmidt und Müller 2002). Die Ergebnisse der quantitativen Western-Blot-Analysen legen nahe, dass *Drosophila* PIAS in ähnlicher Weise wie die Säuger-Orthologen der PIAS-Proteinfamilie die Funktion einer SUMO-E3-Ligase gegenüber Sp3 und wahrscheinlich auch gegenüber anderen Substraten übernehmen kann.

Neben den Mitgliedern der SUMO-Konjugations-Enzymatik wurden mittels quantitativer Immunoblot-Analysen noch zwei weitere Proteine identifiziert, deren Depletion zu einer Reduktion der relativen SUMOylierung von Sp3 führte und die somit entweder direkt oder indirekt die SUMOylierungs-Maschinerie regulieren. Es handelt sich um den Transkriptionsfaktor Jra, das orthologe Protein des Säuger-Transkriptionsfaktors Jun, sowie ein bisher nicht näher charakterisiertes Protein (CG 13088). Wie diese Proteine die SUMOylierungs-Maschinerie beeinflussen ist unbekannt; möglicherweise reguliert Jra die Expression der Enzyme der SUMO-Konjugations-Kaskade. Jra bildet gemeinsam mit Kay, dem orthologen Protein des Säuger-Transkriptionsfaktors Fos, den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1 (Kockel et al. 2001). Die dsRNA-vermittelte Depletion von Kay führte ebenfalls zu einer Aufhebung der transkriptionellen Repression durch SUMO-modifiziertes Sp3, hatte allerdings keine Reduktion der relativen SUMOylierung von Sp3 in quantitativen Immunoblot-Analysen zur Folge. Dies legt nahe, dass die SUMOylierungs-Enzymatik nicht durch AP-1 reguliert wird.

Der Knockdown von weiteren 15 Proteinen, insbesondere der potentiellen SUMO-abhängigen Korepressoren, führte zu keiner Reduktion der SUMO-Modifikation von Sp3; im Gegenteil, die Konjugation mit SUMO wurde z. B. nach Depletion von Mi-2, MEP-1 und Sfmbt leicht verstärkt (Abb. 4.5). Möglicherweise werden im Rahmen der Repression durch SUMOylierte Transkriptionsfaktoren neben den Korepressoren auch SUMO-spezifische Isopeptidasen an den Promotor rekrutiert, die den SUMO-Rest abspalten, sobald der repressive Status etabliert ist. Dies würde erklären, warum stets nur ein relativ geringer Anteil an SUMO-modifiziertem Protein im „steady-state“ vorhanden ist, der aber trotzdem eine vollständige transkriptionelle Repression zur Folge hat. Möglicherweise ist der Mechanismus der SUMO-abhängigen transkriptionellen Repression ein mit der DeSUMOylierung gekoppeltes Ereignis. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass der Chromatin-remodellierende Reptin-Komplex mit den SUMO-spezifischen Proteasen SENP1 und SUSP1 (SENP6) assoziiert ist (J. H. Kim et al. 2006).

Da der Großteil der untersuchten Proteine keinen Einfluss auf die relative SUMOylierung von Sp3 hatte, könnte man annehmen, dass auch die Mehrheit der

übrigen Kandidaten eher am SUMO-abhängigen Repressionsmechanismus als an der Regulation der SUMO-Konjugation beteiligt sind.

Im Rahmen der genomweiten Analysen wurden auch zahlreiche Proteine identifiziert, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind oder sein könnten. Dazu gehören beispielsweise die Kinasen Pkg21D (CG3324) und RdgA (CG10966) sowie CG31302, TRAF1 (CG3048) oder Toll-9 (CG5528), die Rezeptor- oder Adaptorfunktionen in Signalkaskaden übernehmen. Diese Signaltransduktionsprozesse könnten zum einen direkt oder indirekt den SUMO-abhängigen Repressionsmechanismus beeinflussen, indem entweder Korepressoren selbst oder deren Expression reguliert werden. Andererseits könnte über diese Signalkaskaden aber auch die SUMO-Konjugation selbst reguliert werden. Die Regulation der SUMOylierung eines Substratproteins durch einen klassischen Signaltransduktionsprozess wurde bisher nur für den ETS-Transkriptionsfaktor Elk-1 beschrieben. Die Phosphorylierung von Elk-1 durch die MAP-Kinase ERK führt zum Verlust der repressiven SUMOylierung und damit zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Yang et al. 2003).

5.3 SUMO-abhängige Korepressoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Drosophila* Proteine Mi-2, MEP-1 und Sfmbt als SUMO-abhängige Korepressoren identifiziert. Diese Schlussfolgerung basiert auf den folgenden Beobachtungen: 1. Der dsRNA-vermittelte Knockdown von Mi-2, MEP-1 und Sfmbt führt zur partiellen Aufhebung der transkriptionellen Repression durch die SUMO-modifizierten Transkriptionsfaktoren Sp3 und Dorsal, hat aber 2. keine Reduzierung der SUMOylierung von Sp3 selbst zur Folge. Dies zeigt, dass Mi-2, MEP-1 und Sfmbt am SUMO-vermittelten Repressionsmechanismus nach der eigentlichen SUMO-Konjugation beteiligt sind. 3. Mi-2, MEP-1 und Sfmbt interagieren *in vitro* mit SUMO und mit SUMO-modifiziertem Sp3. 4. Alle drei Proteine interagieren untereinander *in vitro* und Mi-2 und MEP-1 sind *in vivo* assoziiert. 5. Mi-2, MEP-1 und Sfmbt werden in Gegenwart von SUMOyliertem Wildtyp Sp3 an einen Sp3-regulierten Promotor rekrutiert, nicht jedoch in Anwesenheit einer SUMOylierungs-defizienten Mutante (Abb. 5.1).

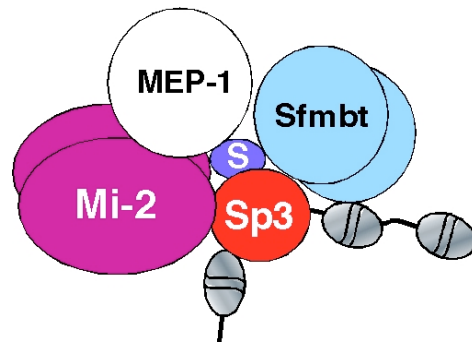


Abbildung 5.1: Modell der SUMO-abhängigen transkriptionellen Repression in *Drosophila*. Der SUMOylierte Transkriptionsfaktor Sp3 rekrutiert die Korepressoren Mi-2, MEP-1 und Sfmtb an einen Sp3-regulierten Promotor.

Drosophila **Mi-2** gehört zur CHD (Chromodomain Helicase DNA-binding)-Familie von Chromatin Remodellern, die ATP-abhängig die Chromatinstruktur verändern können (Marfella und Imbalzano 2007). Es gibt verschiedene Hinweise, dass *Drosophila* Mi-2 assoziiert mit der *Drosophila* Histon-Deacetylase RPD3 sowie weiteren Proteinen, wie p55, p66, MBD2/3 und MTA1-like, als katalytisch aktive Untereinheit Bestandteil eines Proteinkomplexes ähnlich des NuRD (Nucleosome Remodelling and Deacetylase)-Komplexes in Vertebraten ist (Marhold et al. 2004; Bouazoune und Brehm 2006). In Säugern existieren verschiedene Mi-2/NuRD-Komplexe mit unterschiedlichen Zusammensetzungen (Bowen et al. 2004). In menschlichen Zellen gibt es mindestens zwei Isoformen, Mi-2 α (CHD3) und Mi-2 β (CHD4), die beide in NuRD-Komplexen vorkommen. Weitere Komponenten der Mi2/NuRD-Komplexe im Säugersystem sind unter anderem die Proteine MTA1-3, p66, RbAp46/48 sowie die Histon-Deacetylasen HDAC1 und HDCA2. Durch das Vorkommen von HDACs vereinen die Mi-2/NuRD-Komplexe eine ATP-abhängige Chromatin-Remodeling-Aktivität mit einer Histon-Deacetylase-Aktivität und üben somit eine bedeutende Funktion in der transkriptionellen Repression aus (Bowen et al. 2004; Denslow und Wade 2007).

Im initialen RNAi-Screen wurde MTA1-like als potentieller SUMO-abhängiger Korepressor identifiziert. Der Knockdown vom MTA1-like mittels der *HFA12382* dsRNA führte zu einer leichten Aktivierung von SUMOyliertem Wildtyp Sp3 (Abb. 4.3). Die Sequenz dieser dsRNA offenbarte allerdings zahlreiche potentielle unspezifische Zielgene (Off-Targets) und enthielt weiterhin so genannte CAR-Repeats, die ebenfalls zu Off-Target-Effekten beitragen (Ma et al. 2006). Da außerdem eine alternative dsRNA gegen MTA1-like zu keiner Aufhebung der transkriptionellen Repression von SUMOyliertem Sp3 führte (Abb. 4.3), scheint eine Beteiligung von

MTA1-like, sowie anderer Komponenten des *Drosophila* NuRD-Komplexes wie p55, p66 und MBD2/3, die im initialen Screening der RNAi-Bibliothek depletiert wurden, an der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression unwahrscheinlich. Darüber hinaus ist der Mechanismus der SUMO-abhängigen Repression in *Drosophila* unabhängig von der Histon-Deacetylase RPD3, da sowohl der dsRNA-vermittelte Knockdown von RPD3, als auch die Inhibition der Histon-Deacetylase-Aktivität durch verschiedene HDAC-Inhibitoren zu keiner Aktivierung von repressivem SUMOyliertem Sp3 führte (Abb. 4.12). Auch im Säuger-System wurde durch Inhibition der Histon-Deacetylasen die Sp3-SUMO-abhängige Transkription nicht aktiviert (Daten nicht gezeigt). Zudem war in Chromatin Immunpräzipitationen keine Rekrutierung der NuRD-Komplex-Untereinheiten HDAC1 und p66 in Gegenwart von SUMOyliertem Sp3 zu beobachten (Abb. 4.20). Somit ist die Sp3-SUMO-vermittelte transkriptionelle Repression unabhängig von Komponenten des NuRD-Komplexes mit Ausnahme von Mi-2, insbesondere unabhängig von einer Histon-Deacetylase-Aktivität.

In der Literatur finden sich ebenfalls Hinweise für eine transkriptionell repressive Funktion von *Drosophila* Mi-2 unabhängig von einer assoziierten Histon-Deacetylase-Aktivität. Die Aktivität des transkriptionellen Regulators DREF (DNA-replication-related element factor) wird durch Mi-2 HDAC-unabhängig negativ reguliert (Hirose et al. 2002). Entweder ist in diesem Fall für die transkriptionelle Repression durch den NuRD-Komplex nur Mi-2 als katalytische Untereinheit notwendig oder es existiert eine Fraktion von Mi-2 außerhalb des klassischen NuRD-Komplexes, die nicht mit HDACs oder anderen NuRD-Untereinheiten assoziiert ist.

Mi-2 ist *in vivo* mit dem ebenfalls als SUMO-abhängigen Korepressor identifizierten *Drosophila* MEP-1 (s. u.) assoziiert (Stielow et al. 2008a). An diesem Komplex von Mi-2 und MEP-1 sind allerdings keine weiteren Komponenten des NuRD-Komplexes beteiligt (persönliche Kommunikation A. Brehm). Darüber hinaus scheint der Großteil von Mi-2 einer *Drosophila* Zelle nicht mit klassischen NuRD-Komponenten assoziiert, sondern in einem stabilen Komplex mit MEP-1 vorzuliegen (persönliche Kommunikation A. Brehm). Dieser neuartige Mi-2-MEP-1-Komplex existiert neben dem HDAC-assoziierten NuRD-Komplex und scheint einer der entscheidenden Bestandteile des SUMO-vermittelten transkriptionellen Repressionsmechanismus in *Drosophila* zu sein.

Drosophila Mi-2 interagiert mit den transkriptionellen Repressoren Hunchback und Tramtrack69 (Kehle et al. 1998; Murawsky et al. 2001), wobei Tramtrack69 ebenfalls mit SUMO modifiziert wird (Lehembre et al. 2000) und die Domäne von Hunchback,

die die Interaktion mit Mi-2 vermittelt, ein SUMO-Konsensus-Motiv enthält (Kehle et al. 1998). Man könnte spekulieren, dass die Rekrutierung von Mi-2 bzw. entsprechenden die Chromatinstruktur verändernden Komplexen auch bei Tramtrack69 und Hunchback SUMO-abhängig erfolgt und eventuell ein allgemeines Phänomen von SUMOylierten, transkriptionell repressiven Faktoren darstellt.

Auch in Säugerzellen wurde Mi-2 in Gegenwart der SUMOyliertem Transkriptionsfaktoren Sp3 und SF-1 an Promotoren rekrutiert, nicht jedoch in Anwesenheit der jeweiligen SUMOylierungs-defizienten Mutante (Abb. 4.19). Dabei ist unklar, ob Mi-2 α oder das deutlich häufiger vorkommende Mi-2 β als SUMO-abhängiger Korepressor fungiert, da der für die Chromatin Immunpräzipitationen verwendete Antikörper beide Isoformen erkennt. Eine direkte Interaktion zwischen Mi-2 α (CHD3) und SUMO1/2 sowie dem SUMO-modifizierten Korepressor KAP1 mittels eines C-terminalen SUMO-Interaktions-Motivs (SIM), das nur in Mi-2 α vorkommt, ist beschrieben (Ivanov et al. 2007).

Drosophila **MEP-1** ist ein orthologes Protein des *C. elegans* MEP-1 und enthält sieben Zinkfinger. *Drosophila* MEP-1 ist wie bereits erwähnt ein Interaktionspartner von Mi-2 *in vivo* außerhalb des klassischen NuRD-Komplexes. In *C. elegans* ist eine Assoziation von MEP-1 und Mi-2 allerdings innerhalb des klassischen NuRD-Komplexes beschrieben (Unhavaithaya et al. 2002). Zudem gibt es in *C. elegans* Hinweise auf eine Verbindung von MEP-1 zur SUMO-abhängigen transkriptionellen Repression. Der ETS-Transkriptionsfaktor LIN-1 wird mit SUMO modifiziert, was zu einer Verstärkung der LIN-1-abhängigen Repression und zu einer SUMO-abhängigen Interaktion mit MEP-1 führt (Leight et al. 2005). Bisher konnte kein Orthologes von MEP-1 im Säugersystem identifiziert werden. Allerdings besteht auch zwischen den *Drosophila* und *C. elegans* MEP-1-Proteinen nur eine relativ geringe Homologie in Bereich der Zinkfinger, so dass ein eventuell existentes humanes MEP-1-Protein aufgrund starker evolutionärer Veränderungen möglicherweise nicht mehr eindeutig zugeordnet werden kann.

Drosophila **Sfmbt** enthält vier so genannte MBT-Domänen. Diese Domänen sind strukturell verwandt mit den Chromo-Domänen und bilden gemeinsam mit Tudor-, Chromo- und PWWP-Domänen die so genannte Royal-Familie von Proteindomänen, die an methylierte Lysin- und Argininreste in Histonen binden können (Maurer-Stroh et al. 2003). Die MBT-Domänen binden präferentiell an mono- und dimethylierte Histone (J. Kim et al. 2006). *Drosophila* Sfmbt bildet assoziiert mit den Proteinen Pho oder Pho-like einen Polycomb-Komplex (PhoRC, Pho-repressive complex) und fungiert als

transkriptioneller Repressor. Dabei bindet Sfmbt spezifisch an mono- und dimethylierte Lysinreste K9 und K20 der Histone H3 bzw. H4 (Klymenko et al. 2006). Sfmbt und ein weiteres MBT-Domänen-Protein L3mbt werden auch zur transkriptionellen Repression von E2F-regulierten Genen benötigt (Lu et al. 2007). Weitere MBT-Domänen-Proteine in *Drosophila* sind neben Sfmbt die Proteine L3mbt und Scm, die nur über drei bzw. zwei MBT-Domänen verfügen. L3mbt ist als Bestandteil des Myb-E2F2 Repressor-Komplexes beschrieben (Lewis et al. 2004), Scm ist eine Untereinheit des Polycomb-Repressor-Komplexes PRC1 (Levine et al. 2004).

Orthologe Proteine von Sfmbt im Säugersystem sind L3MBTL1 und L3MBTL2. Humanes L3MBTL1 (H-L(3)MBT) enthält drei MBT-Domänen, die für seine Funktion als transkriptioneller Korepressor essentiell sind (Bocconi et al. 2003). L3MBTL1 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor TEL, was zu einer HDAC-unabhängigen Verstärkung der TEL-abhängigen Repression führt (Bocconi et al. 2003). Interessanterweise ist auch TEL als SUMO-modifiziertes Protein beschrieben; die SUMOylierung scheint den Kernexport von TEL zu regulieren und dabei auch die transkriptionelle Repression zu verstärken (Wood et al. 2003). Somit ist L3MBTL1 möglicherweise auch an der Regulation der SUMO-abhängigen Repression durch TEL beteiligt. Kürzlich wurde beschrieben, dass die MBT-Domänen von L3MBTL1 mit den mono- und dimethylierten Lysinresten K20 in Histon H4 und K26 in Histon H1b interagieren und in Abhängigkeit dieser Histon-Modifikationen die Nukleosomenstruktur *in vitro* kompaktieren (Trojer et al. 2007). Das Säuger-Protein L3MBTL2 weist die größte Ähnlichkeit mit dem im RNAi-Screen identifizierten *Drosophila* Sfmbt auf, da es ebenfalls über vier MBT-Domänen verfügt. Über L3MBTL2 ist relativ wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass es Bestandteil eines reprimierend wirkenden E2F6-Komplexes ist (Ogawa et al. 2002). L3MBTL2 interagiert wie L3MBTL1 mit dem heterochromatischen Protein HP1 γ (Trojer et al. 2007).

Drosophila Mi-2, MEP-1 und Sfmbt interagieren *in vitro* sowohl mit SUMO als auch präferentiell mit SUMOyliertem Sp3 (Stielow et al. 2008a). Mittlerweile sind verschiedene SUMO-Interaktions-Motive (SIMs) beschrieben (Minty et al. 2000; Song et al. 2004; Hannich et al. 2005). Die SIM-Konsensus-Sequenz ist relativ variabel und besteht aus einer Kernsequenz von drei bis vier hydrophoben Aminosäureresten sowie einer sauren/polaren Aminosäure an Position 2 oder 3, die von einer Reihe von sauren Aminosäuren sowie mehreren Serin- oder Threoninresten umgeben ist (Hecker et al. 2006). Mehrere putative SUMO-Interaktions-Motive finden sich in Mi-2, MEP-1 und

Sfmbt (Daten nicht gezeigt), wobei MEP-1 drei aufeinander folgende SIMs zwischen den Aminosäuren 241 und 340 besitzt. Dies erklärt möglicherweise, dass *in vitro* die stärkste Interaktion zwischen SUMO und MEP-1 nachzuweisen war (Stielow et al. 2008a).

Interessanterweise gehören die *C. elegans* Orthologen sowohl von Mi-2, MEP-1 und Sfmbt als auch SUMO selbst sowie die Enzyme der SUMO-Konjugations-Kaskade zu den so genannten SynMuv- (Synthetic Multivulval-) Genen, die in *C. elegans* unter anderem die Ras-Signaltransduktion inhibieren, um fehlerhafte Zellentwicklungen bei der Entstehung der Vulva zu verhindern. Darüber hinaus sind diese SynMuv-Gene auch bei der Repression von Genen außerhalb der Vulvaentwicklung involviert (Poulin et al. 2005). Eventuell könnten diese Gene auch in höheren Organismen, wie *Drosophila melanogaster* oder Vertebraten an der Regulation von Entwicklungsprozessen beteiligt sein, wobei die SUMOylierung von Transkriptionsfaktoren und die damit verbundene Rekrutierung der transkriptionellen Korepressoren einen generellen Mechanismus zur Repression von entsprechenden Zielgenen während der Entwicklung darstellen könnte.

Neben Mi-2, MEP-1 und Sfmbt wurden noch drei weitere Proteine identifiziert, die an der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression direkt beteiligt sein könnten. Die spezifische dsRNA-vermittelte Depletion von Chd3, Sbb und HP6 führte zu einer Aufhebung der transkriptionellen Repression durch SUMOylierte Transkriptionsfaktoren.

Bei **Chd3** handelt es sich um ein Paraloges von Mi-2 (Abb. 4.6), das ähnlich wie Mi-2 in der Lage ist, die Nukleosomenstruktur *in vitro* durch Remodelling ATP-abhängig zu verändern. Während Mi-2 *in vivo* assoziiert mit anderen Proteinen in Form von Komplexen vorkommt, liegt Chd3 als Monomer vor (Murawska et al. 2008). Da der dsRNA-vermittelte Knockdown von Chd3 zu einer spezifischen Depletion von Chd3 führt, während die Expression von Mi-2 nicht beeinflusst ist (Murawska et al. 2008), ist anzunehmen, dass beide paraloge Proteine an der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression beteiligt sind.

Scribbler (Sbb) ist ein auch unter dem Namen Brakeless (Bks) beschriebenes nukleäres Zinkfinger-Protein, das zwar als Transkriptionsfaktor in Flybase annotiert ist, das aber mittlerweile auch als transkriptioneller Korepressor der *Drosophila* Transkriptionsfaktoren Engrailed (Wehn und Campbell 2006) und Tailless (Haecker et al. 2007) beschrieben wurde. Die Orthologen von Sbb im Säugersystem sind die humanen Zinkfingerproteine ZNF608/609 (Zfp608/609), über die nur sehr wenig

bekannt ist. Zfp608 scheint die Expression der Thymocyten-spezifischen Gene Rag1 und Rag2 (recombination-activating gene), die während der embryonalen Thymocyt-Entwicklung für eine korrekte Assemblierung der T-Zell-Rezeptor-kodierenden Gene benötigt werden, zu reprimieren (Zhang et al. 2006).

Ebenfalls als potentieller SUMO-abhängiger Korepressor wurde das heterochromatische Protein **HP6** (CG15636) identifiziert. Dieses aus nur 106 Aminosäuren bestehende Protein besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit HP1. Es enthält eine einzelne so genannte Chromo-Shadow-Domäne jedoch keine Chromo-Domäne. HP6 interagiert mit anderen heterochromatischen Proteinen (HP3-HP5) und wird so an heterochromatische Bereiche rekrutiert (Greil et al. 2007). HP6 könnte die Rolle eines möglichen Adaptorproteins zwischen den verschiedenen HP-Mitgliedern während der SUMO-vermittelten Repression übernehmen.

Die dargestellten Korepressoren wurden als Sp3-SUMO-abhängige Repressoren identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass nach dsRNA-vermittelter Depletion von Mi-2, MEP-1, Sfmt, Chd3 und Sbb auch die Transkription durch den *Drosophila* Transkriptionsfaktor Dorsal SUMO-abhängig aktiviert wird (Abb. 4.11). Diese Korepressoren scheinen also auch bei anderen SUMO-modifizierten Transkriptionsfaktoren die Repression zu vermitteln und stellen somit möglicherweise allgemeine Regulatoren der Genexpression durch SUMOylierte Transkriptionsfaktoren dar. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Ko-Expression von SUMO und Ubc9 die Dorsal-vermittelte Transkription aktiviert, was zu der Annahme führte, dass die SUMOylierung von Dorsal die transkriptionelle Aktivität verstärkt (Bhaskar et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch dsRNA-vermittelte Depletion von SUMO gezeigt, dass die SUMO-Modifikation die Dorsal-abhängige Transkription reprimiert. Dieser Widerspruch könnte dadurch erklärt werden, dass überexprimiertes SUMO die beschriebenen Korepressoren durch Competition von entsprechenden Promotoren sequestriert („Sequestration“) und dadurch die Dorsal-abhängige Transkription aktiviert wird.

