

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------|---|-----|
| 1 | EINLEITUNG | 2 |
| 1.1 | ZELLZYKLUS EUKARYOTISCHER ZELLEN | 2 |
| 1.2 | DIE ROLLE DER MOTOR- UND MIKROTUBULIASOZIIERTEN PROTEINE IN DER MITOSE | 5 |
| 1.3 | DAS PROTEIN REPP86 | 7 |
| 1.4 | ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 11 |
| 2 | MATERIAL | 12 |
| 2.1 | CHEMIKALIEN | 12 |
| 2.2 | GERÄTE | 12 |
| 2.3 | LABORZUBEHÖR | 13 |
| 2.4 | LABOR- UND TESTKOMBINATIONEN | 13 |
| 2.5 | ENZYME | 14 |
| 2.6 | ANTIKÖRPER | 15 |
| 2.7 | VEKTOREN | 15 |
| 2.8 | OLIGONUKLEOTIDE | 15 |
| 2.9 | GRÖßENSTANDARDS | 17 |
| 2.10 | DATENBANKEN UND COMPUTERPROGRAMME | 18 |
| 2.11 | ORGANISMEN | 19 |
| 2.12 | KULTURMEDIEN | 20 |
| 2.13 | PUFFER UND LÖSUNGEN | 21 |
| 3 | METHODEN | 24 |
| 3.1 | ZELLKULTUR | 24 |
| 3.2 | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN | 25 |
| 3.3 | BIOCHEMISCHE METHODEN | 35 |
| 3.4 | IMMUNZITOLOGISCHE METHODEN | 41 |
| 4 | ERGEBNISSE | 43 |
| 4.1 | HINWEISE AUF REPP86-DOMÄNEN UND MOTIVE | 43 |
| 4.2 | DIE REGULATION VON REPP86 ERFOLGTE AUF TRANSKRIPTIONSEBENE | 46 |
| 4.3 | REPP86-ÜBEREXPRESSION VERURSACHT EINE ARRETIERUNG VON HEK293-ZELLEN IN DER G2- UND M-PHASE DES ZELLZYKLUS | 49 |
| 4.4 | HUMANES REPP86 KOSEDIMENTIERT MIT MIKROTUBULI <i>IN VITRO</i> | 53 |
| 4.5 | IDENTIFIZIERUNG VON SIAH2 ALS INTERAKTIONSPARTNER VON REPP86 IM <i>YEAST Two-HYBRID</i> -EXPERIMENT | 55 |
| 4.6 | INTERAKTION VON REPP86 UND SIAH2 IN TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLEN | 70 |
| 4.7 | DIE TRANSKRIPTIONSINITIATIONSSTELLE VON REPP86 | 75 |
| 4.8 | EINGRENZUNG DES FÜR DIE REPP86-EXPRESSION ESSENTIELLEN PROMOTORBEREICHES | 86 |
| 5 | DISKUSSION | 92 |
| 5.1 | EINORDNUNG VON REPP86 IN DEN ABLAUF DES ZELLZYKLUS | 92 |
| 5.2 | KONTROLLE DER REPP86-EXPRESSION AUF DER EBENE DER TRANSKRIPTION | 92 |
| 5.3 | EFFEKTE DER ÜBEREXPRESSION VON REPP86 IN <i>S. CEREVISIAE</i> UND HEK293-ZELLEN | 93 |
| 5.4 | REPP86 IST EIN MIKROTUBULIASOZIIERTES PROTEIN | 96 |
| 5.5 | INTERAKTION VON REPP86 MIT SIAH2 IN <i>S. CEREVISIAE</i> UND HEK293-ZELLEN | 101 |
| 5.6 | REGULATION DES REPP86-GENS | 105 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNGEN | 112 |
| 6.1 | ZUSAMMENFASSUNG | 112 |
| 6.2 | SUMMARY | 113 |
| 7 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 115 |
| 8 | LITERATURVERZEICHNIS | 118 |
| 9 | ANHANG | 128 |
| 9.1 | PROTEINÜBERSICHT | 128 |
| 9.2 | VEKTORKARTEN | 132 |

1 Einleitung

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen unterliegt strengen regulativen Mechanismen. Veränderungen, die diese strenge Regulation stören, führen häufig zum unkontrollierten Zellwachstum bis hin zur Krebsentstehung oder zum Zelltod. Untersuchungen ergeben, daß aggressive Tumoren mit einer hohen proliferativen Aktivität der Tumorzellen korrelieren (Rudolph et al., 1999). Aus dem Grunde erhält die Proliferationsaktivität den Status eines wichtigen Kriteriums bei der Einschätzung der Tumoraggressivität. Für die Wahl adäquater Therapien ist es von herausragender Wichtigkeit, daß die proliferative Tumoraktivität richtig eingeschätzt wird. In diesem Zusammenhang bedient sich die moderne histopathologische Diagnostik der Proteine, die zellzyklusabhängig reguliert werden und nur in bestimmten Zellzyklusphasen nachweisbar sind. Diese Proteine dienen als immunhistopathologische Proliferationsmarker. Hierbei gerät aber auch die funktionelle Charakterisierung der Proliferationsmarker immer mehr in den Vordergrund, weil ihre Funktion in der Zelle Rückschlüsse auf die regulativen Mechanismen im Zellzyklus erlauben könnte.

1.1 Zellzyklus eukaryotischer Zellen

Untersuchungen zum Zellzyklus eukaryotischer Zellen werden oft in Modellsystemen mit immortalisierten Zelllinien durchgeführt. Im Zuge solcher Experimente wurde festgestellt, daß eukaryotische Zellen, im Gegensatz zu Bakterien, ihre DNA nicht fortwährend replizieren. Vielmehr lassen sich die Wachstumsphasen einer eukaryotischen Zelle in relativ gut zu trennende Zeitphasen des Zellzyklus einteilen.

In der Synthesephase (S-Phase) findet die DNA-Replikation statt, und es wird ein kontinuierlicher Anstieg des DNA-Gehaltes beobachtet. Im Gegensatz zu bakterieller DNA, die von einem einzigen Startpunkt aus, dem *Origin*, repliziert wird, findet die Replikation eukaryotischer Genome an multiplen Startpunkten statt, die in Abständen von 50 000 bis 200 000 Basenpaaren vorkommen (Huberman und Riggs, 1968). In der prämitotischen *gap 2*-Phase (G₂-Phase) ist die DNA-Replikation abgeschlossen und der DNA-Gehalt verdoppelt. In dieser Phase werden DNA-Schäden behoben. Die Mitose-Phase (M-Phase) wird in Abhängigkeit vom Chromosomenstatus in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterteilt. Die Mitose gipfelt in der Trennung der Schwesterchromatiden und wird mit der Entstehung zweier Tochterzellen, der Zytokinese, beendet. Die Tochterzellen

treten in die *gap 1*-Phase (G1-Phase) ein, deren Dauer sehr unterschiedlich sein kann. In schnell proliferierenden Zellen beläuft sie sich auf zwei bis zwanzig Stunden, in anderen Zellen wird diese Ruhephase manchmal auf Jahre ausgedehnt. In der G1-Phase geht die Zelle ihren spezifischen Stoffwechsellleistungen nach. Es können auch zelluläre Signale etabliert werden, die weitere Mitosen verhindern, und so die G1-Phase extrem verlängern. Aus der G1-Phase heraus können die Zellen in die Dauerruhephase, G0-Phase, übergehen.

1.1.1 Regulation des Zellzyklus

Nach unserer heutigen Vorstellung wird der Zellzyklus temporär und räumlich von einer Vielzahl von Mechanismen kontrolliert. An den so genannten Kontrollpunkten („*checkpoints*“) des Zellzyklus werden die Voraussetzungen für den Eintritt der Zelle in die nächste Phase überprüft. Der Ablauf des Zellzyklus kann an diesen Kontrollpunkten solange unterbrochen werden, bis die Bedingungen für die nächste Phase erfüllt sind (Elledge, 1996; Russell, 1998). So wird beispielsweise sichergestellt, daß die Mitose erst nach der Beendigung der DNA-Replikation und nach der Behebung von DNA-Schäden stattfindet. Diese Regulation wird durch gezielte und zeitlich abgestimmte Synthese- und Abbauvorgänge spezifischer Zellzyklusregulatoren gewährleistet (Pines, 1999). Neben den Zyklinen und zyklinabhängigen Kinasen (Nigg, 1995) wurden Kinasen der *Polo*-Familie (Lane und Nigg, 1996), der *aurora*-Familie (Giet und Prigent, 1999) und der NIMA-Familie (De Souza et al., 2000) entdeckt, die zellzyklusspezifisch exprimiert werden. Zusätzlich sind Proteinkinasen bekannt, die in die Regulation der mitotischen Kontrollpunkte und des Austritts aus der Mitose sowie der Zytokinese involviert sind. Die Regulation der Kinasenaktivität und somit des Zellzyklus wird in erster Linie von posttranslationalen Mechanismen wie Proteinphosphorylierung und Proteolyse bestimmt. Beide Prozesse beeinflussen sich gegenseitig. Die Proteolyse wird durch Phosphorylierungen am Protein kontrolliert, während eine Vielzahl von mitotischen Kinasen durch Proteolyseprozesse herunterreguliert wird (Nigg, 2001).

1.1.2 Schlüsselproteine im Zellzyklus: zyklinabhängige Kinasen

Erste Hinweise auf die Regulation des Zellzyklus wurden durch Untersuchungen an Hefemutanten gewonnen, die bei erhöhter Temperatur in G1-, S- oder G2/M-Phase arretierten (Bartlett und Nurse, 1990; Kornberg und Baker, 1992). Als die entscheidenden Taktgeber des

Zellzyklus wurden Proteinkinasen beschrieben, die erst durch die Interaktion mit Zyklinen aktiviert werden und die Progression des Zellzyklus durch Phosphorylierungen an Zielproteinen regulieren. Die Proteine wurden als zyklinabhängige Kinasen („*cyclin dependent kinases*“, CDK) bezeichnet. Zyklin A und B wurden bereits im Zuge der Untersuchungen zur frühen Embryonalentwicklung von Muscheln und Seeigeln entdeckt (Evans et al., 1983; Swenson et al., 1986).

In *Schizosaccharomyces pombe*-Mutanten wurden die *cdc2*-Kinase (Produkt des „*cell division cycle*“-Gens 2) und die für die G1-Phase spezifischen Zyklone als Schlüsselproteine für die Passage des G1/S-Kontrollpunktes identifiziert. Die Interaktion zwischen *cdc2*-Kinase und den G2-Phase-Zyklinen ermöglicht den Eintritt der Hefezellen in die Mitose. Es wurde festgestellt, daß die *cdc2*-Kinase von *S. pombe* die Funktion des homologen Proteins *CDC28* in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ersetzen kann. Studien an weiteren eukaryotischen *cdc2*-Homologen zeigten, daß dieses Protein bis hin zu höheren Eukaryoten einschließlich des Menschen hochkonserviert ist. In Vertebratenzellen konnten mittlerweile mehrere verschiedene CDKs charakterisiert werden (Sherr, 1993).

1.1.3 Regulation der zyklinabhängigen Kinasen

Zyklone und CDKs können in verschiedenen Kombinationen miteinander interagieren. Durch diese Interaktionen entstehen Zyklin/CDK-Komplexe mit unterschiedlichen Aktivitäten. Die Aktivität der Komplexe bestimmt die Einleitung, das Fortschreiten und die Beendigung einzelner Zellzyklusphasen (Morgan, 1997).

Phosphorylierungsstatus als regulativer Mechanismus: Untersuchungen an zahlreichen Spezies, angefangen mit *Schizosaccharomyces pombe* und *Xenopus laevis* bis hin zum Menschen zeigten, daß die Einleitung der Mitose durch eine exakte Steuerung des Phosphorylierungsstatus eines einzigen homologen Enzyms, des „*cell division cycle*-Gens 2“ (*cdc2* = CDK1) reguliert wird. In der G2-Phase assoziiert *cdc2* mit Zyklin B zum noch inaktiven „*maturation promoting factor*“ (MPF). In Metazoa wird diese Inaktivierung durch die Phosphorylierung von Threonin 14 (T14) und Tyrosin 15 (Y15) des *cdc2*-Moleküls aufrechterhalten. Der MPF wird aktiviert, indem Threonin 161 des *cdc2*-Moleküls durch die CDK-aktivierende Kinase 1 (Cak1) phosphoryliert und T14 und Y15 durch die *cdc25C*-Phosphatase dephosphoryliert werden (Nigg, 2001). Durch die anschließende Phosphorylierung von Zielproteinen wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die den Übergang

in die Mitose steuert. Beispielsweise werden nukleäre Lamine, kinesinverwandte Motorproteine, Kondensine und Komponenten der Golgi-Matrix phosphoryliert, wodurch Prozesse wie der Abbau der Kernmembran, die Centrosomentrennung, der Spindelaufbau, die Chromosomenkondensation und die Fragmentierung des Golgi-Apparates initiiert werden (Nigg, 1995; Kimura et al., 1998; Lowe et al., 1998; Andersen, 1999).

Zyklin/CDK-Inhibitoren: Der Status der enzymatischen Aktivität eines Zyklin/CDK-Komplexes, der generell durch den fließenden Wechsel zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung bestimmt wird, kann zusätzlich durch eine Reihe von CDK-Inhibitoren moduliert werden (Peter und Herskowitz, 1994). In der G1-Phase interagiert die zyklinabhängige Kinase 2 (CDK2) mit Zyklin E, wird hierdurch aktiviert und setzt eine Kaskade in Gang, die normalerweise die Überwindung des Kontrollpunktes G1/S einleitet. An dieser Stelle kann der Zellzyklus gestoppt werden, wenn bestimmte inhibitorische Faktoren zusammenkommen. Beispielsweise wird durch die Bindung von „*transformation growth factor β* “ (TGF- β) an Zelloberflächen-Rezeptoren eine zelluläre Signalkette etabliert, die unter anderem zur Aktivierung des p27-Gens führt (Berridge, 1993). Das Protein p27, ein CDK-Inhibitor, bindet an den CDK2/Zyklin E-Komplex und hemmt damit den Übergang in die S-Phase (Sherr und Roberts, 1999). Wird p27 nicht aktiviert, dann interagiert CDK2 mit Zyklin A, wodurch der Übergang von der S-Phase in die G2-Phase eingeleitet wird. Schließlich assoziiert *cdc2* mit Zyklin B, wird aktiviert und phosphoryliert ihre Zielproteine.

Spezifische Proteolyse: Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Zellzykluskontrolle ist der phasenspezifisch gesteuerte proteolytische Abbau der Zykline über den Ubiquitinweg (Glotzer et al., 1991). Über die Ubiquitinierung der Zykline entscheidet oft ihr Phosphorylierungsstatus (Skowyra et al., 1997).

1.2 Die Rolle der Motor- und mikrotubuliassoziierten Proteine in der Mitose

Im Zuge der Vorbereitung auf die Mitose findet eine Reihe von gravierenden Veränderungen in der Zelle statt. Komponenten der Kernhülle werden in Vesikeln verpackt, das Chromatin kondensiert. Die Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen wird von einer bipolaren Struktur, dem Spindelapparat, vollzogen (Compton, 2000). Am Aufbau des Spindelapparates sind zahlreiche Proteine beteiligt. Faktoren wie die mikrotubuliassoziierten Proteine, Proteinkinasen, Phosphatasen und Proteine der nukleären Matrix reichern sich an den

Centrosomen an (Mayor et al., 1999; Meraldi und Nigg, 2001). Die Aktivierung der Proteine führt zu einer drastischen Reorganisation der Interphasemikrotubuli, die für den Aufbau der mitotischen Spindel benötigt werden (Hyman und Karsenti, 1996).

Spindelmikrotubuli zeichnen sich durch eine hohe dynamische Instabilität aus: ihre Halbwertszeit liegt zwischen 60 und 90 Sekunden (Saxton et al., 1984; Scholey et al., 1984). Die hohe Dynamik der mitotischen Mikrotubuli wird in erster Linie durch den Anstieg der Depolymerisierungsrate an den Mikrotubulienenden verursacht, welcher durch bestimmte Proteinfaktoren, die Destabilisatoren, reguliert wird (Cassimeris, 1999). Als Gegenspieler der Destabilisatoren wirken andere mikrotubuliassoziierte Proteine (MAPs) (Andersen, 2000). Die Aktivität der MAPs wird in vielen Fällen zellzyklusspezifisch reguliert. Das *Xenopus*-MAP215 zum Beispiel erhöht die Polymerisierungsrate an den Plusenden der Mikrotubuli, wobei seine Aktivität durch die *cdc2*-abhängige Phosphorylierung moduliert wird (Gard und Kirschner, 1987; Vasquez et al., 1994; Vasquez et al., 1999). Strukturelle MAPs wie *tau*, MAP2 und MAP4 stabilisieren die Mikrotubuli durch eine Reduktion der Depolymerisierungsrate. Andere MAPs wiederum sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Spindelbipolarität beteiligt.

Die Trennung der Schwesterchromatiden in der Metaphase wird vollzogen, indem die Spindelpole durch Verlängerung der Polmikrotubuli an ihren Plusenden auseinander getrieben werden. Zusätzlich wirken im Bereich der Überlappung der Polmikrotubuli Motorproteine, von welchen die antiparallelen Polmikrotubuli unter ATP-Verbrauch zusätzlich auseinander geschoben werden. Grundsätzlich findet auch ein Transport zu den Spindelpolen statt, der hauptsächlich von dem Motorprotein Dynein betrieben wird. Zu den wichtigsten Motorproteinen, die für die Bewegungen der Mikrotubuli verantwortlich und letztlich an der Chromatidentrennung beteiligt sind, gehören Kinesin, kinesinähnliche Proteine und das bereits erwähnte cytoplasmatische Dynein (Vernos und Karsenti, 1996).

1.3 Das Protein repp86

1.3.1 Die Identifizierung von repp86

In der Medizin wird stets nach geeigneten Proliferationsmarkern gesucht, die verlässliche Aussagen über die Tumoraggressivität erlauben. Zu diesem Zweck werden beispielsweise immortalisierte Zelllinien, wie die Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L428 nach zellzyklus-assoziierten Proteinen durchmustert. Am Institut für Hämatopathologie in Kiel wurden zu diesem Zweck weibliche BALB/C-Mäuse mit nukleären L428-Zellysaten immunisiert (Heidebrecht et al., 1997b). Nach der Herstellung von Hybridomazellen wurden die Antikörper enthaltenden Überstände getestet. Ein aus dieser Versuchsreihe resultierender monoklonaler Maus-Antikörper der Subklasse IgG1 (Ki-S2) war in *Western blot*-Färbungen spezifisch für ein nukleäres Antigen mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Das Protein wurde aufgrund des Molekulargewichts zunächst p100 genannt. Eine Proteinsequenzanalyse ergab, daß es sich bei p100 um ein bisher unbekanntes Protein handelte, welches, wie immunhistochemische Untersuchungen an Gefrierschnitten und Paraffinpräparaten zahlreicher humaner Gewebe zeigten, in den Nuklei einer bestimmten Fraktion proliferierender Zellen zu detektieren war.

p100 wird nur in proliferierenden Zellen vom Zeitpunkt des G1/S-Übergangs bis zum Ende der Zytokinese exprimiert. Lokalisationsstudien mit p100 ergaben, daß das Protein während der S- und G2-Phase im Zellkern diffus verteilt vorliegt, während mit dem Beginn der Mitose eine gravierende Umorganisation der Proteinverteilung zu beobachten ist, die zu einer strengen Kolokalisation mit der mitotischen Spindel und den Spindelpolen führt (Abb. 1).

In L428-Zellen und HeLa-Zellen wird p100 während der Mitose stark phosphoryliert. Nach Beendigung der Zytokinese erfolgt eine schnelle Degradation. Die Halbwertszeit von p100 beträgt 90 Minuten (Heidebrecht et al., 1997b).

Das p100-Gen ist auf Chromosom 20 im Bereich der Chromosomenbande 20q11.2 lokalisiert. Es erhielt die Bezeichnung „*chromosome 20 open reading fragment 1*“ (C20orf1) und wurde unter AF098158 in der *GenBank*-Datenbank hinterlegt (Zhang et al., 1999).

Northern blot-Analysen, die im Institut für Hämatopathologie im Rahmen der Dissertation von Dr. Rott durchgeführt wurden, sowie Ergebnisse der Untersuchungen anderer Gruppen an Zelllinien verschiedener Lungenkarzinome zeigten, daß die p100-mRNA aus ca. 3500 Ribonukleotiden besteht (Manda et al., 1999; Rott, 1999). Zusätzlich wurde auch der

komplette kodierende Bereich von 2241 Nukleotiden identifiziert. Das Protein besteht aus 747 Aminosäuren. Sein theoretisches Molekulargewicht (MG) wurde mit 85,7 kDa berechnet. Mit der Feststellung des zellzyklusabhängigen Expressionsmusters von p100 und im Hinblick auf das theoretische Molekulargewicht wurde das Protein in „*restrictedly expressed proliferation-associated protein 86 kDa*“ (repp86) umbenannt. Andere Synonyme für repp86 sind „*differentially expressed in cancerous and noncancerous lung cells 2*“ (DIL-2) (Manda et al., 1999) und „*human targeting protein for (Xenopus) kinesin-like protein 2*“ (hTPX2) (Wittmann et al., 2000).

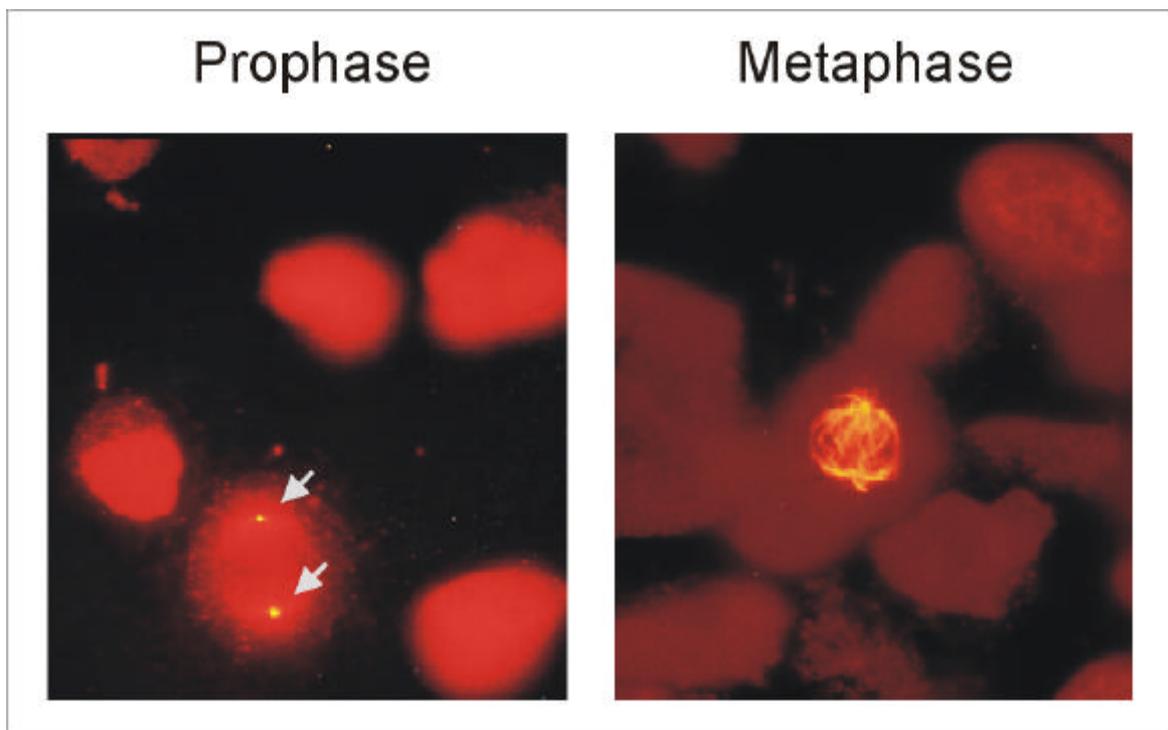


Abbildung 1: repp86-Lokalisation in L428-Zellen während der Mitose. In der Prophase wird repp86 an den Spindelpolen detektiert (gelb, Pfeile). In der Metaphase assoziiert repp86 mit dem Spindelapparat (gelb). repp86 wurde mit Ki-S2 und Cy3TM-markiertem Ziege-anti-Maus-Antiserum nachgewiesen. Nukleinsäuren (rot) wurden mit Propidiumjodid gefärbt (Heidebrecht et al., 1997b).

1.3.2 Zelluläre Proliferation und Tumoraggressivität

In der Krebsdiagnostik wird kontinuierlich nach prognostisch zuverlässigen Kriterien gesucht. Bei einer Vielzahl von Tumorarten erwiesen sich z.B. das klinische Tumorstadium, das Patientenalter, der DNA-Ploidiestatus sowie der histopathologische Malignitätsgrad als zuverlässige Prognosekriterien. Der schnelle Fortschritt in der Funktionsanalyse zellzyklusassoziierter Proteine wie Zykline, zyklinabhängiger Kinasen und Kinaseinhibitoren führte zum besseren Verständnis der Mechanismen, die für die Kontrolle der zellulären

Proliferation verantwortlich sind (Marx, 1991; Hirama und Koeffler, 1995). Die prognostische Relevanz der proliferativen Tumoraktivität wurde daraufhin in zahlreichen Studien untersucht. Im allgemeinen wird ein Tumor als weniger aggressiv eingestuft, wenn die Proliferationsrate einen niedrigen Wert erreicht.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Proliferationsrate bietet die Tatsache, daß zahlreiche zellzyklusassoziierte Proteine spezifischen quantitativen Schwankungen in Abhängigkeit von den Zellzyklusphasen unterliegen. Solche Proteine werden im allgemeinen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und in der diagnostischen Histopathologie als Proliferationsmarker eingesetzt. Insbesondere bei Krebserkrankungen können mit Proliferationsmarkern akkurate Proliferationsindices berechnet werden, die auf die Geschwindigkeit des Tumorwachstums schliessen lassen. Die Proliferationsindices können dann zur Erstellung genauerer Prognosen hinzugezogen werden und für die Wahl geeigneter Therapien ausschlaggebend sein. Im diagnostischen Bereich fanden vor allem Topoisomerase-IIa und das Ki-67-Antigen breite Anwendung (Gerdes et al., 1984; Pileri et al., 1987; Hall et al., 1988; Brown und Gatter, 1990; Kreipe et al., 1993).

In manchen Studien allerdings konnte keine enge Korrelation zwischen der Antigenexpression und der Größe der Wachstumsfraktion nachgewiesen werden (Quinn und Wright, 1990; Scott et al., 1991). Eine häufige Fehlerquelle bei der Unterscheidung zwischen langsam und schnell wachsenden Tumoren war die Überschätzung des Anteils schnell proliferierender Zellen (Morris et al., 1995). Die zellzyklusassoziierten Topoisomerase-IIa und das Ki-67-Antigen werden in den Zellzyklusphasen S, G2, M und G1 exprimiert (Gerdes et al., 1991). Die Dauer der S-, G2- und M-Phase ist in somatischen und entarteten Zellen relativ konstant. Die Dauer der G1-Phase ist hingegen hoch variabel. In schnell wachsenden Tumoren passieren Zellen in der G1-Phase zügig den G1/S-Restriktionspunkt und proliferieren. Die Zellen langsam wachsender Tumoren können eine variabel lange Zeit in der G1-Phase verweilen. Bei der immunologischen Quantifizierung der Proliferationsaktivität eines Tumors stellen deshalb die in der G1-Phase exprimierten Proliferationsmarker den größten Unsicherheitsfaktor dar, weil Zellen mit langen und kurzen G1-Phasen nicht unterscheidbar sind. Prognostische Aussagen, basierend auf der Unterscheidung zwischen langsam und schnell wachsenden Tumoren, sind mit den Proliferationsmarkern Topoisomerase-IIa und Ki-67-Antigen demnach begrenzt möglich, weil die Proteine auch während der G1-Phase exprimiert werden. Ein idealer Proliferationsmarker wäre ein Protein, dessen Expression erst nach Beendigung der G1-Phase, also lediglich in den Zellzyklusphasen S, G2 und M, stattfindet.

1.3.3 repp86 in der Tumordiagnostik

Mit der Identifizierung von repp86 erhielt die histopathologische Diagnostik ein genaueres und aussagekräftigeres Werkzeug für die Einschätzung der Proliferationsaktivität. repp86 wird im Unterschied zu Topoisomerase-IIa und zum Ki-67-Antigen nicht während der gesamten G1-Phase sondern erst beim Übergang von der G1- in die S-Phase bis zur Vollendung der Zytokinese exprimiert (Heidebrecht et al., 1996; Heidebrecht et al., 1997b). Die prognostische Relevanz von repp86 als immunologischer Proliferationsmarker wurde unter anderem in einer Langzeitstudie mit 371 Fällen von lymphknotennegativen Brusttumoren untersucht (Rudolph et al., 1999). Der Verlauf der Erkrankung wurde bei den Patientinnen über einen durchschnittlichen Zeitraum von 95 Monaten aufgezeichnet. Die Fraktion der S-Phase-Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt, während die Tumorzellproliferation immunhistochemisch mittels der monoklonalen Antikörper Ki-S2 (anti-repp86) und Ki-S5 (anti-Ki-67-Antigen) gemessen wurde. Der prozentuale Anteil der Ki-S2- bzw. Ki-S5-positiven Zellen in der Tumorzellpopulation wurde ermittelt. Diese Ki-S2- und Ki-S5-bezogenen Markierungsindices wurden als prognostische Größen in Betracht gezogen und miteinander verglichen. In Fällen, in denen die Ki-S2- und Ki-S5-Indices gut übereinstimmten, konnte von extrem kurzen G1-Phasen der Tumorzellen, also von schnell wachsenden aggressiven Tumoren mit schlechten Prognosen, ausgegangen werden. Bei einem Ki-S5-Markierungsindex, der deutlich höher ausfiel als der Ki-S2-Markierungsindex, konnte hingegen von langen G1-Phasen der Tumorzellen, also von langsamer wachsenden Tumoren mit besseren Prognosen, ausgegangen werden. Die Prognosen korrelierten gut mit den Krankheitsverläufen der Patientinnen. In der Risikogruppe mit einem Ki-S2-Markierungsindex von weniger als 10 % war die Überlebensrate, statistisch gesehen, nicht signifikant anders als bei gesunden Frauen entsprechenden Alters. Bei einem höheren Ki-S2-Markierungsindex stieg das Risiko des Ablebens unabhängig von der eingesetzten adjuvanten Therapie um das Zwanzigfache. Die Studien zeigten, daß ein einzelner Faktor, der Ki-S2-Index, zur Identifizierung einer Patientengruppe mit sehr guter Prognose beitragen kann, die keine adjuvanten Therapien benötigt (Rudolph et al., 1999).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Protein repp86, das im funktionellen Zusammenhang mit dem Ablauf und der Steuerung des Zellzyklus zu stehen scheint. Der Zusammenhang zwischen repp86-Expression und Zellproliferation steht außer Frage. Die Besonderheit des Proteins liegt in seinem Expressionsmuster: repp86 wird im Gegensatz zu vielen bekannten zellzyklusassoziierten Proteinen nicht während der gesamten Dauer der G1-Phase, sondern erst beim Übergang der G1-Phase in die S-Phase exprimiert. Aus umfangreichen histopathologischen Studien wurde ersichtlich, daß repp86 gerade aus diesem Grund als ein sehr guter immunologischer Proliferationsmarker zur Identifizierung aggressiver Neoplasien eingesetzt werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung von Mechanismen, die für die strenge Regulation von repp86 im Zellzyklus verantwortlich sind. Die wichtigsten Fragen in diesem Zusammenhang sind:

- 1) Mit welchen Proteinen interagiert repp86?
- 2) Wie wird die Expression von repp86 reguliert?

Zur Klärung der ersten Fragestellung soll die Methode des *Yeast Two-Hybrid*-Systems angewendet werden. Die erzielten Ergebnisse sollen darüber hinaus mit anderen Methoden abgesichert werden. Im weiteren Verlauf der *Yeast Two-Hybrid*-Studien sollen die an der Interaktion beteiligten Proteindomänen näher charakterisiert werden.

Promotoranalysen bei repp86 könnten Rückschlüsse auf die Regulation der Expression erlauben. Hierzu sollen einleitende Promotorexperimente mit Hilfe der Methode des Luciferase Assays durchgeführt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

| | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid | Fa. Serva, Heidelberg, D |
| Agarose, Ultra Pure | Fa. Gibco BRL |
| <i>Aqua bidest.</i> | Fa. B. Braun Medical AG |
| BCIP/NBT Farbwentwicklungssubstrat | Fa. Promega, Madison, USA |
| Coomassie Brilliant Blue R250 | Fa. Serva, Heidelberg, D |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Fa. Bio-Rad, München, D |
| DO/-L/-T | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |
| DO/-L/-T/-H/-A | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |
| FCS | Fa. Gibco BRL |
| IPTG | Fa. Promega, Madison, USA |
| Minimal SD Agar Base | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |
| Minimal SD Base | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |
| Non Fat Dry Milk, Blotting | |
| Grade Blocker | Fa. Bio-Rad, München, D |
| Trypton | Fa. Difco Laboratories, Detroit, USA |
| X- α -Gal | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |
| YPD | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |
| YPD Agar | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |

Alle weiteren in dieser Arbeit genannten Chemikalien wurden von den Firmen Merck AG (Darmstadt, D) und Sigma Aldrich (Heidelberg, D) bezogen.

2.2 Geräte

| | |
|----------------------------|--|
| <i>Blotting-Kammern</i> | Bio-Rad; MBP3000E 3000V Power Supply, Fa. IBI |
| <i>DNA-Sequenzierer</i> | 310 Genetic Analyzer, Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D |
| <i>Durchflußzytometrie</i> | FACSCalibur Analyzer, Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA |
| <i>Elektrophorese</i> | Horizon 58, Horizon 11.14, Fa. Gibco BRL, Life Technologies Gene Power Supply GPS 200/400, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D |
| <i>Geldokumentation</i> | Gel Doc 2000, Quantity One Software, Version 4.2, Fa. Bio-Rad; München; MP3-Land Camera, Fa. Polaroid, Cambridge, USA |
| <i>Inkubatoren</i> | Schüttelthermostat 3022, GFL; Brutschrank B 5028, Fa. Heraeus, Hanau, D |
| <i>Luminometer</i> | FB 12 Luminometer, Fa. Berthold Detection Systems, Pforzheim, D |

| | |
|---------------------|---|
| <i>PCR-Cycler</i> | PTC-200, Biozym; GeneAmp PCR System 9700, Fa. PE Applied Biosystems |
| <i>pH-Meter</i> | φ 72 pH Meter, Fa. Beckmann, München, D |
| <i>Photometer</i> | Uvikon 860, Kontron, Fa. Eching, D; SpecSmart 3000™, Fa. Bio-Rad, München, D |
| <i>Rührer</i> | MR 2002, Fa. Heidolph, D MAG-E, Fa. Gerhardt, Bonn, D |
| <i>SDS-PAGE</i> | EI-9001-XCell II, Novex; Power-Pac 200, Fa. Bio-Rad, München, D |
| <i>Shaker</i> | Polymax 1040, Fa. Heidolph, D |
| <i>Sonifikation</i> | Sonopuls GM70, Fa. Bandelin, D |
| <i>Thermomixer</i> | Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf, Hamburg, D |
| <i>Vortexer</i> | Vortex Genie 2™, Fa. Bender & Hobein AG |
| <i>Waagen</i> | 1264 MP, 1265 MP, 1801, Fa. Sartorius, Göttingen, D |
| <i>Wasserbäder</i> | VC, Julabo; 3401, Fa. Köttermann, Uetze-Hänigsen, D |
| <i>Zentrifugen</i> | Biofuge pico, Varifuge K, Fa. Heraeus; Hanau, D Centrifuge 5402, Fa. Eppendorf, Hamburg, D; J2-21, Fa. Beckmann, München, D |

2.3 Laborzubehör

| | |
|--|--|
| Einmalpipetten | Fa. Sarstedt AG, Nümbrecht, D |
| Erlenmeyer-Kolben | Fa. Schott |
| PCR-Reagiergefäße | Fa. Sarstedt AG, Nümbrecht, D |
| Petrischalen | Fa. Greiner, Solingen, D |
| Pipetten, PreCision | Fa. Biozym, Hess. Oldendorf, D |
| Pipettierhilfen, <i>pipetus</i> -Standard | Fa. Hirschmann, D |
| Polystyrenreagenzglas, ohne | |
| Verschuß mit Rundboden, 12x75 mm | Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes |
| Autoradiographiefilme, Kodak K Biomax MR, 18x24 cm | Fa. Kodak |
| Röhrchen, 15 ml, 50 ml | Fa. Sarstedt AG, Nümbrecht, D |
| Schikanenkolben | Fa. Merck AG, Darmstadt, D |
| Sequenzierungsgefäße | Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt |
| Zellkulturflaschen | Fa. Greiner, Solingen, D |
| Zellkulturschalen, Falcon, Primaria | Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes |

2.4 Labor- und Testkombinationen

| | |
|--|---|
| BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit | Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt, D |
| Coomassie® Protein Assay Reagent Kit | Fa. Pierce, Rockford, USA |
| CapSite™ cDNA Kit | Fa. Eurogentec, Seraing, Belgien |

| | |
|--|---|
| Dual-Luciferase® Assay System | Fa. Promega, Madison, USA |
| DyeEx™ Spin Kit | Fa. Qiagen, Hilden, D |
| E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit II | Fa. PeqLab GmbH, Erlangen, D |
| First Strand cDNA Synthesis Kit | Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D |
| GST Gene Fusion System | Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D |
| Glutathion Sepharose 4B | Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D |
| Microtubule Associated Protein (MAP) | |
| Spin-Down Assay Kit | Fa. Cytoskeleton, Denver, USA |
| NuPAGE™ 4-12 %Bis-Tris-Gel | Fa. Invitrogen, Leek, Niederlande |
| NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20x) | Fa. Invitrogen, Leek, Niederlande |
| Poly(A)Pure™ mRNA Isolation Kit | Fa. Ambion inc., Cambridgeshire, Großbritannien |
| Premade Human Lymph Node cDNA library | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |
| RPN 2108 ECL™ western blotting analysis system | Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D |
| Qiagen® Maxi Prep Kit | Fa. Qiagen, Hilden, D |
| QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit | Fa. Stratagene, La Jolla, USA |
| Taq DNA-Polymerase Kit | Fa. Qiagen, Hilden, D |
| Yeast Two-Hybrid System 3 | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |

2.5 Enzyme

| | |
|--|--|
| Alkalische Phosphatase, 1 U/μl | Fa. Boehringer Mannheim, D |
| <i>Bam</i> HI, 20 U/μl | Fa. New England Biolabs, Schwalbach, D |
| DNase I, 2 U/μl | Fa. Ambion Inc., Cambridgeshire, Großbritannien |
| <i>Eco</i> RI, 20 U/μl | Fa. New England Biolabs, Schwalbach, D |
| <i>Hind</i> III, 20 U/μl | Fa. New England Biolabs, Schwalbach, D (Roy und Smith, 1973) |
| Lyticase, lyophilisiert | Fa. Sigma Aldrich, Heidelberg, D |
| <i>Nco</i> I, 10 U/μl | Fa. New England Biolabs, Schwalbach, D |
| <i>Pfu</i> DNA-Polymerase, 3 U/μl | Fa. Stratagene, La Jolla, USA |
| <i>Pfu</i> Turbo® DNA-Polymerase, 2,5 U/μl | Fa. Stratagene, La Jolla, USA |
| Protease Inhibitor Cocktail, 25x | Fa. Roche, Mannheim, D |
| RNasin, 40 U/μl | Fa. Promega, Madison, USA |
| <i>Sal</i> I, 20 U/μl | Fa. New England Biolabs, Schwalbach, D |
| <i>Sma</i> I, 20 U/μl | Fa. New England Biolabs, Schwalbach, D |
| T4-DNA-Ligase 1 U/μl | Fa. New England Biolabs, Schwalbach, D |
| <i>Xho</i> I, 20 U/μl | Fa. New England Biolabs, Schwalbach, D |
| <i>Xma</i> I, 20 U/μl | Fa. New England Biolabs, Schwalbach, D |

2.6 Antikörper

| | |
|---|---|
| Cy3-Ziege-anti-Maus, polyklonal | Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D |
| FITC-Ziege-anti-Maus, polyklonal | Fa. DAKO, Hamburg, D |
| Kaninchen-anti-HA-Epitop (polyklonal, 0,1 mg/ml) | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |
| Kaninchen-anti-Maus, polyklonal | Fa. DAKO, Hamburg, D |
| Kaninchen-anti-Ziege-Meerrettich-Peroxidase (IgG, H+L; 0,8 mg/ml) | Fa. Dianova, Hamburg, D |
| Ki-S2 (anti-repp86), Maus-IgG1 | Inst. für Hämatopathologie |
| Maus-anti-c-Myc-Epitop (IgG1, 200 µg) | Fa. Clontech, Paolo Alto, USA |
| Maus-anti-FLAG (IgG) | Fa. Sigma Aldrich, Heidelberg |
| Ziege-anti-GST, polyklonal | Fa. Amersham Biosciences |
| Ziege-anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase (IgG, H+L; 0,8 mg/ml) | Fa. Dianova, Hamburg, D |

2.7 Vektoren

Die Vektoren sind Bestandteil des *Yeast Two-Hybrid-Systems 3* (Fa. Clontech, Paolo Alto, USA):
pACT2, pCLI, pGADT7, pGADT7-Lam, pGADT7-T, pGBKT7, pGBKT7-53.

Die Vektoren sind Bestandteil des Dual-Luciferase® Assay System (Fa. Promega, Madison, USA):
pRL-CMV, pGL3 Basic, pGL3 Control.

Als Expressionsvektoren fanden Anwendung: *pFLAG-CMV2* (Fa. Sigma Aldrich, Heidelberg, D)
pGEX-5X-1 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D)
und *pRK5* (Fa. BD Pharmingen, San Jose, USA)

2.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Eurogentec und IB NAPS bezogen. In den Klonierungsoligonukleotiden wurden die Restriktionsstellen unterstrichen. Der vom jeweiligen Expressionsvektor vorgegebene Leserahmen sowie die Leserahmen der inserierten cDNAs wurden durch Zusammenfassung zu Nukleotidtripletts dargestellt.