Wie bereits erwähnt, könnten über diese Korepressoren hinaus noch weitere Proteine an der SUMO-abhängigen transkriptionellen Repression beteiligt sein, die nicht im RNAi-Screen identifiziert wurden. In der Literatur ist eine Beteiligung von Histon-Deacetylasen und des Korepressors Daxx an der SUMO-vermittelten Repression beschrieben. So wird die Repressionsaktivität des humanen Transkriptionsfaktors Elk1 sowie des Kofaktors p300, die beide mit SUMO modifiziert werden, durch die Histon-Deacetylasen HDAC2 bzw. HDAC6 vermittelt (Girdwood et al. 2003; Yang und

Sharrocks 2004). Wie bereits diskutiert, ist die durch Sp3-SUMO-vermittelte Repression unabhängig von einer HDAC-Aktivität, so dass fraglich ist, ob HDACs allgemeine Regulatoren der SUMO-abhängigen Repression darstellen.

Darüber hinaus beschreiben mehrere Publikationen der Arbeitsgruppe um H. M. Shih die Beteiligung des Korepressors Daxx an der SUMO-abhängigen Repression des Androgen- und Glucocorticoid-Rezeptors, des Transkriptionsfaktors Smad4 sowie des Kofaktors CBP (Lin et al. 2004; Chang et al. 2005; Kuo et al. 2005; Lin et al. 2006). Daxx interagiert mit all diesen SUMO-modifizierten transkriptionellen Regulatoren mittels eines SUMO-Interaktions-Motivs, wird SUMO-abhängig an entsprechende Promotoren rekrutiert und reguliert die Repression auf unterschiedlichem Wege (Shih et al. 2007). Die Interaktion mit Daxx scheint die DNA-Bindung des Androgen-Rezeptors zu beeinträchtigen (Lin et al. 2004), zudem ist eine Daxx-vermittelte HDAC2-Rekrutierung bei der transkriptionellen Repression durch CBP beschrieben (Kuo et al. 2005). Die reprimierende Funktion von Daxx scheint dabei durch dessen nukleäre Lokalisation reguliert zu sein; SUMOyliertes PML rekrutiert Daxx in so genannte PML-Kernkörper (PML nuclear bodies) und steht damit in Konkurrenz mit den SUMOylierten Transkriptionsfaktoren (Lin et al. 2006). Da die SUMO-Modifikation von Sp3 die DNA-Bindungseigenschaften von Sp3 in keiner Weise beeinflusst (Sapetschnig et al. 2002) und der Sp3-SUMO-vermittelte Repressionsmechanismus HDAC-unabhängig ist (Stielow et al. 2008a), scheint eine Beteiligung von Daxx an der Repression durch SUMOyliertes Sp3 eher unwahrscheinlich und wurde nicht weiter untersucht.

5.4 SUMO-modifizierte Transkriptionsfaktoren reprimieren die Transkription durch Ausbildung von lokalem repressivem Heterochromatin

Die im *Drosophila* System identifizierten Korepressoren Mi-2, MEP-1 und Sfmt lassen vermuten, dass die Chromatinstruktur eine entscheidende Rolle bei der SUMO-abhängigen transkriptionellen Repression spielt. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass der stärkste Anstieg der Sp3-SUMO-abhängigen Reporteraktivität nach Depletion von Histonen zu beobachten war (siehe Tabelle 4.1 im Ergebnisteil).

Um die SUMO-abhängige Promotor-Rekrutierung der orthologen Säuger-Proteine zu untersuchen, wurde eine stabil transfizierte Säuger-Zelllinie mit einem als einzelne Kopie stabil im Genom integrierten Gal4-abhängigen Reporter gen etabliert. Dieses stabile Zellsystem bietet gegenüber der transienten Transfektion von Reporterplasmiden

den Vorteil, dass mit der SUMO-abhängigen Repression verbundene Veränderungen der Chromatinstruktur analysiert werden können.

In Gegenwart von SUMOyliertem Wildtyp Gal4-Sp3 wurden Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2 an den Promotor des Reporter-Transgens rekrutiert (Abb. 4.19). In gleicher Weise waren die Korepressoren auch nur in Anwesenheit von transkriptionell reprimierendem Gal4-SF-1WT mit dem Promotor assoziiert, nicht jedoch nach Expression der SUMOylierungs-defizienten Mutante Gal4-SF-1-2K/R (Abb. 4.19). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die SUMO-abhängige Rekrutierung von Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2 einen allgemeinen Mechanismus der Genexpressions-Regulation durch SUMO-modifizierte Transkriptionsfaktoren darstellen könnte.

Überraschenderweise waren spezifisch sowohl SUMOyliertes Gal4-Sp3WT als auch die Korepressoren auch mit Regionen stromabwärts des Gal4-abhängigen Promotors innerhalb des Luciferase-Gens assoziiert (Abb. 4.21). Diese Beobachtung könnte durch eine Kompaktierung der Chromatinstruktur erklärt werden, wodurch relativ weit entfernte DNA-Sequenzen in die Nähe des Promotorbereich kommen würden. Die Verdichtung der Chromatinstruktur in Gegenwart von SUMOyliertem Wildtyp Gal4-Sp3 wurde durch die verminderte Zugänglichkeit des stabil integrierten Reporter-Transgens für Restriktionsenzyme bestätigt (Stielow et al. 2008b). Wie bereits erwähnt, ist beschrieben, dass die MBT-Domänen von L3MBTL1 die Nukleosomenstruktur in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von H4K20 und H1K26 *in vitro* kompaktieren (Trojer et al. 2007). Es ist somit anzunehmen, dass die durch SUMOylierte Transkriptionsfaktoren rekrutierten MBT-Domänen Proteine L3MBTL1 und L3MBTL2 zur transkriptionellen Repression beitragen, indem sie die Chromatinstruktur kompaktieren.

Kompaktiertes Chromatin kommt charakteristischerweise in heterochromatischen Bereichen vor. Daher wurden untersucht, ob weitere Heterochromatin-spezifische Proteine und repressive Histon-Modifikationen SUMO-abhängig an Promotoren nachzuweisen waren. Die heterochromatischen Proteine HP1 α , HP1 β und HP1 γ wurden nur in Gegenwart von SUMOyliertem Wildtyp Gal4-Sp3, nicht jedoch in Anwesenheit der SUMOylierungs-defizienten Mutante an den Promotor des stabil integrierten Reporter-Transgens rekrutiert. Zudem war SUMO-abhängig eine verstärkte Trimethylierung von H3K9 und H4K20 sowie die Rekrutierung der H3K9- bzw. H4K20-spezifischen Histon-Methyltransferasen SETDB1 und SUV4-20H1/2 nachzuweisen (Abb. 4.22).

Die Methylierung von H3K9 ist charakteristisch für transkriptionell repressive Bereiche und scheint sowohl bei der Repression von euchromatischen Genen als auch der Etablierung von konstitutivem Heterochromatin eine entscheidende Rolle zu spielen (Übersichtsartikel: (Sims et al. 2003; Martin und Zhang 2005; Shilatifard 2006). Die Proteine der **HP1**-Familie binden über ihre N-terminale Chromo-Domäne an di- und trimethyliertes Lysin K9 im Histon H3 und tragen entscheidend zur Ausbildung und Aufrechterhaltung von repressiven heterochromatischen Bereichen bei (Singh und Georgatos 2002; Kellum 2003). Charakteristisch für die HP1-Proteine ist weiterhin eine Chromo-Shadow-Domäne, die der Homo- und Heterodimerisierung sowie der Vermittlung von Interaktionen mit anderen Proteinen dient (Lomberk et al. 2006). Dabei finden sich HP1-Proteine nicht nur in konstitutiv heterochromatischen Bereichen, sondern sind auch in euchromatischen Regionen sowohl an der aktivierenden als auch reprimierenden transkriptionellen Regulation beteiligt (Hediger und Gasser 2006). So wird HP1 beispielsweise durch das Retinoblastoma Protein pRb gemeinsam mit der H3K9-Methyltransferase SUV39H1 an den Cyclin E Promotor rekrutiert und vermittelt dessen transkriptionelle Repression (Nielsen et al. 2001). HP1 γ ist mit einem E2F-6-Komplex assoziiert und wird in ruhenden Zellen der G0-Phase an Promotoren von E2F-reprimierten Genen rekrutiert (Ogawa et al. 2002). HP1 γ interagiert mit den SUMO-abhängigen Korepressoren L3MBTL1 und L3MBTL2 (Trojer et al. 2007). Interessanterweise findet sich HP1 γ gemeinsam mit di- und trimethyliertes H3K9 allerdings auch im kodierenden Bereich von mehreren aktiv transkribierten Genen (Vakoc et al. 2005).

Die Methylierung von H3K9 wird von verschiedenen spezifischen Histon-Methyltransferasen (HMTs) katalysiert, die zur Familie der SET-Domänen-Proteine gehören, unter anderem von SUV39H1/2 (KMT1A/B) (Rea et al. 2000; Peters et al. 2003) und SETDB1/ESET (KMT1E) (Schultz et al. 2002; Wang et al. 2003). Da nur SETDB1, nicht aber SUV39H in Gegenwart von SUMOyliertem Sp3 rekrutiert wurde (Abb. 4.22), ist davon auszugehen, dass SETDB1 für die Trimethylierung von H3K9 und die damit verbundene Etablierung der heterochromatischen Strukturen durch repressive SUMOylierte Transkriptionsfaktoren verantwortlich ist.

SETDB1 ist ein direkter Interaktionspartner sowohl von SUMO-1 als auch SUMO-2 (Rosendorff et al. 2006; Ivanov et al. 2007). Die Interaktion findet über ein N-terminales SUMO-Interaktions-Motiv (SIM) statt. Möglicherweise wird SETDB1 direkt durch SUMO-modifizierte Sp3 an Promotoren rekrutiert. SETDB1 ist weiterhin mit dem transkriptionellen Repressor mAM/MCAF1 (MBD1-containing chromatin

associated factor) assoziiert (Wang et al. 2003; Ichimura et al. 2005). Diese Interaktion ermöglicht die von SETDB1 katalysierte Umwandlung von dimethyliertem in trimethyliertes H3K9 (Wang et al. 2003). MCAF-1 interagiert ebenfalls direkt mit SUMO und ist mit dem an methylierte CpG-Inseln bindenden Protein MBD1 assoziiert, das ebenfalls mit SUMO modifiziert wird. Die SUMOylierung verstärkt die Assoziation von MCAF1 und MBD1 und vermittelt so die Rekrutierung von MCAF1 an heterochromatische Regionen sowie die Trimethylierung von H3K9 und die Rekrutierung der heterochromatischen Proteine HP1 β und HP1 γ (Uchimura et al. 2006). Möglicherweise ist MCAF1 über diese Verbindungen ebenfalls an der transkriptionellen Repression durch SUMOyliertes Sp3 oder anderer SUMOylierter Transkriptionsfaktoren beteiligt.

Trimethyliertes H4K20 ist wie H3K9me3 charakteristisch für perizentrisches Heterochromatin (Schotta et al. 2004). Dagegen spielt monomethyliertes H4K20 nicht nur bei der transkriptionellen Repression (Nishioka et al. 2002), sondern auch bei der Zellzyklus-Kontrolle (Karachentsev et al. 2005) und der DNA-Reparatur (Sanders et al. 2004) eine entscheidende Rolle. Die Trimethylierung von H4K20 wird von den SET-Domänen-HMTs **SUV4-20H1** (KMT5B) und **SUV4-20H2** (KMT5C) katalysiert (Schotta et al. 2004). Die Methylierung von H4K20 durch SUV4-20H1/2 ist abhängig von der Aktivität der H3K9-spezifischen Methyltransferase SUV-39H1. Da SUV4-20H mit bestimmten Isoformen der HP1-Proteinfamilie interagiert, wird möglicherweise SUV4-20H durch HP1, das an methyliertes H3K9 bindet, an heterochromatische Bereiche rekrutiert (Schotta et al. 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Mono- und Dimethylierung von H4K20 in Gegenwart von SUMOyliertem bzw. unmodifizierten Gal4-Sp3 untersucht. H4K20me1 und H4K20me2 waren auch in Abwesenheit eines Transkriptionsfaktors auf dem Promotor des Reporter-Transgens detektierbar, in Gegenwart von SUMOyliertem Sp3 waren sie nicht verstärkt nachweisbar (Abb. 4.22). Die Monomethylierung von H4K20 wird von PR-SET7 (SET8, KMT5A) katalysiert (Nishioka et al. 2002) und verstärkt die transkriptionelle Repression durch L3MBTL1, das spezifisch mit den monomethylierten Lysinresten interagiert (Kalakonda et al. 2008). Es ist offen, ob die beschriebene SUMO-abhängige Promotor-Rekrutierung von L3MBTL1 durch von PR-SET7 monomethyliertes H4K20 vermittelt wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in CHIP-Experimenten mit einem α PR-SET7-Antikörper keine Promotor-Rekrutierung dieser HMT nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Der beschriebene Mechanismus der transkriptionellen Repression durch die SUMOylierten Transkriptionsfaktoren Sp3 und SF-1 ähnelt der Repression durch KAP1, einem Korepressor der Familie von KRAB-Zinkfinger-Proteinen (Friedman et al. 1996). Auch KAP1 wird mit SUMO modifiziert und diese SUMOylierung vermittelt die transkriptionelle Repression, indem SUMO-abhängig Mi-2 α und SETDB1 an KAP1-KRAB-regulierte Promotoren rekrutiert werden (Ivanov et al. 2007). Zur KAP1-vermittelten Repression eines stabil integrierten KRAB-regulierten Transgens werden zudem neben SETDB1 auch HP1 α und HP1 γ rekrutiert (Ayyanathan et al. 2003). Darüber hinaus ist auf einem stabil integrierten Reporter-Transgen, das von KRAB-KAP1 reprimiert wird, eine vermehrte Trimethylierung von H3K9 und H4K20 nachzuweisen (Sripathy et al. 2006). Ob diese von KAP1-induzierten Veränderungen SUMO-abhängig geschehen, ist nicht untersucht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Promotor-gebundenen SUMO-modifizierten Transkriptionsfaktoren Sp3 und SF-1 die Transkription reprimieren, indem sie SUMO-abhängig das Chromatin-remodellierende Enzym Mi-2, die MBT-Domänen-Proteine L3MBTL1 und L3MBTL2, die Histon-Methyltransferasen SETDB1 und SUV4-20H, die zu einer Trimethylierung von H3K9 und H4K20 führen, sowie die heterochromatischen Proteine der HP1-Familie an Promotoren rekrutieren (Abb. 5.2). Somit initiieren transkriptionell repressorisch wirkende SUMOylierte Transkriptionsfaktoren die Ausbildung einer lokalen repressiven Chromatinstruktur mit typischen Eigenschaften von kompaktiertem Heterochromatin.

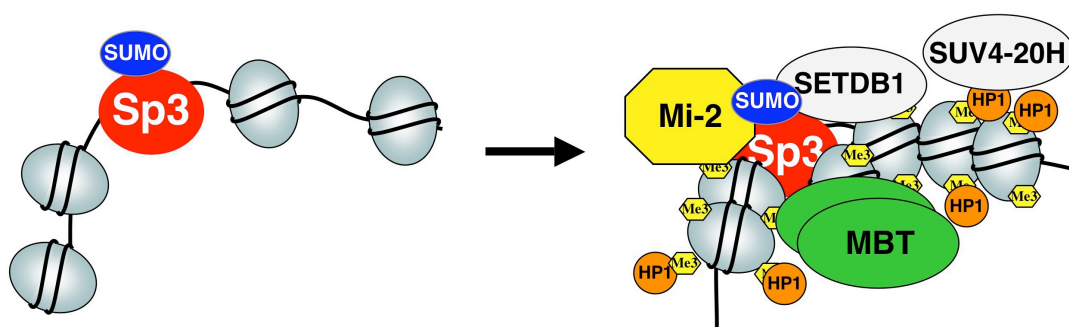


Abbildung 5.2: Erweitertes Modell zur transkriptionellen Repression durch SUMO-modifizierte Transkriptionsfaktoren

DNA-gebundene SUMO-modifizierte Transkriptionsfaktoren wie Sp3 (oder SF-1) initiieren die Ausbildung von lokalem repressivem Heterochromatin durch SUMO-abhängige Rekrutierung des Chromatin Remodelers Mi-2, der MBT-Domänen-Proteine L3MBTL1 und L3MBTL2, die zu einer Kompaktierung des Chromatins führen, sowie der Histon-Methyltransferasen SETDB1 und SUV4-20H, die die Trimethylierung von H3K9 bzw. H4K20 katalysieren. Die Rekrutierung von heterochromatischen Proteinen (HP1) durch die methylierten Lysinreste manifestiert den repressiven Zustand.

Derzeit ist nicht bekannt, in welchem Umfang die einzelnen Proteine zur SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression beitragen. In *Drosophila* Zellen führt die dsRNA-vermittelte Depletion von dMi-2 und dSfmbt zur partiellen Aufhebung der transkriptionellen Repression durch SUMOyliertes Sp3 (siehe Abb. 4.8). Nach RNAi-vermitteltem Knockdown von Mi-2 α , Mi-2 β , L3MBTL1 und L3MBTL2 in Säugerzellen konnte dagegen keine signifikante Aktivierung der Sp3-SUMO-vermittelten Transkription nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte zum einen mit der in Säugerzellen deutlich geringeren Knockdown-Effizienz zusammenhängen; andererseits könnten durch funktionelle Redundanzen unter den Mitgliedern einer Proteinfamilie die Effekte der Depletion eines einzelnen Proteins überdeckt werden. Zudem scheint es so zu sein, dass die Depletion eines einzelnen am SUMO-Repressionsmechanismus beteiligten Proteins die Rekrutierung anderer Faktoren nicht beeinflusst. Nach Knockdown von SETDB1 wurden Mi-2, L3MBTL2 und SUV4-20H noch in gleicher Weise an den endogenen *DHFR*-Promotor rekrutiert (Abb. 4.26). Auch in SUV4-20H1/2-defizienten MEFs waren alle anderen Repressions-Komponenten noch in gleicher Weise mit dem *DHFR*-Promotor assoziiert (Abb. 4.27). Dies zeigt, dass zumindest einige der Proteine, die die SUMO-abhängige transkriptionelle Repression vermitteln, unabhängig voneinander rekrutiert werden.

5.5 SUMO-abhängige Ausbildung von lokalem Heterochromatin auf dem murinen *DHFR*-Promotor

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es auch auf einem endogenen Sp3-regulierten Gen zur SUMO-abhängigen Rekrutierung von heterochromatischen Proteinen und Ausbildung von repressiven Histon-Modifikationen kommt. In Gegenwart von SUMOylierten Wildtyp Sp3 wurden Mi-2, L3MBTL1/L2, HP1 α sowie SETDB1 und SUV4-20H1/2, verbunden mit der Trimethylierung von H3K9 und H4K20, an den murinen *DHFR*-Promotor rekrutiert. Diese Korepressoren und Modifikationen sind in Sp3-defizienten Zellen nicht auf dem *DHFR*-Promotor zu finden (Abb. 4.25). Darüber hinaus wurden die Korepressoren in Sp3-defizienten Zellen nur nach Re-Expression von Wildtyp Sp3, nicht jedoch nach stabiler Expression der SUMOylierungs-defizienten Mutante an den Promotor rekrutiert (Abb. 4.28/29). Diese Rescue-Experimente zeigen, dass die Rekrutierung der Korepressoren in Abhängigkeit der SUMO-Modifikation von Sp3 erfolgt.

Während Chromatin Immunpräzipitationen eine eindeutige Sp3-SUMO-abhängigen Rekrutierung der Korepressoren zeigten, hatte der Verlust von Sp3 bzw. die stabile

Expression einer SUMOylierungs-defizienten Mutante nur relativ geringe Auswirkungen auf die DHFR-Expression. Beim Verlust der transkriptionell reprimierenden SUMO-modifizierten Form von Sp3 wurde DHFR nur geringfügig stärker exprimiert (siehe Northern Blot Analysen in Abb. 4.25, 4.28/29). Dies ist durch stochastische Kompetition von transkriptionell stark aktivem Sp1, das - wie auch die anderen Mitglieder der Sp-Familie Sp2 und Sp4 – ebenfalls an den *DHFR*-Promotor rekrutiert wird (Abb. 4.24) und mit dem repressiven SUMOyliertem Sp3 um die Bindung an die GC-Boxen des Promotors konkurriert, zu erklären. Die DHFR-Expression wird nicht nur durch Sp-Faktoren, sondern auch durch die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie reguliert (Fry et al. 1997). *DHFR* ist ein Zellzyklus-reguliertes Gen und wird in der G0/G1-Phase reprimiert, während es beim Übergang von G1- in S-Phase verstärkt exprimiert wird (Slansky und Farnham 1996). Dabei scheint E2F vor allen für die Repression während der G0/G1-Phase verantwortlich zu sein, während die Aktivierung der DHFR-Expression durch Sp1 vermittelt zu sein scheint (Jensen et al. 1997). Die Repression des *DHFR*-Promotors in bestimmten Phasen des Zellzyklus wird nicht nur durch SUMOyliertes Sp3 vermittelt und bietet eine zusätzliche Erklärung, warum der Verlust von SUMOyliertem Sp3 nur zu einer geringen Verstärkung der DHFR-Expression führt.

Im Zuge der E2F-abhängigen Repression des *DHFR*-Promotors während der G0/G1-Phase ist eine verstärkte SUV39H1-vermittelte Methylierung von H3K9 beschrieben (Nicolas et al. 2003). Da die dargestellten ChIP-Experimente alle mit nicht-synchronisierten, sich teilenden Zellen, die sich in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befinden, durchgeführt wurden, ist unklar, in welchem Umfang die Sp3-SUMO-abhängig induzierte Trimethylierung von H3K9 zur Repression des *DHFR*-Promotors beiträgt. Auch die Genexpressionsstudien wurden in nicht-synchronisierten Zellen durchgeführt. Möglicherweise ergeben sich in bestimmten Zellzyklus-Phasen deutlichere Unterschiede in der *DHFR*-Expression in Abhängigkeit von SUMOyliertem Sp3.

Es ist unklar, ob auch die Expression anderer Zellzyklus-regulierter Gene auf diese Weise durch SUMOylierte Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Außerdem ist bisher ungeklärt, inwieweit andere Sp3-regulierte Gene durch den beschriebenen Mechanismus von SUMO-modifiziertem Sp3 transkriptionell reprimiert werden.

5.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Drosophila* Proteine Mi-2, MEP-1 und Sfbmt als SUMO-abhängige transkriptionelle Korepressoren identifiziert. Auch die humanen Orthologen Mi-2, L3MBTL1 und L3MBTL2 sind an der Repression durch SUMOylierte Transkriptionsfaktoren beteiligt. Durch den RNAi-Screen in *Drosophila* Zellen wurden allerdings noch zahlreiche weitere potentielle Regulatoren der SUMO-abhängigen Repression identifiziert, wie beispielsweise der transkriptionelle Repressor Scribbler (Sbb). Die humanen Orthologen von Sbb sind die Zinkfinger-Proteine ZNF608 und ZNF609, über die bisher nur relativ wenig bekannt ist. Die Rolle von ZNF608/609 bei der transkriptionellen Repression durch SUMOylierte Transkriptionsfaktoren im Säugersystem sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Darüber hinaus wurden mit Hilfe des genomweiten RNAi-Screens auch zahlreiche Proteine von bisher unbekannter Funktion als mögliche SUMO-abhängige Korepressoren oder potentielle Regulatoren der SUMO-Konjugation identifiziert. Weitere Experimente könnten hier neue Erkenntnisse über deren Funktion im SUMO-abhängigen transkriptionellen Repressionsmechanismus bzw. bei der Regulation der SUMOylierungs-Enzymatik sowohl im *Drosophila*- als auch im Säugersystem erbringen.

SUMO-modifizierte Transkriptionsfaktoren reprimieren die Transkription, indem sie SUMO-abhängig Mi-2, L3MBTL1/2, SETDB1 und SUV4-20H1/2 sowie Proteine der HP1-Familie rekrutieren und somit die Ausbildung von lokalem Heterochromatin verbunden mit repressiven Histon-Modifikationen initiieren. Derzeit ist nicht bekannt, in welchem Umfang die einzelnen Komponenten der Repressionsmaschinerie zur transkriptionellen Repression durch SUMO-modifizierte Transkriptionsfaktoren beitragen, noch in welcher Reihenfolge die verschiedenen Proteine SUMO-abhängig an Promotoren rekrutiert werden. Um diese Fragestellungen zu untersuchen, könnten die beschriebene Zelllinie mit dem stabil integrierten Gal4-abhängigen Reporter-Transgen zusätzlich stabil mit Konstrukten zur Expression eines Fusionsproteins von Gal4-Sp3WT bzw. Gal4-Sp3KEEm und der Hormon-bindenden Domäne des Östrogen-Rezeptor (ERHBD) transfiziert werden (Sripathy et al. 2006). Im uninduzierten Zustand sind diese Fusionsproteine (ERHBD-Gal4-Sp3WT bzw. Sp3KEEm) im Cytoplasma mit Heat-Shock-Proteinen assoziiert, nach Induktion durch Tamoxifen lokalisieren sie in den Zellkern und binden an den 5xGal4-Promotor des Reporter-Transgens. Mit Hilfe dieses induzierbaren Zellsystems könnte so in Chromatin Immunpräzipitationen

untersucht werde, wie die SUMO-abhängigen Korepressoren zeitabhängig sowie in Abhängigkeit zueinander rekrutiert werden. Zudem bietet dieses System den Vorteil, dass nach Entfernung von Tamoxifen die ERHBD-Gal4-Fusionsproteine den Promotor wieder verlassen, wodurch die Stabilität der SUMO-abhängigen induzierten Chromatin-Veränderungen analysiert werden kann. Zudem könnten Re-ChIP-Analysen Aufschluss darüber geben, ob die SUMO-abhängigen Korepressoren gleichzeitig an einem Promotor einer Zelle lokalisiert sind.

Von besonderer Bedeutung für zukünftige Experimente sind die beschriebenen Sp3-SUMOylierungs-defizienten MEFs, die aus Sp3-SUMO-KI Mäusen gewonnen wurden, die eine Sp3-Variante exprimieren, bei der das SUMOylierungsmotiv mutiert ist (Krüger, 2007). In Chromatin Immunpräzipitationen waren Mi-2 und L3MBTL2 in Gegenwart von SUMOylierungs-defizientem Sp3 vermindert mit dem *DHFR*-Promotor assoziiert (Abb. 4.30). Wie bereits erwähnt, wird die Expression von DHFR Zellzyklus-abhängig reguliert und dabei durch die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie reprimiert (Fry et al. 1997). Daher sollte die DHFR-Expression in Sp3-SUMOylierungs-defizienten MEFs in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus untersucht werden. Zudem könnte man in diesen Zellen die E2F-vermittelte Repression durch Inhibition der Pocket-Proteine mittels Expression des Papillomavirus-Proteins E7 unterdrücken (Helt und Galloway 2003). Die Pocket-Proteine pRb, p107 und p130 binden an die verschiedenen E2F-Proteine, wodurch die Transkription von E2F-regulierten Genen reprimiert wird (Dyson 1998). Durch Inhibition der Pocket-Proteine würde die Repression durch E2F aufgehoben und der alleinige Einfluss der Sp3-SUMO-vermittelten Repression auf die DHFR-Expression könnte untersucht werden.

Die SUMO-abhängige Rekrutierung der Repressions-Komponenten und die Ausbildung von lokalem Heterochromatin wurden einzig durch Chromatin Immunpräzipitationen auf dem murinen *DHFR*-Promotor nachgewiesen. Es ist also nicht geklärt, ob auch andere Sp3-regulierte Gene auf die gleiche Weise durch SUMOyliertes Sp3 reprimiert werden. Erste Hinweise auf weitere von SUMO-modifiziertem Sp3 repressorisch regulierte Zielgene lieferte die durchgeführte Microarray-Analyse nach RNAi-vermittelter Depletion von Sp3. Nach Validierung der Microarray-Ergebnisse durch RT-PCR und/oder Northern-Blot-Analysen sollte in zukünftigen Experimenten die Rekrutierung der beschriebenen SUMO-abhängigen Korepressoren sowie die Ausbildung der heterochromatischen Strukturen auch auf anderen Sp3-regulierten Genen analysiert werden.

6. Literaturverzeichnis

- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwein, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhatar, R., Shilatifard, A., Workman, J., and Zhang, Y. 2007. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* **131**(4): 633-6.
- Andrews, N.C. and Faller, D.V. 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **19**(9): 2499.
- Ayyanathan, K., Lechner, M.S., Bell, P., Maul, G.G., Schultz, D.C., Yamada, Y., Tanaka, K., Torigoe, K., and Rauscher, F.J., 3rd. 2003. Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev* **17**(15): 1855-69.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. 2005. Reversing histone methylation. *Nature* **436**(7054): 1103-6.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**(6824): 120-4.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. 1998. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* **280**(2): 275-86.
- Bedford, M.T. and Richard, S. 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* **18**(3): 263-72.
- Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Schotta, G., Klatt, P., Jenuwein, T., and Blasco, M.A. 2007. Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J Cell Biol* **178**(6): 925-36.
- Benting, J., Lecat, S., Zacchetti, D., and Simons, K. 2000. Protein expression in *Drosophila* Schneider cells. *Anal Biochem* **278**(1): 59-68.
- Berger, S.L. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**(7143): 407-12.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J., and Lima, C.D. 2002. Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* **108**(3): 345-56.
- Bhaskar, V., Smith, M., and Courey, A.J. 2002. Conjugation of Smt3 to dorsal may potentiate the *Drosophila* immune response. *Mol Cell Biol* **22**(2): 492-504.
- Bhaskar, V., Valentine, S.A., and Courey, A.J. 2000. A functional interaction between dorsal and components of the Smt3 conjugation machinery. *J Biol Chem* **275**(6): 4033-40.
- Bies, J., Markus, J., and Wolff, L. 2002. Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem* **277**(11): 8999-9009.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**(1): 6-21.
- Birnbaum, M.J., van Wijnen, A.J., Odgren, P.R., Last, T.J., Suske, G., Stein, G.S., and Stein, J.L. 1995. Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* **34**(50): 16503-8.

- Boccuni, P., MacGrogan, D., Scandura, J.M., and Nimer, S.D. 2003. The human L(3)MBT polycomb group protein is a transcriptional repressor and interacts physically and functionally with TEL (ETV6). *J Biol Chem* **278**(17): 15412-20.
- Bossis, G., Malnou, C.E., Farras, R., Andermarcher, E., Hipskind, R., Rodriguez, M., Schmidt, D., Muller, S., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M. 2005. Down-regulation of c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. *Mol Cell Biol* **25**(16): 6964-79.
- Bossis, G. and Melchior, F. 2006. Regulation of SUMOylation by reversible oxidation of SUMO conjugating enzymes. *Mol Cell* **21**(3): 349-57.
- Bouazoune, K. and Brehm, A. 2005. dMi-2 chromatin binding and remodeling activities are regulated by dCK2 phosphorylation. *J Biol Chem* **280**(51): 41912-20.
- Bouazoune, K. and Brehm, A. 2006. ATP-dependent chromatin remodeling complexes in Drosophila. *Chromosome Res* **14**(4): 433-49.
- Bouazoune, K., Mitterweger, A., Langst, G., Imhof, A., Akhtar, A., Becker, P.B., and Brehm, A. 2002. The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization. *Embo J* **21**(10): 2430-40.
- Bouras, T., Fu, M., Sauve, A.A., Wang, F., Quong, A.A., Perkins, N.D., Hay, R.T., Gu, W., and Pestell, R.G. 2005. SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem* **280**(11): 10264-76.
- Boutros, M., Kiger, A.A., Armknecht, S., Kerr, K., Hild, M., Koch, B., Haas, S.A., Paro, R., and Perrimon, N. 2004. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in Drosophila cells. *Science* **303**(5659): 832-5.
- Bouwman, P., Göllner, H., Elsässer, H.P., Eckhoff, G., Karis, A., Grosveld, F., Philipsen, S., and Suske, G. 2000. Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *Embo J* **19**(4): 655-61.
- Bouwman, P. and Philipsen, S. 2002. Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* **195**(1-2): 27-38.
- Bowen, N.J., Fujita, N., Kajita, M., and Wade, P.A. 2004. Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta* **1677**(1-3): 52-7.
- Braun, H., Koop, R., Ertmer, A., Nacht, S., and Suske, G. 2001. Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res* **29**(24): 4994-5000.
- Braun, H. and Suske, G. 1999. Vectors for inducible expression of dual epitope-tagged proteins in insect cells. *Biotechniques* **26**(6): 1038-40, 42.
- Brehm, A., Langst, G., Kehle, J., Clapier, C.R., Imhof, A., Eberharter, A., Muller, J., and Becker, P.B. 2000. dMi-2 and ISWI chromatin remodelling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties. *Embo J* **19**(16): 4332-41.
- Chang, C.C., Lin, D.Y., Fang, H.I., Chen, R.H., and Shih, H.M. 2005. Daxx mediates the small ubiquitin-like modifier-dependent transcriptional repression of Smad4. *J Biol Chem* **280**(11): 10164-73.
- Dasso, M. 2008. Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis. *Cell Div* **3**: 5.
- Dennig, J., Beato, M., and Suske, G. 1996. An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *Embo J* **15**(20): 5659-67.
- Dennig, J., Hagen, G., Beato, M., and Suske, G. 1995. Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J Biol Chem* **270**(21): 12737-44.

- Denslow, S.A. and Wade, P.A. 2007. The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* **26**(37): 5433-8.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. 1998. SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* **2**(2): 233-9.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**(6735): 491-6.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6): 457-67.
- Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**(15): 2245-62.
- Echalier, G. and Ohanessian, A. 1970. In vitro culture of Drosophila melanogaster embryonic cells. *In Vitro* **6**(3): 162-72.
- Feng, Q. and Zhang, Y. 2003. The NuRD complex: linking histone modification to nucleosome remodeling. *Curr Top Microbiol Immunol* **274**: 269-90.
- Friedman, J.R., Fredericks, W.J., Jensen, D.E., Speicher, D.W., Huang, X.P., Neilson, E.G., and Rauscher, F.J., 3rd. 1996. KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev* **10**(16): 2067-78.
- Fry, C.J., Slansky, J.E., and Farnham, P.J. 1997. Position-dependent transcriptional regulation of the murine dihydrofolate reductase promoter by the E2F transactivation domain. *Mol Cell Biol* **17**(4): 1966-76.
- Gill, G. 2004. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**(17): 2046-59.
- Gill, G. 2005. Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* **15**(5): 536-41.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D., and Hay, R.T. 2003. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* **11**(4): 1043-54.
- Göllner, H., Bouwman, P., Mangold, M., Karis, A., Braun, H., Rohner, I., Del Rey, A., Besedovsky, H.O., Meinhardt, A., van den Broek, M., Cutforth, T., Grosveld, F., Philipsen, S., and Suske, G. 2001a. Complex phenotype of mice homozygous for a null mutation in the Sp4 transcription factor gene. *Genes Cells* **6**(8): 689-97.
- Göllner, H., Dani, C., Phillips, B., Philipsen, S., and Suske, G. 2001b. Impaired ossification in mice lacking the transcription factor Sp3. *Mech Dev* **106**(1-2): 77-83.
- Göllner, H. 2002 Die biologische Bedeutung der Transkriptionsfaktoren Sp3 und Sp4: Charakterisierung von Sp3- und Sp4-Knockout Mäusen. Dissertation am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg.
- Gong, L. and Yeh, E.T. 2006. Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* **281**(23): 15869-77.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Greil, F., de Wit, E., Bussemaker, H.J., and van Steensel, B. 2007. HP1 controls genomic targeting of four novel heterochromatin proteins in Drosophila. *Embo J* **26**(3): 741-51.

- Guo, D., Li, M., Zhang, Y., Yang, P., Eckenrode, S., Hopkins, D., Zheng, W., Purohit, S., Podolsky, R.H., Muir, A., Wang, J., Dong, Z., Brusko, T., Atkinson, M., Pozzilli, P., Zeidler, A., Raffel, L.J., Jacob, C.O., Park, Y., Serrano-Rios, M., Larrad, M.T., Zhang, Z., Garchon, H.J., Bach, J.F., Rotter, J.I., She, J.X., and Wang, C.Y. 2004. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* **36**(8): 837-41.
- Haecker, A., Qi, D., Lilja, T., Moussian, B., Andrioli, L.P., Luschnig, S., and Mannervik, M. 2007. Drosophila brakeless interacts with atrophin and is required for tailless-mediated transcriptional repression in early embryos. *PLoS Biol* **5**(6): e145.
- Hagen, G., Müller, S., Beato, M., and Suske, G. 1992. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* **20**(21): 5519-25.
- Hagen, G., Müller, S., Beato, M., and Suske, G. 1994. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J* **13**(16): 3843-51.
- Hannich, J.T., Lewis, A., Kroetz, M.B., Li, S.J., Heide, H., Emili, A., and Hochstrasser, M. 2005. Defining the SUMO-modified proteome by multiple approaches in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**(6): 4102-10.
- Hari, K.L., Cook, K.R., and Karpen, G.H. 2001. The Drosophila Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev* **15**(11): 1334-48.
- Hay, R.T. 2005. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**(1): 1-12.
- He, S., Sun, J.M., Li, L., and Davie, J.R. 2005. Differential intranuclear organization of transcription factors Sp1 and Sp3. *Mol Biol Cell* **16**(9): 4073-83.
- Hecker, C.M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., and Dikic, I. 2006. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* **281**(23): 16117-27.
- Hediger, F. and Gasser, S.M. 2006. Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover! *Curr Opin Genet Dev* **16**(2): 143-50.
- Helt, A.M. and Galloway, D.A. 2003. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* **24**(2): 159-69.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**: 425-79.
- Hietakangas, V., Ahlskog, J.K., Jakobsson, A.M., Hellesuo, M., Sahlberg, N.M., Holmberg, C.I., Mikhailov, A., Palvimo, J.J., Pirkkala, L., and Sistonen, L. 2003. Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* **23**(8): 2953-68.
- Hirose, F., Ohshima, N., Kwon, E.J., Yoshida, H., and Yamaguchi, M. 2002. Drosophila Mi-2 negatively regulates dDREF by inhibiting its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* **22**(14): 5182-93.
- Holmstrom, S., Van Antwerp, M.E., and Iniguez-Lluhi, J.A. 2003. Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15758-63.
- Ichimura, T., Watanabe, S., Sakamoto, Y., Aoto, T., Fujita, N., and Nakao, M. 2005. Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. *J Biol Chem* **280**(14): 13928-35.
- Ihn, H. and Trojanowska, M. 1997. Sp3 is a transcriptional activator of the human alpha2(I) collagen gene. *Nucleic Acids Res* **25**(18): 3712-7.

- Ivanov, A.V., Peng, H., Yurchenko, V., Yap, K.L., Negorev, D.G., Schultz, D.C., Psulkowski, E., Fredericks, W.J., White, D.E., Maul, G.G., Sadofsky, M.J., Zhou, M.M., and Rauscher, F.J., 3rd. 2007. PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell* **28**(5): 823-37.
- Jensen, D.E., Black, A.R., Swick, A.G., and Azizkhan, J.C. 1997. Distinct roles for Sp1 and E2F sites in the growth/cell cycle regulation of the DHFR promoter. *J Cell Biochem* **67**(1): 24-31.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**(5532): 1074-80.
- Johansen, K.M. and Johansen, J. 2006. Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res* **14**(4): 393-404.
- Johnson, E.S. 2004. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**: 355-82.
- Johnson, E.S. and Blobel, G. 1999. Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* **147**(5): 981-94.
- Johnson, E.S. and Gupta, A.A. 2001. An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* **106**(6): 735-44.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A., and Wotton, D. 2003. The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* **113**(1): 127-37.
- Kahyo, T., Nishida, T., and Yasuda, H. 2001. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* **8**(3): 713-8.
- Kalakonda, N., Fischle, W., Boccuni, P., Gurvich, N., Hoya-Arias, R., Zhao, X., Miyata, Y., Macgrogan, D., Zhang, J., Sims, J.K., Rice, J.C., and Nimer, S.D. 2008. Histone H4 lysine 20 monomethylation promotes transcriptional repression by L3MBTL1. *Oncogene* **27**(31): 4293-304.
- Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D., and Steward, R. 2005. PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes Dev* **19**(4): 431-5.
- Kavi, H.H., Fernandez, H.R., Xie, W., and Birchler, J.A. 2005. RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Lett* **579**(26): 5940-9.
- Kehle, J., Beuchle, D., Treuheit, S., Christen, B., Kennison, J.A., Bienz, M., and Muller, J. 1998. dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science* **282**(5395): 1897-900.
- Kellum, R. 2003. HP1 complexes and heterochromatin assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* **274**: 53-77.
- Kennett, S.B., Udvardia, A.J., and Horowitz, J.M. 1997. Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res* **25**(15): 3110-7.
- Kim, J., Cantwell, C.A., Johnson, P.F., Pfarr, C.M., and Williams, S.C. 2002. Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J Biol Chem* **277**(41): 38037-44.
- Kim, J., Daniel, J., Espejo, A., Lake, A., Krishna, M., Xia, L., Zhang, Y., and Bedford, M.T. 2006. Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep* **7**(4): 397-403.
- Kim, J.H., Choi, H.J., Kim, B., Kim, M.H., Lee, J.M., Kim, I.S., Lee, M.H., Choi, S.J., Kim, K.I., Kim, S.I., Chung, C.H., and Baek, S.H. 2006. Roles of sumoylation of a reptin chromatin-remodelling complex in cancer metastasis. *Nat Cell Biol* **8**(6): 631-9.

- Kingsley, C. and Winoto, A. 1992. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* **12**(10): 4251-61.
- Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., and Dejean, A. 2002. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J* **21**(11): 2682-91.
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Kocher, T., Schelder, M., Fritsch, C., Wild, B., Wilm, M., and Muller, J. 2006. A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes Dev* **20**(9): 1110-22.
- Kockel, L., Homsy, J.G., and Bohmann, D. 2001. Drosophila AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene* **20**(19): 2347-64.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**(3): 285-94.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. 2002. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* **22**(14): 5222-34.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**(4): 693-705.
- Krüger, I. 2007 Mausmodelle des Transkriptionsfaktors Sp3: Charakterisierung Sp1/Sp3-doppelt-heterozygoter Mäuse, Etablierung einer Sp3-SUMO-defizienten Knockin-Zelllinie, Generierung eines konditionellen Sp3 Knockout Allels. Dissertation am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg.
- Krüger, I., Vollmer, M., Simmons, D.G., Elsässer, H.P., Philipsen, S., and Suske, G. 2007. Sp1/Sp3 compound heterozygous mice are not viable: impaired erythropoiesis and severe placental defects. *Dev Dyn* **236**(8): 2235-44.
- Kulkarni, M.M., Booker, M., Silver, S.J., Friedman, A., Hong, P., Perrimon, N., and Mathey-Prevot, B. 2006. Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. *Nat Methods* **3**(10): 833-8.
- Kuo, H.Y., Chang, C.C., Jeng, J.C., Hu, H.M., Lin, D.Y., Maul, G.G., Kwok, R.P., and Shih, H.M. 2005. SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(47): 16973-8.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**(6824): 116-20.
- Lachner, M., O'Sullivan, R.J., and Jenuwein, T. 2003. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* **116**(Pt 11): 2117-24.
- Lee, M.B., Lebedeva, L.A., Suzawa, M., Wadekar, S.A., Desclozeaux, M., and Ingraham, H.A. 2005. The DEAD-box protein DP103 (Ddx20 or Gemin-3) represses orphan nuclear receptor activity via SUMO modification. *Mol Cell Biol* **25**(5): 1879-90.
- Lehembre, F., Badenhorst, P., Muller, S., Travers, A., Schweisguth, F., and Dejean, A. 2000. Covalent modification of the transcriptional repressor tramtrack by the ubiquitin-related protein Smt3 in *Drosophila* flies. *Mol Cell Biol* **20**(3): 1072-82.
- Leight, E.R., Glossip, D., and Kornfeld, K. 2005. Sumoylation of LIN-1 promotes transcriptional repression and inhibition of vulval cell fates. *Development* **132**(5): 1047-56.

- Lemon, B. and Tjian, R. 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* **14**(20): 2551-69.
- Levine, M. and Tjian, R. 2003. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* **424**(6945): 147-51.
- Levine, S.S., King, I.F., and Kingston, R.E. 2004. Division of labor in polycomb group repression. *Trends Biochem Sci* **29**(9): 478-85.
- Lewis, P.W., Beall, E.L., Fleischer, T.C., Georgette, D., Link, A.J., and Botchan, M.R. 2004. Identification of a Drosophila Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex. *Genes Dev* **18**(23): 2929-40.
- Liang, Y., Robinson, D.F., Dennig, J., Suske, G., and Fahl, W.E. 1996. Transcriptional regulation of the SIS/PDGF-B gene in human osteosarcoma cells by the Sp family of transcription factors. *J Biol Chem* **271**(20): 11792-7.
- Lin, D., Tatham, M.H., Yu, B., Kim, S., Hay, R.T., and Chen, Y. 2002. Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *J Biol Chem* **277**(24): 21740-8.
- Lin, D.Y., Fang, H.I., Ma, A.H., Huang, Y.S., Pu, Y.S., Jenster, G., Kung, H.J., and Shih, H.M. 2004. Negative modulation of androgen receptor transcriptional activity by Daxx. *Mol Cell Biol* **24**(24): 10529-41.
- Lin, D.Y., Huang, Y.S., Jeng, J.C., Kuo, H.Y., Chang, C.C., Chao, T.T., Ho, C.C., Chen, Y.C., Lin, T.P., Fang, H.I., Hung, C.C., Suen, C.S., Hwang, M.J., Chang, K.S., Maul, G.G., and Shih, H.M. 2006. Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* **24**(3): 341-54.
- Lin, J.Y., Ohshima, T., and Shimotohno, K. 2004. Association of Ubc9, an E2 ligase for SUMO conjugation, with p53 is regulated by phosphorylation of p53. *FEBS Lett* **573**(1-3): 15-8.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lomberk, G., Wallrath, L., and Urrutia, R. 2006. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol* **7**(7): 228.
- Lu, J., Ruhf, M.L., Perrimon, N., and Leder, P. 2007. A genome-wide RNA interference screen identifies putative chromatin regulators essential for E2F repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(22): 9381-6.
- Ma, Y., Creanga, A., Lum, L., and Beachy, P.A. 2006. Prevalence of off-target effects in Drosophila RNA interference screens. *Nature* **443**(7109): 359-63.
- Mack, E. 2007 Identifizierung von potentiellen Zielgenen des Transkriptionsfaktors Sp3 in humanen und murinen Zellkultursystemen. Diplomarbeit am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg.
- Majello, B., De Luca, P., Hagen, G., Suske, G., and Lania, L. 1994. Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res* **22**(23): 4914-21.
- Marfella, C.G. and Imbalzano, A.N. 2007. The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res* **618**(1-2): 30-40.
- Marhold, J., Brehm, A., and Kramer, K. 2004. The Drosophila methyl-DNA binding protein MBD2/3 interacts with the NuRD complex via p55 and MI-2. *BMC Mol Biol* **5**(1): 20.
- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F., and Philipsen, S. 1997. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* **89**(4): 619-28.