2.8.1 Klonierung von repp86-cDNA und repp86-Teilsequenzen in *pGBKT7*

| | | |
|-------------|--|------------------|
| repp86NcoIG | 5'-CAT ATG <u>GCC ATG GAG</u> CCG AAT TCC CG-3' | (<i>Nco</i> I) |
| repp86Sall | 5'-AGTTATGCGGCCGCTGCAGGTCGAC-3' | (<i>Sal</i> I) |
| reppIfor | 5'-GTCAC <u>CCG GGT</u> ATG TCA CAA GTT AAA AGC TCT T-3' | (<i>Xma</i> I) |
| reppIIfor | 5'-GTCAC <u>CCG GGT</u> CAG CAA GCT ATT GTC ACA CC-3' | (<i>Xma</i> I) |
| reppIIrev | 5'-CGATGGATCCGG TGT GAC AAT AGC TTG CTG-3' | (<i>Bam</i> HI) |
| reppIIIfor | 5'-GTCAC <u>CCG GGT</u> TCC AAG AGA TGT GCC ACT CC-3' | (<i>Xma</i> I) |
| reppIIIrev | 5'-CGATGGATCC AGG AGT GGC ACA TCT CTT GG-3' | (<i>Bam</i> HI) |
| reppIVfor | 5'-GTCAC <u>CCG GGT</u> CAA CAT CCT AAG AAC CAG GAG-3' | (<i>Xma</i> I) |

| | | |
|---------------|--|------------------|
| reppIVrev | 5'-CGATGGATCC CTC CTG GTT CTT AGG ATG TTG-3' | (<i>Bam</i> HI) |
| reppVfor | 5'-GTCAC CCG GGC TTG CCC AAG AAA CCA CCT G-3' | (<i>Xma</i> I) |
| reppVrev | 5'-CGATGGATCC C AGG TGG TTT CTT GGG CAA G-3' | (<i>Bam</i> HI) |
| reppVIfor | 5'-GTCAC CCG GGA GTG CCC AAG TTC AAG GCA CT-3' | (<i>Xma</i> I) |
| reppVIrev | 5'-CGATGGATCCAG TGC CTT GAA CTT GGG CAC-3' | (<i>Bam</i> HI) |
| CoilNcoNeufor | 5'-CGTACC ATG GAG CTT TCT GGT TCT CTA GTT CAG-3' | (<i>Nco</i> I) |
| CoilPstIrev | 5'-CAGCTCTGCAG TTA GCA GTG GAA TCG AGT GG-3' | (<i>Pst</i> I) |

2.8.2 Klonierung von repp86-cDNA in *pGADT7*

| | | |
|--------------|---|------------------|
| GADreppXmaI | 5'-TTCCAC CCG GGT ATG TCA CAA GTT AAA AGC TC-3' | (<i>Xma</i> I) |
| GADreppBamHI | 5'-TCGATGGATCC TTA GCA GTG GAA TCG AGT GG-3' | (<i>Bam</i> HI) |

2.8.3 Klonierung von repp86 in *pFLAG-CMV2*

| | | |
|-----------|--|--------------------|
| FLreppFOR | 5'-CTGTAAG CTT ATG TCA CAA GTT AAA AGC TC-3' | (<i>Hind</i> III) |
| FLreppREV | 5'-CATCGGATCC TTA GCA GTG GAA TCG AGT GG-3' | (<i>Bam</i> HI) |

2.8.4 repp86-Sequenzierungs- und -PCR-Oligonukleotide

| | |
|------------|-------------------------------|
| start1for | 5'-ATCTGAGGCGAGGCTAGG-3' |
| start1rev | 5'-CCTAGCCTCGCCTCAGATC-3' |
| start9for | 5'-GTCTGTAGGGCCAATCGGGA-3' |
| start9rev | 5'-TCCCGATTGGCCCTACAGAC-3' |
| start7for | 5'-CGATACTGAATGAGTCCCGC-3' |
| start10for | 5'-AGCTGTTCCAGTGGACTCAC-3' |
| start10rev | 5'-CGTGAGTCCACTGGAACAGCT-3' |
| start11for | 5'-CTGAACCTTCAAGGGATAATG-3' |
| start12for | 5'-CCATTTATTATGTGATTTTGGAC-3' |
| PR1for | 5'-GCAGAGCACTCCGGTCTTTG-3' |
| PR6for | 5'-CTTGGAGAGGTCCAGGATGC-3' |
| RP6for | 5'-GACTCCTGGTCTCATGTGGT-3' |
| ext2rev | 5'-GTCTCCCACTTAACGCAGAAG-3' |
| 297rev | 5'-ACCGTTATTAGCCGACAGC-3' |
| 600for | 5'-CATGGTTTGAGGAGAAGGCC-3' |
| 600rev | 5'-GGCCTTCTCCTCAAACCATG-3' |
| 700for | 5'-CCAGTTGACAACACTTACTAC-3' |
| 700rev | 5'-CTGCCTCTTTGTAGTAAGTGTTG-3' |
| Afor | 5'-CAAGAAAACTCCAGCCCAGC-3' |
| Arev | 5'-GCTGGGCTGGAGTTTTTCTTG-3' |
| Bfor | 5'-CAAGAGGTGGTGGAGATGCG-3' |
| Dfor | 5'-GAGTGACTAAGGGATGTACC-3' |
| Drev | 5'-GGTACATCCCTTAGTCACTC-3' |
| Ffor | 5'-GCAAAAGTACAGCAGAGCTGG-3' |
| Frev | 5'-CCAGCTCTGCTGTACTTTTGC-3' |
| 1250for | 5'-GAACAGAATTTCGAATGCCAC-3' |
| 1250rev | 5'-GTGGGCATTCGAATTCTGTTC-3' |
| 1750for | 5'-GCTGGCTACTGAGAAGAGAGC-3' |
| 1750rev | 5'-GCTCTCTTCTCAGTAGCCAGC-3' |
| 1950for | 5'-CCAGCCTCTGACTGTGCCTG-3' |
| 1950rev | 5'-CAGGCACAGTCAGAGGCTGG-3' |
| Xrev | 5'-GGAAGTCAGAAGGAGGTACC-3' |

2.8.5 Klonierung von repp86- Promotorbereichen in *pGL3 Basic*

| | | |
|-------------|--|-----------------|
| PromSacIfor | 5'-TACCGAGCTCGGTTCAAGTGATTCTCCTGC-3' | (<i>Sac</i> I) |
| PromXhoIrev | 5'-AGATCTCGAGCGAATGCACCAATCAGAGCG-3' | (<i>Xho</i> I) |
| Pro33919rev | 5'-TACAGAGCTCGAAGTGTAGTCTCCTGCGC-3' | (<i>Sac</i> I) |
| Pro33061F | 5'-CGTAGAGCTCGAACTCATCGCCTCAAGTGATC-3' | (<i>Sac</i> I) |

| | | |
|-----------|---|---------|
| Pro33252F | 5'-CGTAGAGCTCTGGTCTCGTTATGATGTCTAC-3' | (Sac I) |
| Pro33443F | 5'-CGTAGAGCTCGGACATGTTTGTTCACACTTCTC-3' | (Sac I) |
| Pro33751F | 5'-CGTAGAGCTCCTTGGAGAGGTCCAGGATGC-3' | (Sac I) |
| Pro33850F | 5'-CGTAGAGCTCCGGTCTTTGTAATAACGTACTC-3' | (Sac I) |
| Pro33901F | 5'-GCTAGAGCTCGGCCGACAGGAGACTACACTTC-3' | (Sac I) |
| Pro33989R | 5'-CGATGAGCTCCTACAGACCGCAGCAATACC-3' | (Sac I) |
| Pro33897R | 5'-CGTAGAGCTCCTGAGTCCACTGGAACAGCTC-3' | (Sac I) |

2.8.6 Klonierung von SIAH2 in pFLAG-CMV2

| | | |
|--------------|---|------------|
| SIAH2FLAGfor | 5'-ATGCA AAG CTT ATG AGC CGC CCG TCC TCC AC-3' | (Hind III) |
| SIAH2FLAGrev | 5'-ATCCGGGATCC TGG ACA ACA TGT AGA AAT AGT AAC-3' | (Bam HI) |
| FLsiahCfor1 | 5'-GTCA AAG CTT CAC CTG GTG TGT AAC CAA TG-3' | (Hind III) |
| FlsiahCrev | 5'-GATCGGATCC TCA TGG ACA ACA TGT AGA AAT AG-3' | (Bam HI) |
| FlsiahNrev | 5'-GATCGGATCC TCA CAG GTG CCC GGC CTG GCA CTG-3' | (Bam HI) |

2.8.7 Mutagenese von pFLAG-CMV2-SIAH2 (Stop Codon)

| | |
|--------------|----------------------------------|
| SiahMutFlagF | 5'-CATGTTGTCCATGATCCCCGGGTGGC-3' |
| SiahMutFlagR | 5'-GCCACCCGGGATCATGGACAACATG-3' |

2.8.8 Klonierung von SIAH2 in pGEX-5X-1

| | | |
|------------|---|----------|
| SIAH1for | 5'-ATGCAGG ATC CAG ATG AGC CGC CCG TCC TCC AC-3' | (Bam HI) |
| SIAH972rev | 5'-ATCCGCTCGAG TGG ACA ACA TGT AGA AAT AGT AAC-3' | (Xho I) |
| GEXsiahRev | 5'-GACTCTCGAG TCA TGG ACA ACA TGT AGA AAT AG-3' | (Xho I) |

2.8.9 SIAH2-Sequenzierungsoligonukleotide

| | |
|--------------|-----------------------------|
| SIAHmitteRev | 5'-GTGATGGCCAAAACATGACTG-3' |
|--------------|-----------------------------|

2.8.10 Sequenzierungsoligonukleotide im Vektorbereich

| | |
|--------------|---------------------------------|
| pFLAG900for | 5'-AGTGAACCGTCAGAATTGATC-3' |
| pFLAG1074rev | 5'-ACTGGAGTGGCAACTTCCAAG-3' |
| 5pGEXseq | 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3' |
| 3pGEXseq | 5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3' |
| 5Amplimer | 5'-CTATTTCGATGATGAAGATACCCAC-3' |
| T7Seq | 5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3' |
| pGL3 | 5'-GCAAAATAGGCTGTCCCCAG-3' |

2.8.11 PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der Actin-cDNA

| | |
|------|---------------------------------------|
| actF | 5'-ATGGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3' |
| actR | 5'-TGAATGATGAGCCTTCGTGCCC-3' |

2.9 Größenstandards

Proteingrößenstandard für SDS-PAGE:

MultiMark[®] Multi-Colored Standard: Myosin: 185 kDa; Phosphorylase B: 98 kDa; Glutamindehydrogenase: 52 kDa; Karbonische Anhydrase: 31 kDa; Myoglobin: 19 und 17

kDa; Lysozym: 11 kDa; Aprotinin: 6 kDa; Insulin: 3 kDa in NuPAGE® Bis-Tris (MES)-Gelen (Fa. Invitrogen, Leek, Niederlande).

High M.W. Standard Mixture, 30-200 kDa: Proteingrößen: 205, 116, 97, 66, 45 und 29 kDa. Der Standard ist nicht vorgefärbt und wird nach der Auftrennung mit der Coomassie-Färbelösung gefärbt.

DNA-Größenstandard:

Smart Ladder™ : 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0 kbp (Fa. Eurogentec, Seraing, Belgien).

2.10 Datenbanken und Computerprogramme

Zur Auswertung von DNA-Sequenzen wurden Such- und Analysenprogramme *BLASTN* und *BLASTX* mit den Datenbanken Genbank, EST, EMBL und PDB abgeglichen.

Die Berechnung von isoelektrischen Punkten und theoretischen Molekulargewichten von Proteinen und Peptiden wurde mit *Peptide Mass* durchgeführt.

Analysen der Aminosäuresequenz zur Identifizierung von Motiven und Domänen wurden mit *ProfileScan*, *Coil*, *PairCoil*, *MultiCoil* und *PSORT* durchgeführt.

Zur Identifikation potentieller Phosphorylierungsstellen wurden die Programme *ScanPROSITE* und *NetPhos* verwendet.

Die Suche nach Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren in DNA-Sequenzen wurde mit Hilfe von MatInspector V2.2 in der Datenbank *TransFac* durchgeführt. Programme und Datenbanken sind unter folgenden Internetadressen zu finden:

| | | |
|--------------|--|------------------------------|
| BLAST | www.ncbi.nlm.nih.gov | (Altschul et al., 1990) |
| ProfileScan | www.isrec.isb-sib.ch | |
| PSORT | embnet.dkfz-heidelberg.de | (Horton und Nakai, 1996) |
| Coils v2.1 | www.ch.embnet.org | (Lupas et al., 1991) |
| Paircoil | nightingale.lcs.mit.edu | (Berger et al., 1995) |
| SwissProt | www.expasy.ch | (Bairoch und Apweiler, 2000) |
| Peptide Mass | www.expasy.ch | (Wilkins und Williams, 1997) |
| MultiCoil | nightingale.lcs.mit.edu | (Wolf et al., 1997) |
| Prosite | www.imb-jena.de | (Bairoch et al., 1997) |
| NetPhos | www.cbs.dtu.dk | (Blom et al., 1999) |
| TransFac | http://transfac.gbf.de | (Quandt et al., 1995) |

2.11 Organismen

2.11.1 Bakterienstämme

| | |
|-----------------------------|--|
| BL21, Fa. Stratagene: | <i>E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal</i> |
| TOP10, Fa. Invitrogen: | F <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> |
| TOP10F', Fa. Invitrogen: | F' { <i>lacI</i> ^q Tn10 (Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) F80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> |
| XL1-Blue, Fa. Stratagene: | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> ΔM15 Tn10 (Tet ^R)] |
| XL1Blue MR, Fa. Stratagene: | Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> |

2.11.2 Hefestämme

S. cerevisiae AH109, Fa. Clontech: *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2: :GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3: :MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*

2.11.3 Zelllinien

L428 (Hodgkin-Lymphom; DSMZ: ACC 197)

Die Zelllinie wurde aus der pleuralen Effusion einer 37 Jahre alten Patientin mit Hodgkin-Lymphom im Jahre 1978 etabliert (Schaadt et al., 1980; Drexler et al., 1993). L428-Zellen wachsen nicht adherent.

HEK293 (auch 293; *human embryonal kidney*; DSMZ: ACC 305)

Die Zelllinie wurde aus dem primären humanen embryonalen Nierengewebe durch Transformation mit dem Adenovirus Typ 2 etabliert und als Risikogruppe 1 nach den Vorgaben der Zentralen Kommission für Biologische Sicherheit eingestuft. HEK-293 sind adherent wachsende fibroblastoide Zellen. Die Zellen wurden freundlicherweise von PD S. Adam (Inst. für Immunologie, Kiel) zur Verfügung gestellt.

COS7 (*African green monkey kidney*, DSMZ: ACC 60)

Die Zelllinie wurde aus CV-1 (Zelllinie von *Cercopithecus aethiops*) durch Transformation mit der Origindefekten Mutante von SV-40 etabliert und als Risikogruppe 1 nach den Vorgaben der Zentralen Kommission für Biologische Sicherheit (ZKBS) eingestuft. COS7-Zellen sind fibroblastenähnliche Zellen, die adherent wachsen. Die Zellen wurden freundlicherweise von PD S. Adam (Inst. für Immunologie, Kiel) zur Verfügung gestellt.

2.12 Kulturmedien

Alle Medien wurden, soweit nicht anders ausgewiesen, autoklaviert.

2.12.1 *E. coli*-Kulturmedien

LB Broth:

10,0 g NaCl

10,0 g Trypton

5,0 g Hefeextrakt

LB Agar:

LB Broth

18,0 g Agar

Ad 1 l mit *Aqua bidest.*, pH 7,0, autoklavieren. Nach der Abkühlung auf 55°C erfolgte die Antibiotikazugabe: 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin.

SOC:

20,0 g Trypton

5,0 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

Ad 970 ml mit *Aqua bidest.*, autoklavieren, Nährmedium wurde mit folgenden filtersterilisierten Lösungen supplementiert:

10 ml 1 M MgCl₂

10 ml 1 M MgSO₄

10 ml 1 M Glukose

X-β-Gal-Stammlösung (40 mg/ml):

400 mg X-β-Gal

10 ml DMF

Die Stammlösung wird nicht autoklaviert, sondern aliquotiert und bei -20°C gelagert.

IPTG-Stammlösung (100 mM):

238 mg IPTG

10 ml *Aqua bidest.*

Die Stammlösung wurde sterilfiltriert und in Portionen zu je 1 ml bei -20°C gelagert.

2.12.2 Hefekulturmedien

Selektierende Aminosäuren wurden im Ein-Buchstaben-Code (s. 9.1.1) angegeben.

YPDA:

50,0 g YPD

YPDA Agar:

70,0 g YPD Agar

Ad 1 l mit *Aqua bidest.* auffüllen, pH 6,5 mit 5 M NaOH einstellen. Nach dem Abkühlen des Mediums auf 55°C wurden 15 ml 0,2 % Adeninhemisulfat zugegeben (Endkonzentration 0,003 %).

SD-Medium/-W/-L (mittelselektiv):

26,70 g Minimal SD Base

0,64 g DO/-W/-L

SD-Medium/-W/-L/-H/-Ade (hochselektiv):

26,70 g Minimal SD Base

0,60 g DO/-W/-L/-H/-Ade

Ad 1 l mit *Aqua bidest.* auffüllen, pH 5,8 mit 5 M NaOH einstellen.

SD-Agar/-W/-L (mittelselektiv):

46,70 g Minimal SD Agar Base

0,64 g DO/-W/-L

Ad 1 l mit *Aqua bidest.* auffüllen, pH 5,8 mit 5 M NaOH einstellen. Nach der Abkühlung des Agarnährbodens auf 55°C im Wasserbad wurde 1 ml 20 mg/ml X-α-Gal (hochselektiv) zugegeben.

SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X-α-Gal (hochselektiv)

46,70 g Minimal SD Base

0,60 g DO/-W/-L/-H/Ade

X-α-Gal-Stammlösung (20 mg/ml):

25,00 mg X-α-Gal

1,25 ml DMF

Die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

2.13 Puffer und Lösungen

2.13.1 Hefetransformation

10x TE-Puffer:

100,0 mM Tris

10,0 mM EDTA

pH 7,5 mit HCl einstellen

Transformationspuffer: 1x TE/1x Lithiumacetat:

1,0 ml 1,0 M Lithiumacetat-Lösung, pH 7,5 (steril)

1,0 ml 10x TE-Puffer, pH 7,5 (steril)

8,0 ml *Aqua bidest.* (steril)

Der Puffer wurde immer frisch vorbereitet.

PEG/Lithiumacetat-Lösung (10 ml):

1,0 ml 10x TE-Puffer, pH 7,5 (steril)

1,0 ml 10x Lithiumacetat-Lösung, pH 7,5 (steril)

8,0 ml 50 % PEG-Lösung (steril)

Der Puffer wurde immer frisch vorbereitet.

50 % PEG-Stammlösung:

50,0 g PEG 3350

Ad 100 ml mit sterilem *Aqua bidest.*

Zum Lösen auf 50°C erwärmen.

2.13.2 Zellkultur

10x PBS-Puffer:

0,010 M KH₂PO₄

0,100 M Na₂HPO₄

1,370 M NaCl

0,027 M KCl

pH (10x) 7,0

2x HBS-Puffer (Ca₃PO₄-Transfektion):

16,40 g NaCl

11,90 g HEPES

0,21 g Na₂HPO₄

Ad 1 l mit *Aqua bidest.* auffüllen, pH 7,17 mit 10 M NaOH einstellen und sterilfiltrieren. Der Puffer wurde in Kunststoffbehältern aufbewahrt.

Lysispuffer zur Herstellung der Gesamtlysate aus HEK293:

97,6 ml PBS

2,0 ml Triton X

0,4 ml 0,25 M EDTA

Der Puffer bleibt 5 Tage stabil, wenn er bei 4°C aufbewahrt wird. Unmittelbar vor der Zellyse wird Protease-Inhibitorcocktail (Roche) hinzugefügt.

2.13.3 SDS-PAGE und Proteintransfer2x Laemmli-Puffer:

1,51 g Tris

ad 50 ml mit *Aqua bidest.*, pH auf 6,8 einstellen

20 ml 100 % Glycerin

ad 100 ml mit *Aqua bidest.*,

20 mg Bromphenolblau

6 g SDS

Vor Gebrauch wird DTT zugegeben.

6x SDS-Proteinprobenpuffer:

0,350 M Tris-HCl, pH 6,8

10,280 % SDS

36,000 % Glycerol

5,000 % β -Mercaptoethanol

0,012 % Bromphenolblau

Laufpuffer:

NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)

Transferpuffer:

14,4 g Glycin

3,0 g TRIZMA Base

Ad 1 l mit *Aqua bidest.* auffüllen.10x Wasch- und Entwicklungspuffer (TBS):

0,20 M Tris

1,37 M NaCl

pH auf 7,6 mit HCl einstellen.

1x Waschpuffer (TBST):

100,00 ml 10x TBS

0,05 % Tween-20

Ad 1 l mit *Aqua bidest.* auffüllen.**2.13.4 Agarose-Gelelektrophorese**10x TBE-Puffer:

1,00 M Tris

0,90 M Borsäure

0,01 M EDTA

pH (10x) 8,4

10x DNA-Gelelektrophorese-Auftragspuffer

20,00 % Ficoll

1,00 % SDS

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol

Ethidiumbromid-Stammlösung: 0,5 mg/ml

Ethidiumbromid-Gelkonzentration: 0,5 μ g/ml

2.13.5 APAAP-Färbung

Entwicklungspuffer:

8,7 g NaCl

1,5 g Tris-HCl

4,9 g Tris Base

Ad 1 l mit *Aqua bidest.* auffüllen, pH 7,4

Propandiollösung:

21,000 g Propandiol

0,025 g Levamisol

Ad 1 l *Aqua bidest.* auffüllen, pH 9,7

Substratlösung:

0,031 g Naphthol AS-Biphosphat in 375 µl Dimethylformamin

125,000 µl 5 % Neufuchsin in 2 N HCl, pH 8,8

Kerngegenfärbung:

0,50 % Kaliumaluminiumsulfat

0,10 % Hämatoxylin

0,10 % kristalline Zitronensäure

0,05 % Chloralhydrat

0,02 % Natriumjodat in H₂O

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 HEK293 und COS7

HEK293- und COS7-Zellen wurden zu 1×10^6 Zellen in 20 ml DMEM mit 10 % FCS und je 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin/Penicillin bei 37°C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre drei Tage kultiviert. Nach der Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit 20 ml 1x PBS bei Raumtemperatur (RT) gewaschen und mit 3 ml 0,5 % Trypsinlösung (37°C), gefolgt von 5 min Inkubation im Brutschrank, abgelöst. Nach Zugabe von 30 ml Kulturmedium wurden die Zellen 5 min bei 300 g_n (RT) zentrifugiert. Das Zellpräzipitat wurde in 30 ml DMEM resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer, wobei 100 gezählte Zellen im Großquadrat 1×10^6 Zellen/ml entsprachen. Die Zellsuspension wurde nach Bedarf verdünnt, so daß 1×10^6 Zellen in 20 ml DMEM ausgesät wurden.

3.1.2 L428

L428-Zellen wurden zu 1×10^6 in 50 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS bei 37°C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre jeweils 3 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 300 g_n zentrifugiert, in 50 ml 1x PBS gewaschen, in 30 ml RPMI 1640 resuspendiert und gezählt (Neubauer Zählkammer). Nach der entsprechenden Verdünnung wurden die Zellen wieder zu 1×10^6 in 50 ml RPMI 1640 ausgesät.

3.1.3 *Saccharomyces cerevisiae* AH109

Der Hefestamm AH109 wurde aus der Glycerinkultur (Clontech) auf YPDA Agar ausgestrichen. Einzelne Kolonien wurden in YPDA-Medium bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Transformierte Hefezellen wurden auf entsprechenden selektiven Substraten ausgestrichen und in korrespondierenden Flüssigmedien bei 30°C unter Schütteln kultiviert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 mRNA-Präparation

Das *Poly(A)Pure mRNA Isolation Kit* wurde von der Fa. Ambion bezogen. Das System unterstützt eine effiziente Hybridisierung von Nukleinsäuren (Thompson und Gillespie, 1987), so daß mRNA-Moleküle aufgrund einer Poly(A)-Selektion angereichert werden können (Chirgwin et al., 1979). Die mRNA-Präparation aus 1×10^7 bis 1×10^8 L428-Zellen erfolgte strikt nach dem Herstellerprotokoll. Nach der Bindung von mRNA an Oligo(dT)-Cellulose wurden die Komplexe mit Puffern verschiedener Salzkonzentration mehrfach gewaschen, um ribosomale RNA (rRNA) und unspezifisch gebundenes Material zu entfernen. Die eluierte mRNA wurde anschließend mit 0,1 Volumen 5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen 100 % Ethanol präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 20 bis 50 μ l DEPC-H₂O/EDTA resuspendiert. Die Konzentration der mRNA wurde photometrisch und die Integrität gelelektrophoretisch bestimmt. Nach der Portionierung wurde die mRNA bei -70°C aufbewahrt.

3.2.2 Behandlung der mRNA mit *DNase I*

Zur Entfernung von DNA-Verunreinigungen aus mRNA-Proben wurden 20 μ l RNA-Lösung mit 5 μ l DEPC-H₂O, 2 μ l 10x Transkriptionspuffer, 1 μ l 40 U/ μ l *RNasin*, 1 μ l 200 mM DTT und 1 μ l 2 U/ μ l *DNase I* versetzt. *RNasin* und DTT wurden von Promega und Amersham Pharmacia bezogen, die restlichen Komponenten wurden aus dem *MaxiScript Kit* der Fa. Ambion entnommen. Die Proben wurden 30 min bei 37°C inkubiert, mit 1 μ l 0,5 M EDTA versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Nach Zugabe von 27 μ l DEPC-H₂O, 5 μ l 5 M Ammoniumacetat und 2 μ l Glykogenlösung wurden die Proben gut gemischt und mit 165 μ l 96 % Ethanol versetzt. Die RNA-Präzipitation wurde durch Inkubation bei -70°C für 30 min beschleunigt. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 15000 g_n und 4°C zentrifugiert. Die Präzipitate wurden in 200 μ l 70 % Ethanol gewaschen und in 20 μ l DEPC-H₂O resuspendiert.

3.2.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA aus mRNA erfolgte mit Hilfe des *First-Strand cDNA Synthesis Kit* der Fa. Amersham Pharmacia Biotech (Okayama und Berg, 1982). Die reverse Transkription wurde mit dem bifunktionellen Oligonukleotid *Not I*-d(T)₁₈ und 100 bis 150 ng mRNA durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden mit TE-Puffer (pH 8,0) verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion („*polymerase chain reaction*“, PCR) wurde im allgemeinen nach der Methodik von Saiki durchgeführt (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988). Die Amplifikate wurden entweder direkt zur Auswertung der Experimente zur repp86-Regulation, zum Transkriptionsstart oder für die Subklonierung verwendet. Die Schmelztemperatur T_m der Oligonukleotide wurde nach der Formel $T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 5$ abgeschätzt (Suggs et al., 1981). Die Dauer des Elongationsschrittes bei 72°C war von der Länge des zu synthetisierenden Produktes und der DNA-Polymerase abhängig.

3.2.4.1 PCR zur repp86-Regulation

In den Experimenten zur repp86-Regulation (4.2) waren folgende PCR-Bedingungen gegeben: Nach der Bestimmung der mRNA-Konzentration und der cDNA-Synthese aus je 20 µl mRNA-Lösung wurden 30,00; 3,00; 0,30 und 0,03 ng cDNA in der PCR eingesetzt. In 20 µl Volumen wurden 1 bis 2,4 µl cDNA, 1 µl 10 pmol/µl Oligonukleotid *startIfor*, 1 µl 10 pmol/µl Oligonukleotid *297rev*, 2 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl 10 mM dNTP-Mix, 0,3 µl 100 µg/µl BSA und 0,8 µl 5 U/µl *Taq*-Polymerase pipettiert. Nach 2 min Initialdenaturierung bei 95°C erfolgten 33 Temperaturzyklen (40 s 94°C, 20 s 55°C, 40 s 72°C) mit finalelem Elongationsschritt von 72°C für 5 min. In Parallelansätzen wurden Bereiche von β-Actin-cDNA mit actinspezifischen Oligonukleotiden *actF* und *actR* mit der gleichen cDNA-Verdünnungsreihe amplifiziert.

3.2.4.2 PCR zum Transkriptionsstart

In der Initial-PCR zum repp86-Transkriptionsstart (4.7.2.1) wurden 2,0 µl sscDNA-Bibliothek, 2,5 µl 10 µM *IRC*-Oligonukleotid, 2,5 µl 5 pmol/µl *600rev*-Oligonukleotid bzw. Kontroll-Oligonukleotid 1, 5,0 µl 10x PCR-Puffer, 2,0 µl 50 % Glycerin, 1,0 µl 10 mM

dNTP-Mix, 0,5 µl 25 mM MgCl₂, 0,3 µl 10 mg/ml BSA, 0,5 µl 5 U/µl *Taq* Polymerase und 34,7 µl *Aqua bidest.* pipettiert. Die Ansätze wurden 3 min bei 95°C denaturiert. Der Temperaturzyklus (30 s 95°C, 20 s 54°C, 50 s 72°C) wurde 35x wiederholt. In der *nested*-PCR (4.7.2.1) wurden die Produkte der Initial-PCR mit den inneren spezifischen Oligonukleotiden unter gleichen Bedingungen reamplifiziert.

3.2.4.3 PCR zur *in vitro*-Rekombination von DNA

Zur Subklonierung von DNA-Abschnitten in Vektoren wurde die Matrizen-DNA bei 95°C für 2 min denaturiert. 5'-Bereiche der Klonierungsoligonukleotide enthielten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen und wurden in Konzentrationen von 0,25 bis 0,5 pmol/µl Reaktion eingesetzt. Nach zwei Temperaturzyklen von 30 bis 60 s 95°C, 30 s 50 bis 55°C und 1 bis 4 min 72°C erfolgten 30 bis 40 Temperaturzyklen mit erhöhter Hybridisierungstemperatur von 65 bis 68°C. Im finalen Elongationsschritt für 5 bis 10 min bei 72°C wurde eine vollständige Polymerisierung der Produkte angestrebt. Die Proben wurden nach der erfolgten PCR auf 4°C gekühlt. Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde zur Überprüfung der Produktlänge stets in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde mittels UV-Spektrometer bestimmt. Hierbei wurde die Nukleinsäure 1:100 in Wasser verdünnt. Als Referenz diente Wasser oder der in Wasser entsprechend verdünnte Lösungspuffer. Eine bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm gemessene OD-Einheit (OD₂₆₀) entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml oder einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook et al., 1989). Mit Hilfe des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ wurde eine Aussage über den Verunreinigungsgrad der Nukleinsäuren mit Proteinen und Phenolen getroffen. Die DNA- bzw. RNA-Lösung wurde als rein angesehen, wenn der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 lag.

3.2.6 *in vitro*-Rekombination von DNA

Die *in vitro*-Rekombination von DNA beschränkte sich im wesentlichen auf die Erzeugung von Vektorkonstrukten, die im Zuge der Experimente zum *Yeast Two-Hybrid System*, zur Koimmunpräzipitation und für die Promotorstudien eingesetzt wurden. Detaillierte Informationen zur Herstellung einzelner Konstrukte wurden in den entsprechenden Kapiteln

der Ergebnisse zusammengestellt. Vektorkarten sind im Anhang zu finden. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.8 aufgeführt.

3.2.6.1 Enzymatische Restriktion der PCR-Produkte und Vektor-DNA

Der Restriktionsverdau wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl unter Zugabe von 10 µl 10x Restriktionspuffer, 60 U Restriktionsendonuklease(n), 10 mg/ml BSA in einer Endkonzentration von 100 µg/ml und *Aqua bidest.* für 3 h bei 37°C durchgeführt. In separaten Ansätzen wurden unter gleichen Bedingungen 5 bis 7 µg Vektor-DNA für 2 h geschnitten.

Ansätze mit den PCR-Produkten wurden nach dem abgeschlossenen Verdau mit 100 µl *Aqua bidest.* auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

3.2.6.2 Dephosphorylierung der geschnittenen Vektor-DNA

Nach 2 h Restriktionsreaktion wurden die Ansätze mit der Vektor-DNA mit 11 µl 10 x CIP-Puffer und 1,2 µl 1 U/µl Alkalische Phosphatase versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 1,2 µl 1 U/µl Alkalische Phosphatase wurden die Proben erneut 30 min bei 37°C inkubiert und mit 86,6 µl *Aqua bidest.* auf 200 µl aufgefüllt.

3.2.6.3 Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation der DNA

Ansätze mit verdauten PCR-Produkten und Vektoren wurden mit 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) aufgefüllt und kräftig gemischt. Während der folgenden Zentrifugation für 15 min bei 15000 g_n erfolgte die Phasentrennung. Die obere wäßrige Phase wurde umpipettiert, mit 20 µl 3 M Ammoniumacetat und 600 µl 100 % Ethanol gemischt und 30 min bei -70°C inkubiert. Die Ansätze wurden 15 min bei 15000 g_n und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die ausgefallene DNA wurde mit 600 µl 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 bis 40 µl *Aqua bidest.* gelöst. Die Integrität der DNA und die Vollständigkeit des Verdau wurden in der Gelelektrophorese verifiziert. Nach der Konzentrationsbestimmung (3.2.5) wurden Ligationsansätze vorbereitet.

3.2.6.4 Ligation von DNA mit T4 DNA-Ligase

Im allgemeinen wurden DNA-Moleküle mit kohäsiven überhängenden Enden („sticky ends“) ligiert. Die einzusetzenden DNA-Stoffmengen wurden mit der Formel

$$\mathbf{X \text{ ng Insert}} = \frac{10}{1} \times \frac{\mathbf{A \text{ ng Vektor} \times B \text{ kbp Insert}}}{\mathbf{C \text{ kbp Vektor}}}$$

so errechnet, daß die zu klonierende DNA im 10fachen molaren Überschuß im Vergleich zur Vektor-DNA eingesetzt wurde. Es wurden generell 60 bis 80 ng Vektor-DNA pro Ansatz verwendet. Die Ligation der kompatiblen kohäsiven Enden erfolgte in 10 µl Gesamtvolumen und wurde bei 4°C über Nacht oder 2 h bei RT inkubiert. Wenn lediglich eine Restriktionsendonuklease im Klonierungsprotokoll verwendet wurde, wurde die Mischung aus Vektor- und Insert-DNA zuerst 5 min bei 45°C inkubiert, um bereits hybridisierte DNA zu schmelzen und damit die Ligationseffizienz zu erhöhen. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden Ligationspuffer und Ligase nach Vorgaben des Herstellers (Fa. Boehringer Ingelheim) hinzugefügt. Nach der abgeschlossenen Ligrationsreaktion wurden die Ansätze bis zur weiteren Verarbeitung (3.2.8) bei -20°C eingefroren.

3.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von PCR- und Restriktionsprodukten wurde durch Elektrophorese in 0,8 bis 1,2 % TBE-Agarosegelen mit 5 ng/ml Ethidiumbromid durchgeführt (McDonell et al., 1977; Southern, 1979a; Southern, 1979b). Die Probe wurde 1/10 mit dem 10x DNA-Auftragspuffer gemischt. Als Größen- und Mengenstandard wurden 5 µl *Smart Ladder* (Fa. Eurogentec) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 6 V/cm Gel. Die Detektion und Dokumentation erfolgten in der Geldokumentationsanlage GeldDoc (Fa. Bio-Rad).

3.2.8 Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli*

Für Transformationen wurden *Epicurian Coli XL1Blue Supercompetent cells* (Fa. Stratagene) und *E. coli* TOP10 (Fa. Invitrogen) verwendet. Die Transformationen wurden nach den Vorgaben der Hersteller durchgeführt. Generell wurden 50 ng Plasmid oder 7,5 bis 10 µl Ligrationsansatz verwendet. 100 µl der Ligationstransformanten bzw. 250 µl Transformationsvolumen aus der *Yeast Two-Hybrid*-Transformation wurden auf LB-Agar plattiert, die mit 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin versetzt waren.

Nachdem die LB-Agarplatten bei 37°C über Nacht inkubiert worden waren, wurden jeweils drei bis zwölf Bakterienkolonien in je 6 ml LB-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) überimpft und über Nacht bei 37°C und unter Schütteln vermehrt.

3.2.9 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Fragmente, die in der PCR mit der *Thermus aquaticus*-DNA-Polymerase amplifiziert waren, wurden im Verfahren der TOPO TA™-Klonierung (Fa. Invitrogen) in den Vektor *pCR2.1* (Vektorkarte in 9.2.5) ligiert und in *E.coli* TOP10 transformiert. Die Methode beruht auf der nicht-matrizenabhängigen terminalen Transferaseaktivität der *Taq*-Polymerase, die einzelne Desoxyadenosine an die 3'-Enden der PCR-Produkte addiert. Die Produkte werden in den linearisierten Vektor *pCR2.1* mit T-Überhängen ligiert. In der Ligation wurden 2 bis 4 µl PCR-Reaktion eingesetzt. Die Transformation wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.10 Plasmidpräparation aus *E. coli* im Mini-Maßstab

6 ml LB-Medium mit 50-100 µg/ml Antibiotikum wurden mit einer separat wachsenden Kolonie inokuliert und 16 h bei 37°C und unter Schütteln inkubiert. Aus der Kultur wurden 300 µl entnommen, mit 125 µl 87 % wäßriger Glycerinlösung versetzt und bei -80°C eingefroren. Der Rest der Bakterienkultur wurde für die Plasmidisolation verwendet.

Die Plasmidpräparation (E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II, Fa. PeqLab) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) wurde entsprechend der Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Nach der Elution der Plasmide mit 50 bis 70 µl Tris-HCl (pH 8,0) wurde die DNA-Konzentration gemessen.

3.2.11 Plasmidpräparation aus *E. coli* im Maxi-Maßstab

2,5 ml LB-Medium mit 50-100 µg/ml Antibiotikum wurden mit einer separat wachsenden Kolonie inokuliert und 7 h bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 bis 250 ml LB-Medium mit 50-100 µg/ml Antibiotikum mit 1 bis 2,5 ml der Vorkultur inokuliert und 16 h bei 37°C und unter Schütteln inkubiert. Die Plasmidpräparation (Qiagen® Plasmid Maxiprep Kit, Fa. Qiagen) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse wurde entsprechend der Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Nach der Lösung des DNA-Präzipitates in 200 bis 500 µl Tris-HCl (pH 8,0) oder in *Aqua bidest.* (Plasmid-DNA für Transfektionen) wurde die DNA-Konzentration gemessen.

3.2.12 Präparation von „*bacterial artificial chromosome*“ (BAC) aus *E. coli*

Die Präparation von BAC aus *E. coli* wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit Hilfe des Qiagen® Plasmid Maxiprep Kit (Fa. Qiagen) mit verändertem Protokoll durchgeführt. Da die BAC-DNA im allgemeinen in geringer Kopienzahl in der Zelle vorhanden ist, wurde sie wie „*very low copy*“-DNA behandelt und aus insgesamt 500 ml Bakterienkultur isoliert. Die Veränderung des Maxiprep-Protokolls bestand darin, daß das klare Bakterienlysat über einen Papierfilter auf die Anionenaustauschersäule geladen wurde. Der Schritt sollte Verunreinigungen mit bakterieller chromosomaler DNA minimieren. Die zweite Modifikation betraf die Elution der BAC-DNA von der Säule. Hierbei wurde mit dem auf 60°C aufgewärmten Elutionspuffer eluiert. Die mit 2,5 Volumina Isopropanol präzipitierte BAC-DNA wurde in 100 µl TE (pH 8,0) gelöst.

3.2.13 Kontrollverdau der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Die Kontrollrestriktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 300 bis 600 ng Konstrukt, (je) 6 U Restriktionsendonuklease(n) und, wenn notwendig, mit 0,1 mg/ml BSA im entsprechenden Restriktionspuffer angesetzt. Die Reaktion wurde 1,5 h bei 37°C inkubiert, im 1 % TBE-Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und visualisiert.

3.2.14 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxynukleotidmethode durchgeführt (Sanger et al., 1977). Zu sequenzierende PCR-Produkte wurden generell zuerst subkloniert. Je 500 bis 800 ng Plasmid-DNA wurden mit 1,0 µl 10 pmol/µl vektorspezifischer oder insertspezifischer Oligonukleotide, 4 µl Reaktionspuffer *Premix* (Fa. PE Applied Biosystems) und 12 µl *Aqua bidest.* auf ein Gesamtvolumen von 22 µl gebracht. Das Sequenzierungsprogramm mit der Initialdenaturierung bei 96°C für 1 min und 30 Temperaturzyklen (30 s 96°C; 20 s 50-55°C; 4 min 60°C) wurde mit der Kühlung der Proben auf 4°C abgeschlossen. Nach der Aufreinigung der Sequenzierungsreaktionen via DyeEx® Spin Säulen (Fa. Qiagen) wurden 15 µl Säulendurchfluß mit 10 µl *Aqua bidest.* verdünnt, 2 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Die Auftrennung und Detektion der Produkte wurde kapillarelektrophoretisch im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Fa. PE Applied Biosystems) unter Standardbedingungen durchgeführt.

3.2.15 Gerichtete Mutagenese rekombinanter DNA

Die gerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kits* (Fa. Stratagene) durchgeführt (Braman et al., 1996). Die Methode basiert auf der Amplifikation doppelsträngiger Plasmid-DNA mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden, welche die gewünschte Mutation enthalten. Die Reaktion wird mit hoher Fidelität von der *Pfu*-Polymerase katalysiert. Die parentale Plasmid-DNA wird aus Bakterien isoliert und ist somit methyliert. Nach der PCR wird der gesamte Ansatz mit der für methylierte und hemimethylierte DNA spezifischen Endonuklease *Dpn I* inkubiert, die für den Verdau parentaler DNA eingesetzt wird. Die amplifizierte Plasmid-DNA ist nicht methyliert und wird in *E. coli* transformiert und amplifiziert.

3.2.16 Bestimmung des Titors und Amplifikation der Lymphknoten-cDNA-Bibliothek

Die Lymphknoten-cDNA-Bibliothek wurde in *E. coli* BNN132 als Glycerinkultur von der Fa. Clontech bezogen. Die Bibliothek enthielt nach Herstellerangaben $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone im Plasmid *pACT2*. Die Bestimmung des Titors wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Ein Aliquot der Lymphknoten-cDNA-Bibliothek wurde auf Eis aufgetaut und gemischt. 1 µl des Aliquots wurde in 1 ml LB-Medium überführt (Verdünnung A, $1:10^3$). 1 µl Verdünnung A wurde anschließend in 1 ml LB-Medium überführt und gut gemischt (Verdünnung B, $1:10^6$).

1 µl Verdünnung A wurde in 50 µl LB-Medium aufgenommen und auf LB Agar mit 100 µg/ml Ampicillin plattiert. Ebenso wurden 50 und 100 µl Verdünnung B auf LB Agar mit 100 µg/ml Ampicillin plattiert. Die Platten wurden 36 h bei 30°C inkubiert und die Kolonien gezählt. Für Verdünnung A wurde der Titer mit der Formel

$$X \text{ Kolonien} \times 10^3 \times 10^3 = Y \text{ KBE/ml}$$

errechnet. Für Verdünnung B galt:

$$[X \text{ Kolonien/plattiertes Volumen}] \times 10^3 \times 10^3 \times 10^3 = Y \text{ KBE/ml.}$$

Nach der Titerbestimmung wurde die dreifache Menge der unabhängigen Klone also $3 \times 3,5 \times 10^6 = 1,05 \times 10^7$ unabhängige Klone auf LB Agar/Ampicillin auf 150 mm-Platten zu je 35000 KBE/Platte plattiert. Nach 36 h Inkubation bei 30°C wurden die Kolonien im LB-Medium mit 25 % Glycerin aufgenommen und gesammelt. Aus einem Drittel der Bakterienernte wurden Plasmide (Qiagen®*Maxi Prep Kit*, Fa. Qiagen) isoliert, der Rest wurde portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

3.2.17 Transformation von *S. cerevisiae* AH109 mit Plasmid-DNA

Die Transformationen wurden gemäß der vom Hersteller empfohlenen Methode durchgeführt (Gietz et al., 1992). *Saccharomyces cerevisiae* AH109 wurde aus der Glycerinkultur auf YPDA-Agar ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Einzelne Hefekolonien wurden in 50 ml YPDA-Medium bei 30°C und unter Schütteln über Nacht kultiviert. Ein Teil der Übernachtskultur wurde in 300 ml YPDA überführt, so daß die OD₆₀₀ (1 ml) bei 0,2+/-0,1 lag, und bei gleichen Bedingungen weiter inkubiert, bis die OD₆₀₀ (1 ml) 0,5+/-0,1 betrug. Die Zellen wurden auf 50 ml-Röhrchen verteilt und bei 500 g_n 7 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 ml TE-Puffer (pH 7,5) gewaschen und in 1 ml 1x TE/1x Lithiumacetat resuspendiert.

Für die Transformationen wurden Plasmide des *Yeast Two-Hybrid Systems 3* (Fa. Clontech) verwendet: *pGBKT7-Insert*, *pGBKT7-53* (Kontrollvektor), *pGADT7-Insert*, *pGADT7-T* (Kontrollvektor), *pCL3* (Kontrollvektor) und *pGBKT7-Lam* (Kontrollvektor).

Bei Transformationen einzelner Plasmide wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. In Kotreformationen wurden 200 ng „Köder“-Konstrukt (*pGBKT7-Insert*) und 100 ng Interaktor-Konstrukt eingesetzt. Als Trägermaterial dienten 0,1 mg denaturierte Heringhoden-DNA. 300 µl der transformierten Hefen wurden auf entsprechenden selektiven Substraten plattiert und 3 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert.

3.2.18 Transformation der Lymphknoten-cDNA-Bibliothek in *S. cerevisiae* AH109

Die Transformation im Bibliothekmaßstab wurde sequenziell und gemäß dem Herstellerprotokoll (Fa. Clontech) durchgeführt (Gietz et al., 1992). *S. cerevisiae* AH109 wurde zuerst mit dem *pGBKT7-repp86*-Konstrukt im Kleinmaßstab transformiert (3.2.14). Einzelne Kolonien wurden in 50 ml SD/-W (W = Tryptophan, Ein-Buchstaben-Code; s. 9.1.1) überführt und über Nacht bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Ein Teil der Übernachtskultur wurde in 1 l SD/-W überführt, so daß die OD₆₀₀ (1 ml) bei 0,2+/-0,1 lag und unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert, bis die OD₆₀₀ (1 ml) 0,5+/-0,1 betrug. Die Hefekultur wurde anschließend 10 min bei 500 g_n zentrifugiert, mit insgesamt 250 ml TE-Puffer (pH 7,5) gewaschen und in 8 ml 1x TE/1x Lithiumacetat resuspendiert.

0,7 mg *pACT2-Bibliothek* sowie 20 mg Heringhoden-DNA als Trägermaterial wurden miteinander gemischt. Die DNA-Mischung wurde in 8 ml Suspension kompetenter Hefezellen überführt und gemischt. Nach Zugabe von 60 ml PEG/1x TE/1x Lithiumacetat-Puffer wurde

erneut gemischt und 30 min bei 30°C und unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml DMSO wurde der Transformationsansatz vorsichtig geschwenkt und 15 min bei 42°C inkubiert. Nachdem der Ansatz 5 min auf Eis abgekühlt war, wurde das Transformationsvolumen auf 50 ml-Röhrchen verteilt und 10 min bei 500 g_n und RT zentrifugiert. Die Zellpräzipitate wurden vereinigt und in 10 ml TE (pH 7,5) resuspendiert.

Die Transformanten wurden auf Substraten mit hoher Stringenz (SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X- α -Gal) plattiert. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code (W, L, H) angegeben (s. 9.1.1). Als Positive wurden Hefekolonien ausgewählt, die auf dem hochselektiven Substrat aufgrund der α -Galaktosidaseaktivität blau gefärbt waren und einen blauen Hof in der Agarschicht ausgebildet hatten.

3.2.19 Kontrollen im *Yeast Two-Hybrid-System*

Als Positivkontrolle für eine Interaktion wurden die Konstrukte *pGBKT7-53* und *pGADT7-T*, die u.a. für die miteinander interagierenden Proteine Maus-p53₍₇₂₋₃₉₀₎ und SV40 *large T-antigen*₍₈₄₋₇₀₈₎ kodieren, in AH109 im kleinen Maßstab kotransformiert (Li und Fields, 1993; Iwabuchi et al., 1993). Als Negativkontrolle wurden *pGBKT7-Lam*, welches für das humane Lamin C₍₆₆₋₂₃₀₎ kodiert, und das *pACT2*-Bibliothekskonstrukt des Interaktors kotransformiert. Da Lamin C kaum mit anderen Proteinen interagiert oder Komplexe bildet, eignet es sich besonders gut als eine interne Negativkontrolle im *Yeast Two-Hybrid-System* (Bartel et al., 1993; Ye und Worman, 1995).

3.2.20 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae* AH109

Die auf mittel- oder hochselektiven Substraten gewachsenen Hefekolonien wurden in 3 ml Selektivmedium überführt und über Nacht bei 30°C und unter Schütteln inkubiert. Aus 0,5 ml der Übernachtskultur wurde eine Glycerin-Stammkultur angelegt. 1 ml der Übernachtskultur wurde 5 s bei 15000 g_n abzentrifugiert, in 70 μ l TE-Puffer (pH 7,5) resuspendiert, mit 20 μ l 5 U/ μ l Lyticase versetzt und 2 h bei 37°C inkubiert (Ling et al., 1995). Nach Zugabe von 20 μ l 20 % SDS wurde der Ansatz 1 min gemischt und für 1 h oder über Nacht bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Probe erneut gemischt, mit 160 μ l TE (pH 7,0) und 300 μ l Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,5-8,0) aufgefüllt und 3 min gemischt. Nach 15 min Zentrifugation bei 15000 g_n (RT) wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 16 μ l 10 M Ammoniumacetat und 750 μ l 96 %

Ethanol versetzt und 1 h bei -70°C oder über Nacht bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen und nach 15 min Zentrifugation bei 15000 g_n und RT wurde das DNA-Präzipitat mit $800\text{ }\mu\text{l}$ 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in $15\text{ }\mu\text{l}$ *Aqua bidest.* gelöst.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Koimmunpräzipitation von Proteinen

3.3.1.1 Aussaat der HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden zu 1×10^6 Zellen in 50 ml DMEM, 10 % FCS und je $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und Penicillin ausgesät. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C in 5 %iger CO_2 -Atmosphäre wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen wurden mit 40 ml PBS gewaschen und mit 7 ml 0,05 % Trypsinlösung behandelt. Nach Zugabe von 40 ml DMEM wurde die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt und 5 min bei 300 g_n zentrifugiert. Das Zellpräzipitat wurde in 30 ml DMEM resuspendiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer wurden 1×10^6 Zellen pro 10 cm-Kulturschale in 10 ml DMEM, 10 % FCS und $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und Penicillin ausgesät und 24 h inkubiert.