- Martin, C. and Zhang, Y. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 838-49.
- Martinez, E. 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol* **50**(6): 925-47.
- Maurer-Stroh, S., Dickens, N.J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., and Ponting, C.P. 2003. The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* **28**(2): 69-74.
- Meister, G. and Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**(7006): 343-9.
- Melchior, F. 2000. SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 591-626.
- Melchior, F., Schergaut, M., and Pichler, A. 2003. SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* **28**(11): 612-8.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., and Caput, D. 2000. Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* **275**(46): 36316-23.
- Moldovan, G.L., Pfander, B., and Jentsch, S. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* **129**(4): 665-79.
- Morgenstern, J.P. and Land, H. 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**(12): 3587-96.
- Mukhopadhyay, D. and Dasso, M. 2007. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci* **32**(6): 286-95.
- Müller, P., Kutenkeuler, D., Gesellchen, V., Zeidler, M.P., and Boutros, M. 2005. Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* **436**(7052): 871-5.
- Müller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y., and Dejean, A. 2000. c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **275**(18): 13321-9.
- Müller, S., Ledl, A., and Schmidt, D. 2004. SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* **23**(11): 1998-2008.
- Murawska, M., Kunert, N., van Vugt, J., Langst, G., Kremmer, E., Logie, C., and Brehm, A. 2008. dCHD3, a novel ATP-dependent chromatin remodeler associated with sites of active transcription. *Mol Cell Biol* **28**(8): 2745-57.
- Murawsky, C.M., Brehm, A., Badenhorst, P., Lowe, N., Becker, P.B., and Travers, A.A. 2001. Tramtrack69 interacts with the dMi-2 subunit of the Drosophila NuRD chromatin remodelling complex. *EMBO Rep* **2**(12): 1089-94.
- Naar, A.M., Lemon, B.D., and Tjian, R. 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* **70**: 475-501.
- Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P., and Dejean, A. 2005. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* **9**(6): 769-79.
- Nicolas, E., Roumillac, C., and Trouche, D. 2003. Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* **23**(5): 1614-22.
- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E., and Kouzarides, T. 2001.

- Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**(6846): 561-5.
- Nightingale, K.P., O'Neill, L.P., and Turner, B.M. 2006. Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* **16**(2): 125-36.
- Nishida, T. and Yasuda, H. 2002. PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* **277**(44): 41311-7.
- Nishioka, K., Rice, J.C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Chuikov, S., Valenzuela, P., Tempst, P., Steward, R., Lis, J.T., Allis, C.D., and Reinberg, D. 2002. PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* **9**(6): 1201-13.
- Nowak, S.J. and Corces, V.G. 2004. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* **20**(4): 214-20.
- Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M., and Nakatani, Y. 2002. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**(5570): 1132-6.
- Owerbach, D., McKay, E.M., Yeh, E.T., Gabbay, K.H., and Bohren, K.M. 2005. A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* **337**(2): 517-20.
- Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H., and Jenuwein, T. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**(6): 1577-89.
- Peterson, C.L. and Laniel, M.A. 2004. Histones and histone modifications. *Curr Biol* **14**(14): R546-51.
- Philipsen, S. and Suske, G. 1999. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* **27**(15): 2991-3000.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A., and Melchior, F. 2002. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**(1): 109-20.
- Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., van Dijk, W.J., Korner, R., Olsen, J.V., Jentsch, S., Melchior, F., and Sixma, T.K. 2005. SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat Struct Mol Biol* **12**(3): 264-9.
- Poulin, G., Dong, Y., Fraser, A.G., Hopper, N.A., and Ahringer, J. 2005. Chromatin regulation and sumoylation in the inhibition of Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* **24**(14): 2613-23.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., and Jenuwein, T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**(6796): 593-9.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorova, A. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**(3): 326-30.
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C., and Hay, R.T. 2001. SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* **276**(16): 12654-9.

- Rosendorff, A., Sakakibara, S., Lu, S., Kieff, E., Xuan, Y., DiBacco, A., Shi, Y., Shi, Y., and Gill, G. 2006. NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(14): 5308-13.
- Ross, S., Best, J.L., Zon, L.I., and Gill, G. 2002. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* **10**(4): 831-42.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. 2001. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* **15**(23): 3088-103.
- Saitoh, H. and Hinchev, J. 2000. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* **275**(9): 6252-8.
- Sanders, S.L., Portoso, M., Mata, J., Bahler, J., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. 2004. Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**(5): 603-14.
- Sapetschnig, A. 2006 Mechanismen der SUMO-vermittelten Repression am Beispiel des Transkriptionsfaktors Sp3: Identifizierung potentieller Korepressoren. Dissertation am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg.
- Sapetschnig, A., Koch, F., Rischitor, G., Mennenga, T., and Suske, G. 2004. Complexity of translationally controlled transcription factor Sp3 isoform expression. *J Biol Chem* **279**(40): 42095-105.
- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F., and Suske, G. 2002. Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J* **21**(19): 5206-15.
- Schmidt, D. and Müller, S. 2002. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2872-7.
- Schneider, I. 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* **27**(2): 353-65.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., and Jenuwein, T. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**(11): 1251-62.
- Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G., and Rauscher, F.J., 3rd. 2002. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* **16**(8): 919-32.
- Seeler, J.S. and Dejean, A. 2003. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(9): 690-9.
- Senti, K., Keleman, K., Eisenhaber, F., and Dickson, B.J. 2000. brakeless is required for lamina targeting of R1-R6 axons in the *Drosophila* visual system. *Development* **127**(11): 2291-301.
- Seufert, W., Fitcher, B., and Jentsch, S. 1995. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* **373**(6509): 78-81.
- Shih, H.M., Chang, C.C., Kuo, H.Y., and Lin, D.Y. 2007. Daxx mediates SUMO-dependent transcriptional control and subnuclear compartmentalization. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 6): 1397-400.
- Shilatifard, A. 2006. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* **75**: 243-69.

- Shirokawa, J.M. and Courey, A.J. 1997. A direct contact between the dorsal rel homology domain and Twist may mediate transcriptional synergy. *Mol Cell Biol* **17**(6): 3345-55.
- Sims, R.J., 3rd, Nishioka, K., and Reinberg, D. 2003. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* **19**(11): 629-39.
- Singh, P.B. and Georgatos, S.D. 2002. HP1: facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol* **140**(1-3): 10-6.
- Slansky, J.E. and Farnham, P.J. 1996. Transcriptional regulation of the dihydrofolate reductase gene. *Bioessays* **18**(1): 55-62.
- Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., and Chen, Y. 2004. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(40): 14373-8.
- Sontheimer, E.J. 2005. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 127-38.
- Sripathy, S.P., Stevens, J., and Schultz, D.C. 2006. The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **26**(22): 8623-38.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-59.
- Stielow, B., Sapetschnig, A., Krüger, I., Kunert, N., Brehm, A., Boutros, M., and Suske, G. 2008a. Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNAi screen. *Mol Cell* **29**(6): 742-54.
- Stielow, B., Sapetschnig, A., Wink, C., Krüger, I., and Suske, G. 2008b. SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Rep* **9**(9): 899-906.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-5.
- Subramanian, L., Benson, M.D., and Iniguez-Lluhi, J.A. 2003. A synergy control motif within the attenuator domain of CCAAT/enhancer-binding protein alpha inhibits transcriptional synergy through its PIASy-enhanced modification by SUMO-1 or SUMO-3. *J Biol Chem* **278**(11): 9134-41.
- Suske, G. 1999. The Sp-family of transcription factors. *Gene* **238**(2): 291-300.
- Suske, G., Bruford, E., and Philipsen, S. 2005. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* **85**(5): 551-6.
- Takahashi, Y., Iwase, M., Konishi, M., Tanaka, M., Toh-e, A., and Kikuchi, Y. 1999. Smt3, a SUMO-1 homolog, is conjugated to Cdc3, a component of septin rings at the mother-bud neck in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **259**(3): 582-7.
- Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H., and Hay, R.T. 2001. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* **276**(38): 35368-74.
- Thompson, N.E., Steinberg, T.H., Aronson, D.B., and Burgess, R.R. 1989. Inhibition of in vivo and in vitro transcription by monoclonal antibodies prepared against wheat germ RNA polymerase II that react with the heptapeptide repeat of eukaryotic RNA polymerase II. *J Biol Chem* **264**(19): 11511-20.

- Trojer, P., Li, G., Sims, R.J., 3rd, Vaquero, A., Kalakonda, N., Boccuni, P., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nimer, S.D., Wang, Y.H., and Reinberg, D. 2007. L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* **129**(5): 915-28.
- Turner, B.M. 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**(9): 836-45.
- Turner, B.M. 2007. Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol* **9**(1): 2-6.
- Uchimura, Y., Ichimura, T., Uwada, J., Tachibana, T., Sugahara, S., Nakao, M., and Saitoh, H. 2006. Involvement of SUMO modification in MBD1- and MCAF1-mediated heterochromatin formation. *J Biol Chem* **281**(32): 23180-90.
- Udvadia, A.J., Templeton, D.J., and Horowitz, J.M. 1995. Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(9): 3953-7.
- Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., and Saigo, K. 2004. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res* **32**(3): 936-48.
- Unhavaithaya, Y., Shin, T.H., Miliaras, N., Lee, J., Oyama, T., and Mello, C.C. 2002. MEP-1 and a homolog of the NURD complex component Mi-2 act together to maintain germline-soma distinctions in *C. elegans*. *Cell* **111**(7): 991-1002.
- Vakoc, C.R., Mandat, S.A., Olenchok, B.A., and Blobel, G.A. 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* **19**(3): 381-91.
- van de Wetering, M., Oving, I., Muncan, V., Pon Fong, M.T., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F.C., Brummelkamp, T.R., Agami, R., and Clevers, H. 2003. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* **4**(6): 609-15.
- Vaquero, A., Loyola, A., and Reinberg, D. 2003. The constantly changing face of chromatin. *Sci Aging Knowledge Environ* **2003**(14): RE4.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. 2003. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* **4**(2): 137-42.
- Verrijzer, C.P. 2001. Transcription factor IID--not so basal after all. *Science* **293**(5537): 2010-1.
- Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R.G., and Zhang, Y. 2003. mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell* **12**(2): 475-87.
- Wang, W. 2003. The SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers: similar mechanisms for diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol* **274**: 143-69.
- Wehn, A. and Campbell, G. 2006. Genetic interactions among scribbler, Atrophin and groucho in *Drosophila* uncover links in transcriptional repression. *Genetics* **173**(2): 849-61.
- Wood, L.D., Irvin, B.J., Nucifora, G., Luce, K.S., and Hiebert, S.W. 2003. Small ubiquitin-like modifier conjugation regulates nuclear export of TEL, a putative tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3257-62.
- Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y., and Kikuchi, A. 2003. Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *Embo J* **22**(9): 2047-59.

Literaturverzeichnis

- Yang, S.H., Jaffray, E., Hay, R.T., and Sharrocks, A.D. 2003. Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* **12**(1): 63-74.
- Yang, S.H. and Sharrocks, A.D. 2004. SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* **13**(4): 611-7.
- Zhang, F., Thomas, L.R., Oltz, E.M., and Aune, T.M. 2006. Control of thymocyte development and recombination-activating gene expression by the zinc finger protein Zfp608. *Nat Immunol* **7**(12): 1309-16.
- Zhang, Y. and Reinberg, D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**(18): 2343-60.
- Zhao, J. 2007. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci* **64**(23): 3017-33.
- Zhong, S., Salomoni, P., and Pandolfi, P.P. 2000. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* **2**(5): E85-90.

7. Anhang

Tabelle A1: Deregulierte Gene nach siRNA-vermitteltem Knockdown von Sp3

Angegeben sind nach induzierter siRNA-vermittelter Depletion von Sp3 gegenüber uninduzierten Zellen in drei unabhängigen Experimenten mindestens 3-fach deregulierte Gene. Sp3 selbst wurde 4,2-fach vermindert exprimiert. Hervorgehoben sind Gene, die sowohl nach Sp3- als auch nach Sp1-Depletion verändert exprimiert wurden (siehe Tabelle A2).

Affymetrix Oligonukleotid Sonde	Fache Änderung (1)	Fache Änderung (2)	Fache Änderung (3)	MW Fache Änderung	Gen Name	Gen Symbol
215713_at	39,60	18,33	11,13	23,02	CDNA: FLJ23125 fis, clone LNG08217	
216748_at	20,75	40,11	5,75	22,20	interferon-inducible protein X	IFIX
1562780_at	5,84	13,88	41,90	20,54	Clone IMAGE:5285536, mRNA	
1561156_at	21,03	13,48	21,63	18,71	Full length insert cDNA clone ZD46F04	
221372_s_at	7,19	22,99	22,36	17,52	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2	P2RX2
1561721_a_at	13,35	9,64	26,86	16,62	hypothetical protein FLJ40126	FLJ40126
243936_x_at	30,05	8,27	8,07	15,47		
1563546_at	24,11	8,97	12,55	15,21		
238399_x_at	18,69	17,36	9,35	15,13		
1569191_at	6,99	14,91	22,21	14,70		
210732_s_at	20,85	8,68	14,57	14,70	lectin, galactoside-binding (galectin 8)	LGALS8
233744_at	4,96	26,85	10,82	14,21		
243437_at	22,62	14,81	4,62	14,02	GRIP and coiled-coil domain containing 1	GCC1
241553_at	15,42	14,16	11,43	13,67	germ cell associated 1	GSG1
1559577_at	19,71	9,68	10,48	13,29	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing lectin) 2 (hucolin)	FCN2
210997_at	22,36	10,40	6,02	12,93	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	HGF
1560416_at	20,16	10,03	8,28	12,83	dynein, axonemal, heavy polypeptide 11	DNAH11
1556805_at	17,84	3,93	13,56	11,78	Clone IMAGE:5314388, mRNA	
240989_at	16,35	13,10	5,12	11,52		
240078_at	5,70	20,75	7,85	11,43		
232960_at	9,38	12,30	11,97	11,21	hypothetical protein FLJ20130	FLJ20130
208566_at	4,75	12,39	16,09	11,08	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	KCNJ12
239951_at	9,63	17,22	6,07	10,97		
230081_at	11,15	17,67	4,04	10,95	Similar to RIKEN cDNA B130016O10 gene	
1556847_s_at	11,88	11,51	9,29	10,89	CDNA FLJ36448 fis, clone THYMU2013426	
242650_at	14,67	6,22	10,89	10,60		
1569100_a_at	6,21	11,65	13,84	10,57	Clone IMAGE:5528960, mRNA	
240660_at	14,69	6,99	9,24	10,30		
207958_at	18,83	7,26	4,12	10,07	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide A1	UGT2A1
237590_at	14,59	3,88	11,08	9,85		
1568936_a_at	9,90	15,04	4,58	9,84		
1559665_at	4,83	13,98	10,45	9,75	Clone IMAGE:5271902, mRNA	
231304_at	10,08	8,27	10,83	9,73	protein phosphatase 3 regulatory subunit B, beta isoform	PPP3R2
233523_at	8,05	13,40	6,82	9,42	chromosome 20 open reading frame 186	C20orf186
1553802_a_at	10,57	5,42	11,35	9,11	SRY (sex determining region Y)-box 3	SOX3
224426_s_at	8,56	8,78	9,28	8,87		
1552553_a_at	15,61	6,31	4,28	8,73	caspace recruitment domain family, member 12	CARD12
1569729_a_at	5,68	9,51	10,84	8,68	ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain containing 1	ASZ1
217015_at	4,94	11,99	9,07	8,66		
214382_at	5,07	7,58	13,30	8,65	unc-93 homolog A (C. elegans)	UNC93A
233831_at	11,12	3,20	11,19	8,50	Serologically defined breast cancer antigen NY-BR-40 mRNA, partial cds	

Anhang

242597_at	9,83	8,29	7,13	8,42		
1554276_at	4,81	11,64	7,72	8,06	squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells 3	SART3
1569617_at	4,81	8,29	11,02	8,04	oxysterol binding protein 2	OSBP2
231510_at	12,35	5,91	5,71	7,99		
215745_at	4,69	11,60	7,67	7,99		
208045_at	8,05	7,41	8,38	7,95	surfactant protein A binding protein	SPAR
208573_s_at	9,17	8,32	6,13	7,87	olfactory receptor, family 2, subfamily H, member 2	OR2H2
240428_at	4,11	12,88	6,04	7,68	hypothetical protein LOC285000	LOC285000
1558463_s_at	4,76	6,45	11,66	7,63	Clone IMAGE:5274294, mRNA ///	
1564909_at	10,19	9,58	2,92	7,56	hypothetical protein FLJ12681	FLJ12681
215104_at	4,04	7,14	11,42	7,53	nuclear receptor interacting protein 2	NRIP2
231025_at	8,10	5,18	9,29	7,52		
1556630_at	5,34	4,59	12,54	7,49	cancer susceptibility candidate 2	CASC2
1556095_at	6,73	8,88	6,71	7,44	unc-13 homolog C (C. elegans)	UNC13C
220693_at	3,28	11,88	7,12	7,43		
208488_s_at	7,51	4,81	9,76	7,36	complement component (3b/4b) receptor 1,	CR1
1556812_a_at	5,85	12,86	3,34	7,35	Full length insert cDNA clone YX53E08	
207523_at	7,59	8,73	5,43	7,25	chromosome 6 open reading frame 10	C6orf10
1559865_at	7,95	8,54	5,13	7,21	Clone IMAGE:5272798, mRNA	
1562030_at	5,62	8,06	7,92	7,20	hypothetical protein LOC284898	LOC284898
240555_at	3,16	7,75	10,56	7,16		
1563379_at	5,99	9,85	5,59	7,14		
1563361_at	10,86	2,92	7,63	7,13	Clone IMAGE:5168659, mRNA	
206529_x_at	7,17	3,95	10,20	7,10	solute carrier family 26, member 4	SLC26A4
239685_at	3,59	7,61	10,08	7,09		
228701_at	4,44	4,89	11,32	6,88	hypothetical protein MGC33510	MGC33510
231084_at	9,81	7,20	3,45	6,82	chromosome 10 open reading frame 79	C10orf79
220479_at	4,36	11,66	4,42	6,81	PRO0132 protein	PRO0132
244823_at	3,53	11,06	5,80	6,80	proteasome (prosome, macropain) subunit,	PSMB7
229601_at	8,50	8,61	3,10	6,74		
1556944_at	3,75	10,46	5,93	6,71	Olfactory receptor, family 10, subfamily R,	
217351_at	5,93	10,14	3,90	6,66		
227743_at	6,35	5,28	8,24	6,62	myosin XVB, pseudogene	MYO15B
1557214_at	4,86	3,79	11,18	6,61		
223000_s_at	2,77	9,66	7,20	6,54	F11 receptor	F11R
233822_x_at	8,91	7,62	3,05	6,52	uncharacterized gastric protein YC12P	LOC57400
1556564_at	5,64	6,35	7,51	6,50	KIAA1822	KIAA1822
223779_at	9,96	6,17	3,35	6,49	hypothetical protein MGC10981	MGC10981
236857_at	8,74	7,24	3,50	6,49		
229600_s_at	6,43	2,87	10,15	6,48		
203889_at	2,73	7,89	8,81	6,48	secretory granule, neuroendocrine protein 1	SGNE1
240067_at	3,25	8,51	7,46	6,41		
1556004_at	9,78	4,98	4,38	6,38		
1565228_s_at	6,16	5,28	7,51	6,31	albumin	ALB
1557793_at	4,41	6,23	8,23	6,29	chr3 synaptotagmin	CHR3SYT
1555196_at	3,30	10,00	5,29	6,20	Hypothetical LOC221140	
229186_s_at	5,39	7,35	5,78	6,17		
1562019_at	8,31	3,17	6,81	6,10	hypothetical protein LOC284958	LOC284958
1556207_a_at	8,19	4,39	5,66	6,08	Clone IMAGE:4830861, mRNA	
1556039_s_at	8,61	3,22	6,39	6,08	CDNA clone IMAGE:4151570, partial cds	
242271_at	2,95	6,99	8,08	6,01	solute carrier family 26, member 9	SLC26A9
1557762_at	4,13	6,02	7,85	6,00	Clone IMAGE:5295914, mRNA	
209985_s_at	2,92	9,01	6,01	5,98	achaete-scute complex-like 1 (Drosophila)	ASCL1
1555504_at	3,26	8,87	5,60	5,91	tyrosinase (oculocutaneous albinism IA)	TYR
1570182_at	8,47	2,67	6,46	5,87		
221330_at	8,21	6,46	2,91	5,86	cholinergic receptor, muscarinic 2	CHRM2
239116_at	3,99	9,23	4,36	5,86		
1560246_at	4,29	8,29	4,93	5,83	CDNA FLJ40465 fis, clone TEST12042295	
233259_at	4,31	7,74	5,34	5,80	hypothetical protein FLJ12057	FLJ12057
1554183_s_at	4,42	3,94	8,98	5,78	tripartite motif-containing 50C	TRIM50C
216188_at	4,63	7,46	5,19	5,76	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	MYCNOS
220131_at	9,59	3,72	3,79	5,70	FXVD domain containing ion transport regulator 7	FXVD7

Anhang

211917_s_at	2,81	8,16	6,06	5,68	prolactin receptor /// prolactin receptor	PRLR
237306_at	3,45	9,47	4,06	5,66	hypothetical protein DKFZp7790175	
1563091_at	3,12	5,79	8,01	5,64	Clone IMAGE:4798231, mRNA	
238899_at	7,26	3,23	6,42	5,64		
236289_at	3,94	9,43	3,45	5,61		
241311_at	8,13	2,96	5,72	5,60		
240215_at	3,92	8,31	4,58	5,60		
1557680_at	6,75	7,35	2,60	5,57	hypothetical protein LOC161394	LOC161394
1552639_at	5,24	8,40	3,06	5,57	hypothetical protein BC009980	MGC16635
203915_at	5,49	7,47	3,67	5,54	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CXCL9
239987_at	7,06	2,61	6,67	5,45		
217712_at	5,43	7,00	3,53	5,32		
215180_at	4,26	4,10	7,53	5,29	hypothetical protein LOC283761	LOC283761
239310_at	8,95	3,85	3,06	5,29		
1560898_at	5,54	7,27	3,03	5,28	Clone IMAGE:5264940, mRNA	
230877_at	3,14	7,85	4,77	5,25	immunoglobulin heavy constant delta	IGHD
231036_at	8,45	2,83	4,44	5,24		
217250_s_at	3,94	4,35	7,36	5,22	chromodomain helicase DNA binding protein 5	CHD5
1552879_a_at	5,48	6,39	3,76	5,21	atonal homolog 7 (Drosophila)	ATOH7
1558337_at	7,80	4,75	2,97	5,17	LPP-LRFT fusion protein (LPP-LRFT fusion), partial cds	
237814_at	3,37	7,56	4,35	5,10		
1561214_at	5,61	6,38	3,24	5,08		
227537_s_at	2,88	7,60	4,67	5,05		
205463_s_at	4,88	7,48	2,77	5,04	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGFA
213006_at	5,76	6,69	2,57	5,00	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)	CEBPD
1570126_at	3,17	8,34	3,41	4,97		
1554992_at	2,80	4,76	7,34	4,97	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1	RASGRF1
238198_at	6,63	5,11	3,13	4,96		
1561045_a_at	5,95	2,81	6,09	4,95	Hypothetical gene supported by BC039493	
213723_s_at	7,59	3,13	4,12	4,94		
1561037_a_at	3,25	6,11	5,44	4,93	CDNA clone IMAGE:5260914, partial cds	
238338_at	3,99	4,14	6,66	4,93		
1560396_at	4,23	3,29	7,05	4,86	kelch-like 6 (Drosophila)	KLHL6
236323_at	4,25	5,72	4,60	4,86		
1562431_x_at	3,32	7,43	3,77	4,84	Clone IMAGE:5299520, mRNA	
1559145_at	4,79	5,68	4,00	4,82	hypothetical protein LOC386597	LOC386597
216107_at	7,20	3,51	3,72	4,81	Clone PP552 unknown mRNA	
229739_s_at	2,79	7,13	4,47	4,80	similar to RIKEN cDNA 1700027J05 gene	MGC33692
229034_at	3,91	3,04	7,34	4,77	hypothetical protein FLJ10159	FLJ10159
234115_s_at	4,58	6,89	2,80	4,76		
1569805_at	3,76	6,09	4,38	4,74	Hypothetical gene supported by BC039326	
216844_at	3,00	5,10	6,11	4,74	rotavirus X protein associated with NSP3	RoXaN
230985_at	4,97	6,23	3,00	4,73	hypothetical protein MGC41945	MGC41945
243896_at	6,54	2,93	4,70	4,73	chromosome 10 open reading frame 79	C10orf79
244518_at	3,10	7,21	3,58	4,63	Hypothetical LOC200624	
216151_at	2,94	6,93	3,96	4,61		
204987_at	2,57	5,70	5,30	4,52	inter-alpha (globulin) inhibitor H2	ITI2
207874_s_at	4,83	4,21	4,37	4,47	complement factor H-related 4	CFHL4
230275_at	6,50	2,67	4,23	4,47	Similar to RIKEN cDNA 9330196J05	
229777_at	5,92	2,80	4,57	4,43	hypothetical protein MGC32871	MGC32871
208041_at	3,34	3,55	6,37	4,42	G protein-coupled receptor kinase 1	GRK1
227673_at	4,49	5,75	2,96	4,40	zinc ribbon domain containing, 1	ZNRD1
217233_at	2,50	5,19	5,46	4,38		
206539_s_at	6,53	2,72	3,89	4,38	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 12	CYP4F12
238997_at	4,14	4,36	4,41	4,31		
1557166_at	3,20	5,63	4,08	4,30	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	PDCD4
234847_at	2,37	5,56	4,91	4,28	hypothetical protein DKFZp434G179	
210248_at	2,85	3,35	6,64	4,28	wingless-type MMTV integration site family, member 7A	WNT7A
243408_at	4,62	2,41	5,74	4,26		
237729_at	5,75	3,40	3,56	4,24	CDNA FLJ43970 fis, clone TEST14017848	