3.3.1.2 Transiente Kalziumphosphattransfektion von HEK293-Zellen

Die Transfektionen wurden nach der Kalziumphosphatpräzipitationsmethode durchgeführt (Graham und van der Eb, 1973; Wigler et al., 1978). Für die Kotransfektion von 1×10^6 HEK293-Zellen wurde die Mischung aus je $3\text{ }\mu\text{g}$ *pRK5-repp86* (zur Verfügung gestellt von PD. S. Adam, Inst. für Immunologie, Kiel), $3\text{ }\mu\text{g}$ eines der *pFLAG-CMV2-SIAH2*-Konstrukte und $50\text{ }\mu\text{l}$ 2,5 M CaCl_2 -Lösung in insgesamt 0,5 ml wässriger Lösung in 0,5 ml 2x HBS-Puffer (pH 7,17) vorsichtig unter Schütteln (Vortex Genie 2, Stufe 3, Fa. Heidolph) geträufelt und tropfenweise in die Zellkultur gegeben. Als Negativkontrollen wurden je $3\text{ }\mu\text{g}$ *pRK5* und *pFLAG-CMV2* kotransformiert. Die Zellkulturen wurden anschließend 24 h bei 37°C in 5 %iger CO_2 -Atmosphäre inkubiert und danach lysiert. Die Transfektionsbedingungen galten auch für COS7-Zellen, die in Doppelfluoreszenzfärbungen eingesetzt wurden (3.4.4).

3.3.1.3 Antikörperbindung an Protein A-Sepharose

1 ml Protein A-Sepharose-Beads wurden dreimal mit 1 ml PBS gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und mit $100\text{ }\mu\text{l}$ 1,8 mg/ml Kaninchen-anti-Maus IgG + IgM 1 h auf Eis geschüttelt. Nach dem anschließenden dreimaligen Waschen in je $500\text{ }\mu\text{l}$ PBS wurden die

Komplexe aus Protein A-Sepharose und dem Primärantikörper in 1 ml PBS aufgenommen. 300 μ l der Komplexe wurden anschließend mit 20 μ l 1 μ g/ μ l anti-FLAG-Antikörper 1 h auf Eis unter Schütteln inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (5 s, 15000 g_n) wurden die Komplexe dreimal mit PBS gewaschen und der Versuchsanordnung entsprechend auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt.

3.3.1.4 Herstellung der Gesamtlysate aus HEK-293

Kontrollzellen und transfizierte Zellen wurden von den 10 cm-Kulturschalen unter Zugabe von 100 μ l Proteaseinhibitor mechanisch abgelöst, zweimal in 50 ml PBS gewaschen und gezählt. 1×10^8 Zellen wurden in 1 ml Lysispuffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden kurzen Zentrifugation (5 s, 15000 g_n , 4°C) wurden die Lysate in neue Reaktionsgefäße pipettiert. Das Lysat wurde mit 100 μ l Protein A-Sepharose, die vorher mit PBS gewaschen wurde, 30 min auf Eis inkubiert, um die an Protein A-Sepharose unspezifisch bindenden Proteine durch diesen Reinigungsschritt zu entfernen. Nach kurzem Abzentrifugieren (5 s, 15000 g_n , 4°C) wurde das Lysat mit 100 μ l frischer Protein A-Sepharose inkubiert und anschließend in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert.

3.3.1.5 Kopräzipitation der Interaktoren

Protein A-Sepharose-Antikörperkomplexe (3.3.1.3) wurden 1 h mit den jeweiligen aufgereinigten Zellysaten auf Eis unter Schütteln inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Protein A-Sepharosepräzipitate zweimal mit 500 μ l PBS gewaschen, in 300 bis 400 μ l 2x Laemmli-Puffer resuspendiert und 5 min bei 95°C inkubiert. Durch die Zentrifugation der Proben bei 14000 g_n für 5 min wurde Protein A-Sepharose präzipitiert. Der Überstand mit den Antikörper-Proteinkomplexen wurde in neue Reaktionsgefäße überführt.

3.3.2 Herstellung von Proteinextrakten aus AH109

Einzelne Hefekolonien wurden in 3 ml Vollmedium (YPDA) oder Selektivmedium überführt und bei 30°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Ein Teil der Übernachtskultur wurde in 50 ml des entsprechenden Mediums überführt, so daß die OD₆₀₀ (1 ml) bei 0,2+/-0,1 lag. Nach 2 bis 5 h Inkubation bei 30°C unter Schütteln wurde die Zellsuspension (OD₆₀₀ (1 ml) = 0,5+/-,1) bei 500 g_n und 4°C zentrifugiert, mit 30 ml PBS (4°C) gewaschen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Je nach Zellzahl wurde das Zellpräzipitat in 50 bis 100 μ l eiskaltem PBS/Protease-Inhibitorcocktail resuspendiert und mit 20 bis 40 μ l 6x SDS-Protein-

Auftragspuffer vermischt. Die Zellsuspensionen wurden auf Eis gestellt und nacheinander drei Sonifikationsschritten von je 7 Impulsen unterzogen. Nach kurzem Mischen wurden die Proben 5 min bei 100°C im Wasserbad gekocht, 5 min bei 15000 g_n und 4°C zentrifugiert und sofort in der SDS-PAGE aufgetragen oder zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

3.3.3 Messung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das *Coomassie® Protein Assay Reagent* (CPAR) der Fa. Pierce verwendet (Bradford, 1976). Coomassie „Brilliant Blue“ G 250 bindet an Proteine, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Eine Kalibrierungskurve wurde mit in *Aqua bidest.* gelöstem BSA in Konzentrationen von 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 und 2,00 mg/ml erstellt. Je 5 µl Proteinextrakt wurden in 1 ml CPAR pipettiert und bei 595 nm im Photometer (SpecSmart 3000™, Fa. Eppendorf) gemessen.

3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970) wurde in 7,5-bis 15 % oder 4 bis 12 % Gelen durchgeführt.

Gekochte Proteinkopräzipitate wurden in 7,5-15 % (oder 10-20 %) SDS-Polyacrylamidgelen bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Für das Trenngel wurden 7,50 ml (6,25 ml) *Aqua bidest.*, 3,75 ml 1,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,8), 3,75 ml (5,00 ml) Acrylamid-Bisacrylamid (40 %), 50 µl 10 % APS, 150 µl 10 % SDS und 7 µl TEMED pipettiert. Für das Sammelgel wurden 6,10 ml *Aqua bidest.*, 2,50 ml 1,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 6,8), 1,30 ml Acrylamid, 62 µl 10 % APS, 100 µl 10 % SDS und 10 µl TEMED verwendet. Nach der Auftrennung wurden die Proteine bei 40 V und 4°C über Nacht im Nass-Transferverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

15 bis 30 µl des unter denaturierenden Bedingungen gekochten Proteinextraktes aus AH109 wurden in 4-12 % SDS-PAGE-Fertiggelen (10x10 cm) bei 100 V mit NuPAGE MES SDS als Laufpuffer aufgetrennt. Die Proteine wurden über Nacht bei 4°C und 6 Watt auf eine 8 x 8 cm Nitrozellulosemembran transferiert.

3.3.5 Immunmarkierung und Detektion von Koimmunpräzipitaten auf Nitrozellulosemembranen

Die Nitrozellulosemembran wurde 1 h in 20 ml TBST mit 3 % ECL™ blockiert, dreimal 10 min in 20 ml TBST gewaschen und anschließend 2 h mit 30 ml Ki-S2-Überstand oder 20 ml TBST mit 1 µg/ml anti-FLAG-Antikörper bei RT inkubiert. Die Antikörperlösungen wurden vor dem Einsatz 30 min mit 1 ml 2,5 g/50 ml ECL™-Blocker inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit je 20 ml TBST wurde die Nitrozellulosemembran 1 h mit 30 ml 3,5 µg/ml Kaninchen-anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase inkubiert. Auch diese Antikörper-Lösung wurde zuvor mit 1 ml ECL™-Blocker gemischt (s.o.). Anschließend wurde die Nitrozellulose-membran zweimal mit 20 ml TBST und einmal mit 20 ml TBS gewaschen. Die Membran wurde 1 min in die Entwicklungslösung getaucht. In dieser Reaktion wird das Luminol, ein zyklisches Diacylhydrazid, unter Einwirkung von Wasserstoffperoxid und Peroxidase oxidiert (Whitehead et al., 1979). Die Lichtemission dieser Reaktion erreicht ihr Maximum bei der Wellenlänge von 428 nm und wurde durch Belichtung eines Autoradiographiefilms detektiert.

3.3.6 Immunmarkierung und Detektion der Fusionsproteine des *Yeast Two-Hybrid* Systems auf Nitrozellulosemembranen

Die Membran wurde dreimal 7 min in 10 ml TBST gewaschen, 1 h in TBST mit 3 % BSA blockiert und dreimal 7 min in 10 ml TBST gewaschen.

Alle vom *pGBKT7*-Konstrukt exprimierten Fusionsproteine wurden mit Maus-anti-c-Myc (IgG1) als primärem Antikörper markiert. Die Nitrozellulosemembran wurde 2 h in 20 ml TBST mit 0,5 µg/ml Maus-anti-c-Myc (Maus IgG1) inkubiert. Vollständige und N-terminale repp86-Peptide konnten z.T. mit Ki-S2 markiert werden. Nach dreimaligem Waschen mit 10 ml TBST für 7 min wurde die Membran 1 h in TBST mit 20 ml 10 µg/ml Kaninchen-anti-Maus inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 10 ml TBST erfolgte eine einstündige Inkubation in 20 ml TBST mit 2 µg/ml Ziege-anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase.

pACT2- und *pGADT7*-exprimierte Fusionsproteine wurden mit Kaninchen-anti-Hämagglutininepitop (HA, polyklonal) als primärem Antikörper markiert. Die Nitrozellulosemembran wurde 3 h in 20 ml TBST mit 0,8 µg/ml Kaninchen-anti-HA (polyklonal) inkubiert, dreimal 7 min mit 10 ml TBST gewaschen und 1 h in 20 ml TBST mit 8 µg/ml Ziege-anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase inkubiert.

Die Membran wurde anschließend zweimal in 10 ml TBST und einmal in 20 ml TBS gewaschen. Die Entwicklungslösung wurde immer frisch zubereitet. Hierzu wurden zuerst 60 mg 4-Chloro-1-naphthol in 20 ml eiskaltem Methanol gelöst und in 100 ml TBS (RT) überführt. Dann wurden schnell 60 µl 30 % H₂O₂ hinzugegeben. Nach kurzem Schwenken wurde die Entwicklungslösung auf die Membranen verteilt. Die Entwicklungsreaktion fand im Dunkeln statt und wurde durch Spülen im Leitungswasser gestoppt.

3.3.7 Mikrotubuli-Bindungsassay

Die vollständige kodierende repp86-cDNA bzw. repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎-cDNA wurden in *pGEX-6P-1* bzw. in *pGEX-5X-1* (Amersham Biosciences) kloniert und in *E. coli* BL21 (Stratagene) als Glutathion-S-Transferase-Fusionen (GST) zur Expression gebracht. Die über Glutathionsepharose gereinigten Fusionsproteine wurden eluiert und bei -20°C aufbewahrt. Die bakterielle Expression wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

L428-Kernlysate mit endogenem repp86 bzw. die oben beschriebenen GST-repp86-Fusionsproteine wurden für 30 min bei RT mit taxolstabilisierten Mikrotubuli nach dem Herstellerprotokoll inkubiert (Cytoskeleton Inc., Denver, USA). Als Negativkontrolle wurden repp86-Proteine in Ansätzen ohne Mikrotubuli getestet. Nach 40 min Zentrifugation bei 100000 g_n und bei RT wurde der Überstand verworfen, während die präzipitierten Proteine 5 min bei 95°C im Proteinauftragspuffer gekocht wurden. Die Auftrennung erfolgte im 7,5 bis 15 % SDS-Gel (3.4.5). Die Detektion im *Western blot* erfolgte mit Ki-S2 und polyklonalem anti-GST-Serum nach der unter 3.3.5 beschriebener Prozedur.

Die Quantifizierung des kosedimentierten repp86 erfolgte mittels der Auswertungssoftware „*quantity one*“ Version 4.2 (Geldokumentationsanlage Gel Doc 2000, Fa. Bio-Rad). Der Hintergrund wurde hierbei als 0 % definiert, während die Quantität der repp86-Kontrollen gleich 100 % gesetzt wurde. Das mit den Mikrotubuli kosedimentierte endogene repp86 bzw. die GST-Fusionen wurden in Relation zu diesen standarisierten Größen bestimmt.

3.3.8 Dualer Luciferase Assay

3.3.8.1 Aussaat von HEK293-Zellen

HEK293 wurden am ersten Tag des Experiments zu je 5x10⁴ per *well* in 12-*well*-Kulturschalen in 1 ml D-MEM, 10 % FCS und je 50 µg/ml Streptomycin und Penicillin

ausgesät. Bis zur Transfektion wurden die Zellen 24 h bei 37°C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

3.3.8.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen nach der Kalziumphosphat-präzipitationsmethode

Nach 24 h Inkubation bei 37°C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre wurden die Transfektionsmischungen vorbereitet. In 15 ml-Röhrchen wurden je 500 µl 2x HBS-Puffer (pH 7,17) vorgelegt. In 1,5 ml-Reaktionsgefäßen wurden als Kontrolle für die minimale Promotoraktivität 150 ng *pGL3 Control* (= 85,7 fmol) zusammen mit 100 ng *pRL-CMV* mit *Aqua bidest.* auf ein Gesamtvolumen von 450 µl gebracht. Ebenso wurden je 85,7 fmol der zu transfizierenden Promotorkonstrukte und je 100 ng *pRL-CMV* mit *Aqua bidest.* auf ein Endvolumen von 450 µl gebracht. In die DNA-Mischungen wurden je 50 µl 2,5 M Calciumchlorid pipettiert. Die Transfektionsmischungen wurden unter ständigem Schütteln (Vortex Genie, Stufe 3) tropfenweise in 500 µl 2x HBS-Puffer pipettiert. Davon wurden je 100 µl pro *well* zur Transfektion von HEK293 eingesetzt. Alle Ansätze wurden in dreifacher Ausführung angefertigt. Nach der Transfektion wurden die Zellen 24 h bei 37°C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert.

3.3.8.3 Herstellung von Zellysaten aus HEK293

HEK293 wurden 24 h nach der Transfektion in 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit je 250 µl *Passive Lysis Buffer* (PLB) lysiert. Nach 15 min Inkubation bei RT unter Schütteln wurden die Lysate in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und 30 s bei 15000 g_n und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Gefäße überführt und zur Bestimmung der Luciferaseaktivität hinzugezogen.

3.3.8.4 Bestimmung der Luciferaseaktivität

Der *FB 12 Luminometer* (Berthold Detection Systems) wurde auf 3 s Meßverzögerung und 10 s Meßzeit eingestellt. 100 µl *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II) wurden in Polystyrenreagenzgläser von Falcon vorgelegt. In das Reagenz wurden 20 µl Proteinextrakt pipettiert, gemischt und sofort gemessen. Nach der Messung wurden 100 µl *Stop & Glo*® *Reagent* hinzugefügt. Der Ansatz wurde kurz gemischt und erneut gemessen.

3.4 Immunzytologische Methoden

3.4.1 Fertigung von AH109-Paraffinschnitten

Zur Fertigung der Paraffinschnitte wurden Hefezellen wie unter 3.1.3 inkubiert. 1×10^6 Zellen wurden in PBS gewaschen, und das Zellpräzipitat wurde in 40 ml PBS mit 4 % Paraformaldehyd über Nacht fixiert. Nach dem Abzentrifugieren des Überstandes wurden die Hefezellen automatisiert in einer aufsteigenden Ethanolreihe schrittweise entwässert (vergällter Ethanol; 1x 67,2 %, 2x 92,16 % und 3x 96 %). Nach der Einbettung in Paraffin wurden am Rollenmikrotom 5 bis 7 μm -Schnitte angefertigt, die auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilan beschichtete Objektträger aufgebracht wurden. Nach 24 h Trocknung bei 37°C wurde eine Entparaffinierung in Xylol für 15 min durchgeführt. Nach der Rehydrierung in absteigender Ethanolreihe (vergällter Ethanol; 3x 96 %, 2x 92,16 % und 1x 67,2 %) wurden die Präparate in 0,01 M Zitratlösung (pH 6,0) im Dampfdrucktopf für 2,4 min gekocht, um die Denaturierung und Freilegung der Epitope zu gewährleisten (Shi et al., 2001). Die Präparate wurden mit Leitungswasser gewaschen und in 1x TBS-Puffer aufbewahrt, bis eine APAAP-Färbung (3.4.3) durchgeführt wurde.

3.4.2 Fertigung von Zytozentrifugenpräparaten

Für die Fertigung der Zytozentrifugenpräparate wurden 1×10^6 bis 5×10^6 HEK293-Zellen benötigt. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und in 1 ml 10 % BSA/PBS aufgenommen. Es wurden je 100 μl der Zellsuspension in Zytozentrifugenaufsätze pipettiert. Diese wurden durch 5 min Zentrifugieren bei 120 g_n auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht und über Nacht bei RT getrocknet. Nach der Fixierung im Aceton für 10 min wurden die Präparate kurz luftgetrocknet und nach der APAAP-Methode (3.4.3) gefärbt.

3.4.3 APAAP-Färbung von Paraffinschnitten und Zytozentrifugenpräparaten

Die Methode der APAAP-Färbung (Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase) beruht auf dem Nachweis eines Immunkomplexes (Cordell et al., 1984). Das Antigen wird vom primären Antikörper erkannt. Der sekundäre Antikörper, auch Brückenantikörper genannt, verbindet den Antigenkomplex mit dem Enzym-anti-Enzym-Komplex (Alk. Phosphatase-anti-Alk. Phosphatase).

Die Präparate wurden 1 h bei RT im Ki-S2-Überstand (Maus IgG1) oder mit einem anderen primären Maus-Antikörper inkubiert und dreimal in 1x TBS (pH 7,5) gewaschen. Der Brückenantikörper Kaninchen-anti-Maus (Fa. DAKO) wurde 1:25 in 10 % Humanserum/TBS verdünnt. Nach 30 min Inkubation der Präparate mit dem Antikörper wurde erneut dreimal in TBS gewaschen. Die Präparate wurden anschließend 30 min mit dem APAAP-Komplex inkubiert, der 1:50 in 10 % Humanserum/TBS verdünnt war. Die beiden letzten Inkubationsschritte wurden nach Bedarf zweimal wiederholt, um die Intensität der Färbung zu erhöhen.

Die Alkalische Phosphatase-Reaktion erfolgte durch 20 min Inkubation der Präparate in einer Mischung aus 44 ml Entwicklungspuffer, 15,5 ml 0,2 M Propandiolpuffer, 25 mg Natriumnitrat (ad 312 ml *Aqua bidest.*) und Substratlösung. In der Entwicklungsreaktion katalysiert die Alkalische Phosphatase des APAAP-Komplexes die Hydrolyse des Substrates Naphthol AS-Biphosphat zu Phosphaten und Phenolkomponenten. Letztere reagieren mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) des Neufuchsin zu unlöslichen Azofarbstoffen. Nachdem die gewünschte Intensität der Färbung erreicht war, wurde die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Die Kerngegenfärbung wurde für 1 bis 5 min mit saurem Hämealaun und das Nachbläuen im Leitungswasser durchgeführt. Die Präparate wurden dann schrittweise in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (1x 67,2 %, 2x 92,16 % und 3x 96 % vergällter Ethanol). Das Eindeckeln der Präparate wurde maschinell durchgeführt.

3.4.4 Zellzyklusanalysen mittels Durchflußzytometrie

1×10^6 HEK293- oder COS7-Zellen wurden mit 5 μg *pRK5* (Kontrollzellen) oder 5 μg *pRK5-repp86* transient transfiziert (s. auch 3.3.1.2). HEK293- oder COS7-Zellen wurden nach der jeweiligen Inkubationszeit in PBS mit 1 % Trypsin und 1 mM EDTA abgelöst und mit PBS gewaschen. Nach 30 min Fixierung in 50 % Ethanol bei 4°C wurden die Zellen 1 h mit 30 ml Ki-S2-Überstand bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem Ziege-anti-Maus-Antiserum (1:100, Fa. DAKO) inkubiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 0,1 ml PBS mit 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *RNase A* resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Zellen mit 0,5 ml Färbelösung (0,5 mg/ml Propidiumjodid in PBS und 5 mM EDTA) inkubiert. Zellzyklusanalysen wurden mittels Durchflußzytometrie mit dem *FACSCalibur Analyzer* (Fa. Becton Dickinson) durchgeführt.

4 Ergebnisse

Analysen humaner Zellen im „*fluorescence-activated cell sorting*“-Verfahren (FACS) zeigen, daß das humane „*restrictedly expressed proliferation-associated protein 86 kDa*“ (repp86) zellzyklusabhängig reguliert wird. Der Nachweis von repp86 erfolgt mit dem repp86-spezifischen Maus-IgG1-Antikörper Ki-S2 („Kiel“-S2). Die Expression von repp86 beginnt beim Übergang der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus. In den Phasen S und G2 liegt repp86 diffus verteilt im Nukleoplasma vor. Mit beginnender Mitose erfolgt eine zielgerichtete Reorganisation der repp86-Verteilung. In der Prophase ist repp86 mit den Spindelpolen und später in der Meta- und Anaphase mit dem Spindelapparat assoziiert. In der Telophase wird weniger repp86 an der Spindel und mehr im Bereich des Teilungsrings nachgewiesen. Nach Abschluß der Zytokinese und in der nachfolgenden G1-Phase ist repp86 nicht mehr nachweisbar (Heidebrecht et al., 1997a, 1997b). Aufgrund der strengen Kolo-kalisation mit den Mikrotubuli könnte repp86 eine Rolle im Auf- und Abbau sowie in der Spindeldynamik spielen. Die genaue Funktion von repp86 in diesen Prozessen ist noch ungeklärt. In der Tumordiagnostik erwies sich repp86 aufgrund seiner spezifischen Expression in definierten Zellzyklusphasen als ein hervorragender Proliferationsmarker, der im Unterschied zu anderen bekannten Markern nicht während der gesamten Dauer der G1-Phase exprimiert wird. Eine strenge Korrelation zwischen hoher repp86-Expression und Tumoraggressivität wurde in Langzeitstudien hinreichend belegt (Heidebrecht et al., 1997b; Rudolph et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, die Rolle von repp86 in der Mitose sowie die Mechanismen seiner Regulation aufzuklären.

4.1 Hinweise auf repp86-Domänen und Motive

Für das Verständnis von funktionalen Mechanismen sowie von Interaktionen eines Proteins bei regulativen Prozessen sind tiefgehende Kenntnisse der molekularen Struktur unerlässlich. Aufgrund der Erfahrung aus unzähligen Analysen des Aufbaus von Proteinen gelingt es mittels komplexer Rechnerprogramme, die in der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) verborgene Strukturinformation zu interpretieren. Funktionalitäten und räumliche Anordnung einzelner Proteinteile bis hin zum Gesamtprotein lassen sich so bis zu einem gewissen Grad vorhersagen. Bei dem Einsatz und der Interpretation dieser

rechnergesteuerten Analysen ist jedoch Zurückhaltung angebracht, da die erhaltenen Ergebnisse lediglich die Wahrscheinlichkeit einer Proteinstruktur oder eines Proteinverhaltens geben können. Für die Planung von verifizierenden Experimenten am Protein sind diese rechnergestützten Prognosen jedoch eine unschätzbare Hilfe, da die in der Aminosäuresequenz enthaltene Information ansonsten nur noch schwer faßbar wäre. Im folgenden werden die wichtigsten Informationen über Domänen und Motive, die sich aus der Primärstruktur von repp86 ableiten ließen, abschnittsweise vorgestellt. Die zugehörigen Internetadressen sind unter 2.10 aufgelistet. Die in dieser Arbeit aufgeführten Aminosäuresequenzen werden im Ein-Buchstaben-Code (s. 9.1.1) und in Fettschrift dargestellt. Für eine beliebig austauschbare Aminosäure wird der Buchstabe **X** verwendet. Sollten an einer Aminosäureposition des Proteins zwei definierte Aminosäuren austauschbar sein, so werden beide Aminosäuren in runde Klammern gesetzt und durch einen Schrägstrich getrennt.

Der kodierende mRNA-Bereich von repp86 besteht aus 2241 Ribonukleotiden, die insgesamt für 747 Aminosäuren kodieren (Heidebrecht et al., 1997b). Die vollständige Aminosäuresequenz sowie die hier im Abschnitt gemachten funktionellen und strukturellen Voraussagen von repp86 finden sich im Anhang unter 9.1.2. und in schematischer Form in Abb. 2.

Voraussagen des Analysenprogramms PSORT über die Lokalisierung von repp86 in Zellkompartimenten: Die repp86-Lokalisierung wird zu 95,7 % dem Zellkern zugeordnet. 4 nukleäre Lokalisationssignale (NLS) in der Aminosäuresequenz von repp86 unterstützen diese Annahme. Dieses Analyseergebnis steht im völligen Einklang mit der Tatsache, daß endogen exprimiertes repp86 ausschließlich im Nukleoplasma von S- und G2-Phase-Zellen detektiert wird.

Voraussagen der Analysenprogramms ScanProsite und NetPhos 2.0 über mögliche Phosphorylierungsstellen von repp86: Aus der Aminosäuresequenz von repp86 lassen sich 28 mögliche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen wie die cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase, Proteinkinase C, Caseinkinase II und Tyrosinkinase ableiten. Darüber hinaus enthält repp86 einige potentielle Phosphorylierungsstellen für cdc2-Kinase mit der Konsensussequenz (S/T)PX(K/R) und für die „mitogen activated protein kinase“ (MAPK) mit der Konsensussequenz PX(S/T)P. Weiterhin werden sämtliche Serin-, Threonin- und Tyrosinpositionen von repp86 als mögliche Phosphorylierungspositionen ausgewiesen. Diese

theoretischen Analyseergebnisse werden durch Untersuchungen gestützt, in welchen ein verstärkter Phosphorylierungsstatus von repp86 insbesondere in der Mitose nachgewiesen wurde (Heidebrecht et al., 1997b).

Voraussagen der Analysenprogramme PSORT, PlotStructure und Profilescan über mögliche Sekundärstrukturen von repp86: Zwischen Aminosäure 52 und 59 konnte die Konsensus-Sequenz (A/G)XXXXGK(S/T) für das so genannte P-Loop-Motiv gefunden werden, an welchem ATP oder GTP gebunden werden können (Walker et al., 1982). Das vermeintliche repp86-P-Loop hat die Sequenz **GGLFQGKT**. Im allgemeinen ist diese Region in zahlreichen ATP- oder GTP-bindenden Proteinen glycinreich, schließt mit einem Serin oder einem Threonin ab und bildet typischerweise eine flexible Schlaufe zwischen einer α -Helix und einem β -Faltblatt des Proteins. Diese benachbarten Sekundärstrukturen konnten mit dem Programm *PlotStructure* bestätigt werden, welches nach einem Algorithmus von Chou-Fasman eine α -Helix zwischen Aminosäure 34 bis 46 und ein β -Faltblatt zwischen Aminosäure 66 bis 72 wahrscheinlich macht. Die Schlaufe (P-Loop) interagiert mit einer der Phosphatgruppen im Nukleotid (Saraste et al., 1990). Einige der bekannten Proteine mit einem P-Loop-Motiv sind beispielsweise schwere Ketten des Kinesins und des Myosins, kinesinähnliche Proteine, Dynamine, dynaminähnliche Proteine, DNA- und RNA-Helikasen und GTP-bindende Proteine der Ras-Familie.

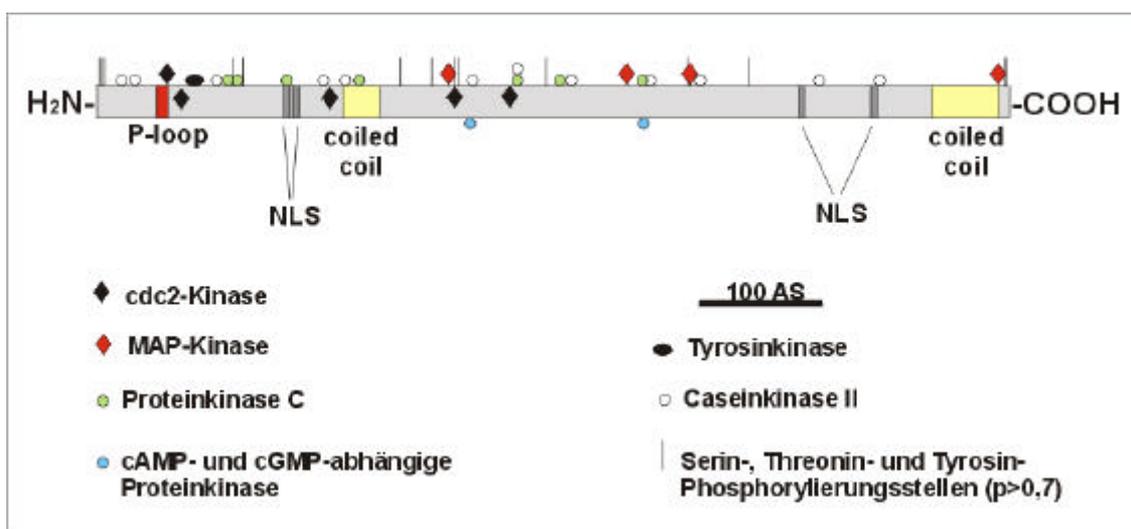


Abbildung 2: Schematische Darstellung des repp86-Proteins mit theoretisch abgeleiteten Domänen und Motiven (siehe Text). Das Protein besteht aus 747 Aminosäuren. Es enthält ein P-Loop-Motiv, zwei potentielle *coiled coil*-Domänen und 4 nukleäre Lokalisationssignale (NLS). Potentielle Phosphorylierungsstellen wurden als farbige Symbole oder als einfache Striche dargestellt (siehe Legende der Abbildung).

Voraussagen der Analysenprogramme Coils, PairCoil und MultiCoil über mögliche coiled coil-Strukturen von repp86: Mit dem Programm *Coil* wurden zwei mögliche *coiled coil*-Domänen in den Aminosäurebereichen 207 bis 239 (Wahrscheinlichkeit 87 %) und 660 bis 716 (Wahrscheinlichkeit 100 %) ermittelt. *Coiled coils* sind so genannte Super-Sekundärstrukturen, die in der Organisationshierarchie eines Proteins zwischen der Sekundär- und der Tertiärstruktur anzusiedeln sind. Zwei bis fünf α -Helices können sich parallel oder antiparallel aneinander lagern, um die *coiled coil*-Struktur zu bilden. Die *coiled coil*-Strukturen können zwischen mehreren Proteinmolekülen gleichen oder unterschiedlichen Typus miteinander interagieren, so daß die Möglichkeit zur Bildung von Homo- oder Heterodimeren gegeben ist. Die Sequenzanalyse mit dem Programm *PairCoil* ergab, daß in den mit *Coils* vorausgesagten Domänen die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von zweisträngigen *coiled coils* bei ca. 40 % für Aminosäuren 207 bis 239 und weiterhin bei 100 % für Aminosäuren 661 bis 716 liegt. Das *MultiCoil*-Programm erlaubte Voraussagen über zwei- und dreisträngige *coiled coils*. Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines Trimeres sank in beiden in Frage kommenden Domänen auf weniger als 15 %. Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer dimeren *coiled coil*-Struktur blieb im Aminosäurebereich von 663 bis 716 sehr hoch und lag bei 79 % (Abb. 2).

Die hier beschriebenen rechnergesteuerten Analysen bestätigen die bisherigen Beobachtungen hinsichtlich der nukleären Lokalisierung und des Phosphorylierungspotentials bzw. -status von repp86. Darüber hinaus geben insbesondere die Vorschläge für Sekundärstrukturen in repp86 Anlaß zur Hoffnung, potentielle Domänen zu identifizieren, durch welche die hier zu untersuchenden Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden können (4.4; 4.5).

4.2 Die Regulation von repp86 erfolgt auf Transkriptionsebene

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Expression von repp86 auf der Ebene der Transkription oder der Translation reguliert wird. Die Expression von repp86 findet ausschließlich in proliferierenden Zellen statt. Es wurde unter anderem demonstriert, daß frisch präparierte periphere Blutlymphozyten zu einem sehr geringen Prozentsatz (weniger als 1 %) repp86 exprimieren. In dieser Zellfraktion sind also weniger als 1 % der Zellen proliferativ aktiv. Wird diese Zellfraktion mit dem Mitogen Phythämagglutinin (PHA) stimuliert, so wird auch die repp86-Expression in ca. 40 % der Zellen induziert. Nach der Auftrennung der PHA-stimulierten Zellen nach Zellzyklusstatus wird deutlich, daß lediglich

Zellen in der S-, G2- und M-Phase repp86-positiv sind. Zellen in der G0- und G1-Phase sind hingegen repp86-negativ (Heidebrecht et al., 1997a; Heidebrecht et al., 1997b). Zur Klärung der Regulationsfrage wurden PCR-Experimente durchgeführt, die das Vorhandensein oder das Fehlen von repp86-mRNA in nicht-proliferierenden, also in repp86-negativen Zellen zeigen sollten.

Experimentelle Durchführung: Im experimentellen Ansatz wurden zuerst Granulozyten- und Lymphozytenfraktionen aus dem Blut gesunder Spender getrennt (Boyum, 1968). Die aus den nicht-proliferierenden Granulozyten und nicht-aktivierten Lymphozyten isolierte RNA wurde mit *DNase I* behandelt. Als Positivkontrolle für repp86-mRNA wurde in derselben Isolierungsprozedur RNA aus den schnell proliferierenden L428-Zellen (Hodgkin-Lymphom) gewonnen und mit *DNase I* behandelt. Nach der Bestimmung der RNA-Konzentration und der cDNA-Synthese wurden 30; 3; 0,3 bzw. 0,03 ng cDNA in der PCR eingesetzt (3.2.4.1). In Parallelansätzen wurde ein Bereich der β -Actin-cDNA mit actinspezifischen Oligonukleotiden mit der gleichen cDNA-Verdünnungsreihe amplifiziert, um die Qualität der zur cDNA-Synthese benutzten RNA zu überprüfen. Die erwarteten Produktgrößen waren 292 Basenpaare (repp86-spezifisch) und 100 Basenpaare (actinspezifisch).

Integrität der RNA: Die RNA-Präparationen wurden gelelektrophoretisch unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die RNA-Lösungen enthielten die intakten 28 S und 18 S ribosomalen RNAs (rRNA). Von diesem Ergebnis wurde auf die Integrität der mRNA geschlossen (Abb. 3, mRNA).

Ergebnisse der PCR: Die Ergebnisse der PCR zeigten, daß repp86-mRNA lediglich in den proliferativ aktiven L428-Zellen vorhanden war (Abb. 3, PCR: L428). Das Fehlen von repp86-Amplifikaten in Granulozyten- und Lymphozytenansätzen zeigte, daß in diesen Zellen keine repp86-mRNA transkribiert wurde. Die Regulation von repp86 ist somit auf der transkriptionellen Ebene anzunehmen (Abb. 3, PCR: Granulozyten und PCR: Lymphozyten). Die Kontroll-PCR mit actinspezifischen Oligonukleotiden zeigte, daß in jedem Probenansatz genügend cDNA zur Synthese häufig vorkommender mRNA-Moleküle vorhanden war (Abb. 3, untere Geldarstellungen). Der Einsatz der cDNA-Verdünnungsreihe in der PCR (30,0; 3,0; 0,3 und 0,03 ng) zeigte außerdem, daß die repp86-mRNA offensichtlich nur in geringen Mengen in der Zelle vorhanden ist. Erst 30 ng cDNA waren für ein deutliches Amplifikationssignal ausreichend, während die Produktmenge in Ansätzen mit 3, 0,3 und

0,03 ng cDNA so gering war, daß sie in der Gelelektrophorese nicht detektiert werden konnte (Abb. 3, PCR: L428).

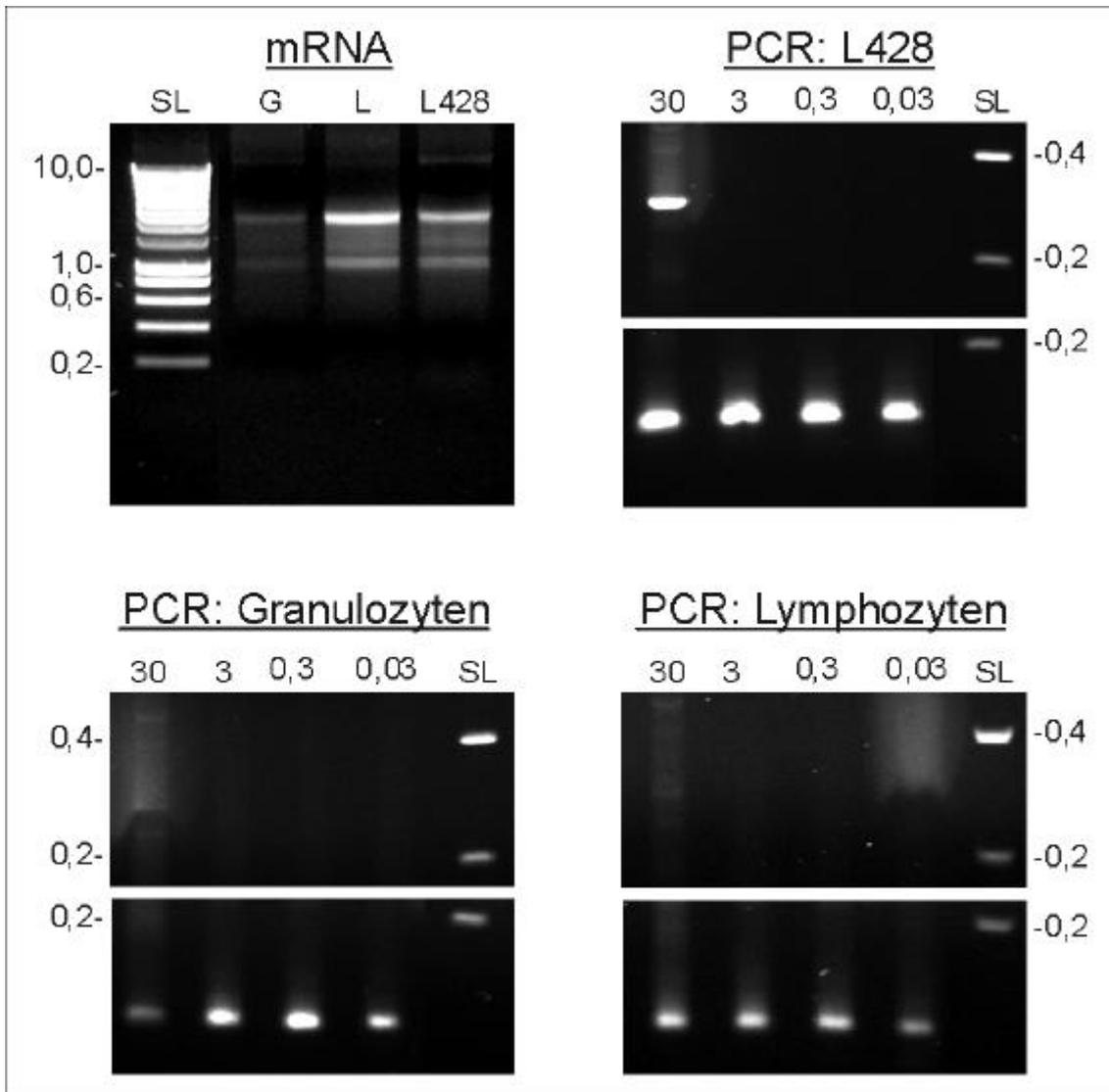


Abbildung 3: mRNA-Gelelektrophorese und PCR zur Amplifikation von repp86-cDNA aus L428, Granulozyten und Lymphozyten. (mRNA) Im 2 % TBE-Agarosegel wurden je 2 µl der RNA-Lösung aufgetragen: (G) aus 1×10^8 Granulozyten, 66,7 ng/µl, (L) aus 1×10^8 Lymphozyten, 130,1 ng/µl, (L428) aus $2,5 \times 10^7$ L428-Zellen, 119,0 ng/µl. (PCR) Auftrag von je 10 µl Produkt aus den PCR-Ansätzen mit der L428-, Granulozyten- und Lymphozyten-cDNA mit 30, 3, 0,3 und 0,03 ng cDNA als Matrize. repp86-Amplifikat (292 bp) wurde lediglich im PCR-Ansatz mit 30 ng L428-cDNA nachgewiesen. Granulozyten- und Lymphozytenproben waren repp86-negativ. Untere Geldarstellungen: β-Actinamplifikate bei 100 bp. (SL) 5 µl Größenstandard Smart Ladder™.

4.3 repp86-Überexpression verursacht eine Arretierung von HEK293-Zellen in der G2- und M-Phase des Zellzyklus

Im Hinblick auf die Kolokalisation von repp86 mit dem Spindelapparat (Heidebrecht et al., 1997b) wurde ein Einfluß von repp86 auf die Zellteilung vermutet. Im folgenden sollte untersucht werden, ob eine repp86-Überexpression Aufschluß darüber geben kann, ob und welche Mechanismen der Zellteilung betroffen sind.

Experimentelle Durchführung: Die für repp86 kodierende cDNA wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor *pRK5* kloniert (*pRK5-repp86*). HEK293-Zellen wurden mit *pRK5* ohne Insert (Kontrollzellen) oder mit *pRK5-repp86* transient transfiziert (3.4.4) und 24, 48 oder 72 h inkubiert. Die Zellen wurden zu den gegebenen Zeitpunkten geerntet. Immunzytochemische Färbungen der Zytozentrifugenpräparate (3.4.2) zeigten, daß ca. 50 % der *pRK5-repp86*-transfizierten HEK293-Zellen eine starke repp86-Überexpression aufwiesen. Aufgrund der hohen Transfektionseffizienz konnten verlässliche Analysen des Zellzyklus durchgeführt werden.

Zellzyklusanalysen: Die Analysen wurden mittels Durchflußzytometrie (3.4.4) im *FACSCalibur Analyzer* durchgeführt (Abb. 4). Mittels der DNA-Färbung mit Propidiumjodid konnte der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt werden. repp86 wurde mit Ki-S2 markiert und über den FITC-gekoppelten polyklonalen Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus nachgewiesen. Über die Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurde die Korrelation zwischen dem DNA-Gehalt und der repp86-Überexpression erstellt. Bei den Zellzyklusanalysen wurden auf der einen Seite die mit dem insertfreien *pRK5*-Vektor transfizierten Kontrollzellen, die lediglich endogenes repp86 exprimierten, ausgewertet (Abb. 4, *pRK5*). Auf der anderen Seite wurde die Zellzyklusanalyse mit *pRK5-repp86*-transfizierten Zellen, also mit repp86-überexprimierenden Zellen, durchgeführt (Abb. 4, repp86). In dieser Zellpopulation waren ca. 50 % der Zellen transfiziert (Ergebnis der Immunzytochemie), so daß sie aus einer Mischung transfizierter und nicht-transfizierter Zellen bestand. Da die repp86-Expression in nicht-transfizierten HEK293-Zellen nur schwach ist, konnte sie in der durchflußzytometrischen Auswertung vernachlässigt werden. Hier wurde sowohl die Zellgesamtheit (Abb. 4, repp86 [alle Zellen]) als auch der Anteil der repp86-exprimierenden Zellen (Abb. 4, repp86 [transfizierte Zellen]) gesondert ausgewertet.

Der Effekt der G2/M-Phasenarretierung: Die durchflußzytometrische Auswertung ergab, daß repp86-überexprimierende Zellen bereits 24 h nach der Transfektion eine signifikante Arretierung in der G2/M-Phase¹ des Zellzyklus im Vergleich zu den pRK5-transfizierten Kontrollzellen zeigten (Abb. 4). Lediglich 13 % der repp86-überexprimierenden Zellen befanden sich in der G1-Phase des Zellzyklus (Kontrolle: 41 %). Die S-Phase wurde in 30 % der repp86-überexprimierenden Zellen nachgewiesen (Kontrolle: 28 %). Rund 54,5 % der repp86-überexprimierenden Zellen befanden sich in der G2/M-Phase (Kontrolle: 29 %).

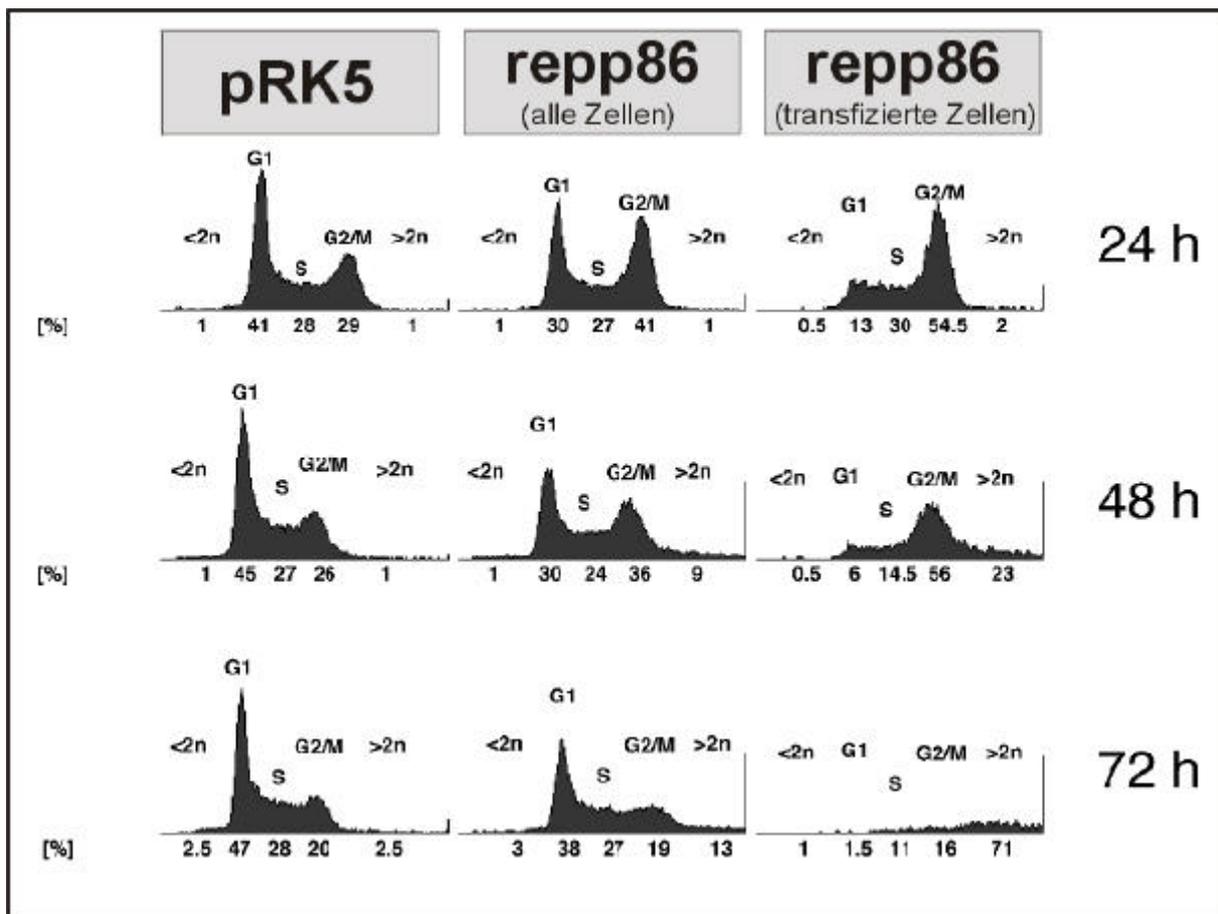


Abbildung 4: Zellzyklusanalyse der repp86-überexprimierenden HEK-293-Zellen. pRK5: HEK293-Zellen wurden als Kontrolle mit dem insertfreien Vektor pRK5 transfiziert; repp86 [alle Zellen]: FACS-Analyse des Zellzyklusstatus in der gesamten Zellernte; repp86 [transfizierte Zellen]: FACS-Analyse des Zellzyklusstatus in repp86-überexprimierenden Zellen. Von oben nach unten: Zeitpunkt der Analyse nach 24, 48 und 72 h nach Transfektion. Über den jeweiligen Diagrammbereichen wurden die Zellzyklusphasen G1, S und G2/M vermerkt. <2n und >2n: DNA-Gehalt; formal = 2n in der Prophase der Mitose. Unter den Diagrammen ist die prozentuale Aufteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen, bezogen auf die untersuchte Zellgesamtheit, zu finden.

Nach 48 h wurden die Veränderungen im Status des Zellzyklus deutlicher. Nur noch 6 % der repp86-überexprimierenden Zellen befanden sich in der G1-Phase (Kontrolle: 45 %). Der

¹ G2/M-Phase: In durchflußzytometrischen Analysen sind Zellen in G2 und M wegen des gleichen DNA-Gehalts nicht unterscheidbar.

Anteil der S-Phase-Zellen (14,5 %) ging im Vergleich zum Wert der 24 h-Inkubation (30 %) deutlich zurück. Der Anteil der in der G2-/M-Phase arretierten Zellen erreichte 56 % (Kontrolle nach 48 h: 26 %). Nach 72 h war die repp86-überexprimierende Zellpopulation im Vergleich zu der analysierten Gesamtzellzahl deutlich dezimiert (Abb. 4, repp86 [transfizierte Zellen], 72 h), was auf ein Absterben der Zellen hindeutet. Der nicht-transfizierte Zellanteil stellte die Hauptmasse der überlebenden Zellen dar (Abb. 4, repp86 [alle Zellen]).

Der Effekt der Polyploidie: Der Prozentsatz polyploider Zellen (DNA-Gehalt $> 2n$) unter den repp86-überexprimierenden Zellen wuchs kontinuierlich mit der fortschreitenden Inkubationszeit (Abb. 4, repp86 [transfizierte Zellen]). 24 h nach der Transfektion waren 2 % der Zellen polyploid (Kontrolle: 1 %). Nach 48 h lag der Zellanteil mit erhöhtem DNA-Gehalt bereits bei 23 % (Kontrollzellen: 1 %), während nach 72 h fast ein Drittel (71 %) der noch lebenden Zellen polyploid war (Kontrolle: 2,5 %).

Aus dem Zellzyklusstatus der Kontrollzellen wurde ersichtlich, daß die Transfektion mit dem insertfreien Vektor *pRK5* das natürliche Zellwachstum nicht negativ beeinflusst. Die Veränderungen im Zellzyklus der repp86-überexprimierenden Zellen gehen also auf das überschüssige repp86 zurück. Die Ergebnisse der Untersuchung lassen vermuten, daß die G2/M-Phasenarretierung der Zellen eine direkte Folge der repp86-Überexpression ist. Die daraus resultierende Polyploidie deutet darauf hin, daß eine korrekte Verteilung der Chromosomen nicht mehr gewährleistet ist.

Um die Morphologie der repp86-überexprimierenden Zellen zu studieren, wurden COS7-Zellen, die eine bessere Morphologie in der Doppelimmunfluoreszenzfärbung als HEK293-Zellen aufweisen, mit *pRK5-repp86* transient transfiziert (3.4.4). Nach 72 h Inkubation mit dem Ki-S2-Überstand wurde repp86 mittels fluoreszenzmarkiertem sekundären Antikörper (FITC-Ziege-anti-Maus, Abb. 5 (B), grün) nachgewiesen. Die DNA wurde mit Propidiumjodid gefärbt (Abb. 5 (A), rot).

repp86-überexprimierende COS7-Zellen wiesen deutliche Veränderungen in der Morphologie der Zellkerne auf. Während die DNA in nicht-transfizierten Zellen in runden und unauffälligen Zellkernen organisiert war (Abb. 5 (C) rot fluoreszierende Zellkerne), wiesen repp86-überexprimierende Zellen (Abb. 5 (C), gelb) lappenartige bis multiple Kernstrukturen auf, die auf Störungen bei der Chromosomenverteilung hinweisen. Diese Störungen könnten

eine Erklärung für die Arretierung von HEK293-Zellen in der M-Phase des Zellzyklus sowie für das vermehrte Auftreten von Zellen mit erhöhtem DNA-Gehalt sein.

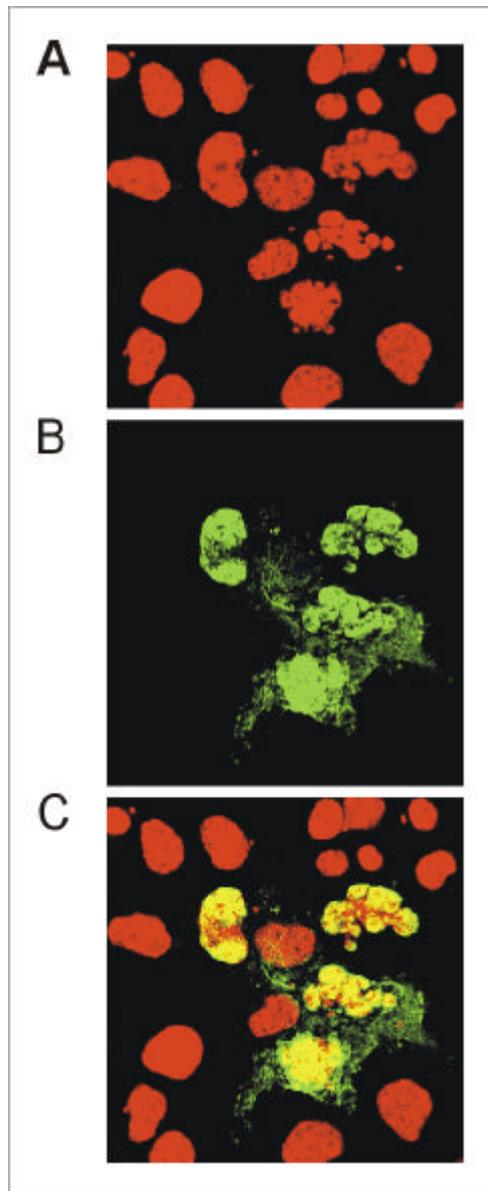


Abbildung 5: Doppelimmunfluoreszenzfärbung der repp86-überexprimierenden COS7-Zellen. (A) COS7-Zellkerne, DNA-Färbung mit Propidiumjodid (rot); (B) repp86-Immunfluoreszenzfärbung mit Ki-S2-Überstand und FITC-markiertem Ziege-anti-Maus-Antiserum (grün); (C) Färbungen aus (A) und (B) zusammengelegt; Bereiche der Rot/Grün-Überlagerung sind gelb. repp86-überexprimierende Zellen zeigen eine veränderte Zellkernmorphologie.

4.4 Humanes repp86 kosedimentiert mit Mikrotubuli *in vitro*

Die zu beobachtende Kolo-kalisation von repp86 und den Mikrotubuli des Spindelapparates in Doppelimmunfluoreszenzexperimenten lieferte erste Hinweise, daß repp86 möglicherweise mit den Mikrotubuli interagiert (Heidebrecht et al., 1997b). Um diese Vermutung zu verifizieren, wurde ein Mikrotubuli-Bindungsassay (3.3.7) durchgeführt.

Erläuterung des Verfahrens: Die Versuchsanordnung beginnt mit der *in vitro*-Polymerisation von Tubulin. Die daraus resultierenden Mikrotubuli werden mit einem Kandidatenprotein inkubiert. Findet eine Interaktion statt, dann kommt es während eines Ultrazentrifugationsschrittes zur Kosedimentation beider Proteine. Im anderen Fall kann davon ausgegangen werden, daß eine Interaktion nicht wahrscheinlich ist.

Experimentelle Durchführung: L428-Kernlysate mit endogenem repp86, aufgereinigtes GST-repp86² und GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎³ wurden mit taxolstabilisierten Mikrotubuli inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die oben beschriebenen aufgereinigten Proteine ohne Mikrotubuli inkubiert. Die sedimentierten Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen im Proteinauftragspuffer gekocht und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Endogenes repp86 und GST-repp86₍₁₋₇₄₇₎ wurden in *Western blots* mit Ki-S2 nachgewiesen. Für die *Western blot*-Färbung von GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎ konnte der Antikörper Ki-S2 nicht verwendet werden, weil das Ki-S2-Epitop im N-terminalen Bereich von repp86 liegt. Deshalb wurde GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎ mit dem polyklonalen Ziege-anti-GST-Serum gefärbt. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden folgende Zellysate im *Western blot* gefärbt: i) L428-Zellysat als repp86-Kontrolle (Abb. 6 (A) „repp86“) und ii) bakterielles Zellysat aus GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎-überexprimierenden BL21-Zellen (Abb.6 (B) „GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎“).

Ergebnisse der Kosedimentation: Die densitometrische Auswertung ergab, daß 45 % des endogenen repp86 und 75 % des rekombinanten GST-repp86 an die *in vitro* polymerisierten Mikrotubuli gebunden waren (Abb. 6). Ebenso kosedimentierten über 35 % des C-terminalen rekombinanten repp86-Bereichs (GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎) mit den Mikrotubuli. Als Negativkontrolle wurden repp86 und die rekombinanten repp86-Proteine in Abwesenheit von *in vitro*

² GST-repp86: rekombinantes Protein, bestehend aus Glutathion-S-Transferase (GST)- und repp86-Sequenz

³ GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎: Die in den Klammern aufgeführten Zahlen stehen in dieser Arbeit für die exprimierten Aminosäuren des betreffenden Proteins.

polymerisierten Mikrotubuli ultrazentrifugiert. In den Proteinpräzipitaten wurden weder repp86 noch rekombinante repp86-Varianten nachgewiesen.

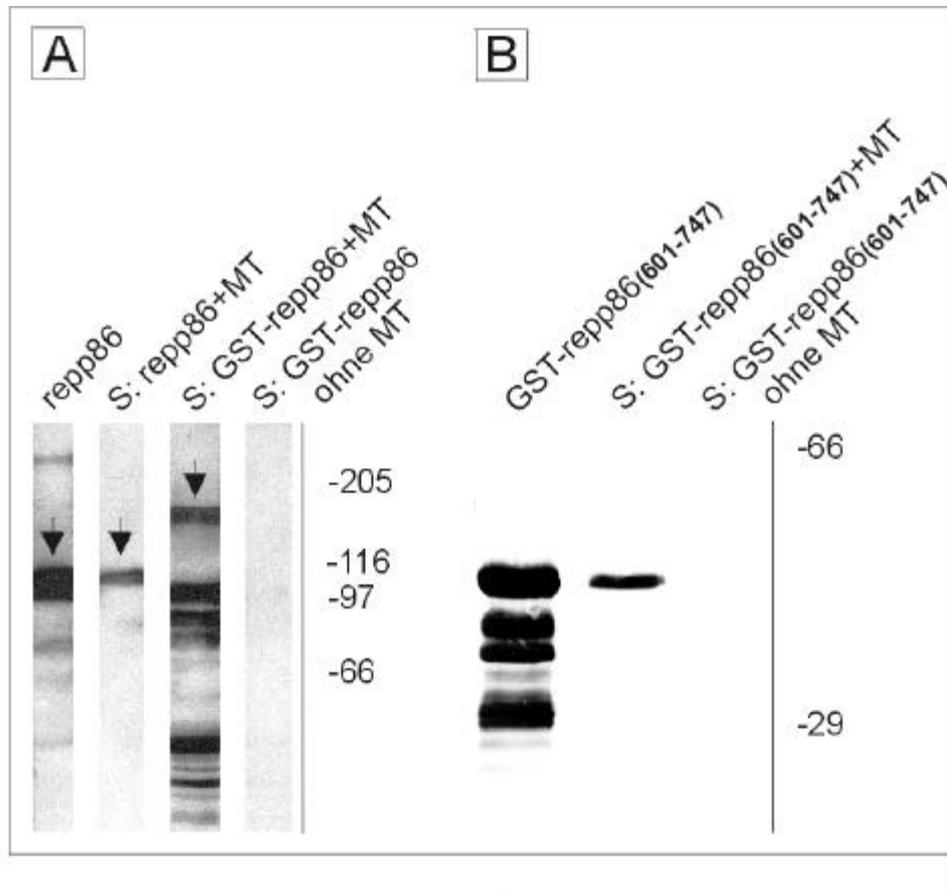


Abbildung 6: Mikrotubuli-Bindungsassay. Endogenes repp86 (A) und bakteriell exprimiertes GST-repp86 (A) bzw. GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎ (B) wurden mit und ohne taxolstabilisierte Mikrotubuli (MT) inkubiert und ultrazentrifugiert. (A) Positivkontrolle: endogenes „repp86“ im Kernlysate von L428; „S: repp86+MT“: kosedimentiertes endogenes repp86 aus L428 nach Inkubation mit MT; „S: GST-repp86+MT“: kosedimentiertes GST-repp86 nach Inkubation mit MT; „S: GST-repp86 ohne MT“: GST-repp86 wurde ohne MT nicht sedimentiert. (B) Positivkontrolle: „GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎“ aus Bakterienlysate; „S: GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎+MT“: kosedimentiertes repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎ nach Inkubation mit MT; „S: GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎ ohne MT“: bakteriell exprimiertes repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎ sedimentierte nicht ohne MT. Größenstandard war *High M. W. Standard Mixture*.

Die Kosedimentationsergebnisse wiesen also auf eine direkte Interaktion zwischen repp86 und den Mikrotubuli *in vitro* hin. Mit der Kosedimentation des rekombinanten GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎ erfolgte eine Einengung des möglichen mit Mikrotubuli interagierenden repp86-Bereiches auf die Aminosäuren 601 bis 747. Es wird vermutet, daß die in diesem Bereich postulierte *coiled coil*-Domäne die Interaktion zwischen repp86 und den Mikrotubuli vermitteln könnte.

4.5 Identifizierung von SIAH2 als Interaktionspartner von repp86 im Yeast Two-Hybrid-Experiment

In Experimenten des *Yeast Two-Hybrid*-Systems sollten potentielle Bindungs- bzw. Interaktionspartner von repp86 identifiziert werden.

Prinzip und Besonderheiten der Methode: Die *Yeast Two-Hybrid*-Methode dient im wesentlichen der Detektion relativ schwacher und transienter Protein-Protein-Interaktionen, die in biochemischen Systemen nicht immer nachgewiesen werden können (Guarente, 1993; Estojak et al., 1995). Untersuchungen haben gezeigt, daß mit dem GAL4-System (s.u.) Proteininteraktionen mit Dissoziationskonstanten von und über $K_d = 70 \mu\text{M}$ nachgewiesen werden können (Yang et al., 1995).

Promotoren verschiedener Hefestämme, insbesondere die der Strukturgene, bestehen in der Mehrheit der Fälle zumindest aus einer Konsensus-TATA-Box (Minimalpromotor), die nicht nur den Transkriptionsstart sondern auch das Ausmaß der basalen Expression bestimmt. Die Aktivität des Minimalpromotors wird durch *cis*-Elemente in der DNA-Sequenz beeinflusst, zu denen Binde- und Interaktionsstellen für Transkriptionsfaktoren und andere *trans*-wirkende regulatorische Proteine zählen. Von einem *cis*-Element, dem UAS („*upstream activating sequence*“) wird beim Entwurf der Reporterregenregulation im rekombinanten Hefestamm AH109 Gebrauch gemacht. Das *cis*-Element wird von spezifischen Transkriptionsfaktoren erkannt und verstärkt die Transkription der stromabwärts liegenden TATA-Regionen (Guthrie und Fink, 1991; Heslot, 1992; Stargell und Struhl, 1996; Pringle et al., 1997).

In vivo und in Anwesenheit von Galaktose bindet das *trans*-wirkende Protein GAL4 an GAL4-responsive UAS-Sequenzen und aktiviert die Transkription von Genen, die in den Galaktosemetabolismus involviert sind. GAL4 besteht im wesentlichen aus zwei funktionellen Domänen. Die DNA-Bindedomäne erkennt die spezifischen UAS-Sequenzen, während die Aktivierungsdomäne mit Komponenten des RNA-Polymerase II-Komplexes interagiert und damit die Transkription initiiert. Die Aktivierung der Transkription findet auch dann statt, wenn die Domänen auf zwei verschiedenen Fusionsproteinen lokalisiert sind, solange beide Fusionsteile miteinander interagieren und dadurch eine räumliche Nähe zwischen den GAL4-Domänen schaffen. Jede Domäne für sich ist jedoch nicht befähigt, Gentranskription zu aktivieren (Brent und Ptashne, 1985; Ma und Ptashne, 1988).

Yeast Two-Hybrid System 3 (Fa. Clontech): Der Testorganismus *Saccharomyces cerevisiae* AH109 ist auxotroph für Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin. AH109 exprimiert kein funktionelles GAL4 und kein GAL80, so daß die Reportergene *HIS3*, *ADE2*, *MEL1* und *lacZ*, die unter der Kontrolle der GAL4-responsiven UAS-Sequenzen stehen, nicht endogen aktiviert werden können.

In der experimentellen Durchführung wird das „Köderprotein“ repp86 als Fusion mit der GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-BD) und dem c-Myc-Epitop aus dem Expressionsvektor *pGBKT7* exprimiert. Der Vektor trägt u.a. einen Autotrophiemarker für Tryptophan (Tryptophanselektion) und das Kanamycin-Resistenzgen für die Selektion in *E. coli*. Das exprimierte Fusionsprotein enthält ein nukleäres Lokalisationssignal, das im *pGBKT7*-Vektor vor dem Gen für GAL4-BD kodiert wird und den Transport des Fusionsproteins in den Zellkern reguliert. Weitere Eigenschaften von *pGBKT7* können aus der Vektorkarte entnommen werden (9.2.2).

Der gesuchte Interaktionspartner wird aus dem cDNA-Bibliothekvektor *pACT2* als Fusion mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) und mit dem Hämagglutininepitop exprimiert. Der Vektor trägt den Autotrophiemarker für Leucin (Leucinselektion) und das β -Lactamasegen für die Ampicillinselektion in *E. coli*. Weitere Eigenschaften von *pACT2* können aus der Vektorkarte entnommen werden (9.2.1).

Werden beide Konstrukte in AH109 exprimiert und interagieren das „Köder-“ und das Bibliotheksprotein miteinander, so verbinden sich beide GAL4-Domänen zum funktionellen Regulatorprotein, welches mit den GAL4-spezifischen UAS interagiert und die Reportergene aktiviert. Die Selektion der Positiven erfolgt auf Substraten mit hoher Stringenz sowohl über die rekonstituierte Autotrophie für Adenin und Histidin als auch über die Blaufärbung der Kolonien und der umgebenden Agarschichten aufgrund der Expression von α -Galaktosidase (Abb. 7).

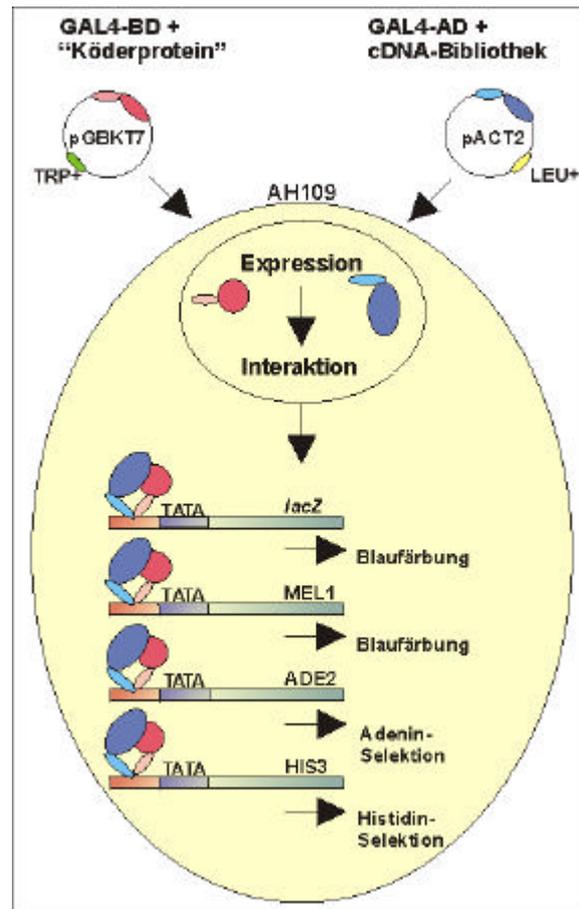


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Yeast Two-Hybrid-Systems in *S. cerevisiae* AH109. Die Expressionsvektoren *pGBKT7* und *pACT2* mit den jeweiligen cDNA-Inhalten werden in AH109 sequenziell oder simultan transformiert. GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4-BD), das c-Myc-Epitop (nicht eingezeichnet) und das „Köderprotein“ werden als ein Fusionsprotein vom Vektor *pGBKT7* exprimiert. Vom Vektor *pACT2* werden das nukleäre Lokalisationssignal (nicht eingezeichnet), die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD), das Hämagglutininepitop (nicht eingezeichnet) und ein zufälliges Protein aus der cDNA-Bibliothek exprimiert. Im Falle einer Interaktion zwischen dem „Köderprotein“ und dem Bibliothekprotein kommt es zu einer Rekonstitution eines funktionellen GAL4-Regulators infolge der Interaktion zwischen GAL4-BD und GAL4-AD. Der Proteinkomplex bindet mittels GAL4-BD/AD an GAL4-UAS, wodurch die Reportergene *lacZ*, *MEL1*, *ADE2* und *HIS3* aktiviert werden. Die Selektion der positiven Klone erfolgt über Adenin- und Histidin-autotrophie sowie über die α -Galaktosidaseaktivität. Schema verändert nach Fa. Clontech.

4.5.1 Titerbestimmung und Amplifikation der Lymphknoten-cDNA-Bibliothek

In der unter 3.2.16 beschriebenen Prozedur wurde der Titer der Lymphknoten-cDNA-Bibliothek in *pACT2* in *E. coli* BNN132 mit $1,88 \times 10^9$ KBE⁴/ml bestimmt. Die Bibliothekgröße belief sich auf $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone. Auf Empfehlung des Herstellers sollte die dreifache Menge an unabhängigen Klonen ($1,05 \times 10^7$) amplifiziert werden, um sicherzustellen, daß die vollständige Bibliothek durchmustert wird.

Das in der Amplifikation einzusetzende Bibliotheksvolumen ergab sich aus der Berechnung:

$$1,05 \times 10^7 \text{ [KBE]} / 1,88 \times 10^9 \text{ [KBE/ml]} = 5,6 \mu\text{l}.$$

Nach der Berücksichtigung des Klonverlustes von ca. 15 % beim Auftauen der Bibliothek wurden letztlich 6,5 µl der Bibliothek auf 300 Platten mit 15 cm Durchmesser zu je 35000 KBE/Platte amplifiziert. Insgesamt wurden 1,35 mg *pACT2*-Konstrukte isoliert.

4.5.2 repp86 wirkt wachstumshemmend in AH109

Mit Hilfe der *Yeast Two-Hybrid*-Methode sollten Interaktionspartner von repp86 identifiziert werden. Als „Köderprotein“ wurde hierbei zuerst das gesamte repp86-Protein verwendet. Der kodierende Bereich von repp86 mit der Länge von 2241 Basenpaaren wurde aus dem Vektor *pGEX-6P-1* (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Pollmann, Inst. für Hämatopathologie, Kiel) ausgeschnitten und in den Vektor *pGBKT7* kloniert.

Manche „Köderproteine“ verfügen über intrinsische DNA-Bindungseigenschaften, die für eine autonome Aktivierung der Reportergene verantwortlich sein können. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde *S. cerevisiae* AH109 in der Anfangsphase des *Yeast Two-Hybrid*-Experiments allein mit *pGBKT7-repp86* (Tryptophan-Autotrophie) transformiert (3.2.17). Die Transformanten wurden auf Substraten mit niedriger (SD-Agar/-W/+X-α-Gal und SD-Agar/-W/-L) und hoher Stringenz (SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X-α-Gal)⁵ plattiert. Auf den Substratkombinationen SD-Agar/-W/-L und SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X-α-Gal erfolgte kein Wachstum. repp86 verursachte also keine autonome Aktivierung der Reportergene. Auf dem niedrigselektiven Substrat (SD-Agar/-W/+X-α-Gal, Tryptophan-Autotrophie) fiel auf, daß sich die einzelnen Kolonien in Größe (Ø 0,2 bis 3,0 mm) und Pigmentierung (weiß und bräunlich) unterschieden. Laut Hersteller (Fa. Clontech) sind lediglich 1 bis 2 % der plattierten Kolonien weiß und klein (Ø < 1 mm). Dieser veränderte Phänotyp der Kolonien ist auf spontane Mutationen zurückzuführen, die zum Verlust der Mitochondrienfunktion führen. Der Prozentsatz kleiner weißer und leicht pigmentierter Kolonien auf dem Testsubstrat war aber deutlich höher (ca. 30 %), was auf eine Unregelmäßigkeit im Experiment hinwies.

In insgesamt 6 *Western blots* mit je 10 repräsentativen AH109-Kolonien konnte die Expression von GAL4-BD-repp86 weder mit dem anti-c-Myc-Antikörper noch mit dem repp86-spezifischen Antikörper Ki-S2 nachgewiesen werden. Zur schnelleren Durchmusterung einer größeren Anzahl von Kolonien wurde anschließend die Technik der APAAP-

⁴ KBE = Kolonie-bildende Einheiten

⁵ SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X-α-Gal: selektives Agarsubstrat ohne bestimmte Aminosäuren, die in dieser Arbeit stets im Ein-Buchstaben-Code (s. 9.1.1) angegeben werden.

Färbung eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden *pGBKT7-repp86*-transformierte AH109-Zellen in Flüssigkulturen (SD/-W) vermehrt. Aus den Zellen wurden Paraffinpräparate erstellt, die mit dem *repp86*-spezifischen Antikörper Ki-S2 gefärbt wurden. Bei der Durchmusterung wurde schließlich ein AH109-Transformant identifiziert, bei dem die APAAP-Färbung des Paraffinschnittes mit dem Antikörper Ki-S2 ein positives Signal (GAL4-BD-*repp86**) ergab (Abb. 8).

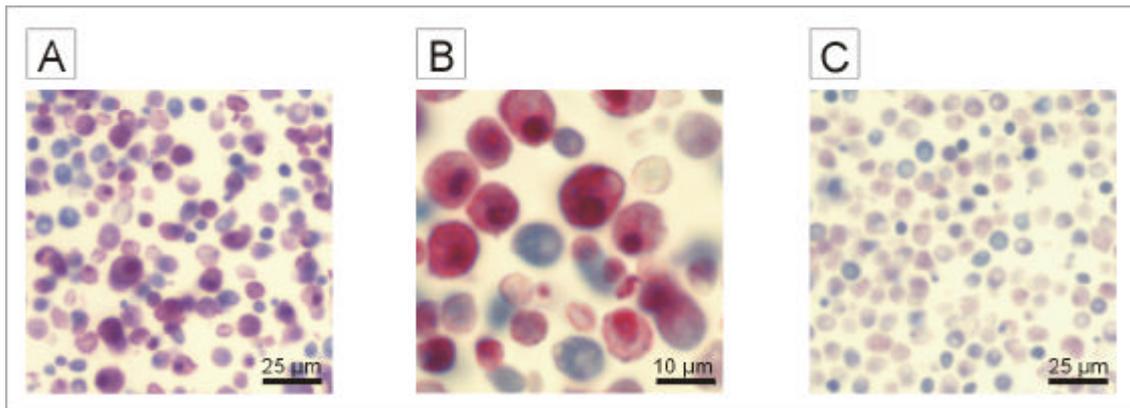


Abbildung 8: Expression von GAL4-BD-*repp86 in AH109.** Aus AH109-Kulturen wurden Paraffinschnitte angefertigt, die mit Ki-S2 und im APAAP-Verfahren gefärbt wurden. (A + B) AH109 mit GAL4-BD-*repp86**. GAL4-BD-*repp86** wird aufgrund des nukleären Lokalisationssignals vorwiegend im Zellkern akkumuliert (rot gefärbte Zellen). Blau gefärbte Zellen sind nicht angeschnittene Zellen, die den primären Antikörper Ki-S2 nicht aufgenommen haben. (C) Untransformierte AH109-Zellen als Negativkontrolle.

Der GAL4-BD-*repp86**-positive AH109-Klon wurde in Flüssigkultur in SD/-W vermehrt. Nach der Plasmidisolierung und Plasmidamplifikation in *E. coli* XL1 Blue wurde das isolierte *pGBKT7-repp86*-Konstrukt sequenziert. Die Sequenzierung ergab, daß das Konstrukt eine Deletion von zwei Nukleotiden in der *repp86*-Sequenz beinhaltetete, woraus eine Verschiebung des Leserasters und die Entstehung eines neuen Stopcodons TAA resultierten (Abb. 9 (A)), obwohl die Sequenzierung des zur Hefetransformation benutzen *pGBKT7-repp86*-Konstruktes die Richtigkeit der *repp86*-Sequenz bestätigte. Die Sequenzierung des Originalkonstruktes wurde wiederholt. Es wurden keine Sequenzfehler identifiziert. Das in AH109 exprimierte Teilstück von *repp86* bestand aus 293 korrekten N-terminalen Aminosäuren, auf welche vier veränderte Aminosäuren infolge der Leserahmenverschiebung folgten (GAL4-BD-*repp86** = GAL4-BD-*repp86*₍₁₋₂₉₃₊₄₎). Aus dem GAL4-BD-*repp86*₍₁₋₂₉₃₊₄₎-exprimierenden Hefeklon wurden anschließend Proteinextrakte angefertigt. Die Expression der verkürzten Variante von *repp86* wurde in der *Western blot*-Färbung mittels Ki-S2, dessen Epitop im N-terminalen Bereich von *repp86* liegt, nachgewiesen (Abb. 9 (B)).

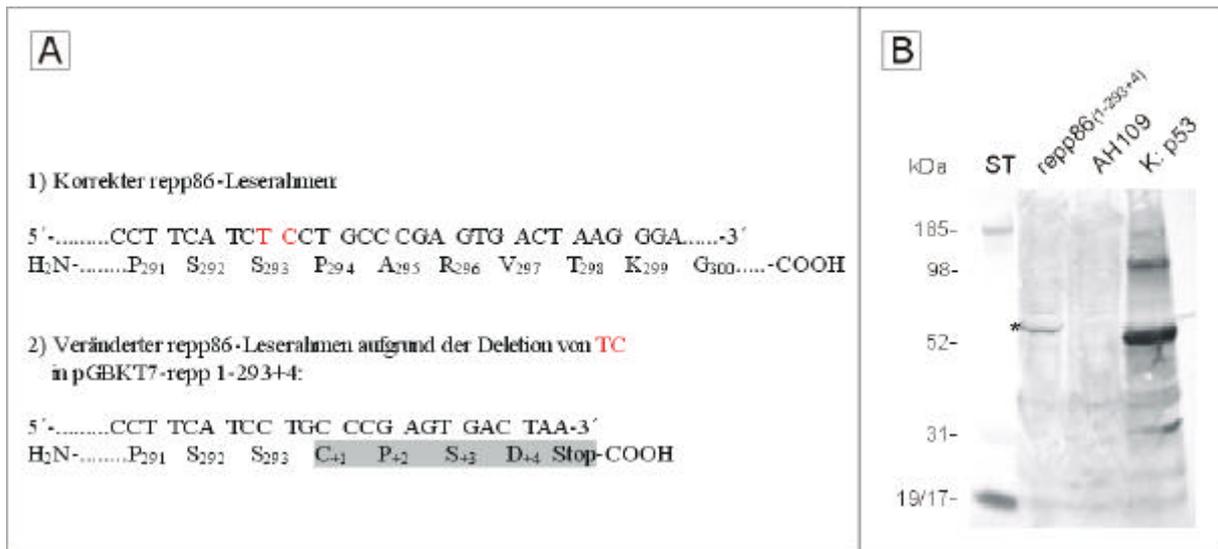


Abbildung 9: Veränderung des repp86-Leserahmens in pGBKT7-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎ aufgrund der Deletion von zwei Nukleotiden und Nachweis der Expression in AH109. (A1). Ausschnitt aus der korrekten repp86-Nukleotidsequenz mit den korrespondierenden Aminosäuren 291 bis 300 im Ein-Buchstaben-Code. **TC**: Nukleotide, die im Konstrukt pGBKT7-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎ (A2) fehlen. Die Leserahmenverschiebung resultiert in der Expression von 293 N-terminalen repp86-Aminosäuren und vier veränderten Aminosäuren (grau unterlegt) und in der Entstehung eines neuen Stopcodons TAA. (B) Western blot-Färbung mit anti-c-Myc; **ST**: Proteingrößenstandard MultiMark® Multi-Colored Standard; **repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎**: Immunnachweis der Expression von GAL4-BD-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎; **AH109**: Proteinextrakt aus untransformiertem AH109 als Negativkontrolle; **K: p53**: Immunnachweis von GAL4-BD-p53₍₇₂₋₃₉₀₎ bei 54,8 kDa in AH109, transformiert mit pGBKT7-53 und pGADT7-T; (*) GAL4-BD-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎ bei 55,5 kDa.

Der isolierte AH109-Klon exprimiert also eine durch Deletion zufällig entstandene verkürzte Version von repp86, in der die 454 C-terminalen Aminosäuren fehlten. Auf der anderen Seite wurden keine Hefekolonien isoliert, die das gesamte repp86-Protein exprimierten. Kontrolltransformationen mit dem insertfreien Vektor pGBKT7 zeigten, daß die Hefezellen normal wuchsen und daß die Expression der kodierten Peptide (GAL4-BD und c-Myc-Epitop) nicht unterbunden war. Der Vorgang der Transformation war also nicht die Ursache der Wachstumshemmung. Aus den Versuchsergebnissen (veränderte Morphologie der Kolonien und negative Western blots) wurde geschlossen, daß das überexprimierte vollständige repp86-Protein eine Wachstumshemmung der Hefezellen verursachte. Die verkürzte Version GAL4-BD-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎ wurde in AH109 exprimiert und wirkte sich nicht wachstumshemmend aus. Unter diesem Aspekt könnten die fehlenden 454 C-terminalen Aminosäuren eine Domäne beinhalten, die für die Wachstumshemmung verantwortlich war. Im Hinblick auf die Tatsache, daß *S. cerevisiae* AH109 zumindest den N-terminalen Bereich von repp86 exprimiert und dabei keine Wachstumshemmung aufwies, wurde das in Abbildung 9 (2) dargestellte Konstrukt bei der Durchmusterung der Lymphknoten-cDNA-Bibliothek verwendet, um Interaktionspartner für den N-terminalen Bereich von repp86 zu finden.

4.5.3 GAL4-BD-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎ interagiert mit SIAH2-Bibliothekskonstrukt

Durchmusterung der Lymphknoten-cDNA-Bibliothek: Der AH109-Klon mit dem repp86-Konstrukt *pGBKT7-repp₍₁₋₂₉₃₊₄₎* wurde in Flüssigkultur in SD/-W vermehrt, mit 0,7 mg *pACT2*-Lymphknoten-cDNA-Bibliothek transformiert und auf Substraten mit hoher Stringenz plattiert (3.2.18). Insgesamt wurden 200 Klone als vorerst positiv klassifiziert. Nach der Erstellung von Dauerkulturen erfolgte die unter 3.2.20 beschriebene Prozedur der Plasmidisolierung, Transformation und Amplifikation in *E. coli* XL1 Blue (3.2.8; 3.2.10), Plasmidverdau mit *Eco* RV und *Xho* I (3.2.13) und Sequenzierung (3.2.14). DNA-Sequenzvergleiche mit den Datenbankeinträgen wurden mit dem Programm *BLAST* durchgeführt (Altschul et al., 1997).

Unter insgesamt 82 sequenzierten *pACT2*-Konstrukten wurden acht Klone mit der unvollständigen cDNA-Sequenz von „*seven in absentia Drosophila homolog 2*“ (*SIAH2*) mit der Länge von ca. 1900 Nukleotiden gefunden, die alle im korrekten Leserahmen inseriert waren. Die Sequenzanalyse ergab, daß diese *pACT2-SIAH2*-Konstrukte für die C-terminalen *SIAH2*-Aminosäuren 99 bis 324 kodierten (*pACT2-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎*) und das Stopcodon TGA enthielten. *SIAH2* wurde als ein Protein, das zur Familie der RING-Finger-Proteine gehört und die Aktivität einer E3-Ubiquitinligase (5.2.1, 5.2.2) besitzt, charakterisiert (Hu et al., 1997a). Die mögliche Interaktion zwischen repp86 und *SIAH2* wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal beschrieben. Die RING-Finger-Domäne wird in *SIAH2* von den Aminosäuren 78 bis 115 gebildet und war in den Konstrukten der Lymphknotenbibliothek nicht vollständig enthalten. Die Domäne und der darauf folgende C-terminale Bereich von *SIAH2* sind in *Drosophila*, in *M. musculus* und im Menschen hochkonserviert (diskutiert in 5.5.1).

Zur Verifizierung des Interaktionsergebnisses zwischen GAL4-BD-repp86 und GAL4-AD-*SIAH2* wurden *pACT2-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎* und *pGBKT7-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎* in AH109 kotransformiert und auf Substraten mit niedriger und mit hoher Stringenz plattiert. Die Transformanten zeigten beim Wachstum auf dem Substrat mit hoher Stringenz eine eindeutige starke Blaufärbung, die auch in den umgebenden Agarschichten vorhanden war (Abb. 10 (A) und (B)). Das Ergebnis zeigte, daß die Reportergene aktiviert wurden, was auf eine Interaktion der beiden Fusionsproteine hindeutete. Als Positivkontrolle wurden *pGBKT7-53* und *pGADT7-T*, die für Fusionen der GAL4-Domänen mit den miteinander interagierenden Proteinen Maus-*p53₍₇₂₋₃₉₀₎* und SV40 *large T-antigen₍₈₄₋₇₀₈₎* kodieren, kotransformiert (Abb. 10 (C)).

Positive Hefekolonien wurden im hochselektiven Flüssigmedium (SD/-W/-L/-H/-Ade) vermehrt. Nach dem Aufschluß der Hefezellen und der Proteinextraktion wurden die exprimierten Fusionsproteine mit dem monoklonalen Maus-anti-c-Myc-Antikörper und dem polyklonalen Kaninchen-anti-HA-Serum als Primärantikörper markiert (Abb. 10 (D) und (E)). In der *Western blot*-Färbung wurde die Expression beider Fusionsproteine in AH109 eindeutig nachgewiesen, wodurch eine Interaktion in Hefen bestätigt worden ist.

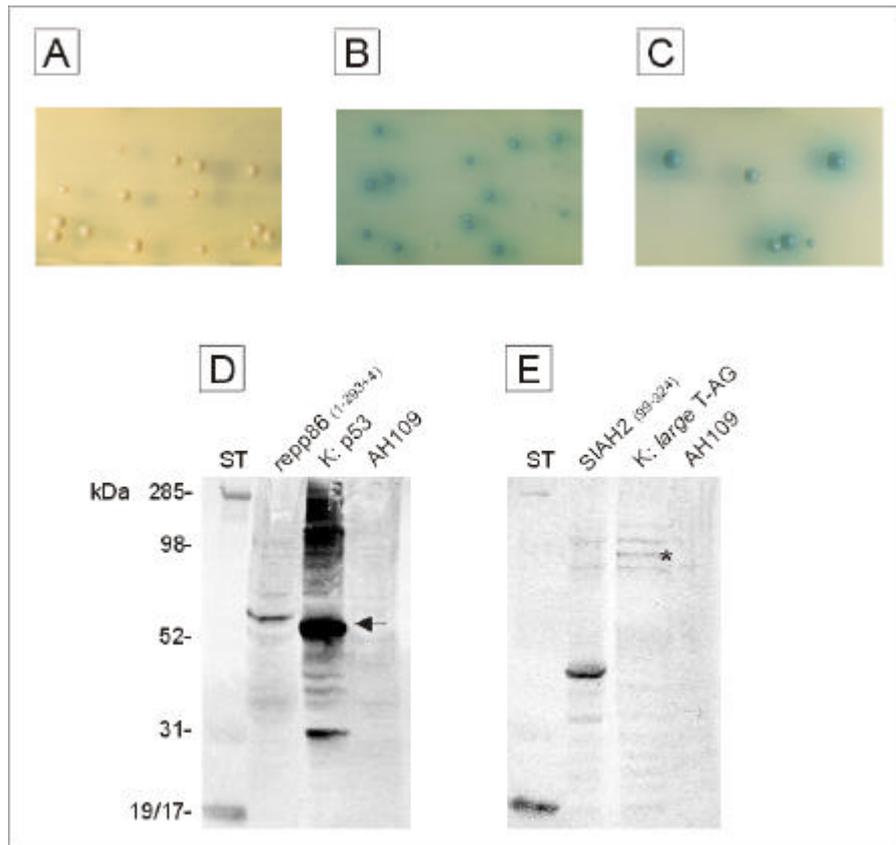


Abbildung 10: Interaktion von GAL4-BD-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎ mit GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ in *S. cerevisiae* AH109. AH109 wurde mit *pGBKT7-repp86*₍₁₋₂₉₃₊₄₎ und *pACT2-SIAH2*₍₉₉₋₃₂₄₎ kotransformiert und (A) auf SD-Agar/-W/-L und (B) auf SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X-α-Gal plattiert. Als Positivkontrolle für eine Interaktion in AH109 wurden *pGBKT7-53* und *pGADT7-T* kotransformiert (C), und auf SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X-α-Gal plattiert. Proteinextrakte aus den oben genannten Transformanten und untransformierten AH109-Zellen wurden im 4-12 % SDS-Fertiggel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Der Nachweis der Expression der Fusionsproteine erfolgte mit dem monoklonalen anti-c-Myc-Antikörper (D) und mit dem polyklonalen anti-HA-Antikörper (E). MG: GAL4-BD-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎ bei 55,5 kDa, GAL4-BD-p53 bei ca. 54,8 kDa in (D); GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ bei 43,6 kDa und GAL4-AD-large *T-antigen* bei 90,4 kDa (*) in (E). AH109 in (D) und (E): Negativkontrolle aus untransformierten AH109-Hefen; ST: *MultiMark*[®] *Multi-Colored Standard*.

4.5.4 Die Expression des vollständigen GAL4-BD-repp86 in AH109 ist möglich, wenn GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ koexprimiert wird

Im Hinblick auf die Funktion von SIAH2 als E3-Ubiquitinligase sollte die Frage geklärt werden, ob die Interaktion zwischen GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ und dem vollständigen repp86-Fusionsprotein die wachstumshemmende Wirkung von repp86 in AH109 aufheben kann. Die Konstrukte *pGBKT7-repp86* und *pACT2-SIAH2*₍₉₉₋₃₂₄₎ wurden in AH109 kotransformiert und auf Substraten mit mittlerer (SD-Agar/-W/-L) und hoher Stringenz (SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X- α -Gal) plattiert. AH109-Transformanten wuchsen auf beiden Substraten, wobei die Kolonien keine auffälligen Abweichungen vom erwarteten Phänotyp zeigten. Offensichtlich wurde die wachstumshemmende Wirkung von repp86 durch die Kotransformation aufgehoben. Das Wachstum auf dem Substrat mit hoher Stringenz setzte eine Aktivierung der Reportergene voraus, die nur bei einer Interaktion zwischen GAL4-BD-repp86 und GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ stattfinden kann. Im folgenden sollte überprüft werden, ob das vollständige repp86-Fusionsprotein und nicht nur eine zufällig entstandene verkürzte Variante von repp86 (wie unter 4.5.2 beschrieben) in AH109 exprimiert wurde.