Anhang

1556623_at	4,74	4,88	3,09	4,24	Clone IMAGE:6054029, mRNA	
1556496_a_at	3,94	2,93	5,79	4,22	Full length insert cDNA clone ZD79H01	
237249_at	6,37	2,78	3,49	4,21	KCNQ1 overlapping transcript 1	
1560334_at	3,81	6,34	2,48	4,21	MEGF11 protein	MEGF11
211670_x_at	4,78	5,50	2,36	4,21		
240298_at	5,32	2,65	4,66	4,21	hypothetical protein LOC147791	LOC147791
240208_at	5,78	2,28	4,51	4,19		
220487_at	2,76	3,12	6,67	4,18	syntrophin, gamma 2	SNTG2
206739_at	5,33	3,93	3,22	4,16	homeo box C5	HOXC5
1555799_at	4,05	5,04	3,39	4,16	immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 2	IRTA2
215762_at	3,49	6,03	2,90	4,14		
215106_at	3,48	3,80	5,06	4,11	hypothetical protein FLJ20619	FLJ20619
244617_at	6,52	3,12	2,70	4,11	G protein-coupled receptor 26	GPR26
215831_at	2,76	4,87	4,68	4,11		
227081_at	5,23	2,35	4,63	4,07	dynein, axonemal, light intermediate polypeptide 1	DNALI1
1561513_at	2,86	3,71	5,62	4,06	CDNA clone IMAGE:5298087, partial cds	
1555581_a_at	4,63	4,23	3,32	4,06	tumor protein p73-like	TP73L
233533_at	4,98	4,04	3,11	4,05	keratin associated protein 1-5	KRTAP1-5
1553534_at	4,61	2,40	5,13	4,04	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 10	NALP10
1556017_at	5,19	4,33	2,58	4,03	KIAA0540 protein	KIAA0540
206678_at	3,74	5,38	2,97	4,03	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha	GABRA1
244013_at	4,55	4,26	3,25	4,02		
203835_at	2,57	6,13	3,35	4,02	glycoprotein A repetitions predominant	GARP
208320_at	5,36	3,30	3,36	4,01	calcium binding protein 1 (calbrain)	CABP1
1553417_at	4,13	4,70	3,16	4,00	hypothetical protein FLJ39058	FLJ39058
1558552_s_at	3,11	4,99	3,84	3,98	hypothetical protein BC010062	LOC152078
1560881_a_at	3,06	3,70	5,11	3,96	chromosome 21 open reading frame 22	C21orf22
1566289_at	5,06	3,93	2,86	3,95	olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 4	OR2M4
1553879_a_at	4,18	2,73	4,90	3,94	hypothetical protein MGC33309	MGC33309
1566137_s_at	3,03	4,18	4,55	3,92		
226147_s_at	5,83	3,36	2,56	3,92	polymeric immunoglobulin receptor	PIGR
215141_at	4,99	3,85	2,80	3,88	chromosome 4 open reading frame 10	C4orf10
223865_at	3,29	5,36	2,93	3,86	SRY (sex determining region Y)-box 6	SOX6
206974_at	3,28	4,87	3,41	3,85	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	CXCR6
210025_s_at	2,92	5,79	2,85	3,85	caspase recruitment domain family, member 10	CARD10
241565_at	4,81	3,46	3,29	3,85		
1570345_at	5,37	3,57	2,55	3,83		
1555257_a_at	4,64	2,81	4,03	3,83	myosin IIIB	MYO3B
1552514_at	4,17	2,41	4,87	3,82	hypothetical protein MGC26816	MGC26816
1563903_x_at	2,81	3,21	5,44	3,82		
237181_at	3,00	5,54	2,90	3,81		
1567303_at	2,62	3,38	5,43	3,81		
1570328_s_at	2,93	4,81	3,63	3,79		
240056_at	2,92	4,88	3,55	3,78		
217581_at	4,37	4,74	2,21	3,77		
1570476_at	2,51	4,81	3,98	3,77		
213966_at	3,41	5,02	2,84	3,76	high-mobility group 20B	HMG20B
229221_at	3,37	4,73	3,12	3,74	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	CD44
1553952_at	4,18	3,66	3,38	3,74	zinc finger, DHHC domain containing 19	ZDHHC19
1563913_at	3,56	4,05	3,59	3,73	CDNA FLJ38952 fis, clone NT2NE2019056	
244807_at	2,81	4,55	3,80	3,72		
1555219_at	3,71	4,40	2,99	3,70	retinal G protein coupled receptor	RGR
207752_x_at	4,45	2,85	3,79	3,69	proline-rich protein BstNI subfamily 2	PRB2
1553020_at	3,25	5,18	2,66	3,69		
236024_at	4,94	3,26	2,88	3,69	glycoprotein M6A	GPM6A
220622_at	3,62	5,14	2,29	3,68	hypothetical protein FLJ23259	FLJ23259
222289_at	4,83	3,74	2,47	3,68		
207224_s_at	4,47	2,24	4,31	3,67	sialic acid binding Ig-like lectin 7	SIGLEC7
215872_at	3,09	3,09	4,76	3,65		
217162_at	4,54	3,46	2,87	3,62		
1562788_at	4,09	3,08	3,57	3,58	hypothetical protein LOC254099	LOC254099

Anhang

219906_at	4,54	4,14	2,04	3,57	hypothetical protein FLJ10213	FLJ10213
237565_at	2,17	4,20	4,33	3,57		
241116_at	4,19	3,81	2,70	3,57		
238847_at	3,97	2,97	3,66	3,54		
1553451_at	3,71	2,49	4,40	3,53	hypothetical protein FLJ35894	FLJ35894
240331_at	4,46	3,02	3,02	3,50		
220330_s_at	4,10	2,50	3,89	3,49	SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1	SAMSN1
1557498_a_at	4,45	2,78	3,25	3,49	Hypothetical LOC256283	
1565660_at	4,04	3,21	3,12	3,46	fucosyltransferase 6 (alpha (1,3)	FUT6
215996_at	3,09	2,52	4,75	3,45		
207146_at	2,82	3,38	4,16	3,45	keratin, hair, acidic, 2	KRTHA2
234636_at	3,14	3,17	4,02	3,44	CDNA: FLJ21642 fis, clone COL08374	
238815_at	4,77	2,07	3,48	3,44	leucine rich repeat transmembrane neuronal 1	LRRTM1
236137_at	4,21	3,78	2,29	3,43		
240922_at	3,09	2,86	4,32	3,42		
237830_at	3,67	4,15	2,44	3,42		
237150_at	2,50	4,72	2,95	3,39		
206773_at	2,12	3,92	4,13	3,39	lymphocyte antigen 6 complex, locus H	LY6H
214454_at	3,90	4,22	2,05	3,39	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type	ADAMTS2
243677_at	2,29	4,46	3,35	3,37		
233217_at	3,43	3,78	2,90	3,37	HSPC102 mRNA, partial cds	
1570383_at	3,27	3,65	3,15	3,36		
210084_x_at	2,29	3,99	3,79	3,36	tryptase beta 1	TPSB1
234174_at	2,06	4,47	3,52	3,35		
217417_at	3,33	4,24	2,40	3,32		
214898_x_at	3,65	3,61	2,70	3,32	mucin 3B	MUC3B
1566102_at	2,35	2,98	4,61	3,31	KIAA0998	KIAA0998
237721_s_at	4,71	2,37	2,73	3,27	ankyrin repeat and SOCS box-containing 4	ASB4
215960_at	2,27	2,67	4,85	3,26	solute carrier family 5 (low affinity glucose cotransporter), member 4	SLC5A4
1563601_at	3,14	2,72	3,85	3,24		
231635_x_at	3,42	2,28	3,94	3,21		
1556300_s_at	3,29	4,27	2,07	3,21	MRNA; cDNA DKFZp564A232	
213777_s_at	3,00	3,79	2,83	3,21	HCF-binding transcription factor Zhangfei	ZF
239120_at	3,09	2,38	4,12	3,19		
240357_at	2,40	4,44	2,69	3,18		
1558947_at	2,26	3,18	4,10	3,18		
235160_at	3,41	2,89	3,23	3,17		
235807_at	2,70	4,64	2,18	3,17		
229645_at	2,72	3,52	3,28	3,17		
1557669_at	4,41	2,52	2,57	3,17	CDNA FLJ35343 fis, clone PROST2015932	
236960_at	3,52	3,93	2,03	3,16		
228657_at	3,82	3,20	2,46	3,16		
205428_s_at	2,94	3,02	3,44	3,13	calbindin 2, 29kDa (calretinin)	CALB2
206841_at	3,53	2,00	3,87	3,13	phosphodiesterase 6H, cGMP-specific,	PDE6H
223956_at	2,27	2,68	4,38	3,11	mosaic serine protease	MSP
242951_at	3,15	3,27	2,88	3,10		
1557888_at	3,46	2,76	3,05	3,09	hypothetical protein LOC126208	LOC126208
210159_s_at	4,05	3,08	2,14	3,09	tripartite motif-containing 31	TRIM31
231499_s_at	3,51	2,03	3,71	3,08		
1566249_at	2,88	2,71	3,66	3,08		
205378_s_at	3,85	3,01	2,36	3,07	acetylcholinesterase (YT blood group)	ACHE
236188_s_at	2,71	2,15	4,30	3,05		
33197_at	3,61	3,38	2,15	3,05		
1566898_at	3,05	2,38	3,67	3,03		
1569065_s_at	2,64	4,09	2,34	3,02		
203470_s_at	3,59	2,76	2,71	3,02	pleckstrin	PLEK
1566457_at	2,84	3,10	3,09	3,01		
210585_s_at	-2,99	-1,96	-4,10	-3,02	transportin 2 (importin 3, karyopherin beta)	TNPO2
234468_at	-2,88	-2,78	-3,42	-3,02		
220826_at	-2,04	-3,19	-3,86	-3,03	chromosome 21 open reading frame 77	C21orf77
220107_s_at	-3,43	-3,72	-1,95	-3,03	chromosome 14 open reading frame 140	C14orf140
206390_x_at	-2,81	-4,32	-2,10	-3,08	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif)	PF4
242493_at	-3,70	-3,22	-2,35	-3,09	protein tyrosine phosphatase, receptor type,	PTPRD

Anhang

1562922_at	-2,07	-3,52	-3,68	-3,09	Clone IMAGE:5725893, mRNA	
206349_at	-2,64	-2,72	-3,95	-3,10	leucine-rich, glioma inactivated 1	LGI1
229652_s_at	-2,57	-4,48	-2,27	-3,11		
241657_at	-4,26	-2,74	-2,33	-3,11		
1554473_at	-3,38	-2,46	-3,51	-3,11	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein	SRGAP1
241512_at	-3,60	-2,92	-2,85	-3,12	similar to Putative protein C21orf56	MGC61633
1555273_at	-3,46	-2,31	-3,60	-3,12		
220527_at	-2,34	-2,44	-4,59	-3,12	mitochondrial ribosomal protein L20	MRPL20
1560744_at	-2,84	-3,16	-3,38	-3,12	Similar to Ras suppressor protein 1	
223869_at	-3,08	-3,77	-2,64	-3,16	sclerosteosis	SOST
205403_at	-2,56	-3,89	-3,07	-3,17	interleukin 1 receptor, type II	IL1R2
227194_at	-2,53	-4,80	-2,33	-3,22	family with sequence similarity 3, member B	FAM3B
230902_at	-3,20	-2,50	-4,11	-3,27		
219505_at	-3,79	-3,76	-2,34	-3,30	cat eye syndrome chromosome region,	CECR1
233846_at	-4,88	-2,52	-2,52	-3,31	KIAA1912 protein	KIAA1912
1569569_x_at	-2,27	-4,89	-2,84	-3,34		
232217_at	-4,70	-3,12	-2,20	-3,34	chromosome 6 open reading frame 188	C6orf188
217284_x_at	-3,87	-3,41	-2,78	-3,35	kraken-like	dJ222E13.1
1569552_at	-4,32	-3,73	-2,01	-3,35	protein tyrosine phosphatase, non-receptor	PTPN18
215349_at	-5,07	-2,53	-2,49	-3,36	CDNA FLJ10133 fis, clone HEMBA1003067	
204533_at	-2,95	-3,63	-3,67	-3,42	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10
1569712_at	-3,46	-2,32	-4,57	-3,45		
231455_at	-2,51	-5,12	-2,77	-3,47	FLJ42418 protein	FLJ42418
234521_at	-3,47	-3,61	-3,34	-3,47		
238961_s_at	-3,19	-4,86	-2,41	-3,49		
228858_at	-2,39	-2,80	-5,31	-3,50		
240558_at	-4,39	-2,83	-3,29	-3,50		
230112_at	-4,17	-4,33	-2,05	-3,51	KIAA1399 protein	KIAA1399
1568635_at	-3,91	-4,48	-2,22	-3,54		
214675_at	-2,39	-3,63	-4,59	-3,54	nucleoporin 188kDa	NUP188
240285_at	-3,49	-4,64	-2,52	-3,55	aquaporin 2 (collecting duct)	AQP2
238733_at	-4,63	-2,14	-3,96	-3,58		
1555098_a_at	-3,41	-4,63	-2,70	-3,58	calcium channel, voltage-dependent, beta 2	CACNB2
229598_at	-2,54	-3,84	-4,51	-3,63	COBL-like 1	COBLL1
47553_at	-4,65	-3,01	-3,35	-3,67	deafness, autosomal recessive 31	DFNB31
233769_at	-3,95	-3,10	-4,01	-3,69		
219438_at	-5,16	-2,60	-3,35	-3,70	hypothetical protein FLJ12650	FLJ12650
227714_s_at	-3,54	-2,83	-4,75	-3,70		
230931_at	-2,80	-5,71	-2,73	-3,75		
1559370_at	-4,53	-4,36	-2,41	-3,77	Clone IMAGE:4768796, mRNA	
243833_at	-3,41	-5,52	-2,49	-3,81		
221137_at	-3,90	-4,92	-2,65	-3,82		
225369_at	-5,33	-2,91	-3,26	-3,83	endothelial cell adhesion molecule	ESAM
1555807_a_at	-2,45	-5,70	-3,37	-3,84	myelin oligodendrocyte glycoprotein	MOG
35974_at	-3,42	-5,03	-3,15	-3,86	lymphoid-restricted membrane protein	LRMP
238791_at	-3,60	-3,99	-4,04	-3,88	zinc finger protein 100	ZNF100
1564004_at	-3,45	-5,23	-2,95	-3,88		
241363_at	-3,96	-2,73	-5,03	-3,91	hypothetical protein FLJ20433	FLJ20433
243400_x_at	-2,86	-3,84	-5,18	-3,96	lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)	LTBR
206493_at	-3,99	-5,59	-2,32	-3,96	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41B)	ITGA2B
1553183_at	-3,69	-3,23	-5,00	-3,97	uromodulin-like 1	UMODL1
233355_at	-4,63	-2,75	-4,63	-4,00	hypothetical protein LOC284739	LOC284739
205709_s_at	-2,48	-4,94	-4,64	-4,02	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidylyltransferase) 1	CDS1
1563654_at	-2,63	-5,55	-4,05	-4,08	plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa	PLEC1
1566958_at	-2,84	-4,14	-5,27	-4,08		
231187_at	-4,45	-5,11	-2,71	-4,09	solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1	SLC28A1
210486_at	-4,46	-2,38	-5,50	-4,11	ankyrin repeat and MYND domain containing 1	ANKMY1
233407_at	-5,41	-2,50	-4,49	-4,13	CDNA FLJ14088 fis, clone MAMMA1000227	
233513_at	-4,83	-4,96	-2,70	-4,16	CDNA FLJ12999 fis, clone NT2RP3000324	
213168_at	-4,29	-4,37	-3,86	-4,17	Sp3 transcription factor	SP3
210327_s_at	-2,61	-6,71	-3,38	-4,23	alanine-glyoxylate aminotransferase)	AGXT

Anhang

221446_at	-3,36	-4,88	-4,58	-4,27	a disintegrin and metalloproteinase domain	ADAM30
1569700_s_at	-3,14	-6,44	-3,31	-4,30	adenylate kinase 7	AK7
1561303_at	-3,71	-4,15	-5,15	-4,34	Clone IMAGE:4828317, mRNA	
241856_at	-3,53	-5,05	-4,66	-4,41		
220461_at	-5,16	-2,70	-5,46	-4,44	hypothetical protein FLJ11383	FLJ11383
208498_s_at	-5,75	-4,96	-2,76	-4,49	amylase, alpha 2B; pancreatic	AMY2B
243602_at	-6,66	-4,19	-2,65	-4,50		
234181_at	-4,22	-6,16	-3,23	-4,54		
211067_s_at	-5,93	-4,89	-2,84	-4,55	growth arrest-specific 7	GAS7
219820_at	-3,00	-6,61	-4,15	-4,59		
239518_at	-5,94	-4,95	-2,88	-4,59		
1568749_at	-6,13	-4,54	-3,19	-4,62		
1563656_at	-6,87	-4,30	-2,70	-4,62		
211282_x_at	-2,59	-5,80	-5,52	-4,63	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	TNFRSF25
231563_at	-5,65	-5,93	-2,33	-4,64	CDNA clone IMAGE:5297975, partial cds	
220378_at	-4,76	-5,07	-4,33	-4,72	t-complex 11 (mouse)	TCP11
1559670_at	-4,85	-6,74	-2,60	-4,73	Clone IMAGE:5163213, mRNA	
238308_at	-5,70	-2,58	-5,92	-4,73		
215668_s_at	-2,49	-4,64	-7,13	-4,75	plexin B1	PLXNB1
1566544_at	-7,29	-3,63	-3,34	-4,76	Similar to Serine/threonine protein phosphatase 5 (PP5)	
240244_at	-3,37	-3,72	-7,21	-4,76		
219883_at	-6,20	-4,27	-3,97	-4,82	potassium channel, subfamily K, member 4	KCNK4
229619_at	-4,98	-4,35	-5,47	-4,93		
206326_at	-5,03	-6,35	-3,62	-5,00	gastrin-releasing peptide	GRP
235986_at	-4,73	-7,61	-2,84	-5,06		
207139_at	-3,64	-4,66	-6,88	-5,06	ATPase, H+/K+ exchanging, alpha	ATP4A
221131_at	-8,18	-4,07	-2,99	-5,08	alpha-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase	A4GNT
229629_at	-6,83	-4,31	-4,19	-5,11		
205696_s_at	-5,69	-6,95	-3,02	-5,22	GDNF family receptor alpha 1	GFRA1
242867_x_at	-4,46	-6,35	-4,98	-5,26		
236113_at	-5,26	-7,01	-3,65	-5,31		
1564783_x_at	-5,42	-2,62	-7,93	-5,33	orofacial cleft 1 candidate 1	OFCC1
242436_at	-6,02	-5,27	-4,70	-5,33		
1555929_s_at	-8,39	-3,94	-3,66	-5,33		
203965_at	-3,54	-8,83	-3,66	-5,35	ubiquitin specific protease 20	USP20
1569727_at	-4,61	-5,97	-5,59	-5,39		
233653_at	-8,94	-3,92	-3,33	-5,40	Clone 24854 mRNA sequence	
240662_at	-9,06	-4,01	-3,26	-5,44		
221331_x_at	-3,21	-8,70	-4,69	-5,53	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	CTLA4
237130_at	-6,83	-5,83	-3,98	-5,55		
1570234_at	-6,88	-5,10	-4,87	-5,62	Hypothetical gene supported by BC029835	
244445_at	-6,73	-7,70	-2,58	-5,67		
238905_at	-8,69	-3,13	-5,54	-5,79	ras homolog gene family, member J	RHOJ
1556346_at	-4,53	-6,26	-6,62	-5,80		
1563561_at	-7,11	-6,30	-4,06	-5,83		
229880_at	-6,04	-8,24	-3,47	-5,92		
1561103_at	-6,52	-7,04	-4,21	-5,92	Clone IMAGE:5259027, mRNA	
242197_x_at	-3,44	-6,67	-7,70	-5,94	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)	CD36
240569_at	-3,92	-5,08	-9,08	-6,03		
210402_at	-3,71	-3,98	-10,62	-6,10	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	KCNJ1
1556381_at	-5,55	-4,11	-8,90	-6,19	transcriptional coactivator tubedown-100	TBDN100
240340_at	-4,41	-9,74	-4,50	-6,22	spermatogenesis associated 3	SPATA3
237013_at	-7,03	-5,34	-6,37	-6,25		
1566339_at	-6,89	-8,68	-3,84	-6,47		
240724_at	-8,45	-4,00	-7,40	-6,62		
210375_at	-6,20	-6,98	-6,73	-6,64	prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	PTGER3
241506_at	-9,74	-3,28	-7,09	-6,70		
226585_at	-9,39	-5,36	-6,01	-6,92	nei like 2 (E. coli)	NEIL2
220345_at	-8,99	-3,44	-8,38	-6,94	leucine rich repeat transmembrane neuronal 4	LRRTM4
205988_at	-8,64	-5,00	-7,18	-6,94	CD84 antigen (leukocyte antigen)	CD84
1561778_at	-9,85	-7,71	-3,98	-7,18		
220389_at	-6,29	-8,96	-6,37	-7,21	hypothetical protein FLJ23514	FLJ23514

Anhang

237530_at	-12,67	-5,70	-3,35	-7,24		
205874_at	-9,12	-8,68	-3,97	-7,26	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A	ITPKA
233654_at	-11,11	-7,64	-3,18	-7,31	hypothetical protein FLJ20265	FLJ20265
1563933_a_at	-4,18	-4,95	-12,96	-7,36	hypothetical protein FLJ40773	FLJ40773
1566437_at	-12,37	-3,89	-6,58	-7,61		
239547_at	-10,28	-7,00	-5,74	-7,67	Similar to c439A6.1 (similar to heparan sulfate (3-O-sulfotransferases)	
206433_s_at	-3,09	-12,43	-7,79	-7,77	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3	SPOCK3
1566762_at	-5,77	-14,00	-3,85	-7,87		
1560750_at	-6,38	-4,58	-12,94	-7,97	hypothetical protein LOC151121	LOC151121
238697_at	-5,76	-12,91	-5,63	-8,10		
1560097_at	-8,30	-8,96	-7,19	-8,15	KIAA1937 protein	KIAA1937
241628_at	-6,48	-6,66	-11,49	-8,21		
242118_x_at	-8,92	-10,46	-5,79	-8,39		
1558507_at	-15,11	-4,07	-6,34	-8,51	Similar to Hypothetical protein CBG13135	
211736_at	-6,85	-8,79	-9,92	-8,52	Sp2 transcription factor	SP2
1555332_at	-13,86	-7,75	-4,02	-8,54	tryptophan hydroxylase 2	TPH2
208241_at	-7,17	-3,64	-15,57	-8,80	neuregulin 1	NRG1
207580_at	-4,21	-9,14	-13,12	-8,82	melanoma antigen, family B, 4	MAGEB4
237764_at	-12,18	-7,70	-6,81	-8,90	LOC389089	
221212_x_at	-15,00	-7,70	-4,08	-8,93	polybromo 1	PB1
1559683_at	-11,65	-11,44	-3,99	-9,03	Full length insert cDNA clone YU75B05	
1564937_at	-15,15	-7,76	-4,35	-9,09	MRNA; cDNA DKFZp547G1017	
1554539_a_at	-8,54	-6,40	-12,45	-9,13	ras homolog gene family, member F (in filopodia)	RHOF
242557_at	-6,23	-6,51	-15,65	-9,46		
1552578_a_at	-18,20	-7,46	-3,91	-9,86	myosin IIIB	MYO3B
210579_s_at	-7,58	-15,90	-6,46	-9,98	tripartite motif-containing 10	TRIM10
221451_s_at	-6,19	-17,14	-6,75	-10,02	olfactory receptor, family 2, subfamily W,	OR2W1
222351_at	-10,42	-14,91	-5,62	-10,32	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	PPP2R1B
237159_x_at	-3,59	-13,64	-15,07	-10,77		
1559274_at	-12,89	-13,07	-7,02	-10,99	Hypothetical gene supported by AK098259	
1566888_at	-7,40	-15,21	-16,29	-12,97		
1553835_a_at	-27,51	-8,03	-5,42	-13,65	hypothetical protein FLJ35880	FLJ35880
1559282_at	-10,27	-10,14	-23,31	-14,57	Clone IMAGE:3934974, mRNA	
205844_at	-27,46	-4,31	-13,15	-14,97	vanin 1	VNN1
243281_at	-9,35	-24,03	-12,04	-15,14		
1567386_at	-32,90	-15,55	-6,33	-18,26		

Tabelle A2: Deregulierte Gene nach siRNA-vermitteltem Knockdown von Sp1

Angegeben sind nach induzierter siRNA-vermittelter Depletion von Sp1 gegenüber uninduzierten Zellen in drei unabhängigen Experimenten mindestens 2-fach deregulierte Gene. Sp1 selbst wurde 2,2-fach vermindert exprimiert. Hervorgehoben sind Gene, die sowohl nach Sp1- als auch nach Sp3-Depletion verändert exprimiert wurden (siehe Tabelle A1).