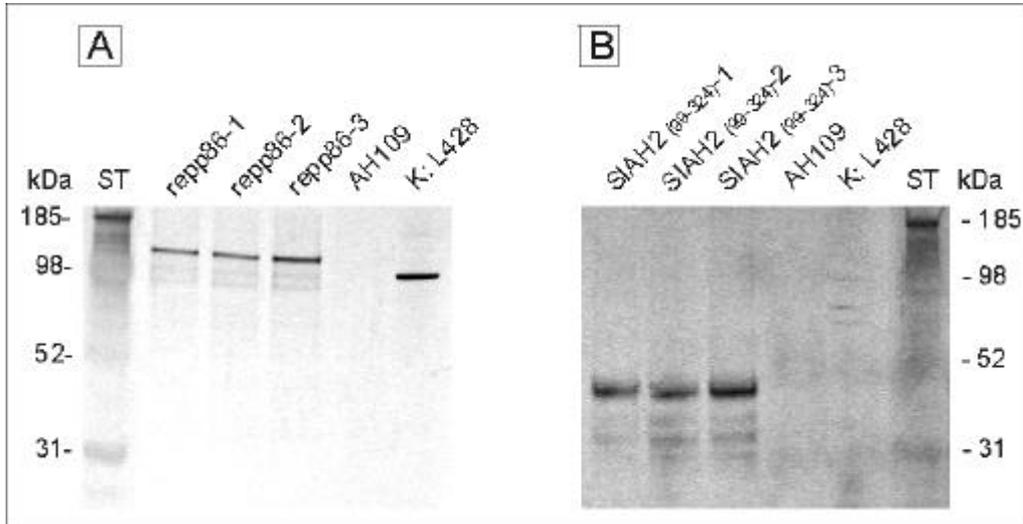


Abbildung 11: Korrelation der Expression von GAL4-BD-repp86 mit der Expression des SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎-Fusionsproteins in AH109. (A) *Western blot* von drei repräsentativen AH109-Klonen mit dem repp86-spezifischen Antikörper Ki-S2. Die Hefeklone exprimieren das gesamte GAL4-BD-repp86 (1 bis 3) mit dem theoretischen Molekulargewicht von 107,6 kDa. (B) *Western blot* gleicher Proteinextrakte mit dem Antikörper Kaninchen-anti-HA zeigt, daß die Hefeklone das Fusionsprotein GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ (1 bis 3) mit dem theoretischen Molekulargewicht von 43,6 kDa exprimieren. AH109: Negativkontrolle, untransformierter AH109; K: L428-Kernlysate als Positivkontrolle für den *Western blot* mit Ki-S2; L428-Zellen exprimierten keine Hämagglutininepitope in (B); ST: Proteingrößenstandard: *MultiMark*[®] *Multi-Colored Standard*.

Proteinextrakte aus drei ausgewählten *pGBKT7-repp86*- und *pACT2-SIAH2*₍₉₉₋₃₂₄₎-transformierten AH109-Klonen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. In *Western blots* mit Ki-S2 bzw. anti-Hämagglutinin wurde die Expression sowohl von GAL4-BD-repp86 in voller Länge als auch von GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ nachgewiesen (Abb. 11 (A) und (B)).

Zusammenfassend wurde in den bisher durchgeführten *Yeast-Two-Hybrid*-Experimenten zunächst festgestellt, daß die *pGBKT7-repp86*-transformierten AH109-Zellen kein vollständiges Fusionsprotein exprimieren. Die durch eine Nukleotiddeletion zufällig entstandene verkürzte repp86-Version (GAL4-BD-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎) ohne den C-terminalen Bereich wurde hingegen exprimiert. In diesem Zusammenhang scheint der C-terminale Bereich von repp86 eine Funktion in AH109 zu besitzen, die das Wachstum der Zellen negativ beeinflusst. Diese Wirkung scheint gemindert oder gar aufgehoben zu sein, wenn GAL4-BD-repp86 und der C-terminale Bereich des Interaktionspartners SIAH2 (GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎) zusammen exprimiert werden.

4.5.5 GAL4-BD-repp86 interagiert mit GAL4-AD-SIAH2 in AH109

Im folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob das vollständige SIAH2-Protein die gleiche mindernde Wirkung bezüglich der postulierten Wachstumshemmung auf das repp86-Fusionsprotein nach der Transformation in AH109 entfaltet.

Experimentelle Durchführung: Der komplette kodierende Bereich der SIAH2-cDNA wurde in den Vektor *pGADT7* (*pGADT7-SIAH2*) kloniert. Als Matrize zur Herstellung der SIAH2-cDNA-Amplifikate in der PCR wurde das Konstrukt IMAGp 998P24184 (RZPD, Berlin) verwendet. Das hergestellte *pGADT7-SIAH2*-Konstrukt wurde zur Kontrolle sequenziert und wies keine Sequenzfehler auf. *pGBKT7-repp86* und *pGADT7-SIAH2* wurden in *S. cerevisiae* AH109 kotransformiert und auf Substraten mit mittlerer und hoher Stringenz plattiert (Abb. 12). Auf dem Substrat mit hoher Stringenz (SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X- α -Gal) wuchsen blaue AH109-Kolonien, die keine Abweichungen vom erwarteten Phänotyp aufwiesen. Die umgebenden Agarschichten wiesen ebenfalls eine Blaufärbung auf (Abb. 12 (2)). Das Ergebnis deutete eine Interaktion beider Fusionsproteine an.

Reportergenkontrolle: Parallel zu der oben beschriebenen Transformation wurde AH109 mit *pGADT7-SIAH2* allein transformiert und auf den Substraten SD-Agar/-L/+X- α -Gal

(Plasmidselektion) und SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X- α -Gal (Reportergenaktivierung) plattiert. In dieser Kontrolltransformation wurde kein Wachstum auf dem hochselektiven Substrat beobachtet. Hefekolonien auf dem Substrat SD-Agar/-L/+X- α -Gal (Plasmidselektion) waren normal pigmentiert und zeigten keine α -Galaktosidaseaktivität. Die Reportergene wurden also durch das SIAH2-Fusionsprotein nicht autonom aktiviert (Abb. 12 (3)).

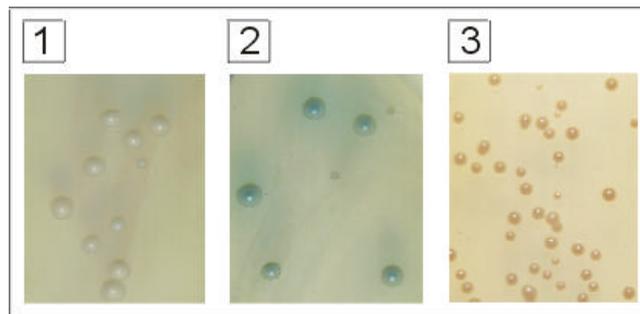


Abbildung 12: Transformation von AH109 mit *pGBKT7-repp86* und *pGADT7-SIAH2*. (1) Transformanten auf Platten mit mittlerer Stringenz (SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X- α -Gal) und (2) hoher Stringenz (SD-Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X- α -Gal). Das Fehlen der bräunlichen Pigmentierung in (1) weist auf die Aktivierung der Reportergene hin. Auf dem hochselektiven Substrat (2) zeigten die Transformanten eine ausgeprägte α -Galaktosidaseaktivität (Blaufärbung). (3) AH109-Transformanten mit *pGADT7-SIAH2* auf dem Substrat SD-Agar/-L/+X- α -Gal zeigen keine Blaufärbung. Reportergene werden von GAL4-AD-SIAH2 nicht autonom aktiviert.

Expression der Interaktionspartner: Zwei der *pGBKT7-repp86*- und *pGADT7-SIAH2*-transformierten Hefeklone wurden im hochselektiven Flüssigmedium vermehrt. Die Expression der Fusionsproteine GAL4-BD-repp86 und GAL4-AD-SIAH2 in AH109 nach der Kotransformation wurde im *Western blot* bestätigt (Abb. 13 (A1) und (B1)).

Kontrolltransformanten: Neben der oben beschriebenen Transformation wurde AH109 wiederholt mit dem *pGBKT7-repp86* und dem Bibliothekkonstrukt *pACT2-SIAH2*₍₉₉₋₃₂₄₎ kotransformiert, um die Ergebnisse des Vorversuchs (4.5.4) zu bestätigen. Auch hier wurden zwei Klone im hochselektiven Flüssigmedium vermehrt. Der Nachweis der Expression der Fusionsproteine erfolgte ebenfalls im *Western blot* (Abb. 13 (A2) und (B2)).

In beiden SDS-Gelen wurden gleiche Volumina (25 μ l) der jeweiligen Proteinextrakte aufgetragen. Die Expression von GAL4-BD-repp86 war schwächer als die Expression der SIAH2-Fusionsproteine. Die Versuchsergebnisse zeigten, daß GAL4-BD-repp86 sowohl mit dem Fusionsprotein GAL4-AD-SIAH2 als auch mit GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ in *S. cerevisiae* AH109 interagiert und daß die wachstumshemmende Wirkung des vollständigen repp86 auf den Hefestamm durch die Interaktion aufgehoben zu sein scheint.

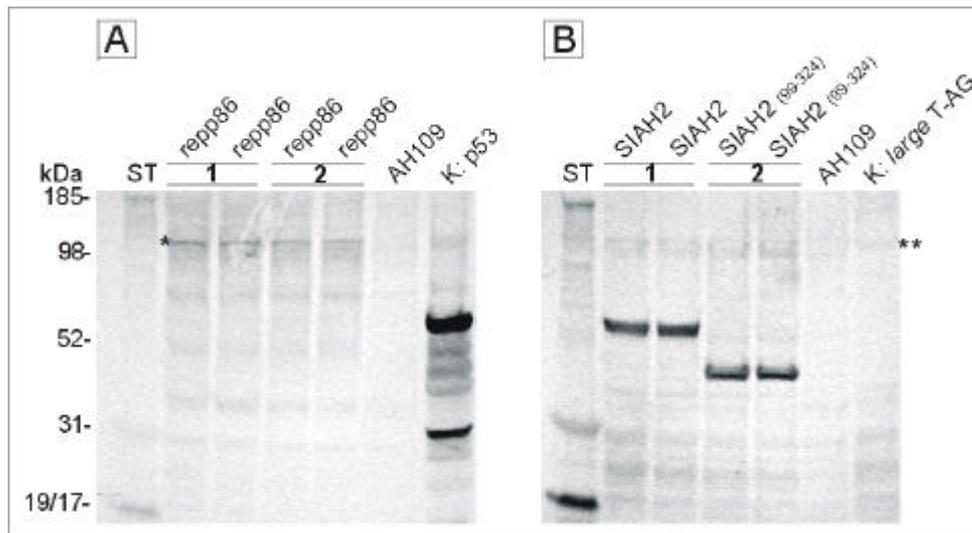


Abbildung 13: Western blot zum Nachweis der Expression von GAL4-BD-repp86, GAL4-AD-SIAH2 und GAL4-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ in *S. cerevisiae*. In (A) erfolgte der Nachweis von GAL4-BD-repp86 mit Ki-S2. In (B) wurden die rekombinanten SIAH2-Proteine mit dem anti-HA-Antikörper markiert. Zwei ausgewählte Hefeklone exprimierten GAL-BD-repp86 (A1) in voller Länge [(*) bei 107,6 kDa] und GAL4-AD-SIAH2 (B1) [55,3 kDa]. Zwei Kontrollklone exprimierten ebenfalls GAL-BD-repp86 (A2) in voller Länge [(*) bei 107,6 kDa] und GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ [(B2) bei 43,6 kDa]. Als Positivkontrolle dienten die mit *pGBKT7-p53* und *pGADT7-large T*-Antigen transformierten AH109-Zellen [„K: p53“ bei 54,8 kDa und „K: large T-AG“ bei 90,4 kDa]. In (B) ist die Expression von GAL4-AD-large T-Antigen schwach ausgeprägt (**). Negativkontrolle: untransformierte AH109-Zellen [AH109]. (ST): Proteingrößenstandard: *MultiMark*[®] *Multi-Colored Standard*.

4.5.6 Bestimmung der interagierenden Domänen von repp86 und SIAH2

Aus den unter 4.5.3 und 4.5.5 beschriebenen Experimenten mit dem Konstrukt *pGBKT7-repp86*₍₁₋₂₉₃₊₄₎ ging hervor, daß die Fusionsproteine GAL4-AD-SIAH2 und GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ mit dem N-terminalen Bereich von repp86 interagieren. In weiteren Experimenten sollte der N-terminale repp86-Bereich weiter eingengt werden. Außerdem sollte geprüft werden, ob die in den Analysen bisher nicht untersuchten C-terminalen repp86-Teilbereiche eine Interaktion mit dem SIAH2-Fusionsprotein zeigen.

Es wurden *pGBKT7-repp86*-Konstrukte hergestellt, die für N-terminale und C-terminale Bereiche von repp86 kodierten. In Tabelle 1 wurde eine Übersicht der Konstrukte mit Nukleotid- und Aminosäureangaben sowie den korrespondierenden theoretischen Molekulargewichten zusammengestellt. In folgenden Experimenten wurden die in Tabelle 2 aufgeführten repp86-Konstrukte zusammen mit *pACT2-SIAH2*₍₉₉₋₃₂₄₎ oder *pGADT7-SIAH2* in AH109 transformiert, um den interagierenden Bereich von repp86 einzugrenzen bzw. um andere Bereiche von der Interaktion auszuschließen (Abb. 14 (A)). Zusätzlich wurde eine Reihe von Kontrolltransformationen durchgeführt.

Tabelle 1: Klonierungsübersicht der repp86-Teilsequenzen in pGBKT7. Die angegebenen Nukleotidzahlen stehen im direkten Bezug zum repp86-Translationsstartpunkt (AUG). In der dritten Spalte wurden die korrespondierenden Aminosäuren angegeben. Die Molekulargewichte (MG) der Fusionsproteine, die aus repp86-Teilsequenz, GAL4-BD, c-Myc-Epitop und einem Teil der „multiple cloning site“ bestehen, wurden in kDa angegeben. In den letzten Spalten wurden die verwendeten PCR-Oligonukleotide und die enthaltenen Restriktionsstellen vermerkt.

| Konstrukt | repp86-Nukleotide | repp86-AS | MG (kDa) | Restriktionsstellen | PCR-Oligonukleotide |
|-------------------------|-------------------|-----------|----------|------------------------------|----------------------------|
| pGBKT7-repp86 (1-423) | 1-1270 | 1-423 | 69,8 | <i>Xma</i> I / <i>Bam</i> HI | reppIfor/reppVrev |
| pGBKT7-repp86 (1-276) | 1-828 | 1-276 | 53,2 | <i>Xma</i> I / <i>Bam</i> HI | reppIfor/reppIVrev |
| pGBKT7-repp86 (1-148) | 1-444 | 1-148 | 38,3 | <i>Xma</i> I / <i>Bam</i> HI | reppIfor/reppIIIrev |
| pGBKT7-repp86 (67-276) | 199-828 | 67-276 | 45,9 | <i>Xma</i> I / <i>Bam</i> HI | reppIIfor/reppIVrev |
| pGBKT7-repp86 (143-423) | 425-1270 | 143-423 | 53,9 | <i>Xma</i> I / <i>Bam</i> HI | reppIIIfor/reppVrev |
| pGBKT7-repp86 (270-559) | 808-1677 | 270-559 | 55,0 | <i>Xma</i> I / <i>Pst</i> I | reppIVfor/CoilPstIrev |
| pGBKT7-repp86 (418-559) | 1251-1677 | 418-559 | 37,9 | <i>Xma</i> I / <i>Pst</i> I | reppVfor/CoilPstIrev |
| pGBKT7-repp86 (563-747) | 1687-2244 | 563-747 | 42,9 | <i>Xma</i> I / <i>Pst</i> I | reppVIfor/CoilPstIrev |
| pGBKT7-repp86 (651-747) | 1951-2244 | 651-747 | 32,3 | <i>Nco</i> I / <i>Pst</i> I | CoilNcoIneuFor/CoilPstIrev |

Experimentelle Kontrollen: Die in Tabelle 2 aufgeführten repp86-Teilkonstrukte wurden allein in *S. cerevisiae* transformiert. Die alleinige Transformation der repp86-Teilkonstrukte diente der Überprüfung ihrer eventuellen autoaktivierenden Eigenschaften, welche die Ergebnisse der SIAH2-Interaktion verfälschen würden. Auf mittelselektiven und hochselektiven Substraten erfolgte kein Zellwachstum, so daß eine autonome Reporteraktivierung durch die repp86-Fusionen ausgeschlossen werden konnte.

Als weitere Kontrolle wurden die Konstrukte *pGADT7-SIAH2* und *pGADT7-SIAH2*₍₉₉₋₃₂₄₎ zusammen mit dem insertfreien Vektor *pGBKT7* in AH109 kotransformiert. Der insertfreie *pGBKT7*-Vektor kodiert für die Aminosäuren der GAL4-DNA-Bindedomäne, des c-Myc-Epitops und des Bereichs der „multiple cloning site“. Diese Kontrolltransformation sollte zeigen, ob die GAL4-DNA-Bindedomäne allein ausreicht, um mit GAL4-AD-SIAH2 positive Signale im *Yeast Two-Hybrid*-System zu ergeben. Für beide SIAH2-Konstrukte wurde kein Wachstum auf hochselektivem Substrat festgestellt. Das Ergebnis bedeutete, daß die Reportergene nicht aktiviert wurden, weil keine Interaktion zwischen den SIAH2-Fusionsproteinen und der GAL4-DNA-Bindedomäne stattgefunden hatte.

Zusätzlich wurden SIAH2-Fusionsproteine auf die Interaktion mit dem Fusionsprotein GAL4-BD-Lamin C untersucht und ergaben keine Interaktion. Die Expression von Lamin C und GAL4-DNA-Bindedomäne wurde in SIAH2-kotransformierten Hefen mittelselektivem Medium (SD/-W/-L) im *Western blot* nachgewiesen (Abb. 14 (B)).

Ergebnisse der Interaktionsstudien: Die Interaktionen zwischen GAL4-BD-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎ bzw. GAL4-BD-repp86 und GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ bzw. GAL4-AD-SIAH2 wurden bereits

beschrieben (4.5.3; 4.5.4 und 4.5.5). Die Fusionsproteine GAL4-BD-repp86₍₁₋₄₂₃₎, -repp86₍₁₋₂₇₆₎, und -repp86₍₁₋₁₄₈₎ interagierten mit den Fusionsproteinen GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ und GAL4-AD-SIAH2 in AH109, während alle anderen repp86-Teilbereiche keine Interaktion mit den SIAH2-Fusionsproteinen zeigten. Der kleinste interagierende Bereich von repp86 bestand aus den Aminosäuren 1 bis 148 (GAL4-BD-repp86₍₁₋₁₄₈₎). Das unmittelbar überlappende Konstrukt *pGBKT7-repp86*₍₆₇₋₂₇₆₎ zeigte keine Interaktion mit den SIAH2-Fusionsproteinen. Mit diesem Konstrukt gelang die Einengung des für die Interaktion mit SIAH2 notwendigen repp86-Bereiches auf die Aminosäuren 1 bis 67 (Abb. 14 (A)).

Mit Ausnahme von GAL4-BD-repp86₍₂₇₀₋₅₅₉₎ und GAL4-BD-repp86₍₅₆₃₋₇₄₇₎ wurde die Expression aller anderen repp86-Fusionsproteine nachgewiesen (Abb. 14(B)). Die Expression der beiden mit SIAH2-Fusionen interagierenden repp86-Fusionsproteinen GAL4-BD-repp86 und GAL4-BD-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎ wurde bereits unter 4.5.3, 4.5.4 und 4.5.5 beschrieben.

Hefetransformanten mit den Konstrukten *pGBKT7-repp86*₍₂₇₀₋₅₅₉₎ und *pGBKT7-repp86*₍₅₆₃₋₇₄₇₎, kotransfiziert mit den jeweiligen SIAH2-Konstrukten, wuchsen auf dem mittelselektiven Substrat SD Agar/-W/-L (Plasmidselektion), waren jedoch auf dem hochselektiven Substrat SD Agar/-W/-L/-H/-Ade/+X- α -Gal nicht wachstumsfähig. Je fünf Transformantenkolonien vom mittelselektiven Substrat wurden im mittelselektiven Flüssigmedium (SD/-W/-L) vermehrt. Die Expression der Fusionsproteine konnte im *Western blot* nicht nachgewiesen werden, so daß davon ausgegangen werden mußte, daß eine plasmidunabhängige Selektion in der Hefekultur stattgefunden hatte. Möglicherweise sind die repp86-Bereiche, die von den Konstrukten abgedeckt werden, für die wachstumshemmende Wirkung des gesamten repp86-Proteins auf AH109 verantwortlich. Im Falle einer Interaktion dieser beiden repp86-Bereiche mit SIAH2 müßte sich der Effekt einer teilweise oder gänzlich aufgehobenen Wachstumshemmung manifestieren, der für das vollständige repp86-Fusionsprotein beobachtet wurde (4.5.5). Da dieser Effekt nicht auftritt, kann davon ausgegangen werden, daß SIAH2-Fusionsproteine weder mit GAL4-BD-repp86₍₂₇₀₋₅₅₉₎ noch mit GAL4-BD-repp86₍₅₆₃₋₇₄₇₎ interagierten. Der alleinige Interaktionsbereich mit GAL4-AD-SIAH2 in der repp86-Sequenz würde demnach die Aminosäuren 1 bis 67 einschließen. Alle anderen Bereiche interagieren nicht mit GAL4-AD-SIAH2.

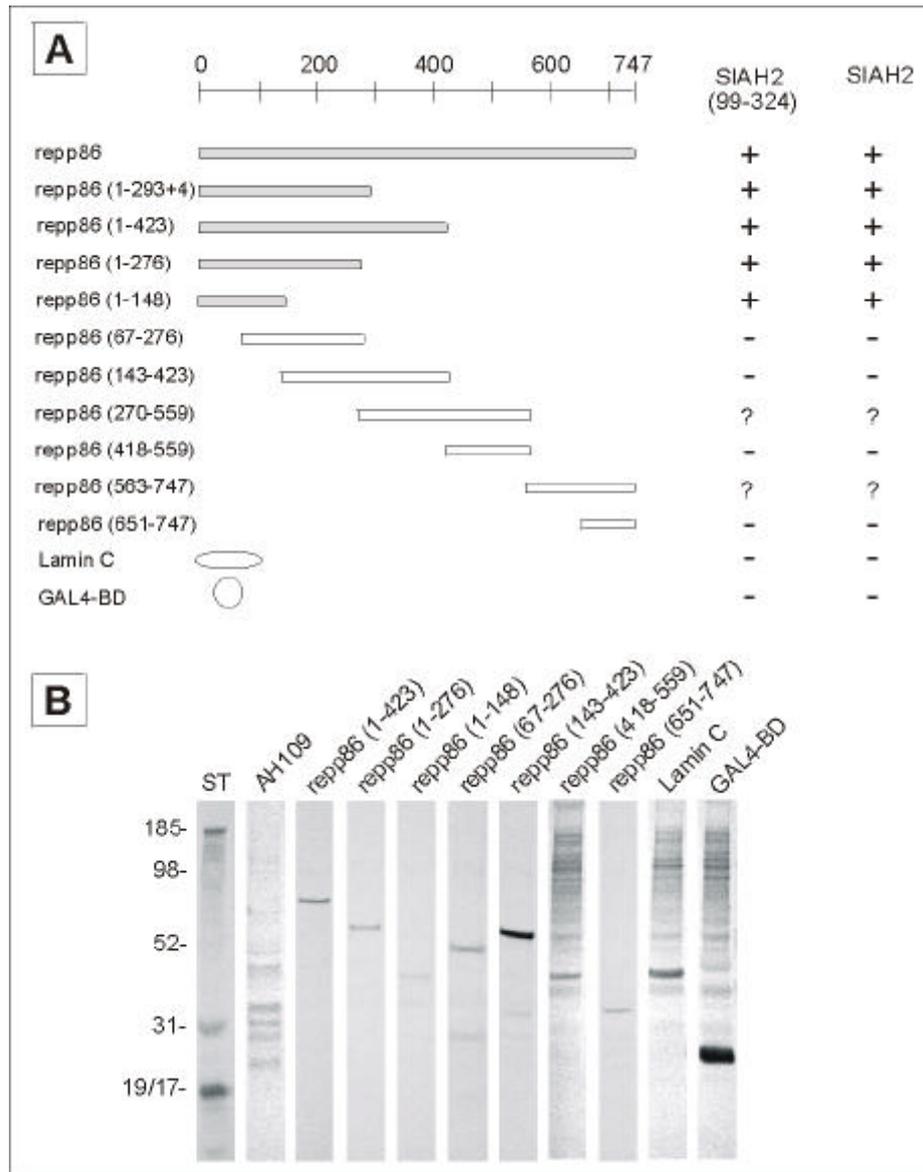


Abbildung 14: Bestimmung des Bindungsbereiches von repp86 bei der Interaktion mit den SIAH2-Fusionsproteinen im Yeast Two-Hybrid. In (A) wurden GAL4-BD-repp86-Teilproteine mit der zugehörigen AS-Bezeichnung dargestellt, die mit GAL4-AD-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ oder GAL4-AD-SIAH2 auf eine Interaktion hin untersucht worden sind. Interagierende repp86-Fusionsproteine sind als graue Boxen dargestellt. Zusätzlich wurden die Interaktionen mit (+)-Zeichen unter den SIAH2-Bezeichnungen vermerkt. Entsprechend wurde das Fehlen einer Interaktion mit (-)-Zeichen angedeutet. Mit (?) vermerkte Proteinpaare ergaben im *Yeast Two-Hybrid* keine Interaktion, aber die Expression der rekombinanten repp86-Proteine war im *Western blot* nicht nachweisbar. Im oberen Bereich der Abbildung wurde ein Maßstab für die repp86-Aminosäuren eingefügt. In (B) wurden *Western blots* der einzelnen repp86-Fusionsproteine und der Kontrollen zusammengestellt. (ST) Proteingrößenstandard: MultiMark[®] Multi-Colored Standard.

Die Fusionsproteine GAL4-BD-repp86₍₁₄₃₋₄₂₃₎ und GAL4-BD-repp86₍₄₁₈₋₅₅₉₎ haben jedes für sich keine wachstumshemmende Wirkung, obwohl sie beide zusammengekommen den Bereich von GAL4-BD-repp86₍₂₇₀₋₅₅₉₎ abdecken. Möglicherweise befindet sich die für die postulierte Wachstumshemmung verantwortliche Domäne im Bereich der Überlappung der Nachbarkonstrukte.

4.6 Interaktion von repp86 und SIAH2 in transfizierten HEK293-Zellen

Die im *Yeast Two-Hybrid*-Experiment erzielten Ergebnisse lieferten Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen repp86 und der E3-Ubiquitinligase SIAH2. Die Interaktion schien die wachstumshemmende Wirkung von repp86 in Hefezellen aufzuheben. Die Ergebnisse sollten in Koimmunpräzipitationsexperimenten verifiziert werden. Die Technik der Koimmunpräzipitation wird zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt. Aus einer Lösung, die neben dem Antigen auch das mit dem Antigen interagierende Protein enthält, werden mit Hilfe des antigenspezifischen Antikörpers Interaktionskomplexe beider Proteine über die Affinität des Antikörpers zu dem an Sepharose gebundenen Protein A präzipitiert. Die einzelnen Komponenten des Komplexes werden im *Western blot* nachgewiesen. Die experimentelle Ausführung wurde unter 3.3.1 beschrieben.

Konstruktherstellung: Der kodierende Bereich der repp86-cDNA wurde in den Expressionsvektor *pRK5* kloniert (PD S. Adam, Inst. für Immunologie, Kiel). SIAH2-cDNAs wurden in den Expressionsvektor *pFLAG-CMV2* kloniert. Zur Herstellung aller SIAH2-Konstrukte wurden die zu inserierenden Bereiche mittels PCR amplifiziert. Als Matrize diente hierzu der Klon IMAGp998P24184 (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, RZPD, Berlin), der die gesamte kodierende humane SIAH2-cDNA enthält. Mit dem Konstrukt *pFLAG-CMV2-SIAH2* wurde eine Mutagenese (3.2.15) zur Einführung eines Stopcodons stromabwärts des letzten kodierenden Nukleotidtriplets mit Hilfe des *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kits* von Stratagene durchgeführt (Kunkel, 1985; Taylor et al., 1985; Vandeyar et al., 1988). Der Klonierungsvorgang wurde unter 3.2.6 beschrieben. In Tabelle 2 wurde die Klonierungsübersicht der SIAH2-(Teil)Sequenzen wiedergegeben.

Tabelle 2: Klonierungsübersicht der SIAH2-(Teil)Sequenzen in pFLAG-CMV2. Zwei SIAH2-Konstrukte beginnen mit dem ersten kodierenden Nukleotid der SIAH2-cDNA. Die angegebenen Nukleotidzahlen stehen im direkten Bezug zum SIAH2-Translationsstartpunkt. In der dritten Spalte wurden die korrespondierenden Aminosäuren angegeben. Molekulargewichte (MG) der Fusionsproteine (SIAH2-(Teil)Sequenzen und FLAG-Epitop) wurden in kDa angegeben. Weiterhin wurden die in den PCR-Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsstellen angegeben. *QuickChange:* Mutagenese-Verfahren von Stratagene, Erläuterung im Text.

| pFLAG-CMV2-Konstrukt | SIAH2-Nukleotide | SIAH2-AS | MG (kDa) | Restriktionsstellen | PCR-Oligonukleotide |
|----------------------|------------------|----------|----------|---------------------|---------------------------|
| SIAH2 | 1-972 | 1-324 | 35,90 | HindIII/BamHI | SIAH2FLAGfor/SIAH2FLAGrev |
| | 1-972+Stop | | | <i>QuickChange</i> | SIAHMutFlagF/SIAHMutFlagR |
| SIAH2 (99-324) | 292-975 | 99-324 | 26,36 | HindIII/BamHI | FLsiahCfor/FLsiahCrev |
| SIAH2 (1-99) | 1-297+Stop | 1-99 | 10,86 | HindIII/BamHI | SIAH2FLAGfor/FLsiahNrev |

4.6.1 Koimmunpräzipitation von repp86 und FLAG-SIAH2

HEK293-Zellen wurden mit *pRK5-repp86*- und *pFLAG-CMV2-SIAH2* oder mit insertfreien Vektorkontrollen *pRK5* und *pFLAG-CMV2* transfiziert (3.3.1.2). Nach 24 h wurden Zellysate angefertigt. Das in HEK293 überexprimierte repp86 wurde im *Western blot* mit dem repp86-spezifischen Antikörper Ki-S2 nachgewiesen. SIAH2 wurde in HEK293 als ein Fusionsprotein mit dem künstlichen Peptid FLAG exprimiert und im *Western blot* mit dem anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen.

Experimentelle Zellysat-Kontrollen: Zur allgemeinen Kontrolle einer erfolgreichen Expression der Proteine wurden Gesamtzellysate ohne vorige Koimmunpräzipitation im *Western blot* untersucht. Mit dem Zellysat aus L428-Zellen (Abb. 15 (A1)) wurde die endogene Expression von repp86 in L428-Zellen zur Kontrolle der Ki-S2-Spezifität nachgewiesen. Die mit insertfreien Vektorkontrollen *pRK5* und *pFLAG-CMV2* transfizierten HEK293-Zellen exprimierten endogenes repp86 von ca. 100 kDa (Abb. 15 (A4)). Im Lysat der mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2* transfizierten HEK293-Zellen wurde die Expression von repp86 (Abb. 15 (A5); ca. 100 kDa) und FLAG-SIAH2 (Abb. 15 (C5); 35,9 kDa) nachgewiesen. Die mit *pFLAG-CMV2-SIAH2* allein transfizierten HEK293-Zellen exprimierten FLAG-SIAH2 (Abb. 15 (C6); 35,9 kDa). Zur Kontrolle wurde eine *Western blot*-Membran ohne Ki-S2 und nur mit dem sekundären Antikörper Kaninchen-anti-Maus inkubiert, um nachzuweisen, daß der sekundäre Antikörper keine Epitope unspezifisch erkennt.

Koimmunpräzipitation: Mit dem Lysat der mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2* kotransfizierten HEK293-Zellen wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt (3.3.1). Im ersten Schritt wurde der Antikörper Kaninchen-anti-Maus (IgG + IgM) an Protein A-Sepharose gebunden. Danach wurde an den Primärantikörper der sekundäre Maus-anti-FLAG-Antikörper gekoppelt (3.3.1.3). Die Sepharose-Antikörper-Komplexe wurden mit dem Zellysat aus HEK293-Zellen, die mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2* transfiziert waren, inkubiert. Mittels des sekundären Antikörpers (Maus-anti-FLAG) sollte FLAG-SIAH2 aus dem Lysat präzipitiert werden. Im Falle einer Interaktion zwischen repp86 und FLAG-SIAH2 müßte auch repp86 im Proteinpräzipitat nachzuweisen sein. Die so inkubierten Protein A-Sepharose-Proteinkomplexe wurden gewaschen, unter denaturierenden Bedingungen im Probenpuffer gekocht und in der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt.

Der Nachweis der präzipitierten Proteine erfolgte im *Western blot* (Abb. 15 (A3)). Im Koimmunpräzipitat konnte repp86 eindeutig identifiziert werden (Abb. 15 (A3), Pfeil).

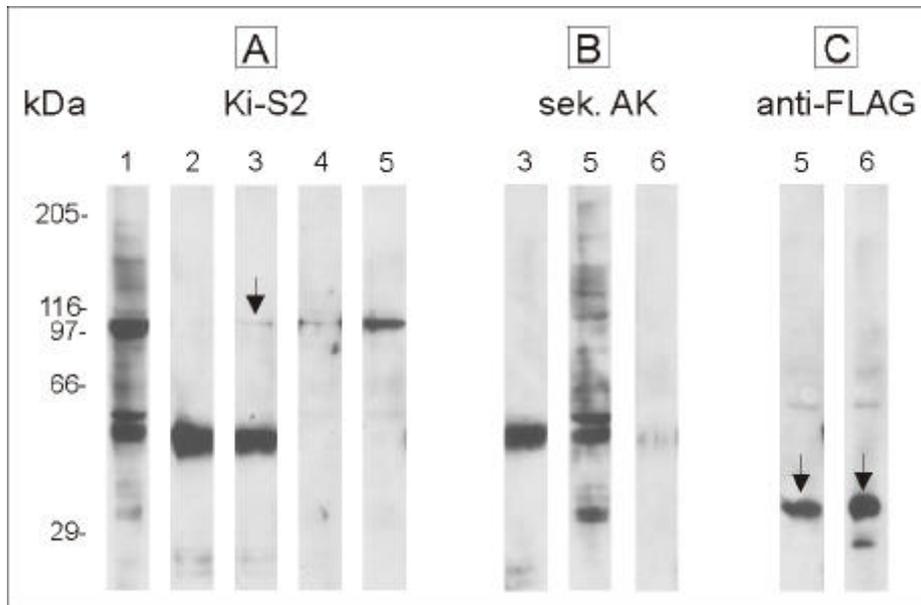


Abbildung 15: Western blots der Koimmunpräzipitation von repp86 und FLAG-SIAH2 aus überexprimierenden HEK293-Zellen mit dem anti-FLAG-Antikörper. *Western blot* (A) wurde mit dem repp86-spezifischen Maus-Antikörper Ki-S2 durchgeführt. (B) wurde zum Ausschluß unspezifischer Proteinerkennung lediglich mit dem sekundären anti-Maus-Antikörper inkubiert. *Western blot* (C) wurde mit Maus-anti-FLAG durchgeführt. (1) L428-Lysat als Positivkontrolle für repp86-Expression (ca. 100 kDa); (2) Koimmunpräzipitat aus HEK293, transfiziert mit *pRK5* und *pFLAG-CMV2* ohne Insert, kein repp86. (3) Koimmunpräzipitat repp86 aus HEK293, transfiziert mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2*. (4) Lysat aus HEK293, transfiziert mit *pRK5* und *pFLAG-CMV2* ohne Insert; (5) Lysat aus HEK293, transfiziert mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2*; (6) Lysat aus HEK293, transfiziert mit *pFLAG-CMV2-SIAH2*. Als Größenstandard wurde *High M. W. Standard Mixture* verwendet. repp86 bei 100 kDa, FLAG-SIAH2 bei 36 kDa und IgG-schwere Kette bei ca. 50 kDa.

Um sicherzugehen, daß repp86 nicht unter der Mitwirkung des FLAG-Peptides kopräzipitierte, wurde eine Koimmunpräzipitationskontrolle durchgeführt. Die Protein A-Sepharose-Antikörper-Komplexe wurden mit dem Zellysat von HEK293-Zellen inkubiert, die kein FLAG-SIAH2 sondern nur das alleinige FLAG-Epitop exprimierten. Die Zellen waren zuvor mit den insertfreien Vektoren *pRK5* und *pFLAG-CMV2* transfiziert worden. Bei der Inkubation wurde das FLAG-Peptid (ca. 3 kDa) an den Antikörper-Komplex gebunden. In der *Western blot*-Detektion mit Ki-S2 konnte kein repp86-Präzipitat nachgewiesen werden (Abb. 15 (A2)). Daraus wurde geschlossen, daß keine unspezifische Interaktion zwischen endogenem repp86 und dem FLAG-Epitop stattfindet.

Die Koimmunpräzipitation von repp86 mit dem FLAG-spezifischen Antikörper war nur unter Vermittlung von FLAG-SIAH2 möglich. Das Ergebnis zeigte, daß Proteinkomplexe aus

repp86 und FLAG-SIAH2 in HEK293-Zellen vorhanden waren, was auf eine Interaktion von repp86 mit SIAH2 schließen läßt.

4.6.2 Kopräzipitation von repp86 und FLAG-SIAH2₍₁₋₉₉₎ bzw. FLAG-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎

In folgenden Experimenten sollte festgestellt werden, ob der C-terminale SIAH2-Bereich, der eine positive Reaktion mit repp86 im *Yeast Two-Hybrid* ergab (SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎), zu einer Kopräzipitation von repp86 führt. Zusätzlich sollte auch der N-terminale Bereich von SIAH2 (SIAH2₍₁₋₉₉₎) untersucht werden.

Die Konstrukte *pFLAG-CMV2-SIAH2*₍₉₉₋₃₂₄₎ und *pFLAG-CMV2-SIAH2*₍₁₋₉₉₎ wurden zusammen mit *pRK5-repp86* in HEK293-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion geerntet und lysiert.

Experimentelle Zellysate-Kontrollen: Ein Teil der Zellysate wurde, wie im vorigen Experiment (4.6.1), direkt in der SDS-PAGE aufgetrennt, um die Expression der Proteine zu bestätigen. L428-Kontrollzellen exprimierten endogenes repp86 (Abb. 16 (A1); ca. 100 kDa). Ebenso zeigten die mit insertfreien Vektoren *pRK5* und *pFLAG-CMV2* transfizierten HEK293 eine endogene repp86-Expression (Abb. 16 (A4)). Die mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2*₍₁₋₉₉₎ transfizierten HEK293-Zellen exprimierten sowohl repp86 als auch FLAG-SIAH2₍₁₋₉₉₎ (Abb. 16 (A5) und (C5)). Das Lysat wurde später in Koimmunpräzipitationsexperimenten eingesetzt. Ebenso exprimierten die mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2*₍₉₉₋₃₂₄₎ transfizierten HEK293-Zellen die Proteine repp86 und FLAG-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ (Abb. 16 (A6) und (C6)). Das Zellysate wurde ebenfalls in Koimmunpräzipitationsexperimenten eingesetzt.

Koimmunpräzipitation: Mit Lysaten der HEK293-Zellen, die mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2*₍₁₋₉₉₎ bzw. mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2*₍₉₉₋₃₂₄₎ kotransfiziert waren, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Die Inkubation der Antikörper-Komplexe mit den Lysaten wurde analog zu dem vorigen Versuch durchgeführt (4.6.1). Mittels des sekundären Antikörpers (Maus-anti-FLAG) sollte FLAG-SIAH2₍₁₋₉₉₎ bzw. FLAG-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ aus dem Lysat präzipitiert werden. Im Falle einer Interaktion mit repp86 müßte auch repp86 in den Proteinpräzipitaten nachzuweisen sein. Nach der Inkubation mit den Lysaten wurden die Protein A-Sepharose-Proteinkomplexe gewaschen, unter denaturierenden Bedingungen im Probenpuffer gekocht und in der SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Der Nachweis der präzipitierten Proteine erfolgte im *Western blot*

(Abb. 16 (A2) und (A3)). In beiden Koimmunpräzipitaten konnte repp86 eindeutig identifiziert werden.

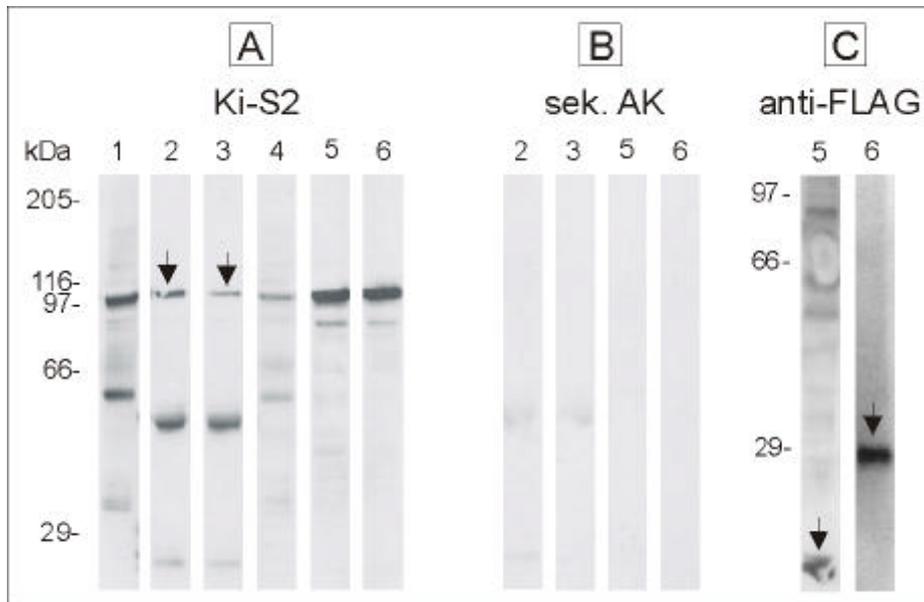


Abbildung 16: Western blots der Koimmunpräzipitation von repp86, FLAG-SIAH2₍₁₋₉₉₎ und FLAG-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ aus überexprimierenden HEK293-Zellen mit dem Maus-anti-FLAG-Antikörper. Western blot (A) wurde mit dem repp86-spezifischen Maus-Ki-S2-Antikörper durchgeführt. (B) wurde zum Ausschluß unspezifischer Proteinerkennung lediglich mit dem sekundären anti-Maus-Antikörper inkubiert und entwickelt. Western blot (C) wurde mit Maus-anti-FLAG durchgeführt. (1) L428-Lysat als Positivkontrolle für repp86; (2) Koimmunpräzipitat repp86 aus dem HEK293-Lysat, Zellen waren mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2₍₁₋₉₉₎* transfiziert; (3) Koimmunpräzipitat repp86 aus dem HEK293-Lysat, Zellen waren mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎* transfiziert; (4) HEK293-Lysat, Zellen waren mit den insertfreien *pRK5* und *pFLAG-CMV2* transfiziert; endogenes repp86 bei ca. 100 kDa; (5) HEK293-Lysat, Zellen waren mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2₍₁₋₉₉₎* transfiziert; (6) HEK293-Lysat, Zellen waren mit *pRK5-repp86* und *pFLAG-CMV2-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎* transfiziert. repp86 bei ca. 100 kDa (A); FLAG-SIAH2₍₁₋₉₉₎ bei 10,9 kDa (C5); FLAG-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ bei 26,4 kDa (C6). Als Größenstandard wurde *High M. W. Standard Mixture* verwendet.

Zusammenfassend wurde festgestellt, daß repp86 mit FLAG-SIAH2, FLAG-SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ und FLAG-SIAH2₍₁₋₉₉₎ kopräzipitiert. Mit dem alleinigen FLAG-Epitop konnte repp86 nicht präzipitiert werden. Die Negativkontrolle deutet auf eine Interaktion von repp86 mit SIAH2 in Zellen hin. Mit der Interaktion der beiden erstgenannten rekombinanten SIAH2-Proteine wurden die Ergebnisse der Untersuchungen im *Yeast Two-Hybrid*-System bestätigt. Die C-terminale SIAH2-Domäne (AS 99-324) scheint den N-Terminus von repp86 spezifisch zu erkennen. Im *Yeast Two-Hybrid*-System zeigte diese Domäne eine positive Reaktion mit dem rekombinanten GAL4-BD-repp86 und mit dem N-terminalen repp86-Bereich. Die Kopräzipitation von repp86 und FLAG-SIAH2₍₁₋₉₉₎ deutete darauf hin, daß auch im N-terminalen Bereich von SIAH2 ein Erkennungs- bzw. Bindungsmotiv für repp86 enthalten sein könnte.

4.7 Die Transkriptionsinitiationsstelle von repp86

Der repp86-Transkriptionsstart ist noch nicht bekannt. In den folgenden Experimenten sollte die Transkriptionsinitiationsstelle von repp86 bestimmt werden. Durch die Identifizierung des 5'-Endes der repp86-mRNA kann die ungefähre Lage der Promotorregion in der genomischen DNA-Sequenz eingeschätzt werden. Experimente zur Ermittlung des für die repp86-Expression essentiellen Promotorbereiches werden in Kapitel 4.8 beschrieben.

4.7.1 Organisation des repp86-Gens

Zur Beschaffung der vollständigen genomischen Sequenz von repp86 wurden sämtliche NCBI-Gendatenbanken mit den bislang bekannten repp86-mRNA-Sequenzen (AL027467 für C20orf2, AB024704 für fls353, AF098158 für repp100) durchsucht. Einige der aufgefundenen Sequenzen waren offensichtlich unvollständig (z.B. AF244547 für *Homo sapiens* TPX2) und variierten zumeist in ihrer Länge am 5'-Ende. Das „*bacterial artificial chromosom*“ (BAC) RPCI11-243J16 hingegen enthielt einen Teilbereich des humanen Chromosoms 20 (ca. 167 kbp), welches auch für repp86 kodierte. Der Klon (gi 8217646; AL160175 in GenBank) wurde vom Sanger Centre, Großbritannien, bezogen (Frengen et al., 1999). Da die DNA-Sequenz des Klons zum Zeitpunkt der Datenbankrecherchen aus ungeordneten Stücken bestand, wurden Kontrollsequenzierungen des 5'-Bereiches des repp86-Gens durchgeführt, die zeigten, daß die in der Datenbank enthaltene repp86-DNA-Sequenz richtig dargestellt war.