Affymetrix Oligonukleotid Sonde	Fache Änderung (1)	Fache Änderung (2)	Fache Änderung (3)	MW Fache Änderung	Gen Name	Gen Symbol
243422_at	12,73	7,23	14,16	11,37		
234800_at	15,78	4,79	12,04	10,87		
1556095_at	14,75	10,47	5,10	10,11	unc-13 homolog C (C. elegans)	UNC13C
1559648_at	14,52	7,43	6,63	9,53	Clone IMAGE:5198554, mRNA	
244048_x_at	7,65	12,54	5,56	8,58		
244745_at	4,15	10,96	7,28	7,47	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	RERG
201859_at	8,38	7,36	5,36	7,03	proteoglycan 1, secretory granule	PRG1
210724_at	6,13	6,31	6,34	6,26	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 3	EMR3
1558280_s_at	3,67	8,01	5,59	5,76	PTPL1-associated RhoGAP 1	PARG1

Anhang

1557052_at	3,52	6,74	6,78	5,68	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3	TAX1BP3
204446_s_at	6,85	3,68	5,88	5,47	arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5
1563531_at	6,55	2,97	4,88	4,80		
233416_at	5,34	5,21	3,68	4,74	CDNA FLJ10148 fis, clone HEMBA1003370	
234098_at	4,95	4,01	4,71	4,56	CDNA FLJ11911 fis, clone HEMBB1000141	
210119_at	3,07	5,98	3,75	4,27	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	KCNJ15
1553573_s_at	4,39	4,27	4,12	4,26	ephrin-A2	EFNA2
1552846_s_at	2,70	4,96	4,84	4,17	hypothetical protein MGC45806	MGC45806
1562786_at	5,11	3,19	3,81	4,04	Clone IMAGE:5768324, mRNA	
205270_s_at	5,06	3,39	3,24	3,90	lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein)	LCP2
244340_x_at	4,72	3,59	3,00	3,77		
236308_at	3,02	4,19	4,07	3,76	hypothetical protein LOC285878	LOC285878
1556460_a_at	3,31	3,77	4,15	3,74	CDNA FLJ35752 fis, clone TESTI2004574	
230568_x_at	3,98	4,57	2,60	3,72		
1556309_s_at	4,03	3,05	3,20	3,42	hypothetical protein FLJ31031	FLJ31031
1556903_at	3,43	4,10	2,72	3,41	CDNA FLJ37392 fis, clone BRAMY2026976	
214827_at	3,37	3,77	2,70	3,28	par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C. elegans)	PAR6B
217668_at	2,54	3,62	3,55	3,24		
243225_at	3,24	3,25	3,11	3,20	hypothetical protein LOC283481	LOC283481
233916_at	2,65	4,10	2,77	3,17	KIAA1486 protein	KIAA1486
242026_at	3,32	2,69	3,26	3,09		
207650_x_at	3,47	2,45	3,29	3,07	prostaglandin E receptor 1	PTGER1
1557639_at	3,55	2,41	2,92	2,96	CDNA FLJ35450 fis, clone SMINT2004280	
1556929_at	3,07	2,47	3,31	2,95	Full length insert cDNA Y138C04	
233169_at	3,01	2,36	3,15	2,84	zinc finger protein 350	ZNF350
236822_at	3,38	2,72	2,37	2,82		
205267_at	3,20	2,68	2,23	2,70	POU domain, class 2, associating factor 1	POU2AF1
234679_at	2,66	2,64	2,73	2,68	keratin associated protein 9-3	KRTAP9-3
233183_at	2,50	2,71	2,61	2,61	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 9	SLC4A9
222234_s_at	2,88	2,76	2,15	2,60	hypothetical protein MGC3101	MGC3101
205804_s_at	2,17	2,42	2,85	2,48	TRAF3-interacting Jun N-terminal kinase (JNK)-activating modulator	T3JAM
241485_at	2,77	2,29	2,36	2,47	myelin transcription factor 1-like	MYT1L
236628_at	2,23	2,65	2,28	2,39		
235571_at	2,08	2,17	2,51	2,25		
240753_at	2,16	2,21	2,34	2,23		
220540_at	2,38	2,20	1,98	2,19	potassium channel, subfamily K,	KCNK15
233663_s_at	-2,02	-2,06	-1,95	-2,01	cadherin-like 26	CDH26
238789_at	-1,94	-2,12	-2,11	-2,06	ankyrin repeat domain 15	ANKRD15
229368_s_at	-1,94	-2,20	-2,17	-2,11		
207322_at	-2,22	-1,94	-2,15	-2,11	intersectin 1 (SH3 domain protein)	ITSN1
1561411_at	-2,10	-1,95	-2,29	-2,11	Clone IMAGE:5583320, mRNA	
228791_at	-2,09	-2,06	-2,19	-2,11	hypothetical protein MGC61550	MGC61550
213674_x_at	-1,99	-2,05	-2,35	-2,13	immunoglobulin heavy constant mu	IGHM
223933_at	-2,05	-2,27	-2,08	-2,14	kinesin family member 5A	KIF5A
241629_at	-2,16	-2,03	-2,23	-2,14		
215078_at	-2,22	-1,97	-2,27	-2,15	superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2
214732_at	-2,03	-2,22	-2,23	-2,16	Sp1 transcription factor	SP1
242499_at	-1,99	-2,38	-2,25	-2,21	U2(RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 1	U2AF1
217330_at	-2,15	-2,24	-2,32	-2,23		
218796_at	-2,29	-2,00	-2,44	-2,25	chromosome 20 open reading frame 42	C20orf42
44673_at	-2,10	-2,25	-2,43	-2,26	sialoadhesin	SN
220213_at	-2,01	-2,28	-2,53	-2,27	chromosome 20 open reading frame 17	C20orf17
1557540_at	-2,41	-2,28	-2,13	-2,27	CDNA FLJ31833 fis	
1567181_x_at	-2,43	-2,08	-2,38	-2,30		
244036_at	-2,22	-2,61	-2,10	-2,31		
1554960_at	-2,25	-2,35	-2,41	-2,34	hypothetical protein MGC48998	MGC48998
233832_at	-2,59	-2,13	-2,31	-2,34	CDNA FLJ11762 fis	

Anhang

1554652_s_at	-2,05	-2,55	-2,53	-2,38	similar to microtubule associated testis specific serine/threonine protein kinase	LOC375449
1556874_a_at	-2,17	-2,28	-2,83	-2,43	ring finger and KH domain containing 2	RKHD2
203184_at	-2,23	-2,32	-2,75	-2,43	fibrillin 2	FBN2
228943_at	-2,33	-2,53	-2,48	-2,45	microtubule-associated protein 6	MAP6
215525_at	-2,51	-2,77	-2,12	-2,47	MRNA; cDNA DKFZp586A0423	
237091_at	-2,53	-2,21	-2,68	-2,47		
202490_at	-2,17	-2,81	-2,46	-2,48	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	IKBKAP
206624_at	-2,14	-2,77	-2,71	-2,54	ubiquitin specific protease 9, Y-linked (fat facets-like, Drosophila)	USP9Y
220793_at	-2,74	-2,31	-2,57	-2,54	sarcoma antigen 1	SAGE1
234545_at	-2,62	-2,62	-2,44	-2,56		
1555638_a_at	-2,90	-2,54	-2,31	-2,58	SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1	SAMSN1
243797_at	-2,78	-2,57	-2,45	-2,60	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	STK17B
1553494_at	-2,74	-2,62	-2,48	-2,61	L-threonine dehydrogenase	TDH
1562346_at	-2,76	-2,48	-2,61	-2,61		
244844_at	-2,60	-2,98	-2,35	-2,64		
1559926_at	-2,92	-2,57	-2,50	-2,66	Clone IMAGE:5167209, mRNA CDNA: FLJ20905 fis, clone ADSE00244	
234228_at	-2,59	-2,52	-2,96	-2,69	thrombospondin, type I, domain containing 6	THSD6
242200_at	-2,64	-3,23	-2,44	-2,77		
217115_at	-2,92	-3,01	-2,38	-2,77		
241072_s_at	-2,58	-3,17	-2,66	-2,80		
1562332_at	-3,03	-2,66	-2,73	-2,81	Clone IMAGE:5302406, mRNA	
1565836_at	-2,90	-2,70	-2,83	-2,81		
230497_at	-2,68	-2,54	-3,21	-2,81	bruno-like 5, RNA binding protein	BRUNOL5
215621_s_at	-2,78	-3,06	-2,60	-2,81	immunoglobulin heavy constant delta	IGHD
211881_x_at	-2,92	-2,39	-3,14	-2,82	immunoglobulin lambda joining 3	IGLJ3
207114_at	-3,30	-2,41	-2,76	-2,82	lymphocyte antigen 6 complex, I	LY6G6C
231100_at	-3,11	-2,86	-2,50	-2,82		
230089_s_at	-2,35	-2,83	-3,30	-2,83		
204555_s_at	-2,59	-2,80	-3,13	-2,84	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3D	PPP1R3D
242848_x_at	-3,06	-2,53	-2,96	-2,85		
216425_at	-2,98	-3,16	-2,43	-2,85		
211218_at	-3,07	-3,15	-2,40	-2,87		
216959_x_at	-3,57	-2,57	-2,48	-2,88	neuronal cell adhesion molecule	NRCAM
231441_at	-2,28	-3,01	-3,36	-2,88	hypothetical protein MGC26647	MGC26647
240278_at	-2,43	-2,71	-3,51	-2,89		
1559145_at	-2,94	-3,43	-2,48	-2,95	hypothetical protein LOC386597	LOC386597
233712_at	-3,35	-2,77	-2,73	-2,95	zinc finger protein 44 (KOX 7)	ZNF44
216629_at	-2,54	-3,00	-3,33	-2,96	serine/arginine repetitive matrix 2	SRRM2
228342_s_at	-2,92	-3,15	-2,89	-2,98	likely ortholog of mouse myocytic induction/differentiation originator	MIDORI
240483_at	-3,80	-2,83	-2,50	-3,04	Similar to zinc finger protein 39	
206475_x_at	-2,63	-3,22	-3,33	-3,06		
208208_at	-2,81	-3,20	-3,20	-3,07	myosin, heavy polypeptide 13, skeletal muscle	MYH13
1561237_at	-3,66	-2,64	-2,93	-3,07	Clone IMAGE:4837485, mRNA	
211869_at	-2,43	-3,82	-3,12	-3,12		
208468_at	-3,29	-3,64	-2,50	-3,15	SRY (sex determining region Y)-box 21	SOX21
234400_at	-2,95	-3,97	-2,56	-3,16	LOC388779	
205561_at	-2,38	-3,57	-3,78	-3,24	hypothetical protein FLJ12242	FLJ12242
242213_at	-2,78	-3,36	-3,59	-3,25		
228738_at	-3,62	-2,58	-3,56	-3,25	hypothetical protein MGC25181	MGC25181
1554022_at	-3,41	-2,43	-4,03	-3,29	hypothetical protein FLJ25467	FLJ25467
243153_at	-3,15	-3,66	-3,08	-3,30	CDK5 regulatory subunit associated protein 2	CDK5RAP2
1555717_at	-4,06	-3,42	-2,44	-3,31		
235377_at	-3,79	-2,60	-3,56	-3,32	chromosome 6 open reading frame 142	C6orf142
231029_at	-4,11	-3,09	-2,77	-3,32		
238600_at	-2,57	-3,32	-4,10	-3,33	multiple coiled-coil GABABR1-binding protein	MARLIN1
217670_at	-2,58	-3,91	-3,63	-3,37		
219935_at	-3,17	-2,67	-4,58	-3,47	a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin	ADAMTS5

Anhang

227339_at	-3,10	-3,04	-4,30	-3,48	hypothetical protein LOC285705	LOC285705
243097_x_at	-2,88	-3,55	-4,09	-3,50		
234019_at	-4,59	-2,79	-3,27	-3,55	Clone 24481 mRNA sequence	
221121_at	-4,25	-2,85	-3,59	-3,57	hypothetical protein FLJ20527	FLJ20527
1570269_at	-3,39	-4,63	-2,71	-3,58		
1559623_at	-3,40	-4,16	-3,23	-3,60	PTD012 protein	PTD012
1568804_at	-4,42	-3,45	-2,92	-3,60		
AFFX-TrpnX-3_at	-3,92	-4,03	-2,93	-3,62		
242891_at	-3,30	-4,44	-3,15	-3,63		
222378_at	-3,22	-4,33	-3,34	-3,63		
1563091_at	-4,14	-4,35	-2,60	-3,69	Clone IMAGE:4798231, mRNA	
238123_at	-3,44	-3,51	-4,16	-3,70		
1557077_a_at	-4,13	-2,74	-4,26	-3,71	CDNA FLJ42571 fis, clone BRACE3008036	
210068_s_at	-3,09	-3,07	-5,00	-3,72	aquaporin 4	AQP4
236697_at	-3,64	-4,51	-3,01	-3,72		
1558372_at	-3,61	-3,41	-4,17	-3,73	CDNA FLJ41651 fis, clone FEBRA2024727	
230647_at	-2,70	-4,73	-3,78	-3,74		
240847_at	-4,44	-2,87	-3,96	-3,76		
218369_s_at	-4,86	-2,82	-3,63	-3,77	exosome component 1	EXOSC1
244696_at	-3,28	-4,72	-3,42	-3,81		
1557873_at	-3,37	-3,07	-5,04	-3,82	CDNA FLJ30191 fis, clone BRACE2001313	
208519_x_at	-4,82	-3,58	-3,13	-3,85	gonadotropin-releasing hormone 2	GNRH2
1568743_at	-3,98	-2,74	-4,82	-3,85		
233555_s_at	-3,98	-3,52	-4,09	-3,86	sulfatase 2	SULF2
215580_at	-3,34	-4,84	-3,48	-3,89	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae) associated	MCM3AP
220336_s_at	-3,57	-5,09	-3,07	-3,91	glycoprotein VI (platelet)	GP6
1566123_at	-2,83	-4,02	-4,90	-3,92		
224179_s_at	-4,19	-3,13	-4,46	-3,93	aldehyde reductase (aldose reductase) like 6	ALDRL6
1563610_at	-3,68	-4,66	-3,55	-3,96	hypothetical protein LOC157273	LOC157273
1556725_a_at	-4,19	-2,96	-4,74	-3,96	Clone IMAGE:5246278, mRNA	
213442_x_at	-4,95	-3,11	-3,89	-3,98		
205360_at	-3,40	-4,90	-3,73	-4,01	prefoldin 4	PFDN4
229750_at	-3,36	-4,39	-4,32	-4,02	hypothetical protein LOC284336	LOC284336
234202_at	-3,80	-4,02	-4,33	-4,05		
237413_at	-3,67	-4,65	-3,86	-4,06		
243167_at	-2,98	-4,16	-5,20	-4,11	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5	ABCB5
1554719_at	-4,35	-3,19	-4,88	-4,14	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa	NDUFA10
1568686_at	-3,34	-5,66	-3,43	-4,14		
206080_at	-4,61	-3,80	-4,07	-4,16	phospholipase C-like 4	PLCL4
1552484_at	-3,36	-3,39	-5,78	-4,18	Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 8	SMCR8
1563897_at	-4,21	-5,38	-2,99	-4,19	cellular retinoic acid binding protein 1	CRABP1
233126_s_at	-3,75	-5,82	-3,03	-4,20	thioesterase domain containing 1	THEDC1
216046_at	-5,58	-3,42	-3,61	-4,21	MRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 124430	
1563985_at	-5,37	-3,79	-3,46	-4,21		
233953_at	-5,21	-4,58	-2,86	-4,22	guanylate cyclase activator 1C	GUCA1C
215970_at	-2,92	-4,34	-5,41	-4,22	MRNA; cDNA DKFZp434B2115 (from clone DKFZp434B2115)	
204929_s_at	-5,02	-2,96	-4,70	-4,23	vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)	VAMP5
1553865_a_at	-5,11	-3,54	-4,08	-4,24	hypothetical protein DKFZp761H2121	
231219_at	-5,87	-3,87	-3,02	-4,25	chemokine-like factor super family 1	CKLF5F1
203110_at	-4,73	-4,56	-3,57	-4,29	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	PTK2B
227389_x_at	-3,06	-3,81	-6,12	-4,33		
230506_at	-5,94	-3,17	-3,91	-4,34	chromosome 6 open reading frame 164	C6orf164
213559_s_at	-4,71	-3,91	-4,58	-4,40		
1565697_at	-5,58	-3,85	-3,77	-4,40		
241723_at	-5,92	-3,65	-3,67	-4,41	IQ motif containing GTPase activating protein 2	IQGAP2
219438_at	-3,95	-4,15	-5,13	-4,41	hypothetical protein FLJ12650	FLJ12650
1558708_at	-3,00	-4,22	-6,04	-4,42	neurexin 1	NRXN1

Anhang

1563113_at	-5,89	-3,09	-4,42	-4,47	retinoblastoma-associated factor 600	RBAF600
1553540_a_at	-3,97	-3,50	-5,95	-4,47	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2	SLC29A2
230908_at	-3,99	-3,64	-5,83	-4,49		
220984_s_at	-4,74	-4,40	-4,36	-4,50	solute carrier organic anion transporter family, member 5A1	SLCO5A1
216056_at	-4,54	-3,71	-5,36	-4,54	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	CD44
1558262_at	-4,00	-3,50	-6,24	-4,58	CDNA FLJ40335 fis, clone TESTI2031935	
219743_at	-3,34	-6,61	-3,81	-4,59	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	HEY2
1560920_s_at	-5,91	-2,86	-5,06	-4,61	IMAGE:729984 clone, mRNA	
234454_at	-4,72	-3,00	-6,12	-4,61		
227705_at	-2,91	-5,39	-5,66	-4,65	transcription elongation factor A (SII)-like 7	TCEAL7
1564238_a_at	-5,03	-5,95	-3,02	-4,67	hypothetical protein FLJ33620	FLJ33620
1566776_at	-3,59	-3,66	-6,84	-4,70	heat shock regulated 1	XLHSRF-1
231548_at	-4,43	-4,92	-4,79	-4,71		
229612_at	-2,95	-6,01	-5,22	-4,73		
234142_at	-3,32	-4,52	-6,37	-4,73		
240102_at	-4,83	-6,12	-3,29	-4,75	Human mRNA for T cell receptor	
237355_at	-6,61	-4,41	-3,25	-4,76		
1567376_at	-5,87	-4,69	-3,80	-4,79		
229825_at	-3,96	-6,60	-3,83	-4,80		
214873_at	-4,89	-6,12	-3,49	-4,83	hypothetical protein DKFZp434O0213	
236775_s_at	-3,98	-3,71	-6,95	-4,88		
205030_at	-5,37	-3,29	-6,03	-4,89	fatty acid binding protein 7, brain	FABP7
229093_at	-4,19	-6,54	-4,00	-4,91	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	NOS3
240061_at	-4,37	-3,95	-6,42	-4,91		
229389_at	-3,47	-6,38	-4,94	-4,93		
1555308_at	-6,18	-3,52	-5,20	-4,97	caspase recruitment domain family, TAF6-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor	CARD14
222053_at	-4,54	-5,08	-5,44	-5,02		TAF6L
237354_at	-5,26	-6,47	-3,37	-5,04	KIAA0251 protein	KIAA0251
217654_at	-6,18	-5,11	-3,85	-5,05		
1552742_at	-6,95	-4,64	-3,61	-5,06	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 8	KCNH8
233902_at	-6,08	-4,37	-4,83	-5,09		
1560279_a_at	-6,26	-4,73	-4,34	-5,11	hypothetical protein LOC221122	LOC221122
205589_at	-3,14	-5,62	-6,58	-5,12	myosin, light polypeptide 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	MYL3
1561432_at	-6,52	-5,68	-3,16	-5,12	Clone IMAGE:4830514, mRNA	
202036_s_at	-3,39	-5,25	-6,84	-5,16	secreted frizzled-related protein 1	SFRP1
241062_at	-5,19	-3,23	-7,07	-5,16		
243547_at	-6,16	-3,61	-5,91	-5,22	hypothetical protein FLJ39639	FLJ39639
215360_at	-6,42	-4,09	-5,30	-5,27	CDNA FLJ12001 fis, clone HEMBB1001535	
220448_at	-3,30	-5,65	-6,86	-5,27	potassium channel, subfamily K, member 12	KCNK12
233452_at	-4,05	-3,98	-7,80	-5,28	HSPC088 mRNA, partial cds	
1555003_at	-3,24	-5,90	-6,89	-5,34	retinoblastoma-like 1 (p107)	RBL1
1564178_at	-7,75	-3,93	-4,40	-5,36	hypothetical protein LOC283033	LOC283033
209619_at	-6,60	-4,54	-4,96	-5,37	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex)	CD74
213870_at	-3,48	-5,43	-7,21	-5,37		
238184_at	-7,63	-4,51	-4,07	-5,40		
208506_at	-4,73	-6,84	-4,73	-5,44	histone 1, H3h	HIST1H3H
215408_at	-6,92	-5,87	-3,58	-5,45	CDNA: FLJ21419 fis, clone COL04084	
222542_x_at	-6,69	-4,10	-5,61	-5,47	chaperone, ABC1 activity of bc1 complex like (S. pombe)	CABC1
221084_at	-3,52	-7,09	-5,90	-5,50	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3B	HTR3B
1555567_s_at	-3,52	-7,17	-5,93	-5,54	leiomodulin 3 (fetal)	LMOD3
1556224_a_at	-4,78	-3,71	-8,14	-5,54	hypothetical protein LOC155060	LOC155060
229808_at	-8,52	-4,58	-3,58	-5,56		
243269_s_at	-3,28	-5,75	-7,67	-5,57		
213640_s_at	-3,21	-6,12	-7,50	-5,61	lysyl oxidase	LOX
204445_s_at	-8,40	-4,45	-4,00	-5,61	arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5
1566152_a_at	-6,04	-6,71	-4,13	-5,63	CDNA FLJ39016 fis, clone NT2RP7001532	

Anhang

223885_at	-3,48	-6,24	-7,18	-5,63	calneuron 1	CALN1
211499_s_at	-4,95	-5,32	-6,68	-5,65	mitogen-activated protein kinase 11	MAPK11
1561849_at	-7,90	-3,64	-5,45	-5,67	polycystic kidney disease 1-like 2	PKD1L2
208251_at	-4,74	-3,79	-8,54	-5,69	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 4	KCNC4
1559911_at	-6,32	-5,81	-4,96	-5,69		
241101_at	-7,00	-5,83	-4,35	-5,73		
1563003_at	-3,89	-6,02	-7,38	-5,77	integrin, alpha X (antigen CD11C (p150), alpha polypeptide)	ITGAX
237688_at	-3,67	-8,81	-4,86	-5,78		
232290_at	-3,50	-5,44	-8,65	-5,86	CDNA: FLJ20869 fis, clone ADKA02377	
226900_at	-7,57	-4,72	-5,36	-5,88	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2, 47kDa	GABPB2
1557343_at	-4,63	-4,39	-8,65	-5,89	dual specificity phosphatase 16	DUSP16
239420_at	-4,23	-5,82	-7,67	-5,91	CDNA FLJ31249 fis, clone KIDNE2005327	
241511_at	-7,08	-4,95	-5,92	-5,98		
244445_at	-6,83	-7,46	-3,69	-5,99		
236323_at	-4,39	-5,44	-8,16	-6,00		
226471_at	-6,42	-7,15	-4,86	-6,14	gamma-glutamyltransferase-like 3	GGTL3
1558976_x_at	-7,32	-3,60	-7,59	-6,17	LOC124402	LOC124402
207441_at	-3,58	-6,64	-8,31	-6,17	proline rich 3	PROL3
1561060_at	-5,92	-3,70	-8,97	-6,20	Clone IMAGE:5298862, mRNA	
215211_at	-4,92	-9,33	-4,59	-6,28	Clone 23832 mRNA sequence	
1567241_at	-9,21	-5,28	-4,38	-6,29		
220502_s_at	-3,41	-9,12	-6,42	-6,32	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 1	SLC13A1
237312_at	-4,75	-9,41	-4,80	-6,32		
1556233_s_at	-8,73	-4,75	-5,50	-6,33	chromosome 6 open reading frame 102	C6orf102
221386_at	-3,85	-6,48	-8,69	-6,34	olfactory receptor, family 3, subfamily A, member 2	OR3A2
221414_s_at	-4,94	-8,97	-5,17	-6,36	defensin, beta 126	DEFB126
233585_at	-8,17	-5,19	-5,74	-6,37	sidekick homolog 2 (chicken)	SDK2
215003_at	-4,45	-7,45	-7,41	-6,44	DiGeorge syndrome critical region gene	DGCR9
216414_at	-8,10	-6,37	-4,87	-6,45		
243103_at	-6,88	-5,49	-7,17	-6,51		
243716_at	-5,46	-7,70	-6,38	-6,52		
213544_at	-5,61	-5,55	-8,52	-6,56		
206835_at	-4,38	-6,27	-9,04	-6,56	KIAA0097 gene product	ch-TOG
203400_s_at	-6,80	-6,45	-6,55	-6,60	transferrin	TF
1557702_at	-6,45	-5,38	-8,00	-6,61	Clone IMAGE:5265308, mRNA	
206340_at	-5,60	-10,22	-4,05	-6,63	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	NR1H4
234256_at	-5,25	-4,50	-10,21	-6,66		
206986_at	-9,11	-5,59	-5,41	-6,70		
242496_at	-8,93	-6,21	-4,99	-6,71	CDNA FLJ23728 fis, clone HEP14243	
208017_s_at	-8,52	-8,12	-3,55	-6,73	MCF.2 cell line derived transforming	MCF2
241482_at	-4,30	-8,06	-7,96	-6,77		
221416_at	-4,43	-5,86	-10,30	-6,86	phospholipase A2, group IIF	PLA2G2F
210507_s_at	-9,16	-6,85	-4,62	-6,88	advillin	AVIL
205834_s_at	-6,34	-5,84	-8,64	-6,94	prostate androgen-regulated transcript	PART1
209235_at	-4,12	-7,40	-9,50	-7,01	chloride channel 7	CLCN7
1565809_x_at	-8,60	-4,05	-8,37	-7,01	LOC400729	
1559062_at	-4,62	-9,18	-7,40	-7,07	Clone IMAGE:5730164, mRNA	
1556378_a_at	-6,40	-4,52	-10,38	-7,10	CDNA FLJ45355 fis, clone BRHIP3012736	
239326_at	-5,12	-5,66	-10,55	-7,11		
234820_at	-10,10	-7,65	-3,62	-7,12	MAS1 oncogene-like	MAS1L
206404_at	-9,73	-3,83	-7,91	-7,16	fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	FGF9
228790_at	-9,35	-6,53	-5,76	-7,21	hypothetical protein MGC39325	MGC39325
240192_at	-3,85	-7,17	-10,70	-7,24	FLJ45983 protein	FLJ45983
219647_at	-9,57	-4,13	-8,07	-7,26	popeye domain containing 2	POPDC2
1552389_at	-7,73	-4,92	-9,15	-7,27	hypothetical protein FLJ39553	FLJ39553
240002_at	-5,80	-5,07	-11,12	-7,33	hypothetical protein LOC286031	LOC286031
1566889_at	-9,51	-3,89	-8,65	-7,35	thyroid adenoma associated	THADA
1555421_at	-4,51	-5,93	-11,67	-7,37	adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit	AP1S3

Anhang

244322_at	-7,67	-5,05	-9,44	-7,39	Hypothetical protein FLJ43663	
211396_at	-6,96	-8,40	-6,94	-7,43	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor for (CD32)	FCGR2B
229753_at	-11,48	-3,94	-7,26	-7,56		
232985_s_at	-6,70	-8,33	-7,94	-7,66	developmental pluripotency associated	DPPA4
205225_at	-12,02	-5,17	-5,83	-7,67	estrogen receptor 1	ESR1
1552842_at	-6,86	-9,24	-7,26	-7,79	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3	HS6ST3
240820_at	-5,17	-8,06	-10,14	-7,79		
230601_s_at	-12,23	-5,11	-6,04	-7,79	hypothetical gene MGC16309	MGC16309
1560990_a_at	-5,07	-6,53	-11,92	-7,84	Full length insert cDNA clone YY93H10	
1561536_at	-6,27	-5,52	-11,90	-7,90	hypothetical protein LOC283435	LOC283435
1554214_at	-6,47	-12,02	-5,39	-7,96		
207815_at	-11,46	-7,98	-4,59	-8,01	platelet factor 4 variant 1	PF4V1
240989_at	-7,24	-7,36	-9,82	-8,14		
236183_at	-6,82	-4,86	-12,85	-8,18	dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide	DNCH1
1557060_at	-11,47	-5,78	-7,30	-8,18	hypothetical protein LOC148756	LOC148756
239849_at	-7,43	-9,06	-8,29	-8,26		
220907_at	-7,38	-13,06	-4,36	-8,27	hypothetical protein FLJ22684	FLJ22684
1559843_s_at	-7,33	-4,29	-13,39	-8,34		
207110_at	-3,93	-9,69	-11,40	-8,34	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	KCNJ12
211300_s_at	-11,76	-8,40	-5,06	-8,41	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	TP53
233059_at	-8,33	-6,30	-10,74	-8,45	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	KCNJ3
1570432_at	-6,92	-10,99	-7,47	-8,46		
217583_at	-12,65	-5,47	-7,29	-8,47	phenylalanine hydroxylase	PAH
211242_x_at	-13,31	-5,04	-7,15	-8,50	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4	KIR2DL4
205727_at	-13,05	-6,85	-5,70	-8,54	telomerase-associated protein 1	TEP1
215830_at	-13,67	-7,72	-4,23	-8,54		
233643_at	-5,15	-10,54	-10,29	-8,66	hypothetical protein FLJ10408	FLJ10408
211188_at	-9,16	-6,32	-11,02	-8,83	CD84 antigen (leukocyte antigen)	CD84
204570_at	-8,81	-7,35	-10,33	-8,83	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1 (muscle)	COX7A1
211903_s_at	-15,43	-6,06	-5,27	-8,92	myeloproliferative leukemia virus oncogene	MPL
240951_at	-12,76	-10,07	-4,03	-8,95	CDNA FLJ31407 fis, clone NT2NE2000137	
241188_at	-6,30	-14,48	-6,21	-9,00		
235512_at	-10,16	-5,64	-11,69	-9,16	cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)	CDKL1
223563_at	-15,52	-5,72	-6,65	-9,30	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1-like	GNB1L
1569942_at	-6,21	-7,77	-13,98	-9,32	Clone IMAGE:4796388, mRNA	
237982_at	-15,06	-5,38	-7,88	-9,44	Hypothetical LOC151363	
1563943_at	-6,75	-10,72	-11,17	-9,55	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1, beta	PPARGC1B
236686_at	-9,91	-6,64	-12,83	-9,80	mevalonate kinase (mevalonic aciduria)	MVK
237581_at	-11,97	-4,23	-13,23	-9,81		
1560621_at	-13,46	-9,79	-6,33	-9,86	Full length insert cDNA clone YB66H06	
1553645_at	-16,37	-4,68	-8,70	-9,92	hypothetical protein FLJ39502	FLJ39502
206251_s_at	-6,26	-6,51	-17,03	-9,93	arginine vasopressin receptor 1A	AVPR1A
234872_at	-10,15	-13,93	-6,67	-10,25		
216478_at	-12,12	-5,29	-13,96	-10,46		
241142_at	-11,19	-10,34	-10,43	-10,65		
207433_at	-7,30	-18,57	-7,02	-10,96	interleukin 10	IL10
205471_s_at	-10,96	-15,12	-7,30	-11,13	dachshund homolog 1 (Drosophila)	DACH1
238091_at	-7,83	-5,84	-19,75	-11,14	Clone IMAGE:4817555, mRNA	
230010_at	-11,40	-4,99	-17,12	-11,17	KIAA1853 protein	KIAA1853
1555221_at	-8,34	-13,21	-12,35	-11,30	CDNA clone MGC:25008 l	
232799_at	-7,57	-7,59	-19,05	-11,40	Hypothetical protein LOC285173	
244147_at	-10,53	-15,36	-8,49	-11,46		
1555011_at	-20,27	-5,67	-8,65	-11,53	zinc finger, FYVE domain containing 16	ZFYVE16
236230_at	-7,48	-12,00	-15,85	-11,78		
1561368_at	-13,11	-15,86	-6,56	-11,85	Clone IMAGE:5194369, mRNA	
214599_at	-12,37	-7,89	-15,30	-11,86	involucrin	IVL
1561154_at	-4,72	-14,66	-16,44	-11,94	Full length insert cDNA YU78B07	
220279_at	-10,38	-5,19	-20,40	-11,99	tripartite motif-containing 17	TRIM17

Anhang

210159_s_at	-7,84	-18,71	-10,01	-12,19	tripartite motif-containing 31	TRIM31
1561450_at	-19,65	-8,91	-8,16	-12,24		
237389_at	-5,46	-15,67	-15,75	-12,30	HC6 (HC6) mRNA, complete cds	
1553183_at	-20,62	-7,20	-9,16	-12,33	uromodulin-like 1	UMODL1
224362_at	-18,94	-9,89	-8,25	-12,36		
224491_at	-16,54	-11,75	-9,04	-12,44	apolipoprotein L, 4 /// apolipoprotein L,	APOL4
238537_at	-10,98	-17,29	-10,23	-12,83		
240776_at	-6,80	-9,56	-22,15	-12,84		
220317_at	-10,52	-19,96	-8,60	-13,03	lecithin retinol acyltransferase)	LRAT
216020_at	-16,67	-17,91	-5,14	-13,24	MRNA; cDNA DKFZp586D0522	
241139_at	-15,95	-19,74	-4,76	-13,48		
216089_at	-24,67	-8,80	-7,24	-13,57	multiple coagulation factor deficiency 2	MCFD2
215929_at	-18,84	-13,41	-8,47	-13,57	hypothetical protein LOC283079	LOC283079
1566995_at	-7,66	-24,99	-8,50	-13,72	Clone GCRG114 mRNA sequence	
233463_at	-23,05	-11,07	-7,15	-13,76	Ras association (RalGDS/AF-6) domain	RASSF6
243240_at	-19,44	-6,50	-16,05	-14,00		
1559790_at	-24,30	-8,53	-10,34	-14,39	Clone IMAGE:5201079, mRNA	
210472_at	-6,80	-9,64	-26,99	-14,48	metallothionein 1G	MT1G
242285_at	-26,64	-9,23	-8,15	-14,67		
1554862_at	-25,23	-13,89	-5,52	-14,88	cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase)	CMAH
207453_s_at	-7,31	-9,28	-29,42	-15,34	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B,	DNAJB5
1557014_a_at	-21,48	-17,34	-7,21	-15,34	chromosome 9 open reading frame 122	C9orf122
222304_x_at	-5,33	-26,27	-15,91	-15,84	CDNA clone IMAGE:5590288,	
214609_at	-6,99	-12,21	-29,46	-16,22	paired-like (aristaless) homeobox 2a	PHOX2A
1554384_at	-12,98	-12,78	-28,59	-18,11	peptidyl arginine deiminase, type II	PADI2
230964_at	-10,29	-36,20	-7,94	-18,15	hypothetical protein DKFZp686J0811	DKFZp686J08
1558185_at	-27,43	-9,97	-18,97	-18,79	CDNA FLJ41906 fis, clone PEBLM2006135	
217621_at	-27,91	-20,94	-7,71	-18,85		
1567251_at	-9,97	-9,26	-37,77	-19,00	olfactory receptor, family 10, subfamily A, member 3	OR10A3
1568840_at	-5,94	-26,57	-25,59	-19,37	DKFZP564O0463 protein	
1559278_at	-10,31	-15,55	-39,57	-21,81		
1569191_at	-8,54	-34,42	-23,07	-22,01		
1559812_at	-11,12	-33,10	-28,89	-24,37	CDNA clone IMAGE:5277868	
237168_at	-27,76	-20,40	-27,66	-25,27		
210147_at	-9,68	-22,07	-47,38	-26,38		
208193_at	-22,25	-25,20	-40,31	-29,26	interleukin 9	IL9
1553851_at	-10,26	-40,51	-38,16	-29,64	Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	SPIC
233670_at	-11,71	-15,13	-62,79	-29,88	Clone IMAGE:123704, mRNA sequence	
1556392_a_at	-28,98	-14,87	-51,48	-31,78	CDNA clone IMAGE:5285271, partial cds	
1555034_at	-20,32	-10,53	-89,19	-40,01	Usher syndrome 3A	USH3A

Tabelle A3: Deregulierte Gene nach gleichzeitigen Knockdown von Sp3 und Sp1
 Angegeben sind nach induzierter siRNA-vermittelter Depletion von Sp3 und Sp1 gegenüber uninduzierten Zellen in drei unabhängigen Experimenten mindestens 4-fach deregulierte Gene.

Oligonukleotid Sonde	Fache Änderung (1)	Fache Änderung (2)	Fache Änderung (3)	MW Fache Änderung	Gen Name	Gen Symbol
1559274_at	66,94	20,95	10,37	32,75	Hypothetical gene supported by AK098259	
233040_at	14,84	67,24	9,53	30,54	pleckstrin homology domain containing, family A member 5	PLEKHA5
242101_at	48,26	12,05	22,92	27,74		
215514_at	8,64	47,73	25,97	27,45	MRNA; cDNA DKFZp564M0616	
211811_s_at	34,35	34,59	8,78	25,91	protocadherin alpha 6	PCDHA6
233886_at	19,11	28,63	20,51	22,75	MRNA; cDNA DKFZp564F172	
1563858_at	26,37	18,27	12,40	19,02		

Anhang

205837_s_at	18,30	29,85	7,46	18,53	glycophorin A	GYPA
1552466_x_at	8,83	7,29	37,18	17,77	chromosome 21 open reading frame	C21orf100
231981_at	24,83	19,41	6,19	16,81	prolactin receptor	PRLR
1554196_at	9,80	26,60	13,23	16,54	hypothetical protein MGC34799	MGC34799
1564276_at	14,05	17,38	17,93	16,45	Hypothetical gene supported by AK096941; AK128882	
1555103_s_at	8,47	21,61	18,81	16,29	fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)	FGF7
207107_at	26,53	13,38	8,53	16,15	retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa	RPE65
239116_at	24,00	5,48	17,48	15,66		
240726_at	14,89	8,16	23,04	15,36		
240259_at	6,82	23,00	12,59	14,14	LOC388003	
207496_at	8,49	28,18	5,41	14,03	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2	MS4A2
222953_at	18,20	10,32	8,81	12,44	G protein-coupled receptor 83	GPR83
243811_at	12,89	12,29	10,96	12,05		
1568848_at	3,96	15,80	16,32	12,03	Hypothetical gene	
220313_at	4,21	19,93	11,60	11,91	G-protein coupled receptor 88	GPR88
241052_at	17,62	12,73	4,70	11,68		
232850_at	22,08	5,43	6,90	11,47	CDNA FLJ12220 fis, clone MAMMA1001082	
1564413_at	14,06	7,23	13,09	11,46	FLJ36116 protein	FLJ36116
244806_at	12,62	15,21	6,34	11,39		
235578_at	17,25	4,74	12,16	11,38		
240753_at	13,05	12,01	9,07	11,38		
234237_s_at	5,05	19,71	8,85	11,20	hypothetical protein FLJ20294	FLJ20294
233202_at	11,80	6,05	15,51	11,12	contactin associated protein-like 3	CNTNAP3
207363_at	14,52	10,98	7,68	11,06	retinoschisis (X-linked, juvenile) 1	RS1
207849_at	9,48	9,18	14,43	11,03	interleukin 2	IL2
230334_at	4,91	11,88	16,04	10,94		
1569927_at	11,92	16,76	3,82	10,83		
1558449_at	4,99	11,95	14,89	10,61	Clone IMAGE:4723759, mRNA	
243522_at	7,27	14,47	9,95	10,56		
1556263_s_at	5,74	11,39	14,21	10,45	CDNA FLJ25418 fis, clone TST03512	
217568_at	6,69	17,36	6,43	10,16	family with sequence similarity 12,	FAM12A
231410_at	13,05	9,74	7,60	10,13		
232711_at	10,43	12,69	6,72	9,94	CDNA FLJ11880 fis, clone HEMBA1007129	
236843_at	12,81	12,50	4,05	9,78		
206336_at	8,70	14,54	6,02	9,75	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CXCL6
1566861_at	6,10	9,34	13,75	9,73		
239095_at	7,19	15,48	6,35	9,68	MRNA; cDNA DKFZp686G08203 (
1565698_at	6,23	5,36	17,42	9,67		
1561738_at	17,13	4,98	6,77	9,63		
1555929_s_at	10,95	9,96	7,94	9,62		
226061_s_at	10,00	10,89	7,89	9,59		
220884_at	15,88	4,78	7,83	9,50		
1560697_at	9,32	12,38	6,63	9,44	hypothetical protein LOC283392	LOC283392
1564356_at	14,00	7,82	6,17	9,33	zinc finger protein 568	ZNF568
243952_at	9,38	13,73	4,77	9,29		
244540_at	9,65	10,89	7,11	9,21		
234773_x_at	15,94	6,46	4,59	9,00		
240489_at	5,80	14,77	6,39	8,98		
237949_at	8,17	13,69	5,05	8,97		
1562017_at	6,68	11,20	8,99	8,96		
210423_s_at	4,96	11,86	9,44	8,75	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters),	SLC11A1
1569819_at	8,75	13,98	3,50	8,74	CDNA FLJ25418 fis, clone TST03512	
202411_at	12,38	8,84	4,84	8,69	interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27
1560019_at	5,46	10,23	10,33	8,67	CDNA FLJ33783 fis, clone	
1552736_a_at	7,41	4,19	13,36	8,32	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 1	NETO1
1566202_at	3,51	10,78	10,03	8,10	Clone HQ0657 PRO0657 mRNA	
1556895_a_at	13,49	6,75	3,88	8,04	hypothetical protein FLJ12442	FLJ12442
1561140_at	14,51	5,13	4,42	8,02	Full length insert cDNA clone ZD93E02	
240814_at	4,38	14,82	4,74	7,98	Hypothetical gene	
205151_s_at	4,77	12,58	6,58	7,97	KIAA0644 gene product	KIAA0644
237385_at	5,85	12,29	5,41	7,85		
1565621_at	4,11	4,92	14,24	7,76		