Die längste bekannte mRNA-Sequenz (AF098158) mit 3151 Ribonukleotiden (zuzüglich des Poly(A)-Schwanzes) wurde mit der BAC-Sequenz im NCBI-Modus BLAST *Two Sequences* verglichen. Die Sequenzdaten zeigten, daß das repp86-Gen aus mindestens 18 Exonen besteht, die durch Introne sehr unterschiedlicher Länge voneinander getrennt sind (Abb. 17). Das längste Intron (Nr. 2) besteht aus 14,7 kbp. Der Translationsstartpunkt (AUG) befindet sich im Exon 3 und wird von Sequenzen flankiert, die mit der Konsensusinitiationssequenz von Kozak relativ gut übereinstimmen (Kozak, 1987). Die 5'-„untranslatierte“ Region hätte demnach die Länge von 471 Ribonukleotiden. Im Exon 18, stromabwärts des Stopcodons TAA, befindet sich das Polyadenylierungssignal AATAAA.

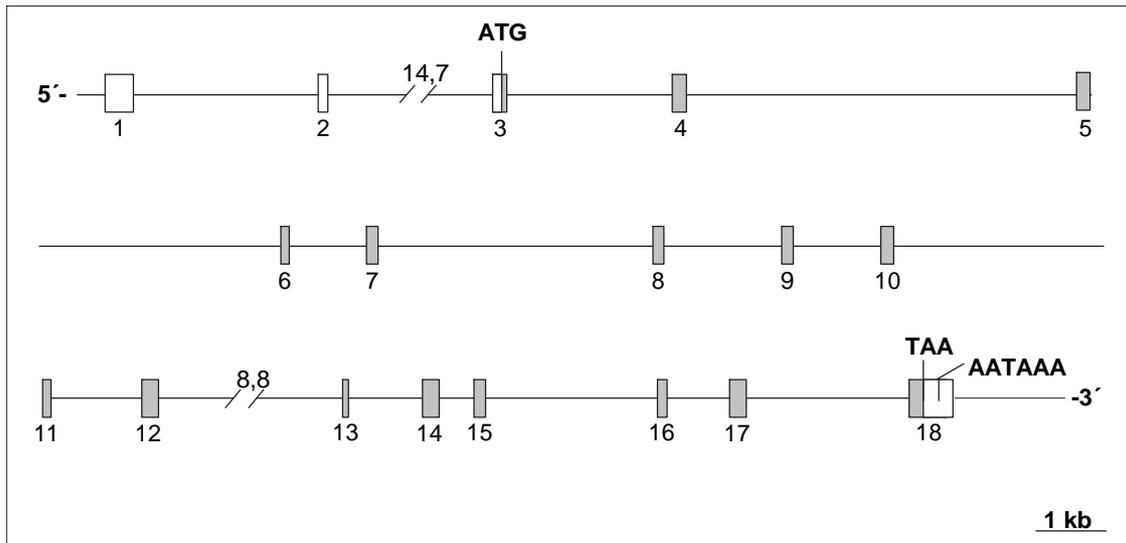


Abbildung 17: Schematische Übersicht des repp86-Gens. Das repp86-Gen ist in 18 Exone aufgeteilt. Kodierende Exone sind als graue Boxen, 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche als transparente Boxen dargestellt. Im letzten Exon (Nr. 18) befindet sich das Stopcodon TAA und das Polyadenylierungssignal AATAAAA. Die Längenverhältnisse der Exone und Introne wurden originalgetreu dargestellt. Die zwei größten Introne wurden verkürzt dargestellt. Zur besseren Übersicht ist ihre Länge in Kilobasenpaaren (kbp) angegeben.

Der Transkriptionsstart von repp86 wird in der 5'-„untranslatierten“ Region stromaufwärts von Exon 1 vermutet, wobei die genaue Stelle der Transkriptionsinitiation noch unbekannt ist. Da die repp86-mRNA AF098158 in 5'-Richtung unvollständig sein kann, darf das erste 5'-Ribonukleotid nicht ohne weiteres dem Transkriptionsstart gleichgesetzt werden. Zur Auffindung der Transkriptionsstartstelle waren weiterführende Untersuchungen notwendig.

4.7.2 CapSite™-Verfahren zur Ermittlung des repp86-Transkriptionsstartes

Die grobe Lokalisierung des Genpromotors erfolgt zunächst über die Bestimmung der Transkriptionsstartstelle. Zu diesem Zweck wurde das CapSite™-cDNA-Kit von der Fa. Eurogentec verwendet.

Erläuterung des Verfahrens: Eukaryotische zelluläre mRNA enthält eine 5'-terminale 7-Methylguanodin-Struktur (m^7GpppN -Struktur), die eine entscheidende Rolle im Aufbau der ribosomalen Translationsmaschinerie spielt und die mRNA-Vorläufer vor 5'-Exonukleasen schützt (Furuichi et al., 1975). Das Vorhandensein der m^7GpppN -Struktur wird bei der Herstellung der CapSite™ 5'-Terminus-cDNA (Fa. Eurogentec) ausgenutzt, die ihrerseits zur Bestimmung des genauen 5'-Terminus also der Transkriptionsstartstelle eingesetzt wird (Abb. 18). Die Technik schließt eine initiale Dephosphorylierung der m^7GpppN -Struktur und ihre Pyrophosphorolyse mit Hilfe der Nukleinsäurepyrophosphatase aus der Tabakpflanze ein

(Shinshi et al., 1976). Im nachfolgenden Schritt wird an die „gestutzte“ mRNA ein spezifisches Oligoribonukleotid mittels RNA-Ligase ligiert (Furuichi und Shatkin, 1989). Die Ligation des Oligoribonukleotides erfolgt nur an solchen mRNA-Molekülen, die mit der modifizierten m^7GpppN -Struktur bestückt sind, also nur an vollständigen Transkripten. Bereits unvollständige bzw. z.T. degradierte mRNAs ohne die m^7GpppN -Struktur werden mit dem Oligoribonukleotid nicht ligiert. Mit der so modifizierten mRNA wird eine reverse Transkription mit anschließendem RNA-Verdau durchgeführt. Die daraus resultierende „single strand copy cDNA“ (sscDNA) wird gereinigt. In diesem Schritt werden sscDNA-Moleküle mit dem ligierten Oligonukleotid, also mit vollständigen 3'-Enden spezifisch selektiert und angereichert. Das 3'-Ende der sscDNA ist hierbei mit dem Transkriptionsstart gleichbedeutend.

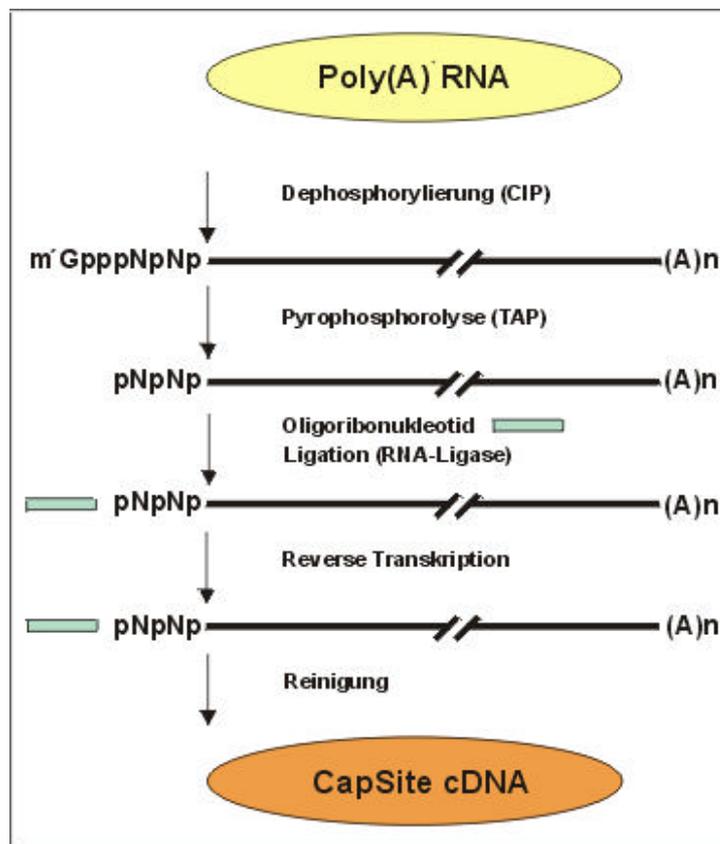


Abbildung 18: Schematische Darstellung der CapSite-cDNA™-Synthese. Nach der mRNA-Isolierung wird diese dephosphoryliert. Nachdem die Dephosphorylierung des 7-Methylguanosis erfolgt ist, wird ein Oligoribonukleotid ligiert, das nach der reversen Transkription und anschließender Reinigung der sscDNA als Matrize für nunmehr Transkriptionsstart-spezifische Oligonukleotide dient. Schema aus dem CapSite™-Protokoll von der Fa. Eurogentec entnommen.

In PCR-Experimenten wird die sscDNA, deren 3'-Ende bestimmt werden soll, spezifisch amplifiziert. Die Amplifikation erfolgt mit Hilfe des 3'-spezifischen Oligonukleotides *IRC*

und eines genspezifischen Oligonukleotides (Initial-PCR). Oft wird eine *nested*-PCR zur Reamplifikation seltener cDNA durchgeführt. Dazu wird der nach innen versetzte 3'-spezifische Oligonukleotid *2RC* und ein nach innen versetztes genspezifisches Oligonukleotid eingesetzt. *IRC* und *2RC* sowie die sscDNA sind Bestandteile des CapSite-PCR™-Kits der Fa. Eurogentec. Im Kit sind außerdem Kontroll-Oligonukleotide *K1* und *K2* enthalten, die zur Amplifikation von β -Actin-cDNA eingesetzt werden.

Die *nested*-PCR-Produkte werden anschließend in Plasmide kloniert, die in *E. coli* amplifiziert werden. Durch diesen zusätzlichen Schritt wird eine zur Sequenzierung sicher ausreichende Ausgangsmenge an DNA bereitgestellt. An die bekannte Sequenz des am 5'-Ende der mRNA hybridisierten Oligonukleotids muß dann die gesuchte Transkriptions-initiationsstelle des Gentranskriptes grenzen.

Initial-PCR: In der Initial-PCR wurden 2,0 μ l sscDNA-HeLa-Bibliothek aus dem CapSite cDNA™-Kit (Fa. Eurogentec) als Matrize zur Amplifikation des 3'-Bereiches der repp86-cDNA mit dem 3'-spezifischen Oligonukleotid *IRC* und dem repp86-spezifischen äußeren Oligonukleotid *600rev* eingesetzt. Die eingesetzte cDNA-Menge entsprach 5 ng Poly(A)⁺RNA. Als Positivkontrolle wurde 1 μ l sscDNA-Bibliothek mit dem 3'-spezifischen äußeren *IRC*-Oligonukleotid und dem äußeren Kontroll-Oligonukleotid 1 (*K1*) amplifiziert. Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne sscDNA-Bibliothek mit *IRC* und *600rev* bzw. mit *IRC* und dem Kontroll-Oligonukleotid 1 (*K1*) „amplifiziert“. Die Produktausbeute der Proben- und Kontrollansätze war nicht ausreichend, um in der Gelelektrophorese visualisiert zu werden. Die Produkte wurden in einer *nested*-PCR reamplifiziert (s.u.).

Nested-PCR: Von der Initial-PCR wurden 5 μ l bzw. 10 μ l in der nachfolgenden *nested*-PCR reamplifiziert. 5 μ l des Produktes *IRC/600rev* wurden mit dem inneren 3'-spezifischen Oligonukleotid *2RC* und dem inneren repp86-spezifischen Oligonukleotid *297rev* (Abb. 19 (3); *nested*-Produkt *2RC/297rev*) amplifiziert. Eine analoge PCR wurde ebenfalls mit 10 μ l des Produktes durchgeführt (Abb. 19 (4)). Weitere 5 μ l des Produktes wurden mit dem inneren 3'-spezifischen Oligonukleotid *2RC* und dem inneren repp86-spezifischen Oligonukleotid *RACE1rev* (Abb. 19 (6); *nested*-Produkt *2RC/RACE1rev*) amplifiziert. Als Positivkontrolle wurden 5 und 10 μ l des Kontrollansatzes aus der Initial-PCR mit *2RC* und dem inneren Kontroll-Oligonukleotid 2 (*K2*) amplifiziert (Abb. 19 (5) und (7); Produkt *2RC/K2*). Als Negativkontrollen wurden die zwei Proben der Initial-PCR ohne sscDNA mit

2RC und 297rev (Abb. 19 (1); kein Produkt) sowie mit 2RC und K2 (Abb. 19 (2); kein Produkt) „amplifiziert“.

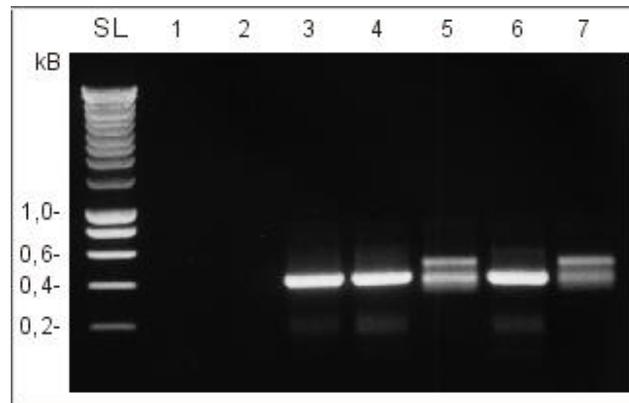


Abbildung 19: Produkte der CapSite™-nested-PCR. Je 5 µl Produkt der *nested*-PCR wurden aufgetragen. In Klammern werden stets die in der Initial-PCR eingesetzten Oligonukleotide angegeben. (1) Negativkontrolle 1: Reamplifikation von 5 µl Initial-PCR ohne sscDNA (*IRC/600rev*) wurde mit *2RC/297rev* durchgeführt; (2) Negativkontrolle 2: Reamplifikation von 5 µl Initial-PCR ohne sscDNA (*IRC/K1*) wurde mit *2RC* und *K2* durchgeführt; (3) und (4) 5 bzw. 10 µl Initial-PCR mit sscDNA (*IRC/600rev*) wurden mit *2RC* und *297rev* amplifiziert; (6) 5 µl Initial-PCR mit sscDNA (*IRC/600rev*) wurden mit *2RC* und *RACE1rev* amplifiziert; (5) und (7) Positivkontrolle: 5 und 10 µl Initial-PCR mit sscDNA (*IRC/K1*) wurden mit *2RC* und *K2* amplifiziert; (SL) Smart Ladder™, Größenstandard.

Klonierung der nested-Produkte in E. coli: Je 4 µl der *nested*-PCR-Produkte *IRC/297rev* (Abb. 19 (3) und (4)) und *2RC/RACE1rev* (Abb. 19 (6)) wurden in den Vektor *pCR2.1* ligiert und in *E. coli* TOP10F transformiert (3.2.9). Die durch blau/weiß-Selektion gekennzeichneten positiven Kolonien wurden im ampicillinhaltigen LB-Medium vermehrt. Plasmide wurden mit *Eco*RI geschnitten (3.2.13) und im 1 %-TBE-Agarosegel visualisiert (Abb. 20).

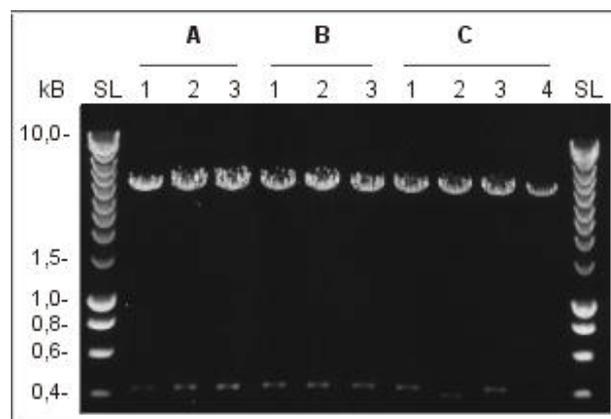


Abbildung 20: Enzymatischer Restriktion der TOPO TA-CapSite™-Konstrukte. *pCR2.1*-Konstrukte wurden mit *Eco*RI geschnitten. Je 5 µl der Restriktionsreaktion wurden aufgetragen. (A) Drei Konstrukte aus der Transformation des *nested*-PCR-Produktes Nr. 3 (*2RC/297rev*); (B) Drei Konstrukte aus der Transformation des *nested*-PCR-Produktes Nr. 4 (*2RC/297rev*); (C) Vier Konstrukte aus der Transformation des *nested*-PCR-Produktes Nr. 6 (*2RC/RACE1rev*); Inserts in 2 und 4 undeutlich. Vektor *pCR2.1*: 3,9 kbp; (SL) Smart Ladder™, Größenstandard. Die klonierten PCR-Fragmente haben eine Länge von ca. 420 Nukleotiden.

Die inserierten PCR-Produkte *2RC/297rev* (Abb. 20 (A 1-3) und (B 1-3)) und *2RC/RACE1rev* (Abb. 20 (C1) und (3)) waren von gleicher Länge (s. u). Zwei der Konstrukte mit dem *2RC/RACE1rev*-Insert (Abb. 20 (C2) und (4)) enthielten offensichtlich Inserts geringerer Länge (s.u.), wie die Auswertung der nachfolgenden Sequenzierung zeigte.

4.7.3 Ergebnisse der CapSite™-PCR

Die Restriktionsreaktion der subklonierten CapSite™-Produkte (4.7.2) deutete an, daß mindestens zwei potentielle Stellen als Transkriptionsinitiationspunkte in Frage kommen. Die genaue Länge der subklonierten CapSite™-Produkte sowie die genaue Position der gesuchten Nukleotide des Transkriptionsstarts wurde mittels Sequenzierung bestimmt.

Sequenzierung der subklonierten CapSite™-Produkte: In der Sequenzierungsreaktion wurden 300 ng *pCR2.1*-Konstrukt mit 1 µl Sequenzierungsoligonukleotid *M13(-20)rev* eingesetzt. Nach 30 Zyklen wurde die Reaktion über DyeEx™ Spin-Säulen gereinigt, 1:2 mit *Aqua bidest.* verdünnt, denaturiert und unter Standardbedingungen sequenziert.

Ergebnisse der Sequenzierung: Die Sequenzen der *pCR2.1*-Konstrukte *2RC/297rev* (Abb. 20 (A1-3) und (B1-3)) und *2RC/RACE1rev* (Abb. 20 (C1) und (C3)) waren repp86-spezifisch und wiesen dasselbe Nukleotid als die vermeintliche Transkriptionsinitiationsstelle aus. Als Beispiel wurde in Abb. 21 der relevante Sequenzbereich aus dem Konstrukt *pCR2.1-2RC/297rev* (Abb. 20 (A3)) aufgeführt. Das in Frage kommende Nukleotid (Adenin: A) an Position 91 im Sequenzierungsbericht wurde mit „+1“ markiert.

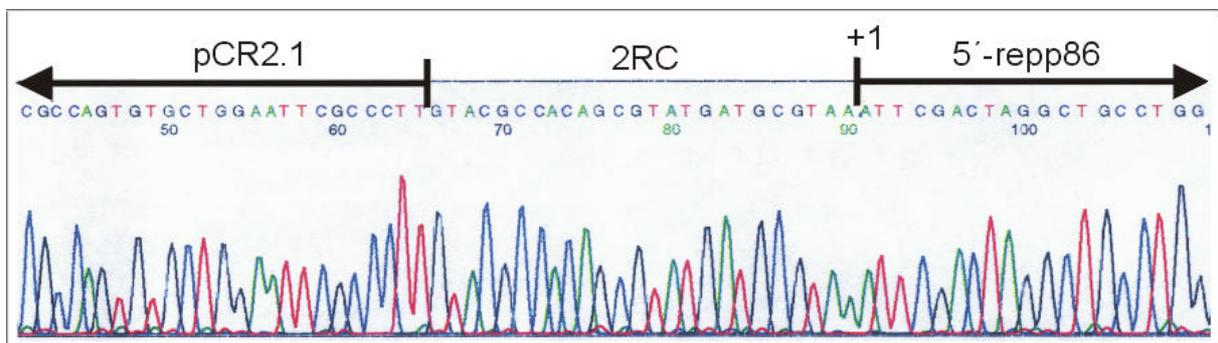


Abbildung 21: Ausschnitt aus der Sequenz des CapSite™-Produktes *2RC/297rev* nach der Klonierung in *pCR2.1*. Die Sequenzierung des Konstruktes *pCR2.1-2RC/297rev* (Abb. 20 (A3)) wurde mit *M13(-20)rev* durchgeführt. Die vermeintliche Transkriptionsinitiationsstelle wurde mit +1 markiert und befindet sich an Position 91. „2RC“ bezeichnet das Oligonukleotid *2RC*, das während der Herstellung der CapSite™-sscDNA an das 5'-Ende ligiert wurde (Schema der sscDNA-Herstellung: s. Abb. 18).

Die Sequenzierung der Konstrukte *pCR2.1-2RC/RACE1* (Abb. 20 (C2) und (C4)) ergab, daß ein 30 Stellen stromabwärts positioniertes Nukleotid als mögliche Transkriptionsinitiationsstelle in Frage kommt. In Abb. 22 wurde der relevante Sequenzbereich aus dem Konstrukt *pCR2.1-2RC/RACE1* (Abb. 20 (C4)) als Beispiel aufgeführt. Unter dem Sequenzbereich wurde die Sequenz des Komplementärstranges hinzugefügt, die dem Anfang der *repp86*-mRNA entspricht. Der alternative Transkriptionsstart befindet sich in dieser Abbildung an Position 405 (Adenin: A).

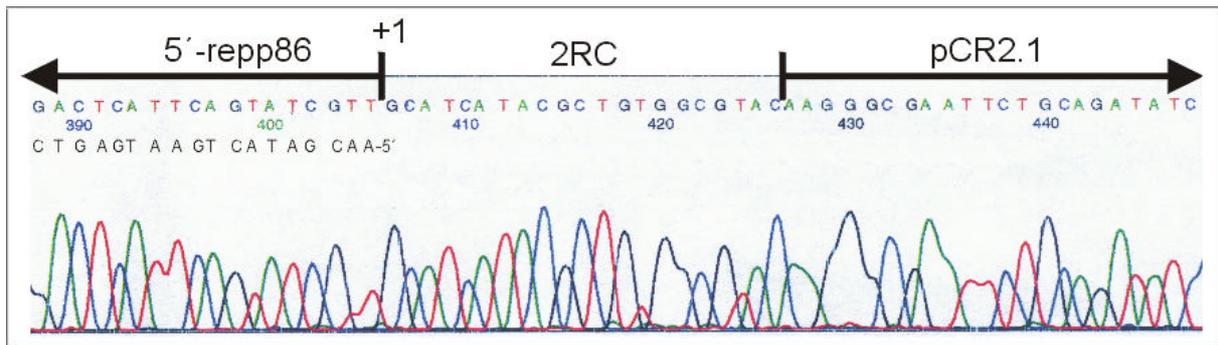


Abbildung 22: Ausschnitt aus der Sequenz des CapSite™-PCR-Produktes 2RC/RACE1rev nach der Klonierung in pCR2.1. Die Sequenzierung des pCR2.1-Konstruktes wurde mit *M13(-20)rev* durchgeführt. Die vermeintliche alternative Transkriptionsinitiationsstelle wurde mit +1 markiert und befindet sich an Position 405. „2RC“ bezeichnet das Oligonukleotid 2RC, das während der Herstellung der CapSite™-sscDNA an das 5'-Ende ligiert wurde (Schema der sscDNA-Herstellung: s. Abb. 18).

Mit der Bestimmung der vermeintlichen Transkriptionsinitiationsstellen (Abb. 21 und 22) konnte die *repp86*-mRNA um 78 (Abb. 23 (1b)) bzw. 48 Nukleotide (Abb. 23 (1a)) im 5'-Bereich ergänzt werden. Zwei Gründe sprachen jedoch dagegen, diese Stellen als die tatsächlichen Transkriptionsstartpunkte zu betrachten:

1. *Northern blot*-Analysen des *repp86*-Transkriptes aus den Arbeiten von Rott (Rott, 1999) und Manda et al. (1999) berichteten von einem einzigen Transkript in der Größenordnung von 3400 bis 3500 Basen. Nach Addition der 78 bzw. 48 Nukleotide zu der längsten bisher bekannten mRNA (3151) ergab sich für das Transkript eine Gesamtlänge von 3229 bzw. 3199 Nukleotiden. Das Transkript wäre demnach zu kurz, so daß die vermeintliche Transkriptionsstartstelle keine Relevanz hätte.

2. In der EST-Datenbank („*expressed sequence tags*“) im NCBI-Blastn-Modus wurde der EST-Klon BE888044 identifiziert, der den 5'-Bereich der *repp86*-cDNA aus der humanen Uterustumorzelllinie NIH MGC 71 enthielt. Der Klon wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD, Berlin) bezogen und zur Verifizierung der Ergebnisse der CapSite™-PCR sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, daß der cDNA-Klon

die komplette bisher bekannte repp86-cDNA mit einem Insert von ca. 200 Nukleotiden aus dem Bereich des Intron 2 enthielt. Möglicherweise wurde bei der Konstruktion des cDNA-Klons eine nicht vollständig prozessierte repp86-mRNA-Spezies bearbeitet, was aber für die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes irrelevant wäre. Das erste 5'-Nukleotid des cDNA-Inserts lag 139 Nukleotide vor dem äußeren in der CapSite™-PCR bestimmten Transkriptionsstartpunkt (Abb. 23 (+1c)).

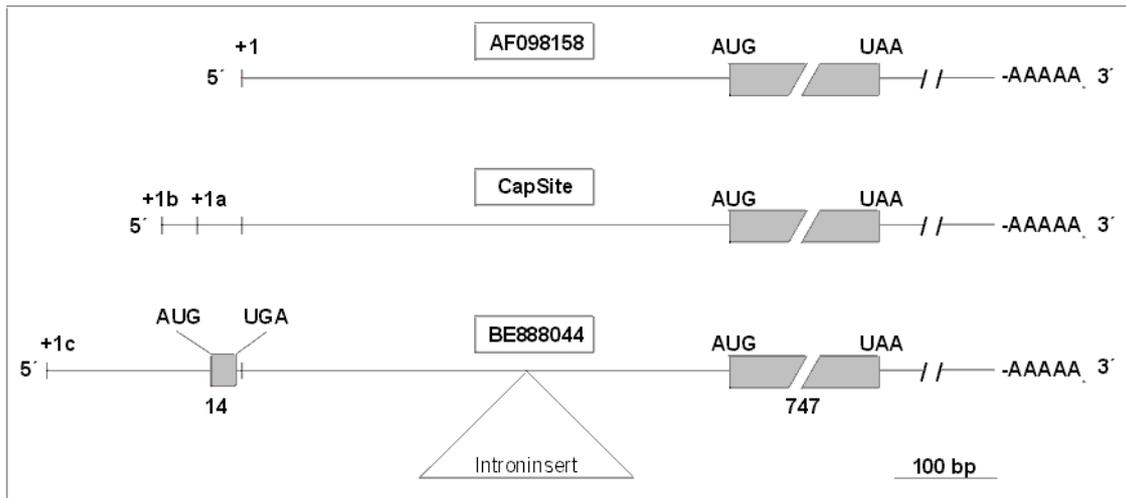


Abbildung 23: Erkenntnisse zum repp86-Transkriptionsstart. Die „repp100“-mRNA (AF098158) mit der Länge von 3151 Nukleotiden wurde mit der CapSite™-PCR-Methode um 78 bzw. 48 Nukleotide in 5'-Richtung verlängert (+1b und +1a). Mit der Identifizierung des EST-Klones BE888044 wurde das repp86-Transkript um weitere 139 Nukleotide in 5'-Richtung vervollständigt (+1c). Damit wurde der 5'-„untranslatierte“ Bereich von repp86 auf insgesamt 668 Ribonukleotide verlängert. Der für 747 repp86-Aminosäuren kodierende Bereich wurde als eine graue unterbrochene Box dargestellt. Das für 14 Aminosäuren kodierende „*upstream open reading frame*“ (uORF) wurde als eine graue Box dargestellt.

Weitere Sequenzanalysen ergaben, daß 42 Nukleotide stromabwärts von dem vermeintlichen in Abb. 21 dargestellten Transkriptionsstart ein so genanntes „*upstream open reading frame*“ (uORF) für 14 Aminosäuren kodiert und von dem Stoppcodon UGA beendet wird (Abb. 23/+1c). Die abgeleitete Peptidsequenz (9.1.3) zeigt keine Übereinstimmung mit anderen bekannten Peptid- oder Proteinsequenzen.

Unter der Berücksichtigung der Sequenzanalysen des EST-Klones BE888044 betrug die Gesamtlänge des repp86-Transkriptes nunmehr 3368 Ribonukleotide. Die Identifizierung dieses neuen Transkriptionsstartkandidaten wurde jedoch lediglich als Annäherung an den Transkriptionsstart betrachtet. In PCR-Experimenten mit L428-cDNA wurde die Umgebung der Stelle näher untersucht (4.7.4).

4.7.4 PCR zur Eingrenzung des repp86-Transkriptionsstartes

Mit der Identifizierung des EST-Klons BE888044 und der Auffindung einer neuen weiter stromaufwärts gelegenen Kandidatenstelle für den repp86-Transkriptionsstart wurden die Ergebnisse der CapSite™-Experimente in Frage gestellt. Mittels der PCR-Experimente sollte die neue Kandidatenstelle verifiziert werden.

Experimentelle Durchführung: In der Umgebung der neuen Kandidatenstelle BE888044 für den Transkriptionsstart wurden anhand der genomischen repp86-Sequenz (BAC RPCI11-243J16) PCR-Oligonukleotide herausgesucht, die in der PCR zum Einsatz kamen. Als Matrize diente hierbei die Gesamt-cDNA, die aus der Poly(A)-RNA der L428-Zellen synthetisiert wurde.

Parallel zu der cDNA-PCR wurden PCR-Synthesen mit dem genomischen repp86-BAC-Klon als Qualitätskontrolle der Oligonukleotide durchgeführt. In Abb. 24 (A) wurden die Hybridisierungsstellen der Oligonukleotide in Relation zum Startpunktkandidaten (+1) dargestellt. Alle Oligonukleotide waren 20 bis 21 Basen lang. Die angegebenen Hybridisierungsstellen beziehen sich auf die zum ersten 5'-Nukleotid komplementäre Position in der cDNA bzw. in der genomischen Sequenz.

Kontrolle der cDNA-Qualität: Um eine Verunreinigung der cDNA mit genomischer DNA ausschließen zu können, wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden *RP6* und *ext2rev* durchgeführt. *RP6* hybridisiert im Bereich von Intron 2 des repp86-Gens und ergibt in der PCR mit *ext2rev*, der im Exon 3 hybridisiert, ein Produkt von 340 Basenpaaren mit genomischer repp86-DNA als Matrize. Da die mRNA nach dem Prozessieren keine Introne enthält, kann das Intron 2-spezifische Oligonukleotid *RP6* mit der cDNA nicht hybridisieren und ergibt kein Produkt mit *ext2rev*. Ein solches Produkt war in der PCR-Reaktion mit der L428-cDNA tatsächlich nicht vorhanden, so daß eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte (Abb. 24 (B1) 7).

Bestätigung der Kandidatenstelle BE888044 als eine gute Annäherung an den Transkriptionsstart: Die nachfolgende PCR-Analyse zeigte, daß der tatsächliche repp86-Transkriptionsstart in der unmittelbaren Umgebung des ersten Nukleotides im EST-Klon BE888044 liegt.

Die Oligonukleotide *start10for*, *start9for*, *start7for* und *start1for* hybridisierten mit der repp86-cDNA und ergaben mit *297rev* definierte Produkte erwarteter Länge (Abb. 24 (B1) 3,4,5,6). Das Vorhandensein der Produkte bedeutete, daß alle oben genannten Oligonukleotide im Bereich des repp86-Transkriptes liegen.

Das Oligonukleotid *start10for* überlappte die Kandidatenstelle im 3'-Bereich um lediglich 3 Nukleotide (Hybridisierungsbereich von -18 bis +3). Die beobachtete hohe Quantität des Produktes *start10for/297rev* (Abb. 24 (B1) 3 und (C1) 4) deutete darauf hin, daß der tatsächliche Überlappungsbereich von *start10for* und der Kandidatenstelle etwas länger sein mußte. Das Ergebnis zeigte, daß die endgültige Transkriptionsstartstelle wohl weiter stromaufwärts jedoch nicht gänzlich außerhalb der von *start10for* abgedeckten Region liegt. Zu dieser Überzeugung führte wiederum die Beobachtung, daß mit den Oligonukleotiden *PR1for* und *PR6for* keine Amplifikate mit *297rev* entstanden (Abb. 24 (C1) 2 und 3). Die Amplifikation der genomischen BAC-DNA mit *297rev* und den Oligonukleotiden *PR1for* und *PR6for* war hingegen erfolgreich (Abb. 24 (C2) 2 und 3). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Hybridisierungssequenzen von *PR1for* und *PR6for* im repp86-Transkript nicht mehr enthalten sind. Die Hybridisierungssequenzen von *start10for* und *PR1for* sind um lediglich 19 Nukleotide voneinander getrennt, so daß der Transkriptionsstart nur noch innerhalb dieser Sequenz liegen kann.

Die weiter stromaufwärts hybridisierenden Oligonukleotide *start12for* und *start11for* (Hybridisierung an Positionen -473 bzw. -218) ergaben ebenfalls keine Produkte mit *297rev* (Abb. 24 (B1) 1 und 2). Das Ergebnis zeigte, daß die komplementären Sequenzen von *start12for* und *start11for* im repp86-Transkript nicht enthalten sind, so daß keine Produkte mit *297rev* entstehen können. Im PCR-Ansatz hingegen, in dem die genomische BAC-repp86-DNA als Matrize verwendet wurde, entstanden mit allen oben aufgelisteten Oligonukleotiden Produkte erwarteter Länge (Abb. 24 (B2) 1 bis 6). Alle verwendeten Oligonukleotide eigneten sich also sehr gut, um gewünschte repp86-Bereiche zu amplifizieren.

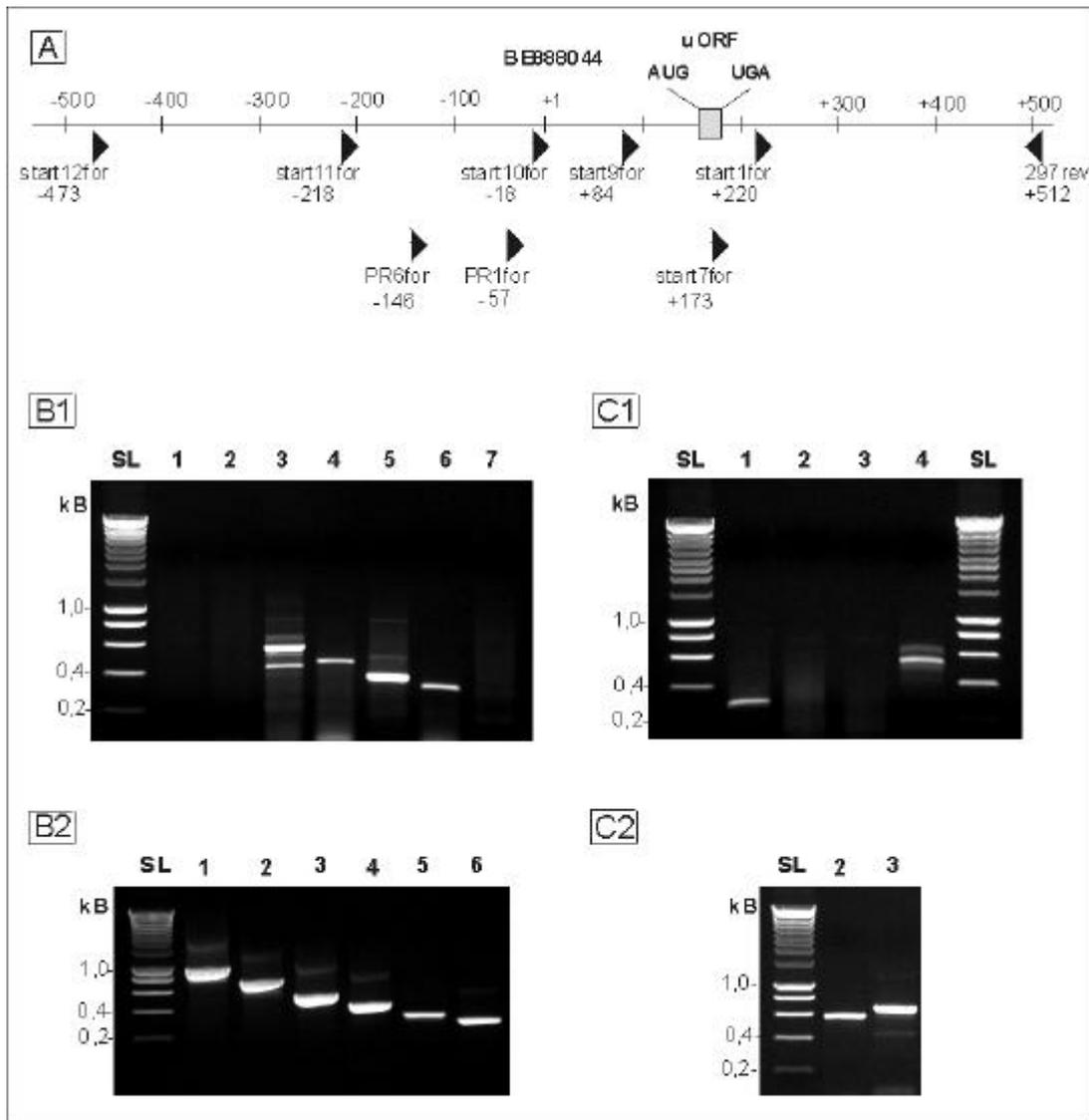


Abbildung 24: PCR zur Eingrenzung des Transkriptionsstartes. (A) Ausschnitt aus dem repp86-Gen im Bereich des Transkriptionsstartes bezogen auf das erste Nukleotid (+1) im EST-Klon BE888044. Der „*upstream open reading frame*“ (uORF) liegt bei +181. In der Abbildung wurden die Bezeichnungen der RT-PCR-Oligonukleotide und ihre Hybridisierungsstellen Δ angegeben. (B1) RT-PCR mit L428-cDNA als Matrize; (1) *start12for/297rev*, (2) *start11for/297rev*, (3) *start10for/297rev*, (4) *start9for/297rev*, (5) *start7for/297rev*, (6) *start1for/297rev*, (7) *RP6for/ext2rev*; (B2) wie in B1 mit dem genomischen BAC-Klon RPC111-243J16 als Matrize; (C1) RT-PCR mit L428-cDNA als Matrize; (1) *start1for/297rev*, (2) *PR1/297rev*, (3) *PR6/297rev*, (4) *start10for/297rev*; (C2) Oligonukleotidpaare wie in C1 PCR mit dem genomischen BAC-Klon RPC111-243J16 als Matrize.

Zur besseren Orientierung wurde das erste Nukleotid des EST-Klons BE888044 in allen nachfolgenden Experimenten mit +1 bezeichnet. Die Ergebnisse zeigten, daß die neue Kandidatenstelle in der unmittelbaren Umgebung des Transkriptionsstartes von repp86 liegt. Von dieser Stelle ausgehend, wurden die stromaufwärts gelegenen Nukleotide als der am meisten wahrscheinliche Promotorbereich betrachtet. In weiteren Experimenten sollte der essentielle Bereich des repp86-Promotors eingegrenzt werden.

4.8 Eingrenzung des für die repp86-Expression essentiellen Promotorbereiches

4.8.1 Übersicht des repp86-Promotorbereiches

Zur Detektion in Frage kommender Erkennungs- und Bindestellen für *trans*-wirkende Elemente wurde die Sequenz des BAC-Klones RPCI11-243J16 mit der Datenbank *Transfac* im MatInspector V2.2-Programm abgeglichen. In Abb. 25 wurden mögliche Erkennungsstellen für zahlreiche Transkriptionsfaktoren eingetragen, die in der Datenbanksuche Werte von 1,0 für die Kernregion der Bindestelle und 1,0 bis 0,91 für die Ähnlichkeit der Bindestellenmatrix aufwiesen. Im Bereich von -1002 bis -714 und von -416 bis -189 wurden zwei Cytidin/Guanosin-Dinukleotidinseln (CpG-Inseln) identifiziert (Abb. 25).

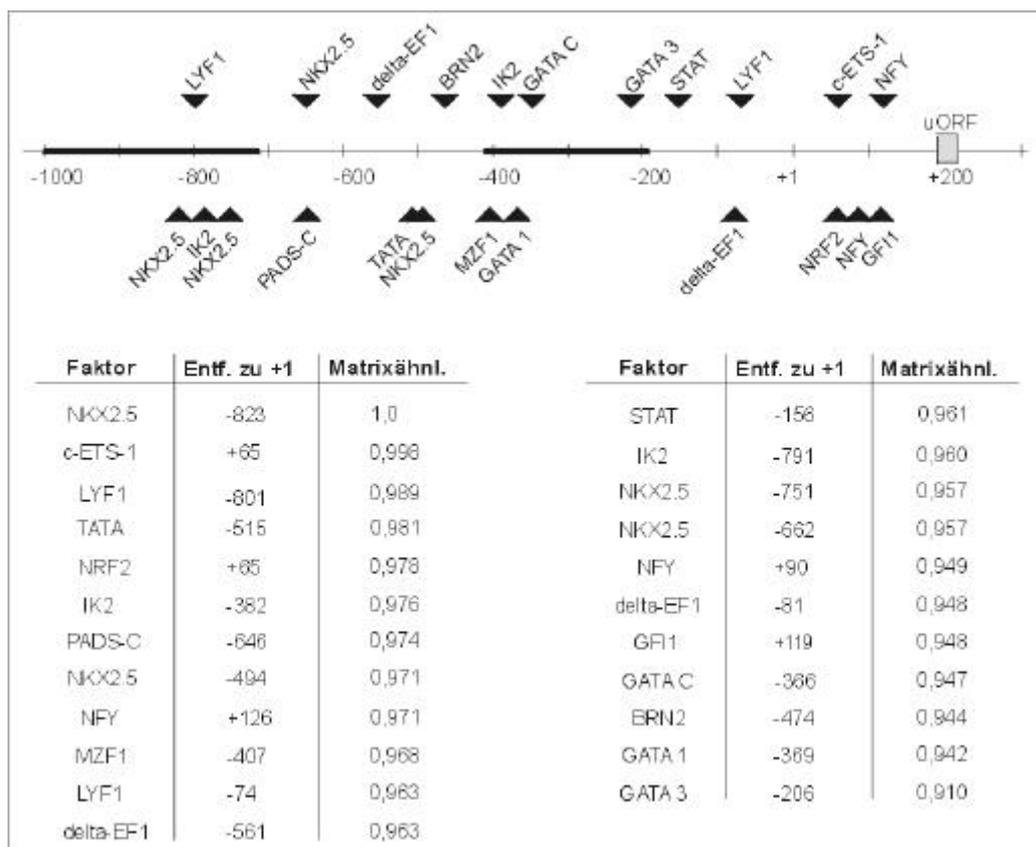


Abbildung 25: Schematische Übersicht des repp86-Promotorbereiches. Es wurden insgesamt 23 mögliche Erkennungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Δ) und zwei im Bereich des Promotors liegende CpG-Inseln (dick markierte Linien) gefunden. Zur besseren Orientierung wurde der vor dem repp86-Leserahmen liegende „upstream open reading frame“ (uORF) eingezeichnet. Der Längenmaßstab beträgt 100 Nukleotide. (+1) bezieht sich auf das erste Nukleotid des EST-Klons BE888044. Tabellarisch wurden die Bezeichnungen der Transkriptionsfaktoren in Relation zu (+1) mit den dazugehörigen Werten für die Matrixähnlichkeit der Bindestellen aufgeführt. In allen Fällen betragen die Werte für die Ähnlichkeit der Kernregion 1,0.

4.8.2 Promotoranalysen im Luciferase Assay

Untersuchungen zur Funktionalität eines Promotors sowie die Bestimmung eines Minimalpromotors werden im allgemeinen zuerst mit Hilfe von einfachen genetischen Reportersystemen durchgeführt, die eine grobe Eingrenzung der essentiellen Bereiche ermöglichen. 5'-DNA-Abschnitte werden vor besondere Reportergene kloniert und in Zellen transfiziert, in denen eine indirekte Quantifizierung der Promotoraktivität über die Expression des Reportergens oder über die Aktivität des Reporterproduktes stattfindet.

Zur Eingrenzung des Minimalpromotors von repp86 wurde das *Dual-Luciferase® Assay System* (Fa. Promega) verwendet. Als Reportergene fungierten hierbei die Luciferasen von *Photinus pyralis* und *Renilla reniformis*. Zwischen der *Photinus*- und der *Renilla*-Luciferase besteht ein Analogie- und kein Homologieverhältnis, was sich sowohl in der Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur als auch in der Substratspezifität und Biolumineszenzeigenschaften bemerkbar macht. Aufgrund dieser Eigenschaften erlaubt das *Dual-Luciferase® Reporter System* eine sequenzielle Messung der Biolumineszenz beider Luciferasen aus einem Probenansatz.

Vektoren im Luciferase Assay: In den Experimenten zum repp86-Promotor wurden drei unterschiedliche Vektoren verwendet: *pGL3 Basic*, *pGL3 Control* (Vektorkarten unter 9.2.6 und 9.2.7) und *pRL-CMV*.

Der Vektor *pGL3 Basic* kodiert für das *Photinus pyralis*-Luciferasegen und besitzt selbst keine endogene Promotoraktivität. Der insertfreie, promotorlose Vektor *pGL3 Basic* eignet sich deshalb für die Bestimmung der autogenen Expression des Reportergens *Photinus*-Luciferase.

Die zu untersuchenden Promotorbereiche von repp86 wurden in den Vektor *pGL3 Basic* vor das *Photinus pyralis*-Luciferasegen kloniert. Da *pGL3 Basic* selbst keine endogene Promotoraktivität besitzt, konnte die Transkription des *Photinus*-Luciferasegens nur durch die Insertion aktivierender repp86-Promotor-DNA erfolgen. Die zu klonierenden Promotorbereiche von repp86 wurden mittels PCR synthetisiert. Als Matrize diente hierbei das BAC-Konstrukt RPC111-243J16, das die gesamte genomische Sequenz von repp86 enthält.

Der Kontrollvektor *pGL3 Control* kodiert ebenfalls für die *Photinus pyralis*-Luciferase und enthält im Unterschied zu *pGL3 Basic* einen dem Reportergen vorgeschalteten SV40-

Minimalpromotor. Der Vektor wurde in den Experimenten als Maß für die Basalaktivität eines Minimalpromotors eingesetzt.

Mit jedem repp86-Promotorkonstrukt sowie mit jedem Kontrollansatz wurde ein zusätzlicher Vektor, *pRL-CMV*, kotransfiziert. *pRL-CMV* kodiert für die *Renilla reniformis*-Luciferase und enthält den „CMV immediate-early enhancer/promoter“, der für eine strenge konstitutive Expression des Reportergens sorgt. Der Vektor wurde als interne Kontrolle für die Transfektionseffizienz eingesetzt.

Die oben beschriebenen Vektoren und Konstrukte wurden mittels der Kalziumphosphatpräzipitationsmethode in HEK293-Zellen transient transfiziert (3.3.8). 24 h nach der Transfektion wurden Gesamtzelllysate hergestellt, die zur Bestimmung der Proteinkonzentration und zur Messung der Biolumineszenzwerte beider Luciferasen dienten.

Auswertung der Meßdaten: Die Auswertung wurde vorgenommen, indem die Werte für die relative *Photinus*- und *Renilla*-Luciferaseaktivität zunächst durch die Proteinkonzentration der zugehörigen Probe dividiert wurden. Von den so standardisierten *Photinus*-Werten der repp86-Promotorkonstrukte wurden die standardisierten Werte für Autoaktivität des promotorfreien *pGL3 Basic* subtrahiert. Mittelwerte dieser Daten wurden dann als prozentuale Anteile der standardisierten Biolumineszenzwerte der *Renilla*-Luciferase ausgedrückt. Die Aktivität des „CMV immediate-early enhancer/promoter“ im *pRL-CMV* war ca. hundertfach stärker als die Aktivität des SV40-Promotors im *pGL3 Control*-Vektor. Die Aktivitäten der längsten repp86-Konstrukte waren im Bereich der Aktivität des *pGL3 Control*-Minimalpromotors anzusiedeln. Dementsprechend waren die standardisierten Werte der *Photinus*-Luciferaseaktivität dieser Konstrukte, bezogen auf 100 % der *Renilla*-Werte, nicht höher als 2.

Ergebnisse des Luciferase Assays: Die Expressionsaktivität des Kontrollvektors *pGL3 Control* mit dem SV40-Minimalpromotor betrug 1,13 standardisierte Lichteinheiten pro Sekunde (RLU/s).

Der längste in *pGL3 Basic* klonierte Promotorabschnitt überspannte die Region -967/+143 des repp86-Gens und hatte eine Luciferaseaktivität von 1,24 RLU/s (Abb. 26). Dieser Wert lag im Bereich der Luciferaseaktivität von *pGL3 Control* (s.o.). Der Promotorabschnitt enthielt eine mit MatInspector V2.2 detektierte potentielle Bindestelle für das TATA-Box bindende Protein (TBP). In TATA-haltigen Promotoren der Vertebraten befindet sich die TATA-Box-Konsensussequenz ca. 30 Nukleotide stromaufwärts vom Transkriptions-

startpunkt, also in Position -30 . Im Falle von repp86 wurde der im EST-Klon BE888044 angenäherte Transkriptionsstart durch PCR-Experimente bestätigt (4.8) und würde sich 515 Nukleotide stromabwärts von der vermeintlichen TATA-Box befinden. Aufgrund der großen Entfernung wäre die Relevanz der vorgeschlagenen TATA-Konsensussequenz für die Regulation der repp86-Expression fraglich. Daß die TATA-Box-Konsensussequenz nicht funktionell ist, wurde beim Vergleich der Promotorkonstrukte $-967/+143$ und $-146/+143$ deutlich. Im ersten Konstrukt war die TATA-Box, die an Position -515 liegt, enthalten, während sie im Konstrukt $-146/+143$ nicht mehr vorhanden war. Das längere TATA-Box-enthaltende Konstrukt $-967/+143$ hatte eine Luciferaseaktivität von 1,24 RLU/s. Die Luciferaseaktivität des kürzeren Konstruktes ohne TATA-Box lag bei 1,6 RLU/s und war damit sogar höherer als die Aktivität des längeren Konstruktes (Abb. 26 (B)). Beim Subtrahieren einer funktionellen TATA-Box wäre jedoch ein gegenteiliges Ergebnis zu erwarten, nämlich eine Verringerung der Luciferaseaktivität. Das Ergebnis zeigte, daß die TATA-Box keine Relevanz für die Regulation der repp86-Expression besitzt. Die Möglichkeit eines alternativen Transkriptionsstartes war wenig wahrscheinlich, da in *Northern blot*-Experimenten von Rott (Rott, 1999) und Manda et al. (1999) von einem einzigen repp86-Transkript berichtet wurde.

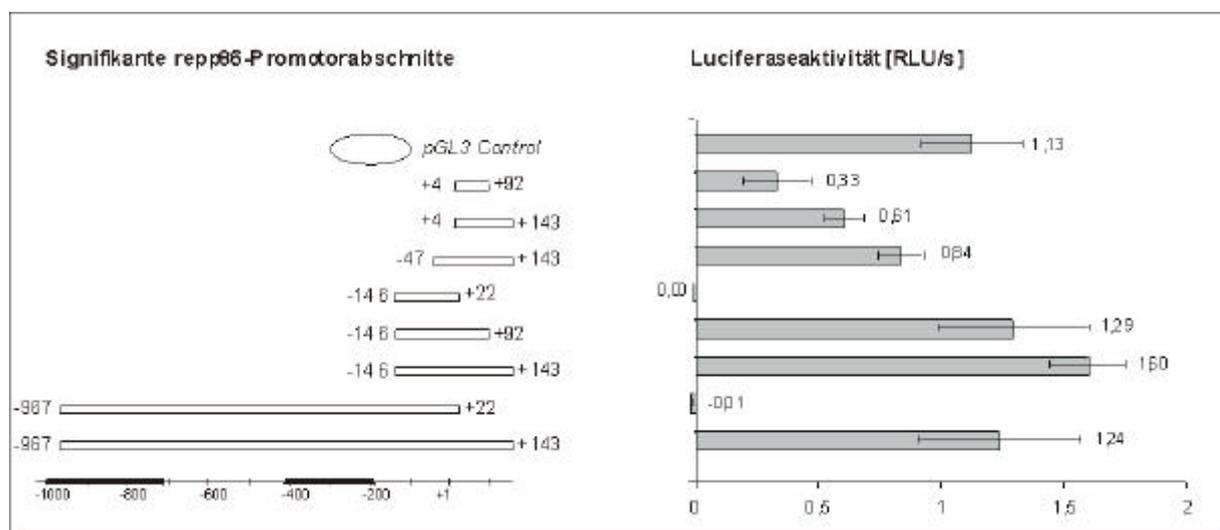


Abbildung 26: Eingrenzung des Promotorbereiches von repp86, Minimalpromotor. Links wurden einige signifikante Bereiche des repp86-Promotors dargestellt, die in den Vektor *pGL3 Basic* kloniert waren. Zur besseren Orientierung wurde unten der genomische repp86-Bereich mit dem Transkriptionsstartpunkt (+1) eingezeichnet. CpG-Inseln sind als schwarze Linien markiert. Die korrespondierenden Werte für die Luciferaseaktivität wurden rechts dargestellt. RLU/s = „relative light units per second“; relative Lichteinheiten pro Sekunde.

In weiteren Experimenten wurde der Promotorabschnitt -146/+143 vom 3'-Ende her um 51 Nukleotide (Konstrukt -146/+92) bzw. 121 Nukleotide (Konstrukt -146/+22) verkürzt. Das Promotorkonstrukt -146/+92 hatte eine Aktivität von 1,29 RLU/s, die etwas geringer war als die von -146/+143 (1,60 RLU/s). Im Gegensatz dazu wirkte sich die Verkürzung des DNA-Abschnitts um 121 Nukleotide negativ auf die Promotoreigenschaften aus: die gesamte Promotoraktivität ging im Konstrukt -146/+22 verloren. Ein ähnlicher Effekt wurde in den Experimenten mit den Konstrukten -967/+143 und -976/+22 beobachtet. Hierbei war die Aktivität von -967/+143 (1,24 RLU/s) durch die Verkürzung des 3'-Bereiches auf -967/+22 vollständig reduziert (-0,01).

Zusammengenommen zeigten die Ergebnisse, daß die essentiellen Komponenten des repp86-Promotors im Bereich von +22 bis +92 enthalten sind. Unabhängig von der Länge des 5'-Bereiches führte die Reduktion des 3'-Abschnittes bis zum Nukleotid +22 in allen Konstrukten zur vollständigen Einbuße der Promotoraktivität. Im Bereich +22/+92 wurden durch das Auswerteprogramm MatInspector V2.2 Erkennungsstellen für die Transkriptionsfaktoren c-ETS-1 (+65) und NRF2 (+65) vorgeschlagen. Die minimale Promotoraktivität des Bereiches +22/+92 scheint durch Sequenzen im Bereich -147 bis +22 und +92 bis -143 verstärkt zu werden. In diesen Bereichen befinden sich potentielle Bindestellen für DeltaEF1 (-81) und LYF1 (-74) bzw. GFI1 (+119) und NF-Y (+126) (Abb. 25).

Das Protein c-ETS-1 („*chicken E26 transformation specific*“), auch p54 genannt, ist ein humanes Protoonkogen und kann als Repressor und als Aktivator der Genexpression wirken. NRF2, „*nuclear respiratory factor 2*“ (M00108 in *TransFac*) ist ein Aktivator der Expression der Cytochromoxidase (Virbasius et al., 1993). DeltaEF1 („*delta-cristallin/E2-box factor 1*“) ist ein transkriptionaler Repressor in *G. gallus*, der die E2-Box-vermittelte Genaktivierung hemmt (Sekido et al., 1994). Sein humaner Homolog wird „*Atp1a1 regulatory element binding factor 6*“ (AREB6, P37275 in *SwissProt*) genannt. LYF1 („*lymphoid transcription factor 1*“, Q13422 in *Swissprot*), auch IKAROS oder IK1 genannt, gehört zur Familie der C2H2-Zinkfingerproteine (Nietfeld und Meyerhans, 1996). GFI1 („*growth factor independence 1*“) ist ein Transkriptionsfaktor, der mit hoher Wahrscheinlichkeit in die Aktivierung von Genen, die in G1/S-Phase des Zellzyklus in T-Zellen aktiviert und exprimiert werden, involviert ist (Roberts und Cowell, 1997).

NFY, (= CBF, „*CCAAT-binding factor*“, P25208 *SwissProt*) ist ein Transkriptionsfaktor in Säugetieren und bindet an das CCAAT-Motiv einer Vielzahl von Genen. Die Relevanz des Faktors für die Regulation des repp86-Gens sollte bereits jetzt in Frage gestellt werden. Unter

der Berücksichtigung des ermittelten repp86-Transkriptionsstartes befände sich die CCAAT-Konsensussequenz stromabwärts der Transkriptionsinitiationsstelle (Position +126). In allen bekannten Publikationen wird jedoch berichtet, daß funktionelle CCAAT-Boxen 50 bis 130 Nukleotide stromaufwärts vom Transkriptionsstart positioniert sind. Am Beispiel von zwei Konstrukten konnte außerdem gezeigt werden, daß dieser Bereich für die Regulation der Genexpression nicht signifikant sein kann. Die CCAAT-haltige Region -146/+143 hatte eine Promotoraktivität von 1,60 RLU/s, während die CCAAT-lose Region -146/+92 mit 1,29 RLU/s nicht signifikant kleiner war. Beim Verlust einer funktionellen CCAAT-Box wäre ein größerer Unterschied in den Aktivitäten zu erwarten. Die Ausführung gilt auch für den Transkriptionsfaktor GLI1, dessen Bindeposition bei +119 läge.

In Anbetracht der ermittelten essentiellen Promotorregion von +22 bis +92, könnten die zwei Transkriptionsfaktoren c-ETS-1 und NRF2 für die Aktivierung des repp86-Gens von besonderer Wichtigkeit sein. Dies müßte in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Die Funktion einzelner Transkriptionsfaktoren wird in 5.6.4 ausführlicher diskutiert.

5 Diskussion

5.1 Einordnung von repp86 in den Ablauf des Zellzyklus

Untersuchungen an ruhenden peripheren Blutlymphozyten zeigen, daß in weniger als 1 % dieser Zellen repp86-Expression stattfindet (Heidebrecht et al., 1997b). Nach der Stimulation mit dem Mitogen Phythämagglutinin wird nach drei Tagen die Expression von repp86 in ca. 40 % der Zellen induziert. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen intakter proliferierender Zellen zeigen die subzelluläre Verteilung von repp86. In S- und G2-Phase-Zellen ist repp86 diffus im Zellkern verteilt; in Prophase-Zellen wird eine repp86-Lokalisation an den Spindelpolen beobachtet, während es in der Metaphase zu einer Assoziation mit den Mikrotubuli kommt. Weitere Untersuchungen zeigen, daß repp86 nicht mit dem Interphase-Tubulin kolokalisiert (Heidebrecht et al., 2003). Zellzyklusanalysen im „*fluorescence-activated cell sorting*“-Verfahren (FACS) mit Ki-S2 zeigen, daß repp86 vom Übergang G1/S bis zum Ende der Mitose exprimiert wird. Diese Erkenntnisse geben Anlaß zu der Vermutung, daß die zellzyklusabhängige Expression von repp86 und seine mögliche Interaktion mit der Spindel im Zusammenhang mit dem Aufbau und der Dynamik des Spindelapparates stehen.

5.2 Kontrolle der repp86-Expression auf der Ebene der Transkription

Die Expression von Genen wird bei den Eukaryoten vorwiegend auf der Ebene der Transkription kontrolliert. Die meisten Eukaryotengene sind inaktiv, bis sie durch die Einwirkung von Aktivatoren spezifisch eingeschaltet werden. Erst nach der Genaktivierung und dem Aufbau des Transkriptionsinitiationskomplexes kann das Primärtranskript synthetisiert werden. Das Primärtranskript der Eukaryoten wird prozessiert, und das Produkt, die *messenger*-RNA (mRNA), dient als Informationsträger in der Proteinbiosynthese. Das Vorhandensein einer mRNA-Spezies in der Zelle bedeutet also, daß das für sie kodierende Gen zuvor aktiviert wurde.

Nicht-proliferierende Zellen exprimieren kein repp86 (Heidebrecht et al., 1997b). Erfolgt die repp86-Regulation auf der Ebene der Transkription, sollte keine repp86-mRNA in nicht-proliferierenden Zellen detektierbar sein. Dies wurde in PCR-Experimenten mit der cDNA nicht-proliferierender Granulozyten und nicht-aktivierter Lymphozyten überprüft. In diesen

PCR-Experimenten wurden keine repp86-spezifischen Amplifikate nachgewiesen. Das negative Ergebnis bedeutete, daß in den Zellen keine repp86-mRNA transkribiert wurde. Offensichtlich ist das Gen für repp86 in ruhenden Zellen inaktiv, und die Kontrolle der Expression erfolgt somit auf der Ebene der Transkription.

Die Ergebnisse der PCR mit der cDNA ruhender Granulozyten und Lymphozyten wurden durch zwei Positivkontrollen abgesichert. In der PCR mit actinspezifischen Oligonukleotiden wurden aus der Gesamt-cDNA der Granulozyten, der Lymphozyten und der L428-Zellen Actin-DNA-Fragmente erwarteter Länge amplifiziert. Actin ist ein ubiquitäres Protein, dessen mRNA in jeder Zellzyklusphase transkribiert wird. Deshalb kann die Actin-mRNA als interne Kontrolle für die Integrität der Gesamt-mRNA eingesetzt werden. Das Vorhandensein der Actinamplifikate in allen PCR-Proben zeigte, daß die cDNA in allen drei Versuchsansätzen (Granulozyten, Lymphozyten, L428) intakt war. Wäre also in den ruhenden Zellen (Granulozyten und Lymphozyten) repp86-mRNA vorhanden, müßten repp86-spezifische Amplifikate nachzuweisen sein. Das negative Versuchsergebnis bedeutet also, daß in ruhenden Zellen keine repp86-mRNA transkribiert wird.

In der zweiten Positivkontrolle wurden aus 30 ng Gesamt-cDNA der proliferierenden L428-Zellen spezifische repp86-DNA-Fragmente amplifiziert. Mit dem Ergebnis wurde bestätigt, daß die Amplifikation repp86-spezifischer Sequenzen mit den PCR-Oligonukleotiden *start1for* und *297rev* prinzipiell möglich ist, solange die entsprechende Matrize (repp86-cDNA) vorhanden ist. In PCR-Ansätzen mit 3 ng, 0,3 ng und 0,03 ng L428-Gesamt-cDNA war die Konzentration der repp86-spezifischen Amplifikate so gering, daß die PCR-Produkte in der Agarosegelelektrophorese nicht detektiert werden konnten. Das Ergebnis deutet darauf hin, daß die repp86-mRNA in relativ kleinen Mengen in der Zelle vorhanden ist.

5.3 Effekte der Überexpression von repp86 in *S. cerevisiae* und HEK293-Zellen

Im Rahmen der Untersuchungen zu Protein-Protein-Wechselwirkungen von repp86 im *Yeast Two-Hybrid*-System (4.5) wurde festgestellt, daß überexprimiertes repp86 in voller Länge eine wachstumshemmende Wirkung in *S. cerevisiae* AH109 hat (4.5.2). Eine durch Deletion von zwei Nukleotiden zufällig entstandene verkürzte repp86-Variante (GAL4-BD-repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎) wurde in *S. cerevisiae* exprimiert und wirkte nicht wachstumshemmend (4.5.2; Abb. 8 und Abb. 9). Der in dieser repp86-Variante fehlende repp86-Bereich (AS 294 bis 747) könnte

deshalb für den Effekt der Wachstumshemmung in *S. cerevisiae* verantwortlich sein. In diesem Proteinbereich wird mit hoher Wahrscheinlichkeit eine *coiled coil*-Domäne ausgebildet, die in der Etablierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eine Rolle spielt. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, daß diese *coiled coil*-Domäne an der Interaktion mit Mikrotubuli *in vitro* beteiligt ist (Mikrotubuli-Bindungsassay unter 4.4). Ob und in wie weit repp86 bzw. seine postulierte C-terminale *coiled coil*-Domäne mit der Knospung der Hefezellen interferieren, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden, weil bis *dato* kein repp86-Homolog in *S. cerevisiae* identifiziert wurde.

Der Effekt der Wachstumshemmung bzw. der G2/M-Phasenarretierung wurde außerdem in Experimenten mit transfizierten HEK293- und COS7-Zellen beobachtet, die repp86 überexprimierten (4.3, Abb. 4 und 5). Durchflußzytometrische Analysen der Zellzyklusphasen zeigten, daß eine repp86-Überexpression zur Akkumulation von transfizierten HEK293-Zellen in der G2/M-Phase führt. Der Prozentsatz der arretierten HEK293-Zellen wuchs in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach der Transfektion. Nach 24 h war der Prozentsatz der G2/M-arretierten Zellen bereits fast doppelt so hoch wie der Prozentsatz der in G2/M-befindlichen Kontrollzellen. Die transfizierten Zellen waren nicht befähigt, Mitosen durchzuführen und in die G1-Phase überzugehen. 48 h nach der Transfektion waren lediglich 6 % der transfizierten Zellen in der G1-Phase, während sich 45 % der Kontrollzellen in dieser Phase befanden.

Neben der G2/M-Phasenarretierung wurde eine zunehmende Polyploidie der transfizierten Zellen festgestellt. 48 h nach der Transfektion zeichneten sich 23 % der repp86-überexprimierenden Zellen durch eine ausgeprägte Polyploidie aus (DNA-Gehalt $> 2n$). Mit der Polyploidie ging ein Absterben der transfizierten Zellen einher. Kontrollzellen zeigten hingegen ein normales Wachstumsverhalten. Nach 72 h waren bereits 71 % der überlebenden repp86-überexprimierenden HEK293-Zellen polyploid.

Aus früheren Experimenten (Heidebrecht et al., 1997b) war bekannt, daß endogen exprimiertes repp86 während der Mitose stark phosphoryliert wird und mit der mitotischen Spindel kolokalisiert. Im Gegensatz zum endogenen repp86 wird das in HEK293-Zellen überexprimierte repp86 nur ineffizient phosphoryliert (Dr. Heidebrecht, pers. Mitteilung). Die Phosphorylierung könnte daher eine Rolle in der repp86-Lokalisierung spielen und seine spezifische Funktion am Spindelapparat vermitteln. Eine erhöhte Konzentration des überexprimierten und nicht effizient phosphorylierten repp86 könnte in HEK293-Zellen Veränderungen in der Spindeldynamik hervorrufen und damit für den Effekt der G2/M-

Phasenarretierung und der Polyploidie verantwortlich sein. Die Morphologie der repp86-überexprimierenden Zellen wurde daraufhin in COS7-Zellen studiert.

In Doppelimmunfluoreszenzfärbungen der repp86-überexprimierenden COS7-Zellen (4.3) wurden 72 h nach der Transfektion mit *pRK5-repp86* mißgebildete, lappenartige, polymorphe Zellkerne beobachtet. Anscheinend waren die Mechanismen der Spindelorganisation und damit der Chromosomenverteilung gestört, was im Einklang mit der beobachteten Polyploidie der HEK293-Zellen stünde. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung von Wittmann et al. (2000), daß ein Überschuß des repp86-Homologs TPX2 in *Xenopus* („*targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2*“) zur Ausbildung monopolarer Spindelstrukturen mit abnorm vergrößerten Polen in mitotischen *Xenopus*-Eiextrakten führt. TPX2 zeigt das gleiche zellzyklusabhängige Verteilungsmuster in *Xenopus*-Eiern wie repp86 in humanen Zellen (Wittmann et al., 1998). Während der Mitose wird TPX2, ähnlich wie repp86, stark phosphoryliert (Heidebrecht et al., 1997b; Wittmann et al., 2000). Weiterhin wurde berichtet, daß die Spindelpollokalisierung von TPX2 mit der Aktivität des Dynein-Dynactin-Komplexes eng verknüpft ist. Mit der Entfernung von TPX2 aus mitotischen *Xenopus*-Eiextrakten mittels eines TPX2-spezifischen Antikörpers zeichnen sich gravierende Veränderungen des Spindelapparates ab. Es entstehen bipolare Spindelstrukturen mit deformierten Spindelpolen und erhöhter Mikrotubulidichte (Wittmann et al., 2000). Experimente von Gruss et al. (2002) zeigten, daß TPX2 und repp86 (humanes TPX2) echte funktionelle Homologe sind (Gruss et al., 2002). Endogen exprimiertes repp86 wird für die Ausbildung normaler Spindelmorphologie und für die Aufrechterhaltung der Spindelpolintegrität benötigt (Garrett et al., 2002).

Im Hinblick auf die strenge Kollokalisierung zwischen repp86 und den Mikrotubuli in intakten Zellen und im Zusammenhang mit der Interaktion zwischen repp86 und den Mikrotubuli *in vitro* (diskutiert unter 5.4) liegt die Vermutung nahe, daß repp86-Überexpression den kritischen Schritt der Chromatidentrennung durch seine Interaktion mit den Spindelmikrotubuli beeinträchtigt. Möglicherweise wird die Mikrotubulidynamik und Motilität durch die Interaktion mit überschüssigem repp86 beeinflusst. Dadurch könnte die gesamte Funktionalität des Spindelapparates nicht mehr gegeben sein. Über die genauen Mechanismen, die zur Beeinträchtigung der Spindelfunktion führen, kann zur Zeit nur spekuliert werden, weil die genaue Funktion von repp86 noch nicht bekannt ist. Aus Publikationen ist allerdings bekannt, daß die Funktion einer ganzen Reihe von Mikrotubulidestabilisierenden bzw. -stabilisierenden Proteinen über die zellzyklusphasenspezifische

Phosphorylierung reguliert wird. Dazu gehören z.B. die strukturellen mikrotubuliassoziierten Proteine (MAPs) Stathmin/Op18 (Andersen et al., 2000) und *tau* (Cross et al., 2000). Auffälligerweise wird repp86 in der Mitose stark phosphoryliert, was auf einen analogen Zusammenhang mit den strukturellen MAPs hindeutet und für die repp86-Funktion essentiell sein könnte. Interessanterweise wird das in HEK293-überexprimierte repp86 nicht effizient phosphoryliert (Dr. Heidebrecht, pers. Mitteilung), so daß seine Funktion beeinträchtigt sein und zu dem beschriebenen Effekt der Spindelhehlfunktion führen könnte.

In *S. cerevisiae* wurde bis *dato* kein repp86-Homolog gefunden, so daß keine Aussagen über eine mögliche Korrelation des wachstumshemmenden Effektes in humanen und Hefezellen getroffen werden können.

Im Zusammenhang mit dem Effekt der repp86-abhängigen Wachstumshemmung in Hefen ist die Wirkung des koexprimierten SIAH2 (4.5.4; 4.5.5) interessant. Die Interaktion zwischen dem N-terminalen repp86-Bereich und dem C-terminalen Bereich von SIAH2 schien die Wachstumshemmung abzuschwächen oder sogar zu eliminieren. Der auf der Interaktion beruhende Effekt wird in Kapitel 5.5 ausführlich diskutiert.

5.4 repp86 ist ein mikrotubuliassoziiertes Protein

Die Ergebnisse der repp86-Überexpression in HEK293- und COS7-Zellen deuten auf eine Funktion von repp86 als strukturelles mikrotubuliassoziiertes Protein (MAP) hin, obwohl repp86 keine Sequenzhomologien mit anderen MAPs aufweist und keine bekannten Mikrotubuli-Bindemotive enthält.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde demonstriert, daß repp86 zusammen mit *in vitro* polymerisierten Mikrotubuli im Proteinsediment nachzuweisen ist. Es wurden 45 % des in den L428-Zellen endogen exprimierten repp86 detektiert. 75 % des bakteriell exprimierten Fusionsproteins GST-repp86₍₁₋₇₄₇₎ wurden kosedimentiert, während die C-terminale Variante GST-repp₍₆₀₁₋₇₄₇₎ mit 35 % der eingesetzten Proteinmenge im Sediment vertreten war. Das Fusionsprotein GST-repp86₍₆₀₁₋₇₄₇₎ enthält eine C-terminale *coiled coil*-Struktur (s.u.), die eine Interaktion mit den Mikrotubuli vermitteln könnte.

Für repp86 werden zwei potentielle *coiled coil*-Regionen postuliert (4.1). Für die N-terminal gelegene *coiled coil*-Struktur (AS 207 bis 239) wurde eine Wahrscheinlichkeit von 87 % errechnet, während der Wahrscheinlichkeitswert für die C-terminale *coiled coil*-Struktur (AS

660 bis 716) bei 100 % liegt. *Coiled coils*, so genannte Super-Sekundärstrukturen, sind bekanntlich an der Etablierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt, die in der Entstehung von Proteinhomodimeren und Proteinheterodimeren eine Rolle spielen (Benson et al., 2001). Zellzyklusanalysen und morphologische Studien der repp86-überexprimierenden HEK293- und COS7-Zellen (4.3) wiesen auf eine direkte Beteiligung von repp86 in der Steuerung des Spindelaufbaus und der Spindelfunktion hin (diskutiert unter 5.3).

Die Mikrotubulidynamik wird *in vivo* durch zahlreiche mikrotubuliassoziierte Proteine (MAPs) reguliert, die in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: stabilisierende und destabilisierende MAPs. Zu den bekanntesten Mikrotubulistabilisatoren gehören innerhalb der Mammalia die zwei neuronal exprimierte *tau* und MAP2 sowie das in allen nicht-neuronalen Zellen vorkommende MAP4. In allen drei Proteinen ist die Mikrotubuli-Bindedomäne C-terminal lokalisiert (Valiron et al., 2001). Wie das Mikrotubuli-Bindungsassay-Experiment zeigte, bindet der C-Terminus von repp86 (AS 601-747) an *in vitro* polymerisierte Mikrotubuli. Im Proteinsediment wurden 35 % des eingesetzten rekombinanten repp86-C-Terminus nachgewiesen. Das gesamte rekombinante repp86-Protein GST-repp86₍₁₋₇₄₇₎ zeigte allerdings eine höhere Bindungsaffinität an Mikrotubuli: im Proteinsediment waren 75 % des im Experiment eingesetzten Proteins wiederzufinden. Die N-terminal postulierte, jedoch weniger wahrscheinliche *coiled coil*-Domäne, sowie das weiter N-terminal gelegene P-loop-Motiv könnten sowohl in die Mikrotubulibindung als auch in Interaktionen mit anderen Proteinen involviert sein. Die Unterschiede in der Bindungsaffinität des endogen exprimierten repp86 (45 % im Kosediment) und des bakteriell exprimierten GST-repp86₍₁₋₇₄₇₎ (75 % im Kosediment) an Mikrotubuli *in vitro* könnten sich als Folge unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus ergeben haben.

Die Kosedimentation des bakteriell exprimierten repp86 und den *in vitro* polymerisierten Mikrotubuli deutet darauf hin, daß zwischen beiden Proteinen eine direkte Interaktion ohne die Vermittlung eines anderen humanen Proteins stattfindet.

In den letzten Jahren haben sich die Hinweise auf die Zugehörigkeit von repp86 zu der großen Familie der mikrotubuliassoziierten Proteine weiter verdichtet. In zahlreichen Untersuchungen wurde eine Korrelation zwischen repp86 und bekannten mikrotubuliassoziierten bzw. mit anderen zellzyklusregulierten Proteinen bestätigt (s.u.).

Das funktionelle Homolog von repp86 in *Xenopus*, das „*targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2*“ (TPX2), interagiert mit dem „*Xenopus kinesin-like protein 2*“ (Xklp2)

(Boleti et al., 1996). Xklp2 ist ein kinesinähnliches Protein mit einer N-terminalen Motordomäne. Das Protein ist an den Minusenden der Spindelmikrotubuli und an den Spindelpolen lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Centrosomentrennung. Außer der Aktivität des Dynein-Dynactin-Komplexes wird die Aktivität von TPX2 für die Lokalisierung von Xklp2 an den Spindelpolen benötigt (Wittmann et al., 1998).

Das humane Xklp2-Homolog, das „*human kinesin-like protein 2*“ (Hklp2) wurde bereits identifiziert (Sueishi et al., 2000). Die Interaktion zwischen repp86 und Hklp2 wurde in Kopräzipitationsexperimenten bestätigt (Heidebrecht et al., 2003). In der Metaphase kolokalisieren beide Proteine im Bereich der Spindelpole und der Spindel. In der Interphase sind die Proteine unabhängig voneinander verteilt. Die Experimente zeigen, daß repp86 und Hklp2, wie die *Xenopus*-Homologe TPX2 und Xklp2, während der Mitose miteinander assoziiert sind und möglicherweise eine analoge Funktion besitzen.

Im Zuge der Untersuchungen zur TPX2-Funktion fanden Gruss et al. (2001) heraus, daß TPX2 unter der Vermittlung der „*small GTPase Ran*“, die seine Dissoziation von den nukleären Importfaktoren Importin α und Importin β katalysiert, reguliert wird (Gruss et al., 2001). Im Hinblick auf die hohe strukturelle und funktionelle Homologie zwischen repp86 und TPX2 könnte der Mechanismus des nukleären Transportes auch für repp86 gelten.

Die Position von repp86 im mitotischen Netzwerk gewann an Komplexität, nachdem bekannt wurde, daß die Aurora-A-Kinase, eine Serin/Threonin-Proteinkinase aus der Familie der Aurora/Ip11p-Kinasen, unter Vermittlung von repp86 an die Spindel dirigiert wird. repp86 wird von Aurora-A phosphoryliert, aber die Interaktion beider Proteine ist von der Kinaseaktivität unabhängig (Kufer et al., 2002). Während der Mitose wird repp86 stark phosphoryliert. Am Anfang der Mitose beginnt auch die Umverteilung von repp86 an die Spindelpole, später in der Metaphase wird repp86 auch im gesamten Bereich der Spindelmikrotubuli nachgewiesen. Interessanterweise erreichen die Protein- und Aktivitätspeaks von Aurora-A ihre Höhepunkte beim Übergang der G₂- in die M-Phase des Zellzyklus (Giet und Prigent, 1999; Bischoff und Plowman, 1999). Es erscheint plausibel, daß repp86 als ein Substrat von Aurora-A gerade in G₂ und M phosphoryliert wird, was für seine Umverteilung und Funktion entscheidend sein könnte. An dieser Stelle sollten die potentiellen Phosphorylierungsstellen für die Mitose-einleitende *cdc2*-Kinase und die „*mitogen activated protein kinase*“ (MAPK) in der repp86-Primärsequenz nicht außer Acht gelassen werden (4.1). Der hohe Konservierungsgrad dieser potentiellen Phosphorylierungsstellen in repp86-

Homologen von *X. laevis*, *M. musculus* und *D. rerio* unterstreicht die hohe funktionelle Relevanz. Wittmann et al. zeigten, daß mindestens eine der *cdc2*-Stellen und alle MAPK-Stellen im repp86-Homolog in *Xenopus* (TPX2) phosphoryliert werden (Wittmann et al., 2000). Differentielle Phosphorylierung könnte also mit spezifischen Funktionen von repp86 als strukturelles MAP im Zusammenhang stehen. Welche Faktoren für die Lokalisierung von repp86 am Spindelapparat zusätzlich notwendig sind, ist noch unbekannt.

Aurora-Kinasen spielen eine Rolle in der Centrosomentrennung (Glover et al., 1995) sowie bei der Regulation der Chromosomenverteilung und der Zytokinese (Bischoff und Plowman, 1999). Aurora-Kinasen kolokalisieren mit den Centrosomen, den Spindelpolen und den Spindelmikrotubuli (Giet und Prigent, 1999). Für die Aurora-Kinasen wird auch eine Rolle in der Tumorgenese impliziert. Überexpression von Aurora-A führte zur neoplastischen Transformation von NIH-3T3-Zellen (Zhou et al., 1998). Tatsächlich wird Aurora-A in vielen Tumoren überexprimiert (Bischoff et al., 1998). In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß Aurora-A im Genlocus 20q13.2-13.3 kodiert wird, der in Dickdarm-, Brust- und Magentumoren oft amplifiziert vorliegt (Sen et al., 1997). Im Hinblick auf die direkt benachbarten Genloci von repp86 (20q11.2) und Topoisomerase I (20q12-q13.1) könnte vermutet werden, daß die Gene zu einem in der Tumorgenese wichtigen Amplikon gehören.

Die ektopische Expression von Aurora-A führt zur Centrosomamplifikation und Aneuploidie in Säugetierzellen in Kultur (Bischoff et al., 1998; Meraldi et al., 2002). Der Mechanismus der Wirkung ist allerdings noch ungeklärt. Mit diesen Auswirkungen von dereguliert exprimierter Aurora-A-Kinase könnte erklärt werden, warum die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Versuche, die Interaktion von repp86 und Aurora-A im *Yeast Two-Hybrid*-System nachzuweisen, gescheitert sind. Transformationen von Hefen mit *pGBKT7-Aurora-A* oder *pGADT7-Aurora-A* blieben ergebnislos, weil kein Hefewachstum stattfand. In *S. cerevisiae* wird ein Homolog von Aurora-A (das Protein IpI1p) exprimiert, welches das einzige in dieser Spezies bekannte Mitglied der Aurora-Familie repräsentiert. Da alle Aurora-Kinasen hochkonservierte C-terminale katalytische Domänen besitzen, ist eine Substitution der IpI1p-Aktivität durch das humane Aurora-A vorstellbar. In diesem Falle könnte die Überexpression von Aurora-A in Hefezellen für ähnliche Effekte sorgen (Centrosomamplifikation und Aneuploidie), die aus den Säugetierzellen in Kultur bekannt sind.

In Abbildung 27 wurden die bereits bekannten und postulierten Interaktionen von repp86 mit anderen Proteinen im hypothetischen Modell wiedergegeben:

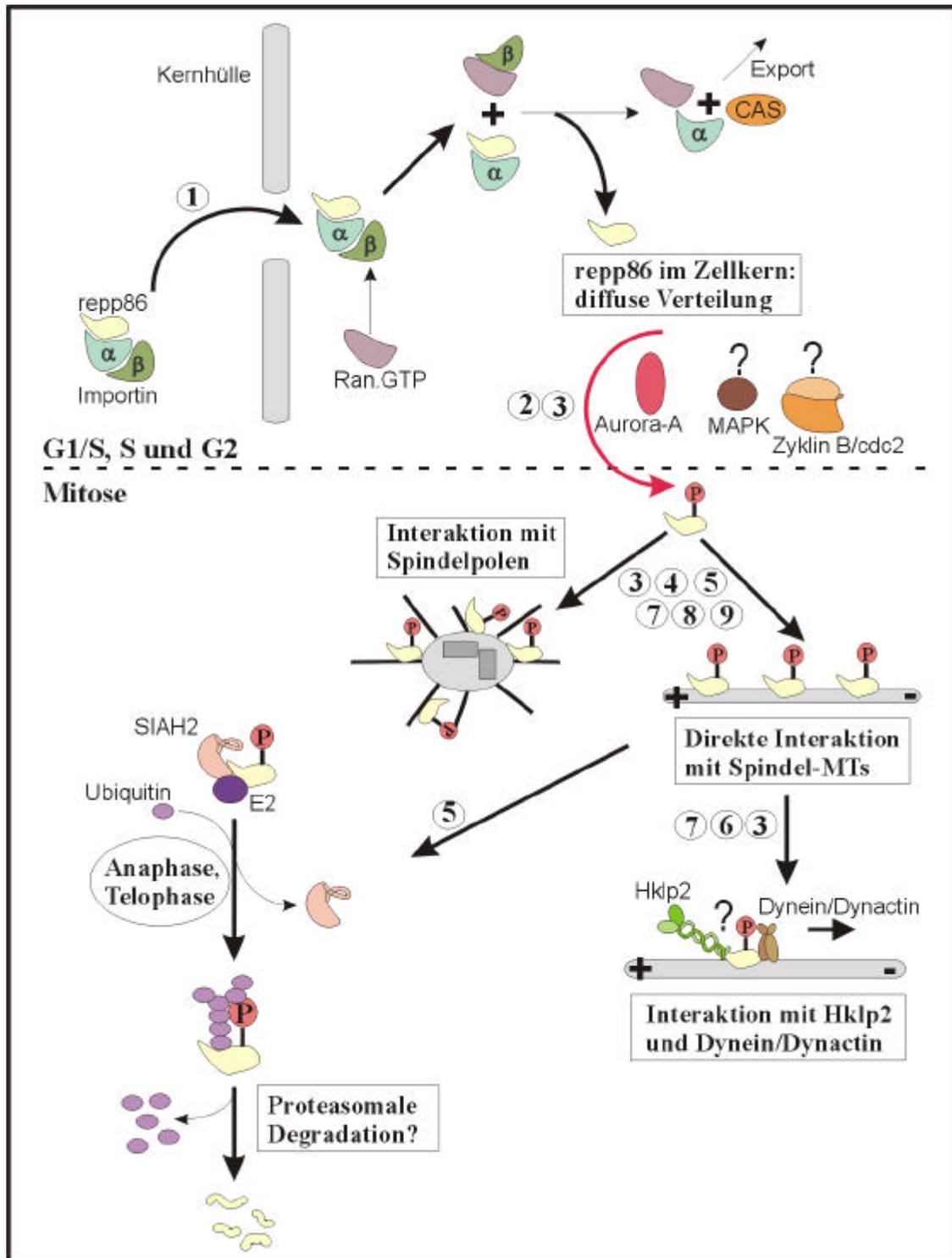


Abbildung 27: Hypothetisches Modell wahrscheinlicher repp86-Wechselwirkungen mit proliferationsassoziierten Proteinen. Nukleärer repp86-Transport erfolgt wahrscheinlich unter der Vermittlung des Importinsystems (α und β). Vor bzw. während der Mitose wird repp86 durch Aurora-A und möglicherweise durch MAPK und ZyklinB/cdc2 phosphoryliert. In der Mitose interagiert repp86 mit Spindelpolen und direkt mit Mikrotubuli (MT). Unter Vermittlung des Dynein/Dynactin-Komplexes und repp86 wird das Motorprotein Hklp2 an die Minusenden der MTs transportiert. In Anaphase und Telophase erfolgt die Ubiquitinierung von repp86 durch SIAH2 und möglicher Abbau im Proteasom (diskutiert unter 5.5). Differentielle Phosphorylierung könnte die Bindungsaffinitäten von repp86 an Proteine bestimmen und seine Ubiquitinierung bedingen. Literatur: (1) Gruss et al., 2001; (2) Kufer et al., 2002; (3) Wittmann et al., 2000; (4) Heidebrecht et al., 1997b; (5) vorliegende Arbeit; (6) Wittmann et al., 1998; (7) Heidebrecht et al., 2003; (8) Garrett et al., 2002; (9) Gruss et al., 2002.

Aufgrund der funktionellen Homologie von repp86 und TPX2 (Gruss et al., 2002) wurden einige funktionelle Aspekte des TPX2 auf repp86 übertragen. Zur Erstellung des hypothetischen Modells wurden Informationen aus den in Abbildung 27 aufgeführten Literaturquellen hinzugezogen.

5.5 Interaktion von repp86 mit SIAH2 in *S. cerevisiae* und HEK293-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen repp86 und der humanen RING-Finger-E3-Ubiquitinligase „*seven in absentia Drosophila homolog 2*“ (SIAH2) im *Yeast Two-Hybrid*-System und in Koimmunpräzipitationsexperimenten im humanen System nachgewiesen (4.5.3, 4.5.4, 4.6.1, 4.6.2).

Nach dem heutigen Wissensstand werden E3-Ubiquitinligasen in HECT-Domänenenzyme („*homologous to E6-AP C terminus*“) und in vier Klassen der RING-Finger-Enzyme unterteilt (Jackson et al., 2000). Zu den RING-Finger-E3-Ligasen gehören der „*anaphase-promoting complex*“ (APC), der „*Skp1-cullin-F box protein ligase complex*“ (SCF-Komplex) und der „*von Hippel-Lindau-Elongin B-Elongin C complex*“ (VBC) sowie „*single polypeptide*“ RING-Finger E3-Enzyme (Saurin et al., 1996).

SIAH2 gehört zur Klasse der „*single polypeptide*“ RING-Finger-E3-Enzyme.

Die Proteolyse spezifischer regulatorischer Proteine wie Zykline, Zyklin/Kinase-Inhibitoren, Motorproteine, transkriptionaler Regulatoren und Membranrezeptoren spielt eine wichtige Rolle in einer Vielfalt zellulärer Prozesse wie Zellzyklusprogression, Signaltransduktion und Metabolismuskontrolle (Ciechanover, 1994; Hochstrasser, 1995). Über die Ubiquitinierung der Zykline entscheidet oft ihr Phosphorylierungsstatus (Skowyra et al., 1997).

In eukaryotischen Zellen werden die meisten instabilen Proteine durch die Konjugation von multiplen Ubiquitinmolekülen für den proteolytischen Abbauprozess markiert (Wilkinson et al., 1980; Hershko und Ciechanover, 1992; Hochstrasser, 1996). Nach der Konjugation werden die Substrate entfaltet und zu kleinen Peptiden abgebaut (Hershko et al., 1980; Baumeister et al., 1998). Dies geschieht gewöhnlich im 26 S-Proteasom, einer komplex gebauten ATP-getriebenen Protease mit multiplen katalytischen Zentren (Hough et al., 1986), die in ähnlicher Ausführung in Eubakterien, Archaeobakterien (Maupin-Furlow und Ferry, 1995) und Eukaryoten vorhanden ist (Ciechanover und Schwartz, 1994). Die Bindung

einzelner Ubiquitinmoleküle an Zielproteine geschieht in Eukaryoten unter der Vermittlung von drei Enzymklassen:

- 1) Ubiquitin wird unter ATP-Verbrauch über eine energiereiche Thioesterbindung an ein Cystein des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1) gebunden.
- 2) Im nächsten Schritt erfolgt der Transfer des aktivierten Ubiquitins an ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym („*ubiquitin conjugating enzyme*“ = Ubc oder E2) über eine zweite energiereiche Thioesterbindung. Diese Enzymklasse katalysiert den Ubiquitintransfer auf das Substratprotein.
- 3) In vielen Fällen wird die Aktivität einer Ubiquitinligase oder eines Ubiquitinligase-Komplexes (E3; s.o.) für die Substratubiquitinierung benötigt. Über die jeweilige Zusammenstellung der E2- und E3-Komponenten entscheidet oft ihr Phosphorylierungsstatus (Maniatis, 1999). Die Halbwertszeit eines Proteins ist im hohen Maße von seinem N-terminalen Aminosäurerest abhängig: stark destabilisierend wirkende Arginin- und Leucinreste begünstigen eine schnelle Ubiquitinierung, während Methionin- und Prolinreste stabilisierend wirken. E3-Ubiquitinligasen erkennen N-terminale Aminosäurereste (Tobias et al., 1991) und sind kritisch für eine substratspezifische Ubiquitinierung (Lorick et al., 1999).

5.5.1 Die Familie der SIAH-Proteine

Das *Drosophila*-Homolog, „*seven in absentia*“ (*sina*), spielt eine kritische Rolle in der Determination des Photorezeptors R7 (Carthew und Rubin, 1990). *sina* besteht aus 314 Aminosäuren mit einer N-terminalen cysteinreichen Domäne, der so genannten C₃HC₄- oder RING-Zink-Finger-Domäne (Saurin et al., 1996). Drei hochkonservierte *sina*-Homologe wurden in *M. musculus* identifiziert: Siah-1A, Siah-1B und Siah-2 (Della et al., 1993). Die humanen Homologe SIAH1 und SIAH2 zeigen eine sehr hohe Aminosäuresequenzähnlichkeit von 96 bis 99 % zu den Maus-Proteinen und sind untereinander zu 77 % identisch (Nemani et al., 1996). Die 270 C-terminalen Aminosäuren von *sina* und den humanen SIAH-Homologen sind zu 85 % identisch (Della et al., 1993; Hu et al., 1997). Aus einigen Publikationen geht hervor, daß *sina* und die SIAH-Proteine in die Ubiquitinierung von einigen spezifischen Proteinsubstraten involviert sind. Die ubiquitinierende Funktion wird in SIAH1 durch die N-terminale RING-Domäne vermittelt, während die C-terminalen Sequenzen die Substratbindung regulieren (Hu und Fearon, 1999). Die humanen SIAH-Proteine binden an Ubiquitin-konjugierende Enzyme (Hu et al., 1997).