Anhang

1566805_at	13,24	5,60	4,28	7,71		
1562629_a_at	12,07	4,70	5,70	7,49	type I hair keratin KA36	KA36
236979_at	7,37	4,13	10,94	7,48		
1557646_at	3,32	11,42	7,20	7,31	LOC400125	
240937_at	8,88	4,10	8,83	7,27		
239621_at	10,43	4,37	7,00	7,27		
240762_at	11,01	3,96	6,78	7,25		
244422_at	4,38	12,39	4,97	7,24		
233542_at	12,70	3,63	5,29	7,21		
1569730_at	5,37	4,86	11,30	7,18	hypothetical protein FLJ40243	FLJ40243
1562358_at	4,89	7,23	9,33	7,15		
221697_at	8,78	4,27	8,36	7,14		
223874_at	9,53	5,10	6,65	7,09	Similar to actin-related protein Arp11	
243680_at	9,50	3,41	8,29	7,07		
220062_s_at	6,23	11,01	3,93	7,06	melanoma antigen, family C, 2	MAGEC2
213131_at	3,64	9,56	7,78	6,99	olfactomedin 1	OLFM1
229919_at	4,88	9,32	6,53	6,91	hypothetical protein FLJ11383	FLJ11383
244463_at	9,69	4,23	6,61	6,84	a disintegrin and metalloproteinase	ADAM23
1559355_at	9,31	6,89	4,30	6,83	neurexophilin 2	NXP2
232684_at	5,44	10,83	4,18	6,81		
237251_at	3,74	9,79	6,60	6,71	hypothetical protein FLJ32884	FLJ32884
205769_at	5,70	8,36	5,87	6,64	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	SLC27A2
240060_at	6,53	9,32	3,76	6,53	diacylglycerol kinase, theta 110kDa	DGKQ
1563208_s_at	5,07	8,32	5,90	6,43	CDNA FLJ32900 fis, clone TEST12005492	
228167_at	6,54	5,48	7,22	6,41	kelch-like 6 (Drosophila)	KLHL6
242057_at	5,76	5,15	8,23	6,38		
236608_at	7,83	6,08	5,16	6,36	G protein-coupled receptor 113	GPR113
1566664_at	6,95	7,53	4,59	6,35		
237602_at	4,82	6,29	7,90	6,34		
220517_at	3,87	9,41	5,51	6,27	vacuolar protein sorting 13C (yeast)	VPS13C
1561479_at	5,90	3,53	9,36	6,26	CDNA FLJ34650 fis, clone KIDNE2017956	
229185_at	3,97	10,41	4,34	6,24		
222963_s_at	3,34	6,48	8,86	6,23	interleukin 1 receptor accessory protein-sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3	IL1RAPL1
1554418_s_at	7,05	4,31	7,15	6,17		SPOCK3
1557427_at	8,94	6,69	2,88	6,17	CDNA FLJ39803 fis, clone SPLEN2007794	
222178_s_at	8,45	4,47	5,57	6,17		
1553425_at	4,19	6,48	7,83	6,17	hypothetical protein FLJ32000	FLJ32000
227209_at	3,07	7,89	7,32	6,09	contactin 1	CNTN1
232187_at	7,80	2,79	7,63	6,07	palmdelphin	PALMD
1555711_x_at	6,43	6,00	5,50	5,98	immunoglobulin heavy constant alpha 2	
1552394_a_at	8,47	3,75	5,62	5,95	hypothetical protein FLJ25421	FLJ25421
1554675_a_at	6,36	4,33	7,13	5,94	chromosome 10 open reading frame 94	C10orf94
208383_s_at	5,92	4,40	7,46	5,93	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	PCK1
1561590_a_at	4,26	7,59	5,89	5,92	BC038740 mRNA	BC038740
1558448_a_at	7,33	6,15	4,23	5,90	Clone IMAGE:5215251, mRNA	
243897_at	2,93	6,71	8,05	5,90		
211204_at	6,59	2,99	8,02	5,87	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent,	ME1
1556648_a_at	2,89	7,80	6,85	5,85	chromosome 10 open reading frame 40	C10orf40
1564705_at	3,20	6,28	8,04	5,84	mitochondrial glutaminase pseudogene	GA
231397_at	3,95	6,12	7,30	5,79	hypothetical protein LOC163404	LOC163404
228317_at	6,48	3,45	7,34	5,76		
1559728_at	5,08	6,47	5,57	5,71	KIAA0478 gene product	KIAA0478
239097_at	5,96	6,22	4,92	5,70		
1554382_at	5,86	8,18	2,92	5,65	hypothetical protein LOC200261	LOC200261
1566537_at	5,31	6,56	5,05	5,64		
208090_s_at	6,39	3,56	6,97	5,64	autoimmune regulator	AIRE
233269_at	6,73	6,84	3,25	5,61	peroxisome biogenesis factor 26	PEX26
1560940_at	4,91	4,96	6,92	5,60	CDNA FLJ32834 fis, clone TEST12003236	
226187_at	5,46	7,06	4,23	5,59	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 1	CDS1
202517_at	7,03	5,20	4,51	5,58	collapsin response mediator protein 1	CRMP1
205544_s_at	2,92	8,52	5,18	5,54	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2	CR2
223549_s_at	5,28	8,19	3,11	5,53	espin	ESPN
230385_at	3,73	6,21	6,56	5,50	hypothetical protein LOC153277	LOC153277

Anhang

239293_at	6,15	7,62	2,73	5,50	vesicular membrane protein p24	VMP
206596_s_at	4,63	7,72	4,06	5,47	neural retina leucine zipper	NRL
209722_s_at	4,61	8,25	3,51	5,46	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	SERPINB9
240704_at	4,53	2,89	8,63	5,35		
1568574_x_at	5,47	6,48	3,97	5,31	secreted phosphoprotein 1 (SPP1
236190_at	6,04	5,89	3,97	5,30		
238362_at	6,43	3,04	6,31	5,26		
1558493_at	4,69	4,26	6,79	5,25	cystatin pseudogene	
232585_at	5,98	4,36	5,39	5,24	tousled-like kinase 2	TLK2
1570516_s_at	3,02	5,22	7,42	5,22		
239606_at	3,11	8,38	4,18	5,22	CDNA FLJ25345 fis, clone TST01118	
243823_at	6,80	4,94	3,91	5,22		
1557807_a_at	3,16	5,91	6,36	5,14	Full length insert cDNA clone ZB77E08	
1562990_at	8,22	3,98	3,15	5,12		
1559131_a_at	6,27	6,31	2,77	5,12	Clone IMAGE:5189615, mRNA	
232926_x_at	6,38	3,37	5,60	5,12	ankyrin repeat domain 19	ANKRD19
236412_at	2,52	6,36	6,40	5,10		
243173_at	5,58	6,56	3,13	5,09	calcium binding protein 7	CABP7
1561538_at	4,55	5,43	5,26	5,08	Clone IMAGE:5271875, mRNA	
211642_at	7,69	3,46	4,09	5,08	Clone RA702-G3-25.fa immunoglobulin heavy chain mRNA, partial cds	
239310_at	3,77	4,04	7,35	5,06		
222961_at	7,97	4,34	2,83	5,04	tumor differentially expressed 2-like	TDE2L
1558960_a_at	7,91	4,45	2,76	5,04	milk fat globule-EGF factor 8 protein	MFGE8
235481_at	3,60	7,77	3,74	5,03		
215803_at	3,78	4,41	6,78	4,99	hypothetical protein FLJ10178	FLJ10178
230349_at	6,60	4,92	3,43	4,98		
211393_at	2,77	5,50	6,61	4,96	zinc finger protein 278	ZNF278
206424_at	4,73	7,40	2,74	4,96	cytochrome P450, family 26, subfamily	CYP26A1
204122_at	2,65	6,68	5,51	4,95	TYRO tyrosine kinase binding protein	TYROBP
242375_x_at	2,61	6,48	5,75	4,95		
222965_at	7,15	3,40	4,27	4,94		
1554541_a_at	7,53	3,73	3,56	4,94	KIAA0514	KIAA0514
229477_at	6,45	2,73	5,62	4,93	thyroid hormone responsive	THRSP
235403_at	3,28	4,78	6,72	4,93		
221336_at	5,04	2,64	7,07	4,92	atonal homolog 1 (Drosophila)	ATOH1
237717_x_at	6,63	3,60	4,48	4,91		
205713_s_at	4,29	4,92	5,46	4,89	cartilage oligomeric matrix protein	COMP
1560117_at	3,73	5,49	5,42	4,88	abhydrolase domain containing 1	ABHD1
1561035_at	5,10	2,96	6,52	4,86	Clone IMAGE:4822975, mRNA	
220300_at	6,36	5,70	2,49	4,85	regulator of G-protein signalling 3	RGS3
210893_at	4,97	4,72	4,65	4,78		
1566099_at	4,63	6,88	2,83	4,78		
233026_s_at	6,02	3,13	5,17	4,78	PDZ domain containing 3	PDZK3
211726_s_at	6,63	2,66	4,91	4,73	flavin containing monooxygenase 2	FMO2
224306_at	5,46	3,88	4,83	4,72	NPC1 like 1	NPC1L1
241475_at	4,62	4,20	5,33	4,72	Similar to hypothetical protein	
210535_at	4,61	3,44	6,08	4,71	B9 protein	EPPB9
239012_at	6,37	3,77	4,00	4,71		
221416_at	4,82	6,67	2,63	4,71	phospholipase A2, group IIF	PLA2G2F
235549_at	3,45	6,37	4,20	4,67	IBR domain containing 2	IBRDC2
235575_at	4,24	6,00	3,73	4,66	programmed cell death 6	PDCD6
238354_x_at	7,19	2,79	3,95	4,64		
223149_s_at	6,37	3,54	3,89	4,60	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 23	PTPN23
239249_at	4,47	3,13	6,13	4,58		
244799_s_at	4,69	4,64	4,32	4,55		
211832_s_at	4,18	2,69	6,74	4,54		
243214_at	6,70	3,98	2,90	4,53		
235832_at	6,42	4,34	2,73	4,50		
213219_at	3,88	2,83	6,71	4,47	adenylate cyclase 2 (brain)	ADCY2
1570284_x_at	5,89	3,00	4,52	4,47		
224293_at	5,22	5,64	2,53	4,47	testis-specific transcript, Y-linked 10	TTY10
1561290_at	6,02	3,63	3,73	4,46	hypothetical protein LOC339622	LOC339622
236148_at	4,35	2,88	6,14	4,46	CDNA clone IMAGE:6166085	

Anhang

243767_at	4,98	5,25	3,13	4,45		
213840_s_at	4,78	6,07	2,50	4,45		
237576_x_at	4,23	5,03	4,09	4,45	hypothetical protein LOC284116 /// keratin pseudogene	
234658_at	3,00	3,50	6,81	4,44		
232593_at	5,20	2,85	5,23	4,43	hypothetical protein BC012317	LOC93082
217252_at	3,47	6,52	3,27	4,42	oxidative stress induced like	OSIL
37020_at	4,66	3,60	4,93	4,40	C-reactive protein, pentraxin-related	CRP
225518_x_at	6,09	4,42	2,68	4,40		
218704_at	5,37	3,15	4,51	4,34	hypothetical protein FLJ20315	FLJ20315
234372_at	5,64	4,67	2,69	4,33		
1569297_at	5,80	2,95	4,16	4,30		
220620_at	3,86	3,92	5,02	4,27	chromosome 1 open reading frame 42	C1orf42
1561959_x_at	5,80	4,26	2,74	4,26	Full length insert cDNA clone YR17E12	
244096_at	6,13	3,86	2,74	4,24		
217654_at	5,82	4,26	2,63	4,24		
243060_at	2,63	5,80	4,20	4,21		
1563783_a_at	3,95	5,64	2,97	4,19	zinc finger protein 333	ZNF333
232638_at	2,86	3,55	6,14	4,18	KIAA1510 protein	KIAA1510
207815_at	3,66	6,08	2,80	4,18	platelet factor 4 variant 1	PF4V1
216653_at	3,18	4,71	4,62	4,17	down-regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2)	DR1
1560952_at	3,66	3,49	5,33	4,16	CDNA FLJ25399 fis, clone TST02783	
239395_at	6,07	3,70	2,67	4,15	hypothetical protein LOC285620	LOC285620
211517_s_at	4,46	2,65	5,32	4,14	interleukin 5 receptor, alpha	IL5RA
204399_s_at	6,21	3,40	2,79	4,13	echinoderm microtubule associated 2	EML2
1560219_at	5,27	4,63	2,40	4,10	ankyrin and SOCS box-containing 3	ASB3
241228_at	3,21	3,99	5,05	4,08		
1569386_at	4,82	3,99	3,42	4,08	KIAA1922 protein	KIAA1922
241856_at	3,41	2,98	5,81	4,07		
1564561_at	5,09	3,82	3,28	4,06	LOC387932	
244269_at	5,66	3,51	2,98	4,05		
220700_at	4,50	5,25	2,35	4,03		
235738_at	6,19	2,71	3,10	4,00		
210536_s_at	-3,36	-4,58	-4,09	-4,01	sperm adhesion molecule 1 (PH-20 hyaluronidase, zona pellucida binding)	SPAM1
1569537_at	-6,01	-3,04	-2,97	-4,01		
1565729_at	-6,27	-2,90	-2,88	-4,02		
223725_at	-3,38	-5,89	-2,89	-4,05	NPC-related protein NAG73	NAG73
236284_at	-6,25	-2,97	-2,95	-4,06	KIAA0146 protein	KIAA0146
206998_x_at	-6,08	-2,77	-3,33	-4,06	proline-rich protein BstNI subfamily 2	
238710_at	-3,56	-2,89	-5,78	-4,08	hypothetical protein FLJ90119	FLJ90119
1556398_a_at	-4,11	-4,42	-3,82	-4,12	CDNA FLJ37122 fis, clone BRACE2022448	
209419_at	-4,60	-5,02	-3,01	-4,21	chromosome 22 open reading frame 19	C22orf19
221348_at	-4,67	-5,38	-2,91	-4,32	natriuretic peptide precursor C	NPPC
1559861_at	-4,55	-2,56	-5,90	-4,34	Clone IMAGE:5478062, mRNA	
242237_at	-6,46	-3,01	-3,76	-4,41		
232110_at	-4,14	-3,92	-5,29	-4,45	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5	GALNT5
227202_at	-4,66	-2,97	-5,75	-4,46	contactin 1	CNTN1
204713_s_at	-5,77	-2,63	-4,98	-4,46	coagulation factor V (proaccelerin,	F5
208522_s_at	-4,03	-5,73	-3,88	-4,55	patched homolog (Drosophila)	PTCH
235841_at	-5,15	-3,49	-5,00	-4,55		
214926_at	-5,87	-3,70	-4,52	-4,70		
219911_s_at	-4,75	-2,91	-6,50	-4,72	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	SLCO4A1
235066_at	-4,50	-2,92	-7,04	-4,82	microtubule-associated protein 4	MAP4
1568286_at	-5,25	-2,84	-6,44	-4,84		
243240_at	-4,55	-4,01	-5,98	-4,85		
226985_at	-3,44	-7,42	-4,64	-5,17	FYVE, RhoGEF and PH domain 5	FGD5
240197_at	-4,64	-4,61	-6,27	-5,17		
230167_at	-7,03	-4,08	-4,52	-5,21		
230627_at	-3,96	-6,42	-5,28	-5,22		
213660_s_at	-3,11	-7,87	-5,09	-5,36	topoisomerase (DNA) III beta	TOP3B
218186_at	-7,97	-3,39	-4,80	-5,39	RAB25, member RAS oncogene family	RAB25
232444_at	-6,56	-6,88	-2,80	-5,42	chromosome 6 open reading frame 204	C6orf204
1553796_at	-6,36	-6,36	-3,54	-5,42	hypothetical protein FLJ30594	FLJ30594

Anhang

243581_at	-3,96	-4,89	-7,55	-5,46	MRNA similar to proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, 3	
224215_s_at	-2,91	-4,68	-8,85	-5,48	delta-like 1 (Drosophila)	DLL1
202988_s_at	-3,05	-7,74	-5,65	-5,48	regulator of G-protein signalling 1	RGS1
208525_s_at	-5,49	-6,62	-4,38	-5,50		
219685_at	-9,27	-4,09	-3,42	-5,60	transmembrane protein 35	TMEM35
210333_at	-6,09	-4,74	-6,13	-5,65	nuclear receptor subfamily 5, group A,	NR5A1
1565192_at	-8,99	-3,55	-4,47	-5,67		
217666_at	-4,95	-5,00	-7,14	-5,70		
207745_at	-8,12	-4,34	-4,72	-5,73	calcium binding protein 2	CABP2
233023_at	-6,07	-8,10	-3,02	-5,73	CDNA FLJ11406 fis, clone HEMBA1000773	
244746_at	-5,60	-3,13	-8,81	-5,84		
230563_at	-5,94	-7,78	-4,15	-5,96	RasGEF domain family, member 1A	RASGEF1A
1552837_at	-9,40	-3,63	-4,91	-5,98	intestinal cell (MAK-like) kinase	ICK
1560412_at	-5,92	-3,28	-8,77	-5,99	CDNA FLJ35132 fis, clone PLACE6008989	
227652_at	-5,84	-4,91	-7,45	-6,07	hypothetical protein MGC20262	MGC20262
206457_s_at	-8,57	-6,78	-2,95	-6,10		
234507_at	-6,94	-3,98	-7,56	-6,16		
1560742_at	-8,87	-6,67	-3,08	-6,21	CDNA FLJ33673 fis, clone BRAWH2001862	
214468_at	-6,13	-4,43	-8,17	-6,24	myosin, heavy polypeptide 6, alpha	MYH6
207901_at	-3,28	-5,47	-10,00	-6,25	interleukin 12B)	IL12B
237159_x_at	-5,76	-6,75	-6,44	-6,32		
1562137_at	-5,47	-3,44	-10,12	-6,34	Full length insert cDNA clone Y149G05	
241421_at	-5,33	-6,77	-7,31	-6,47		
1566842_at	-6,83	-9,58	-3,48	-6,63		
243525_at	-3,81	-7,38	-8,71	-6,64	sec1 family domain containing 1	SCFD1
220993_s_at	-9,44	-4,75	-5,88	-6,69	G protein-coupled receptor 63	GPR63
231226_at	-10,74	-5,36	-4,57	-6,89	Clone IMAGE:5300185, mRNA	
212707_s_at	-4,22	-9,80	-6,65	-6,89	RAS p21 protein activator 4	RASA4
237909_at	-6,33	-4,04	-10,31	-6,89	Clone BPG169 immunoglobulin heavy chain VDJ region	
213821_s_at	-4,65	-5,54	-10,85	-7,02	Clone 488469 iduronate-2-sulfatase (IDS2) pseudogene, mRNA sequence	
234504_at	-6,54	-5,50	-9,10	-7,05	sperm associated antigen 4-like	SPAG4L
1559595_at	-6,08	-6,55	-9,70	-7,44	CDNA FLJ30500 fis, clone BRAWH2000471	
216765_at	-10,26	-5,92	-6,24	-7,48	mitogen-activated protein kinase kinase	MAP2K5
244684_at	-8,50	-6,04	-8,07	-7,54		
1567703_at	-4,35	-14,36	-4,74	-7,82		
236349_at	-3,90	-14,19	-5,80	-7,96	CDNA clone IMAGE:5259778	
233180_at	-14,09	-4,05	-6,19	-8,11	CDNA FLJ12088 fis, clone HEMBB1002545	
234103_at	-6,71	-4,30	-13,59	-8,20	sodium- and chloride-activated ATP-sensitive potassium channel	SLICK
1567251_at	-9,44	-7,20	-8,92	-8,52	olfactory receptor, family 10	OR10A3
208526_at	-5,04	-5,81	-15,17	-8,67		
231690_at	-4,28	-7,08	-15,15	-8,84		
1561501_s_at	-9,30	-5,59	-11,66	-8,85	CDNA FLJ35175 fis, clone PLACE6013400	
211119_at	-13,18	-9,47	-5,10	-9,25	estrogen receptor 2 (ER beta)	ESR2
210843_s_at	-4,88	-11,17	-12,12	-9,39	microfibrillar-associated protein 3-like	MFAP3L
1566046_at	-15,16	-5,11	-8,18	-9,48		
213120_at	-11,75	-11,41	-5,53	-9,57	KIAA0701 protein	KIAA0701
1570114_at	-10,50	-5,37	-13,03	-9,63	MAM domain containing 1	MAMDC1
1560469_at	-10,88	-11,84	-6,75	-9,82	nuclear receptor subfamily 5, group A,2	NR5A2
1561997_at	-10,50	-15,35	-5,31	-10,38	Similar to tripartite motif-containing 43	
220416_at	-20,28	-8,86	-8,22	-12,45	ATPase, Class I, type 8B, member 4	ATP8B4
244118_at	-29,83	-7,93	-5,99	-14,58	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1	GABRA1

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Aos1	Activation of Smt3p
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumine, Rinder-Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CHD	Chromodomain Helicase DNA-binding
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
Dox	Doxycyclin
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
E2F	E2 Factor
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ehylenglycolbistetraessigsäure
Elk-1	Ets-like Protein 1
ERHBD	Östrogen-Rezeptor Hormon-bindende Domäne
Ets	E26 transformation specific, Erythroblast transformation specific
FLuc	Firefly-Luciferase
G	Guanosin
H1-H4	Histon H1-Histon H4
HA	Hämagglutinin
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK	Human Embryonic Kidney Zelllinie
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinethansulfonsäure
HP	Heterochromatin Protein
HSF1	Heat Shock Factor Protein 1
ID	Inhibitorische Domäne
IgG	Immunglobulin G
KAP1	KRAB-associated Protein1
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KI	Knockin
KLF	Krüppel-like Factor
KMT	Lysin-Methyltransferase
KO	Knockout
KRAB	Krüppel-associated Box
LEF1	Lymphoid-enhancer Factor 1
MBT	Malignant Brain Tumor
MEF	mouse embryonic fibroblasts, embryonale Mausfibroblasten
MEP-1	Mog interacting, ectopic granules family member
Mi-2	Mitchell Autoimmun-Antikörper 2
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA

Anhang

MTA	Metastasis-associated
NAM	Nicotinamid
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NuRD	Nucleosome Remodelling Histone Deacetylase
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Pho	Pleiohomeotic
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PML	Promyelocytic Leukemia Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastom Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RLuc	Renilla-Luciferase
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SAE	SUMO-activating enzyme
SAM	Sterile Alpha Motif
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SDS	Sodium dodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SENP	Sentrin/SUMO-specific Protease
SF-1	Steroidogenic Factor 1
Sfmbt	Scm-related gene cotaining four mbt domains
SIM	SUMO-Interaktions-Motiv
siRNA	small interfering RNA
Sp	Specificity Protein
Sp3SD	Sp3 Small Deletion
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
SUSP	SUMO-specific Protease
Su(var)	Suppressor of position effect variegation
SV40	Simian-Virus 40
SynMuv	Synthetic Multivulval
T	Thymin
Tcf4	T-cell Factor 4
TBS	Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEL	Translocation Ets Leukemia
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TSA	Trichostatin A
Uba2	(similar to) Ubiquitin-activating enzyme
Ubc9	(similar to) Ubiquitin-conjugating enzyme
UpM	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen

Stielow, B., Sapetschnig, A., Krüger, I., Kunert, N., Brehm, A., Boutros, M., and Suske, G. 2008. Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNAi screen. *Mol Cell* **29**(6): 742-54.

Stielow, B., Sapetschnig, A., Wink, C., Krüger, I., and Suske, G. 2008. SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Rep* **9**(9): 899-906.

Sapetschnig, A., **Stielow, B.** und Suske, G. Wie hemmen SUMOylierte Transkriptionsfaktoren die Genaktivität? BIOSpektrum 04.08: 362-64. (angeforderter Review-Artikel, keinem Peer-Reviewing-Prozess unterzogen).

Kongressbeiträge in Form eines Posters

A. Sapetschnig, G. Rischitor, **B. Stielow**, F. Melchior and G. Suske: *Inactivation of the transcription factor Sp3 by SUMO modification*. Cold Spring Harbor Laboratories Meeting The Ubiquitin Family, 23.-27.04.2003, Cold Spring Harbor, USA.

A. Sapetschnig, G. Rischitor, **B. Stielow**, F. Melchior and G. Suske: *Regulation of the transcription factor Sp3 by SUMO modification*. Cold Spring Harbor Laboratories Meeting Mechanisms of Eukaryotic Transcription, 27.-31.08.2003, Cold Spring Harbor, USA.

B. Stielow, A. Sapetschnig, I. Krüger, M. Boutros and G. Suske: *Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNA interference screen*. 4th International Conference Ubiquitin, Ubiquitin-like Proteins and Cancer, 07.-09.02.2008, Houston, USA.

B. Stielow, A. Sapetschnig, C. Wink and G. Suske: *SUMO-modified transcription factors repress transcription by provoking local heterochromatic gene silencing*. 4th International Conference Ubiquitin, Ubiquitin-like Proteins and Cancer, 07.-09.02.2008, Houston, USA.

B. Stielow, A. Sapetschnig, I. Krüger, M. Boutros and G. Suske: *Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNA interference screen*. 59. Mosbacher Kolloquium Epigenetics – Molecular Principles and Mechanisms, 27.-29.03.2008, Mosbach.

B. Stielow, A. Sapetschnig, C. Wink and G. Suske: *SUMO-modified transcription factors repress transcription by provoking local heterochromatic gene silencing*. 59. Mosbacher Kolloquium Epigenetics – Molecular Principles and Mechanisms, 27.-29.03.2008, Mosbach.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller, Aurich, Beato, Daut, Eilers, Elsässer, Feuser, Fritz, Grzeschik, Hartmann, Hasilik, Jungclas, Kaiser, Kern, Kirchner, Klug, Knöller, Koch, Koolman, Körle, Lammel, Lill, Löffler, von Löw, Lührmann, Meinhardt, Müller, Moll, Neumann, Niessing, Renkawitz-Pohl, Röhm, Schäfer, Schulz, Seifart, Seitz, Slater, Suske, Tampe, Voigt, Walther, Weiser, Westermann, Westphal.

Danksagung

Danke.