Die p53-induzierbaren SIAH-Proteine wirken als negative Regulatoren der Zellproliferation. In SIAH1-transfizierten GM701-Fibroblasten kommt es zur Wachstumshemmung, wobei die Zellen nicht apoptotisch werden (Matsuzawa et al., 1998). In humanen Zellen werden die Proteine „*deleted in colorectal cancer*“ (DCC), „*nuclear corepressor*“ (NCoR) und „*BOB.1/OBF.1 coactivator*“ unter der Vermittlung der SIAH-Proteine ubiquitiniert und proteasomal degradiert (Boehm et al., 2001).

5.5.2 Ubiquitinierung von repp86 durch SIAH2

Im Hefesystem verursachte überexprimiertes vollständiges repp86 zunächst eine Wachstumshemmung (4.5.2). Da die Hefen den N-terminalen Bereich von repp86 (repp86₍₁₋₂₉₃₊₄₎) exprimierten und keine nachteiligen Effekte auf das Zellwachstum beobachtet wurden, liegt die Vermutung nahe, daß der C-terminale *coiled coil*-enthaltende repp86-Bereich für die Wachstumshemmung entscheidend ist. Dieses Ergebnis korreliert in gewisser Weise mit den Effekten, die sich in repp86-überexprimierenden HEK293- und COS7-Zellen manifestierten (4.3; diskutiert in 5.3). Aufgrund der Ergebnisse wurde eine direkte Interaktion zwischen repp86 und den mitotischen Mikrotubuli in humanen Zellen postuliert, die letztlich mit dem korrekten Ablauf der Kernteilung interferierte. Über die Frage, ob die Wachstumshemmung in Hefen auf einer repp86-abhängigen Störung des Knospungsprozesses beruht, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden.

Die repp86-abhängige Wachstumshemmung in *S. cerevisiae* wurde jedenfalls durch die Koexpression des C-terminalen SIAH2 (4.5.4) bzw. des vollständigen SIAH2 (4.5.5) aufgehoben. In einigen Publikationen wurden Interaktionen zwischen SIAH1 oder SIAH2 mit anderen Substraten untersucht, wobei die C-terminale SIAH-Domäne stets für die Interaktion mit dem Substratprotein verantwortlich war (Hu et al., 1997; Boehm et al., 2001). Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse der Hefeexperimente korrelierten mit den veröffentlichten Beobachtungen: in die Interaktion waren die N-terminale repp86-Domäne (repp86 = Substrat) und die C-terminale-SIAH2-Domäne involviert. Die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation (4.6) bestätigten ebenfalls die Beteiligung der genannten Domänen an der Interaktion. Die Kopräzipitation des N-terminalen SIAH2-Bereiches mit repp86 muß noch in weiteren Experimenten verifiziert werden, um aufzuklären, ob N-terminale SIAH2-Aminosäuren im Falle von repp86 an der Substraterkennung ebenfalls beteiligt sein könnten.

Es ist unbekannt, ob repp86 unter der Vermittlung von SIAH2 in Hefezellen ubiquitiniert und zum Teil degradiert wurde. Obwohl noch kein repp86-Homolog in der Hefezelle identifiziert wurde, scheint eine Ubiquitinierung von repp86 durch SIAH2 im Hefesystem nicht ausgeschlossen. Die Hefezelle verfügt über Proteasomkomplexe, die sich strukturell und funktionell von denen der höheren Eukaryoten kaum unterscheiden. In Hefen wurden neben Ubiquitin auch weitere Komponenten der ubiquitinabhängigen Proteolyse, d.h. Ubiquitin-aktivierende und Ubiquitin-konjugierende Enzyme, identifiziert, die große Homologien mit Proteinen der höheren Eukaryoten haben. In Publikationen gibt es Hinweise darauf, daß einige Komponenten des Ubiquitinierungssystems unter verschiedenen Spezies sogar ausgetauscht werden können (Hu et al., 1997b):

i) Innerhalb der Eukaryoten ist Ubiquitin hochkonserviert: das Hefe-Ubiquitin unterscheidet sich von dem des Menschen nur in 3 von insgesamt 76 Aminosäuren. Der hohe Konservierungsgrad macht deutlich, daß nahezu alle Ubiquitinaminosäuren für die Übertragung auf Substratproteine essentiell sind. Das Hefe-Ubiquitin und das humane Ubiquitin sind in ihrer Funktion austauschbar. Hu et al. (1997b) fanden mittels des *Yeast Two-Hybrid-System*s heraus, daß die humanen SIAH1 und SIAH2 mit dem Protein „*deleted in colorectal cancer*“ (DCC) interagieren. DCC ist ein Transmembranprotein von 1447 Aminosäuren mit einer cytoplasmatischen Domäne von 325 Aminosäuren (Hedrick et al., 1994). Die cytoplasmatische Domäne von DCC, das Hefe-Ubiquitin und humanes SIAH2 wurden in COS1-Zellen koexprimiert. Das aus Zellysaten immunpräzipitierte Hefe-Ubiquitin war an das humane DCC kovalent gebunden (Hu et al., 1997b). Das Experiment demonstrierte, daß das Hefe-Ubiquitin anstelle des humanen Ubiquitins im proteolytischen System eines höheren Eukaryoten eingesetzt werden kann. Zudem wurde deutlich, daß humanes SIAH2 das Hefe-Ubiquitin zur Ubiquitinierung eines humanen Substrates verwenden kann. Unter diesem Aspekt wäre eine SIAH2-vermittelte Übertragung des Hefe-Ubiquitins auf repp86 vorstellbar.

ii) Im *Yeast Two Hybrid-System* interagiert SIAH2 mit dem humanen Ubiquitin-konjugierenden Enzym 9 (Ubc9), von welchem es ein Homolog in der Hefe gibt (Hu et al., 1997b).

Die Substratbindedomäne von SIAH2 ist im C-terminalen Proteinbereich (140 C-terminale Aminosäuren) anzusiedeln, während die RING-Finger-Domäne (Aminosäuren 78 bis 115 in SIAH2) die Übertragung der Ubiquitine katalysiert (Hu et al., 1997b; Boehm et al., 2001). In dieser Arbeit interagierte der C-terminale SIAH2-Bereich (Aminosäuren 99-324) mit den N-

terminalen repp86-Aminosäuren 1 bis 67 und sorgte für die Aufhebung der Wachstumshemmung in *S. cerevisiae*, obwohl die RING-Finger-Domäne im rekombinanten SIAH2-Protein (AS 99-324) um 21 N-terminale Aminosäuren reduziert war. Es ist fraglich, ob eine Ubiquitinierung mit dieser unvollständigen RING-Finger-Domäne durchgeführt werden kann. Wenn keine SIAH2-vermittelte Ubiquitinierung von repp86 in der Hefe stattfindet, könnte allein die Komplexbildung zwischen SIAH2₍₉₉₋₃₂₄₎ und repp86 für die Aufhebung der repp86-abhängigen Wachstumshemmung gesorgt haben. Hu et al. (1997b) zeigten beispielsweise, daß humane SIAH2-Mutanten ohne aminoternale Sequenzen (ohne RING-Finger-Domäne) trotzdem stabile Komplexe mit dem SIAH-Substrat DCC bilden, ohne die Degradation des Substrates auszulösen (Hu et al., 1997b).

Die ubiquitinabhängige Proteolyse von repp86 unter der Vermittlung von SIAH2 in humanen Zellen könnte in weiteren Experimenten durch eine gezielte Inhibition der Proteasomfunktion in intakten Zellen mittels MG132, eines sehr wirksamen Proteasominhibitors, verifiziert werden. Eine direkte repp86/SIAH2-Interaktion müßte durch *in vitro*-Ubiquitinierungsassays mit gereinigten Komponenten des Ubiquitinierungssystems nachgewiesen werden.

5.6 Regulation des repp86-Gens

5.6.1 Transkriptionsstart von repp86

Die grobe Lokalisierung des Genpromotors in einer bekannten Gensequenz kann durch die Bestimmung der Transkriptionsinitiationsstelle vorgenommen werden. Im repp86-Gen war die Position des Transkriptionsstartes nicht bekannt. In erster Linie wurden die in der Genbank-Datenbank eingetragenen mRNA-Sequenzen von repp86 mit dem genomischen BAC-Klon RPCI11-243J16 abgeglichen (4.7). Die längste eingetragene Sequenz war AF098158, doch es konnte nicht von ihrer Vollständigkeit ausgegangen werden. Der Transkriptionsstart sollte demnach mittels CapSite-PCR™ bestimmt werden (4.7.2; 4.7.3). Die Sequenz der AF098158-mRNA konnte um 48 bzw. 78 Nukleotide in 5'-Richtung ergänzt werden. Mit der Auffindung des EST-Klons BE888044, der eine längere mRNA-Sequenz in 5'-Richtung enthielt, wurden auch diese Ergebnisse in Frage gestellt. Durch Kontroll-PCR-Experimente mit repp86-spezifischen Oligonukleotiden wurde der tatsächliche repp86-Transkriptionsstart schätzungsweise bis auf 19 Nukleotide angenähert. Die Ergebnisse wurden wegen ihrer Komplexität bereits im Ergebniskapitel 4.7.4 erläutert. Unter

Berücksichtigung des neuen angenäherten repp86-Transkriptionsstarts betrug die Länge des annähernd vollständigen repp86-Transkriptes 3368 Ribonukleotide (s. 9.1.2). Die 5'-„untranslatierte“ Region umschließt 688 Ribonukleotide, in denen ein „*upstream open reading frame*“ (uORF) kodiert wird. Mit der Bestimmung des ungefähren repp86-Transkriptionsstartes konnte die wahrscheinliche repp86-Promotorsequenz eingegrenzt werden, so daß anschließend einleitende Experimente zur Promotoraktivität durchgeführt werden konnten (diskutiert in 5.6.4).

5.6.2 CpG-Inseln im repp86-Promotor

Im Bereich -1002 und -189 des repp86-Promotors wurden zwei potentielle CpG-Inseln identifiziert (4.8). Die Transkription des repp86-Gens *in vivo* könnte daher durch DNA-Methylierung kontrolliert werden.

Bei den CpG-Inseln handelt es sich um Abschnitte von einigen Hundert Basenpaaren, in denen Cytidin/Guanosin-Dinukleotide (CpG) zehnmal häufiger als in anderen Genomabschnitten vorkommen. In diesen Abschnitten können Cytidinreste im Vertebratengenom durch DNA-Methyltransferasen noch während der DNA-Replikation methyliert werden. CpG-Methylierungen ergeben Muster, die gen- und gewebsspezifisch sind. Gene können durch die DNA-Methylierung inaktiviert werden (Razin und Riggs, 1980; Razin und Szyf, 1984). Eine eindeutige Korrelation zwischen hormoninduzierter DNA-Demethylierung und darauffolgender Genaktivierung wurde am Beispiel des Vitellogenins im Huhn nachgewiesen (Saluz et al., 1986). Es wurde postuliert, daß methylierte Erkennungsstellen für Transkriptionsfaktoren von diesen mit einer geringeren Effektivität oder gar nicht gebunden werden, so daß eine Hemmung der Expression betroffener Gene erreicht wird (Comb und Goodman, 1990; Prendergast und Ziff, 1991). Bei einigen Transkriptionsfaktoren hingegen, z.B. Sp1, ist die DNA-Methylierung für die DNA-Bindung irrelevant (Harrington et al., 1988). Daraufhin wurde die Existenz von Proteinen postuliert, die methylierte DNA spezifisch erkennen, daran binden, und so die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern. Die Theorie wurde bestätigt, als eine ganze Familie von Proteinen mit einem Motiv zur Erkennung methylierter DNA identifiziert wurde (Huang et al., 1984; Nan et al., 1997; Cross et al., 1997).

Im Angesicht der strikten zellzyklusgebundenen repp86-Expression wäre eine zyklische Demethylierung des repp86-Promotorbereiches Voraussetzung für die Proteinexpression.

Das Problem der reversiblen DNA-Methylierung wurde mit der Isolation einer echten Demethylaseaktivität aus der humanen Zelllinie A549 („*non small cell lung carcinoma*“) gelöst (Ramchandani et al., 1999). Das 5'-Methylcytosin wird spezifisch an den CpG-Dinukleotiden demethyliert. Das Enzym ist prozessiv (Cervoni et al., 1999). Entgegen der früheren Überzeugung wurde gezeigt, daß die DNA-Methylierung wie alle anderen biologischen Prozesse (Phosphorylierung, Acetylierung, Glykosylierung) reversibel ist, so daß Gene, die durch Methylierung inaktiviert wurden, gezielt wieder reaktiviert werden können.

Die genaktivierende DNA-Demethylierung könnte also einen wichtigen Aspekt im Hinblick auf die Regulation der repp86-Expression darstellen. Aus den PCR-Experimenten (4.2) ging hervor, daß die Regulation der Expression von repp86 auf der Transkriptionsebene abläuft. Einige der Promotorkonstrukte, die in den Experimenten zur Bestimmung des essentiellen Promotorbereiches (4.7.3) verwendet wurden, enthielten CpG-Inseln. Die DNA in diesem Bereich war nicht methyliert. Die Frage nach dem Methylierungsstatus des repp86-Gens *in vivo* könnte in *Southern blot*-Experimenten mit genomischer DNA aus repp86-positiven und repp86-negativen Zellen geklärt werden. Manche Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden Stellen in der DNA, die CpG-Dinukleotide enthalten. Von einigen Endonukleasen (*Hpa* II, *Not* I, *Xho* I) ist bekannt, daß die CpG-Methylierung innerhalb der Erkennungs- bzw. Schnittstelle die Restriktion blockiert. Ein Restriktionsexperiment mit kombinierten Endonukleasen ergäbe also in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus unterschiedliche DNA-Muster, die im *Southern blot* mittels genspezifischer DNA-Sonden detektiert werden können (Kelleher und Raleigh, 1991; Kladde und Simpson, 1996).

DNA-Methylierungen können außerdem mittels der Bisulfit-Konversion der DNA nachgewiesen werden. Alle nicht methylierten Cytidine werden in Thymin konvertiert, während methyliertes Cytidin unverändert bleibt. Die konvertierte DNA wird sequenziert und mit der nicht konvertierten DNA-Sequenz verglichen (Santourlidis et al., 2002).

5.6.3 Die Bedeutung der „*upstream open reading frames*“ (uORFs) für die Regulation der Translation

Untersuchungen zum repp86-Transkriptionsstart führten zur Identifizierung eines stromaufwärts gelegenen AUG-Codons in der 5'-Transkriptregion von repp86. Der nachfolgende Abschnitt kodiert für weitere 13 Aminosäuren und wird mit dem Stopcodon UGA beendet (Sequenz unter 9.1.2; 9.1.3). Der uORF liegt im gleichen Leserahmen wie das

„Hauptprodukt“ repp86. Unabhängig von der Regulation der repp86-Expression auf der Transkriptionsebene (4.2) könnte das Vorhandensein eines uORFs auf eine zusätzliche Regulation auf der Translationsebene hindeuten. Ob der uORF im repp86-Gen in humanen Zellen allerdings translatiert wird, wurde noch nicht nachgewiesen.

Die „*upstream AUG codons*“ (uAUGs) kommen in weniger als 10 % der eukaryotischen mRNAs vor (Kozak, 1987). In der Gruppe der Gene mit uAUGs befinden sich auffallend viele Onkogene und Proteine, die in die Kontrolle der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung involviert sind (Kozak, 1991; Morris, 1995).

Ob ein uORF translatiert wird, hängt davon ab, ob sein uAUG-Codon von der ribosomalen 40S-Untereinheit und den assoziierten Initiationsfaktoren erkannt wird. Dabei spielen solche Parameter wie die Nukleotidumgebung des uAUGs, die Entfernung des uAUGs vom 5'-Ende der mRNA und die Struktur der mRNA eine wichtige Rolle.

Die Nukleotidumgebung des repp86-uAUGs lautet AUACUGAAUGA⁶. Die Sequenz weicht von der Vertebraten-Konsensussequenz GCC^A/_GCCAUGG für die Umgebung der Translationsinitiation bei Vertebraten deutlich ab (Kozak, 1981; Kozak, 1984). Die zwei am meisten konservierten Nukleotide in der Konsensussequenz sind das A in Position -3 und das G in Position +4, ausgehend vom A des AUG-Initiationscodons. Mutationsanalysen von Kozak zeigten, daß diese zwei Positionen den stärksten Einfluß auf die Initiationseffizienz ausüben. Deshalb kann ein potentielles Initiationscodon bereits durch den Vergleich der beiden hochkonservierten Positionen als „schwach“ oder „stark“ klassifiziert werden. Unter diesem Aspekt könnte der repp86-uAUG als „schwaches“ Translationsstartcodon klassifiziert werden, das nicht sehr effizient oder gar nicht erkannt wird, weil die hochkonservierten A und G durch andere Nukleotide ersetzt sind. Die Nukleotidumgebung des repp86-AUGs lautet AGACAAUGU. In dieser Sequenz stimmt das hochkonservierte A an Position -3 und das C an Position -2 mit der Vertebraten-Konsensussequenz überein. Das hochkonservierte G an Position +4 ist in der repp86-Sequenz durch ein U ersetzt. Die Nukleotidsequenz der AUG-Umgebung von repp86 zeigt also insgesamt eine bessere Übereinstimmung mit der Konsensussequenz als die des uAUG.

Wird ein uORF translatiert, dann ergeben sich für das Ribosom folgende Möglichkeiten (Morris und Geballe, 2000):

⁶ AUACUGAAUGA: A = Adenin, U = Uracil, C = Cytosin, G = Guanin. Translationsstartcodon: fett gedruckt.

i) Das 80S-Ribosom dissoziiert von der mRNA und stromabwärts gelegene AUGs werden nicht translatiert.

ii) Nach der uORF-Translation reinitiiert das 40S-Ribosom am AUG des „Hauptcistrons“, so daß die Genexpression nicht negativ beeinflusst wird.

iii) Das 80S-Ribosom „stockt“ während der Elongation oder der Termination auf der uORF-mRNA und errichtet eine translationale Blockade. Für das „Stocken“ des Ribosoms sind in den bekannten Fällen die uORF-Sequenzeigenschaften verantwortlich. In diesem Fall wird das „Hauptcistron“ gar nicht oder ineffizient translatiert.

Diese vielen Alternativen zeigen, daß uORFs eine Möglichkeit zur Modulation der Translationseffizienz stromabwärts gelegener „Hauptcistrone“ darstellen.

Die intercistronische Distanz zwischen dem repp86-uORF und dem repp86-ORF beträgt 462 Nukleotide. Es ist bekannt, daß die Reinitiationseffizienz eines Ribosoms nach der Translation eines uORFs maßgeblich durch die Eigenschaften der mRNA beeinflusst wird.

Wird zum Beispiel die vorhandene intercistronische Distanz um 50 bis 80 Nukleotide verlängert, so können die inhibitorischen Effekte eines uORFs auf die Translation des „Hauptcistrons“ in einigen Fällen erheblich reduziert oder sogar eliminiert werden (Cao und Geballe, 1995). Expressionsexperimente mit verlängerten oder verkürzten intercistronischen Sequenzen könnten die oben genannten Möglichkeiten bezüglich repp86 klären.

uORFs können außerdem die Genexpression beeinflussen, indem sie durch ihr Vorhandensein die Stabilität der mRNA verändern. Einige der uORF-enthaltenden mRNAs lösen den so genannten „*nonsense-mediated decay pathway*“ aus, einen Mechanismus, der zum gezielten Abbau von Transkripten mit 5'-proximalen *nonsense*-Mutationen dient (Ruiz-Echevarria und Peltz, 2000).

Es ist noch nicht geklärt, ob der Mechanismus der modulierenden uORF-Translation im Zusammenhang mit der Expression von repp86 eine Rolle spielt. Zuerst muß untersucht werden, ob der uORF in humanen Zellen überhaupt translatiert wird. Eine Klonierung der Promotor- und uORF-Sequenz vor ein bekanntes Epitop und Expression in humanen Zellen würde Antworten auf diese Frage liefern. Wird der uORF translatiert, sollte als nächstes die Frage geklärt werden, ob die Translation des uORFs negative oder positive Auswirkungen auf die Translationseffizienz des repp86-Cistrons hat. Zur Klärung dieser Frage könnte die gesamte repp86-cDNA mit einer Punktmutation im uAUG in humane Zellen transfiziert

werden, um festzustellen, ob sich die Translationseffizienz von repp86 im Vergleich zur Transfektion mit nicht-mutierter uAUG-DNA verändert.

5.6.4 Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in der Umgebung der Transkriptionsinitiationsstelle von repp86

Im Bereich des Promotorabschnittes +22/+92 (4.7.3), der sich als essentiell für die Expression des Reportergens *Photinus*-Luciferase erwies, wurden mit Hilfe der *software* MatInspector V2.2 potentielle Erkennungsstellen für die Transkriptionsfaktoren c-ETS-1 (+65) und NRF2 (+65) identifiziert (Abb. 25). Eine verstärkende Funktion in der Promotoraktivität könnten die Transkriptionsfaktoren deltaEF1 (-81) und LYF1 (-74) ausüben.

Das Protein c-ETS-1 („*chicken E26 transformation specific*“, P14921 in *SwissProt*), auch p54 genannt, ist ein humanes Protoonkogen. Isoformen des Proteins können durch alternatives Spleißen (c-ETS-1 und c-ETS-2) entstehen. Der Transkriptionsfaktor kann außerdem differentiell phosphoryliert werden. Die Expression von c-ETS-1 ist in ruhenden humanen T-Lymphozyten hochreguliert und nimmt mit der T-Zellaktivierung sehr stark ab. Die Expression von c-ETS-2 in ruhenden T-Lymphozyten ist hingegen nicht nachweisbar, während sie nach der T-Zellaktivierung induziert wird. Aufgrund der Ergebnisse wurde postuliert, daß c-ETS-2 mit der Zellproliferation assoziiert, während c-ETS-1 mit der Ruhephase der Zellen verbunden ist. Das Protein ist für Transformationen von Erythroblasten und Fibroblasten verantwortlich. Die Korrelation von Interferon und c-ETS-1 könnte in die Pathogenese monozytärer Leukämien involviert sein (Nunn et al., 1983; Reddy und Rao, 1988; Watson et al., 1988; Werner et al., 1995).

NRF2, „*nuclear respiratory factor 2*“ (M00108 in *TransFac*), wurde bisher in *Cercopithecus aethiops* und *Rattus norvegicus* identifiziert und gehört aufgrund der Homologie der Bindungssequenz zu der ETS-Klasse der Transkriptionsfaktoren (Virbasius et al., 1993). Der Faktor ist notwendig bei der Aktivierung des Adenovirus-E4-Gens.

DeltaEF1 („*delta-cristallin/E2-box factor 1*“) ist ein transkriptionaler Repressor in *G. gallus*, der die E2-Box-vermittelte Genaktivierung hemmt (Sekido et al., 1994). Sein humanes Homolog wird „*Atp1a1 regulatory element binding factor 6*“ (AREB6, P37275 in *SwissProt*) genannt. Das Protein gehört zu den Zinkfinger- und Homöodomänenfaktoren. AREB6 wird in Herz- und Skelettmuskulatur sowie in T-Lymphozyten exprimiert (Watanabe et al., 1993). Es fehlt in Leber, Milz und Bauchspeicheldrüse. AREB6 inhibiert die Expression des

Interleukin 2-Gens und die Aktivität des Genenhancers der schweren Immunglobulinkette (Williams et al., 1991). AREB6 kann in verschiedenen Konformationen an DNA binden und dadurch Genaktivierung oder Genrepression bewirken. Die Repressorwirkung wird außerdem durch Interaktion der AREB6-Repressordomäne mit dem „*negative cofactor 2*“ (NC2) etabliert (Ikeda und Kawakami, 1995; Ikeda et al., 1998).

LYF1 („*lymphoid transcription factor 1*“, Q13422 in Swissprot), auch IKAROS oder IK1 genannt, gehört zur Familie der C2H2-Zinkfingerproteine (Nietfeld und Meyerhans, 1996). Das Protein ist im Nukleus lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle in der Spezifizierung und Reifung von T-Lymphozyten. LYF-1 wird in Thymus, Milz, peripheren Blutleukozyten und Lymphknoten exprimiert. Eine schwächere Expression von LYF-1 wird im Knochenmark und im Dünndarm beobachtet (Molnar et al., 1996). Das Protein interagiert mit einem kritischen Element im Promotor der terminalen Desoxynukleotidyltransferase sowie mit Promotoren anderer Gene, die während der frühen Entwicklungsstadien von B- und T-Lymphozyten exprimiert werden. Es wurde gezeigt, daß LYF-1 an den Enhancer im Gen für CD3^{delta} bindet und das Gen hierdurch aktiviert. Außerdem wurde nachgewiesen, daß auch das Gen für CD8-alpha durch die Bindung von LYF-1 an den im letzten Intron liegenden Enhancer (*delta A-Element*) aktiviert wird (Hambor et al., 1993). Der Abgleich in *Blast Two Sequences* zwischen der genomischen repp86-Sequenz im BAC RPCI11-243J16 und der CD8-alpha-Enhancer-Konsensussequenz ergab, daß die 29 Nukleotide lange Enhancersequenz gleich zweimal im repp86-Intron 2 vorkommt und keine Abweichung in der Nukleotidabfolge enthält. Zusätzlich wurde in Position -2596/-2569 der um ein 5'-terminales Nukleotid verkürzte Enhancerkonsensus identifiziert. Bei der in der Nähe des Transkriptionsstartes detektierten Enhancerkonsensussequenz (Position -74/-45) lag der Wert für die Matrixähnlichkeit bei 0,963 (max. Wert = 1).

Die Rolle der hier aufgeführten in Frage kommenden Transkriptionsfaktoren in der Regulation der repp86-Expression muß noch untersucht werden. Hierbei könnten sich Methoden wie „*DNase I protection assay*“ und „*Band shift assay*“ als nützlich erweisen.

6 Zusammenfassungen

6.1 Zusammenfassung

Mit Hilfe des im Institut für Hämatopathologie in Kiel erstellten monoklonalen Antikörpers Ki-S2 (IgG1) wurde das Protein „*restrictedly expressed proliferation-associated protein 86 kDa*“ (repp86) entdeckt. Die Expression von repp86 wird zellzyklusspezifisch reguliert. Das Protein ist ab dem Übergang der G1- in die S-Phase des Zellzyklus bis zum Ende der Zytokinese nachweisbar. In der S und G2-Phase ist repp86 diffus im Zellkern verteilt. In der Mitose wird repp86 stark phosphoryliert und kolokalisiert den Spindelpolen und dem Spindelapparat. In der repp86-Primärsequenz sind mehr als 40 potentielle Phosphorylierungsstellen vorhanden, die bekannten Konsensussequenzen für verschiedene Proteinkinasen u.a. *cdc2*-Kinase und MAP-Kinase entsprechen. repp86 ist ein Substrat der Serin/Threonin-Proteinkinase Aurora-A.

Die Ergebnisse der hier präsentierten Arbeit geben neue Informationen hinsichtlich der Regulation der repp86-Expression, der Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und zum essentiellen Bereich des repp86-Promotors.

In ruhenden, nicht proliferierenden Zellen, wie Granulozyten oder nicht-aktivierten Lymphozyten, wird keine repp86-mRNA transkribiert. Die Regulation der repp86-Expression in ruhenden Zellen erfolgt also auf der Transkriptionsebene. Überexpression von repp86 in der humanen Zelllinie HEK293 führt zur Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Die Zellen werden polyploid und sterben ab. repp86-überexprimierende COS7-Zellen weisen deformierte bis multiple Kernstrukturen auf. Die Beobachtungen deuten auf eine repp86-abhängige Störung bei der Chromosomenverteilung hin. repp86 ist ein mikrotubuliassoziiertes Protein (MAP). Es interagiert mit *in vitro* polymerisierten Mikrotubuli, wobei die postulierte C-terminale *coiled coil*-Domäne von repp86 für die Interaktion verantwortlich sein könnte. In *S. cerevisiae* wirkt überexprimiertes repp86 in voller Länge wachstumshemmend. Für diesen Effekt ist mit hoher Wahrscheinlichkeit der C-terminale repp86-Bereich (AS 294-747), der die *coiled coil*-Domäne enthält, verantwortlich. Die repp86-abhängige Wachstumshemmung wird durch die Koexpression der Ubiquitinligase SIAH2 aufgehoben bzw. bedeutend abgeschwächt. Hierbei interagiert der N-terminale Bereich von repp86 (AS 1 bis 67) mit dem C-terminalen SIAH2 Bereich (AS 99 bis 324).

Beide Proteine wurden aus transfizierten HEK293-Zellen koimmunpräzipitiert. Diese mit zwei unabhängigen Methoden dargestellte Interaktion deutet auf eine spezifische Ubiquitinierung von repp86 durch SIAH2 und den Abbau im Proteasom *in vivo* hin, was den schnellen Abbau von repp86 nach dem Abschluß der Zytokinese erklären würde.

In PCR-Experimenten wurde die Umgebung des Transkriptionsstartes von repp86 näher charakterisiert. Die repp86-mRNA hat die Länge von 3368 Ribonukleotiden. Im Promotorbereich von repp86 befinden sich zwei potentielle CpG-Inseln, die für die repp86-Regulation auf der transkriptionellen Ebene verantwortlich sein könnten. Zwischen dem 5'-Ende der repp86-mRNA und dem repp86-Translationsstart liegen 687 Ribonukleotide. In dieser Sequenz wurde ein „*upstream open reading frame*“ (uORF) identifiziert, der für eine Modulation der repp86-Translation verantwortlich sein könnte.

Der repp86-Promotorbereich +22/+92 erwies sich als essentiell für die Expression des Reportergens *Photinus*-Luciferase. In diesem DNA-Abschnitt wurden potentielle Erkennungsstellen für die Transkriptionsfaktoren c-ETS-1 und NRF2 identifiziert.

6.2 Summary

The “restrictedly expressed proliferation-associated protein 86 kDa” (repp86) was identified in Western blots with Ki-S2, a monoclonal IgG1 antibody raised by immunizing female BALB/C mice with nuclear L428 lysates (Institute of Hematopathology, University of Kiel). Amino acid sequence comparison revealed at that time no sequence homologies with already described proteins. The expression of repp86 is specifically regulated in a cell cycle-dependent manner. repp86 is exclusively expressed in proliferating cells from the transition G1/S until the end of cytokinesis. During mitosis, repp86 becomes highly phosphorylated and associates with the spindle poles and the spindle apparatus. In S and G2, repp86 is diffusely distributed throughout the cell nucleus. More than 40 potential phosphorylation sites are included in its primary sequence, which resemble well known consensus sequences for different protein kinases, e.g. cdc2 kinase and MAP kinase. repp86 is a substrate of the serine/threonine protein kinase Aurora-A.

The results of the presented work yielded new information concerning the regulation of the expression of repp86, protein interactions, and the essential promoter part of repp86.

In quiescent granulocytes or non-activated lymphocytes, the repp86-mRNA is not transcribed. Therefore, the regulation of repp86-expression in quiescent cells occurs at the transcriptional

level. repp86-overexpressing human HEK293 cells undergo cell cycle arrest in G2/M-phase and become polyploid. repp86-transfected COS7 cells become multinucleated and contain malformed polymorphous nuclei. These observations point to a repp86-dependent disturbance of chromosome segregation. repp86 interacts with *in vitro* polymerized microtubules. Thus, repp86 is likely to be a microtubule associated protein (MAP). The interaction could be mediated by the postulated C-terminal coiled coil domain of repp86. Full length repp86-expression in *S. cerevisiae* causes growth arrest. Yeast Two-Hybrid experiments additionally revealed that the C-terminal repp86 area containing the coiled coil domain (aa 294-747) is very likely to cause this growth inhibition. The repp86-dependent growth arrest is neutralized or mainly diminished as a result of SIAH2-coexpression. The C-terminal part of the ubiquitin ligase SIAH2 (aa 99-324) interacts with the N-Terminus of repp86 (aa 1-67). Both proteins coimmunoprecipitate from lysates of transfected HEK293 cells. This interaction, found in two independent methods, points to a specific repp86-ubiquitination by SIAH2, which probably targets repp86 for proteasomal degradation. Proteasomal targeting would explain the rapid degradation of repp86 after cytokinesis.

In PCR experiments the transcription initiation site of repp86 was closely characterized. The repp86-transcript has a length of 3368 ribonucleotides. The repp86-promoter includes two potential CpG islands, that could regulate repp86-expression at the transcriptional level. The 5'-transcript leader consists of 687 ribonucleotides. In this sequence an "upstream open reading frame" (uORF) was identified. The uORF codes for 14 amino acids and matches the repp86-reading frame. If translated, the uORF could modulate the translation of repp86-mRNA.

The repp86 promoter area +22/+92 was the smallest promoter fragment essential for the expression of the reporter gene *Photinus*-luciferase. The promoter region includes potential recognition sites for the transcription factors c-ETS-1, and NRF2.

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| A | Adenin |
| aa | engl.: <i>amino acid</i> , Aminosäure |
| Abb. | Abbildung |
| Ade | Adeninhemisulfat |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| anti-HA | polyklonaler Kaninchen-anti-Hämagglutinin-Antikörper |
| APAAP | Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase |
| APC | engl.: <i>anaphase promoting complex</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure(n) |
| AREB6 | engl.: <i>Atp1a1 regulatory element binding factor 6</i> |
| 3-AT | 3-Amino-1,2,4-triazol |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAC | engl.: <i>bacterial artificial chromosome</i> ; künstliches Bakterienchromosom |
| bp | engl.: <i>base pairs</i> ; Basenpaare |
| BSA | engl.: <i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| C | Cytosin |
| C20orf1 | engl.: <i>chromosome 20 open reading fragment 1</i> |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat (3',5'-cyclo-AMP) |
| CDK | engl.: <i>cyclin dependent kinase</i> ; zyklinabhängige Proteinkinase |
| cDNA | engl.: <i>copy deoxyribonucleic acid</i> |
| c-ETS | engl.: <i>chicken E26 transformation specific</i> |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat (3',5'-cyclo-GMP) |
| CIP | engl.: <i>calf intestine phosphatase</i> |
| COS7 | engl.: <i>African green monkey kidney cell line</i> |
| CPAR | engl.: <i>Coomassie® protein assay reagent</i> |
| CpG | Cytidin/Guanosin-Dinukleotid |
| Cy3 TM | Eingetragenes Warenzeichen der Fa. Amersham Pharmacia Biotech |
| DCC | engl.: <i>deleted in colorectal cancer</i> |
| deltaEF1 | engl.: <i>delta-cristallin/E2-box factor 1</i> |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DIL-2 | engl.: <i>differentially expressed in cancerous and noncancerous lung cells 2</i> |
| DMEM | engl.: <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> |
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat-Mischung |
| DO | engl.: <i>dropout</i> |
| <i>D. rerio</i> | lat.: <i>Danio rerio</i> , Zebrafisch |
| dsDNA | engl.: <i>double strand deoxyribonucleic acid</i> |
| DSMZ | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH |
| DTT | Dithiothreitol |
| E1 | Ubiquitin-aktivierendes Enzym |
| E2 | Ubiquitin-konjugierendes Enzym |
| E3 | Ubiquitin-Ligase |
| ECL TM | engl.: RPN 2108 ECL TM <i>western blotting analysis system</i> |
| <i>E. coli</i> | lat.: <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | engl.: <i>epidermal growth factor</i> |
| EST | engl.: <i>expressed sequence tags database</i> |
| Fa. | Firma |
| FACS | engl.: <i>fluorescence-activated cell sorting</i> |
| FCS | engl.: <i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |

| | |
|------------------------|---|
| fmol | Femtomol |
| G | Guanin |
| G1-Phase | <i>gap1</i> -Phase des Zellzyklus |
| G2-Phase | <i>gap2</i> -Phase des Zellzyklus |
| g | Gramm |
| g_n | Erdbeschleunigung, $g_n = 9,80665 \text{ ms}^{-2}$ |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| HA | Hämagglutinin epitop |
| HECT | engl.: <i>homologous to E6-AP C terminus domain</i> |
| HEK293 | engl.: <i>human embryonal kidney cell line 293</i> |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure |
| Hklp2 | engl.: <i>human kinesin-like protein 2</i> |
| IPTG | Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid |
| K_d | Dissoziationskonstante |
| KBE | Kolonie-bildende Einheiten |
| kbp | engl.: <i>kilobase pairs</i> ; Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| Ki-S2 | Kiel-Maus IgG-Antikörper 2, repp86-spezifisch |
| l | Liter |
| LAR II | engl.: <i>luciferase assay reagent</i> |
| LB Broth | Luria-Bertani-Medium |
| LYF1 | engl.: <i>lymphoid transcription factor 1</i> |
| M | molar |
| MAPK | engl.: <i>mitogen activated protein kinase</i> ; mitogenaktivierte Proteinkinase |
| MAPs | engl.: <i>microtubuli associated proteins</i> ; mikrotubuliassoziiertes Protein |
| MES | |
| MG | Molekulargewicht |
| min | Minute |
| mM | milimolar |
| <i>M. musculus</i> | lat.: <i>Mus musculus</i> , Maus |
| M-Phase | Mitose-Phase des Zellzyklus |
| MT | Mikrotubulus |
| MTOC | engl.: <i>microtubuli organizing center</i> ; Mikrotubuli-Organisationszentrum |
| MTs | Mikrotubuli |
| mRNA | engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| NC2 | engl.: <i>negative cofactor 2</i> |
| NCoR | engl.: <i>nuclear corepressor</i> |
| NLS | engl.: <i>nuclear localisation signal</i> ; nukleäres Lokalisationssignal |
| nm | Nanometer |
| NP-40 | Ethylphenylpolyethylenglykol |
| NRF2 | engl.: <i>nuclear respiratory factor 2</i> |
| OD | optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | engl.: <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | engl.: <i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion |
| PDGF | engl.: <i>platelet-derived growth factor</i> |
| PEG 3350 | Polyethylenglykol, MG 3350 |
| PEST | Peptiddegradationssignal mit häufigen Aminosäuren Prolin (<u>P</u>), Glutaminsäure (<u>E</u>), Serin (<u>S</u>) und Threonin (<u>T</u>) |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| pmol | picomol |
| <i>Pfu</i> -Polymerase | <i>Pyrococcus furiosus</i> DNA-Polymerase |
| repp86 | engl.: <i>restrictedly expressed proliferation-associated protein</i> 86 kDa |
| RLU | engl.: <i>relative light units</i> ; relative Lichteinheiten |
| RNA | engl.: <i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | engl.: <i>rotations per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institut</i> |

| | |
|------------------------|--|
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | engl.: <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> |
| RZPD | engl.: Resource Center / Primary Database; Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH |
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| S | Sedimentationskoeffizient |
| S. | Seite |
| <i>S. cerevisiae</i> | lat.: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Bäckerhefe |
| SCF | engl.: <i>Skp1-cullin-F box protein ligase complex</i> |
| SD | engl.: <i>minimal synthetic dropout medium</i> |
| SDS | engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat |
| SIAH2 | engl.: <i>seven in absentia Drosophila homolog 2</i> |
| s.o. | siehe oben |
| SOC | Optimalmedium in Bakterienkultur |
| S-Phase | Synthese-Phase des Zellzyklus |
| <i>S. pombe</i> | lat.: <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , Spaltheife |
| sscDNA | engl.: <i>single strand copy DNA</i> |
| s.u. | siehe unten |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| <i>Taq</i> -Polymerase | <i>Thermus aquaticus</i> DNA-Polymerase |
| TBS | engl.: <i>Tris-buffered saline</i> |
| TBST | engl.: <i>Tris-buffered saline Tween-20</i> |
| TE | Tris/EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TGF- β | engl.: <i>transformation growth factor β</i> |
| TPX2 | engl.: <i>targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2</i> |
| Tris | Tris[hydroxymethyl]aminomethan |
| TRIZMA Base | Tris[hydroxymethyl]aminomethan |
| U | engl.: <i>unit</i> , Einheit |
| u.a. | unter anderem |
| Ubc | engl.: <i>ubiquitin conjugating enzyme</i> |
| UV | ultraviolettes Licht |
| V | Volt |
| VBC | engl.: <i>von Hippel-Lindau-Elongin B-Elongin C complex</i> |
| X- α -Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranosid |
| X- β -Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid |
| YPD | vollwertiges Hefemedium |
| YPDA | vollwertiges Hefemedium mit 0,003 % Adeninheemisulfat |
| ZKBS | Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit |
| z.T. | zum Teil |

8 Literaturverzeichnis

- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., and Lipman,D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Andersen,S.S. (1999). Balanced regulation of microtubule dynamics during the cell cycle: a contemporary view. *Bioessays* 21, 53-60.
- Andersen,S.S. (2000). Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends Cell Biol.* 10, 261-267.
- Bairoch,A. and Apweiler,R. (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res.* 28, 45-48.
- Bairoch,A., Bucher,P., and Hofmann,K. (1997). The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res.* 25, 217-221.
- Bartel,P., Chien,C.T., Sternglanz,R., and Fields,S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14, 920-924.
- Bartlett,R. and Nurse,P. (1990). Yeast as a model system for understanding the control of DNA replication in Eukaryotes. *Bioessays* 12, 457-463.
- Baumeister,W., Walz,J., Zuhl,F., and Seemuller,E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.
- Benson,M.A., Newey,S.E., Martin-Rendon,E., Hawkes,R., and Blake,D.J. (2001). Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. *J Biol. Chem.* 276, 24232-24241.
- Berger,B., Wilson,D.B., Wolf,E., Tonchev,T., Milla,M., and Kim,P.S. (1995). Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 8259-8263.
- Berridge,M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325.
- Birnboim,H.C. and Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bischoff,J.R., Anderson,L., Zhu,Y., Mossie,K., Ng,L., Souza,B., Schryver,B., Flanagan,P., Clairvoyant,F., Ginther,C., Chan,C.S., Novotny,M., Slamon,D.J., and Plowman,G.D. (1998). A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 17, 3052-3065.
- Bischoff,J.R. and Plowman,G.D. (1999). The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 9, 454-459.
- Blom,N., Gammeltoft,S., and Brunak,S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol. Biol.* 294, 1351-1362.
- Boehm,J., He,Y., Greiner,A., Staudt,L., and Wirth,T. (2001). Regulation of BOB.1/OBF.1 stability by SIAH. *EMBO J* 20, 4153-4162.
- Boleti,H., Karsenti,E., and Vernos,I. (1996). Xklp2, a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis. *Cell* 84, 49-59.
- Boyum,A. (1968). Isolation of leucocytes from human blood. A two-phase system for removal of red cells with methylcellulose as erythrocyte-aggregating agent. *Scand. J Clin. Lab Invest Suppl* 97, 9-29.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-254.
- Braman, J., Papworth, C., and Greener, A. (1996). Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol. Biol.* *57*, 31-44.
- Brent, R. and Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* *43*, 729-736.
- Brown, D.C. and Gatter, K.C. (1990). Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* *17*, 489-503.
- Cao, J. and Geballe, A.P. (1995). Translational inhibition by a human cytomegalovirus upstream open reading frame despite inefficient utilization of its AUG codon. *J. Virol.* *69*, 1030-1036.
- Carthew, R.W. and Rubin, G.M. (1990). *seven in absentia*, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye. *Cell* *63*, 561-577.
- Cassimeris, L. (1999). Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 134-141.
- Cervoni, N., Bhattacharya, S., and Szyf, M. (1999). DNA demethylase is a processive enzyme. *J Biol. Chem.* *274*, 8363-8366.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* *18*, 5294-5299.
- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* *79*, 13-21.
- Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1994). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J* *8*, 182-191.
- Comb, M. and Goodman, H.M. (1990). CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res.* *18*, 3975-3982.
- Compton, D.A. (2000). Spindle assembly in animal cells. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 95-114.
- Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N., Ghosh, A.K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K.A., Stein, H., and Mason, D.Y. (1984). Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem. Cytochem.* *32*, 219-229.
- Cross, D.C., Munoz, J.P., Hernandez, P., and Maccioni, R.B. (2000). Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J Cell Biochem.* *78*, 305-317.
- Cross, S.H., Meehan, R.R., Nan, X., and Bird, A. (1997). A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat. Genet.* *16*, 256-259.
- De Souza, C.P., Osmani, A.H., Wu, L.P., Spotts, J.L., and Osmani, S.A. (2000). Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell* *102*, 293-302.
- Della, N.G., Senior, P.V., and Bowtell, D.D. (1993). Isolation and characterisation of murine homologues of the *Drosophila* *seven in absentia* gene (*sina*). *Development* *117*, 1333-1343.
- Drexler, H.G., Hane, B., Hu, Z.B., and Uphoff, C.C. (1993). HeLa cross-contamination of a leukemia cell line. *Leukemia* *7*, 2077-2079.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* *274*, 1664-1672.

- Estojak,J., Brent,R., and Golemis,E.A. (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol. Cell Biol.* *15*, 5820-5829.
- Evans,T., Rosenthal,E.T., Youngblom,J., Distel,D., and Hunt,T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* *33*, 389-396.
- Frengen,E., Weichenhan,D., Zhao,B., Osoegawa,K., van Geel,M., and de Jong,P.J. (1999). A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics* *58*, 250-253.
- Furuichi,Y. and Shatkin,A.J. (1989). Characterization of cap structures. *Methods Enzymol.* *180*, 164-176.
- Furuichi,Y., Shatkin,A.J., Stavnezer,E., and Bishop,J.M. (1975). Blocked, methylated 5'-terminal sequence in avian sarcoma virus RNA. *Nature* *257*, 618-620.
- Gard,D.L. and Kirschner,M.W. (1987). A microtubule-associated protein from *Xenopus* eggs that specifically promotes assembly at the plus-end. *J Cell Biol.* *105*, 2203-2215.
- Garrett,S., Auer,K., Compton,D.A., and Kapoor,T.M. (2002). hTPX2 Is Required for Normal Spindle Morphology and Centrosome Integrity during Vertebrate Cell Division. *Curr. Biol.* *12*, 2055-2059.
- Gerdes,J., Lemke,H., Baisch,H., Wacker,H.H., Schwab,U., and Stein,H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* *133*, 1710-1715.
- Gerdes,J., Li,L., Schlueter,C., Duchrow,M., Wohlenberg,C., Gerlach,C., Stahmer,I., Kloth,S., Brandt,E., and Flad,H.D. (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J Pathol.* *138*, 867-873.
- Giet,R. and Prigent,C. (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine- threonine kinases. *J Cell Sci.* *112 (Pt 21)*, 3591-3601.
- Gietz,D., St Jean,A., Woods,R.A., and Schiestl,R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* *20*, 1425.
- Glutzer,M., Murray,A.W., and Kirschner,M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* *349*, 132-138.
- Glover,D.M., Leibowitz,M.H., McLean,D.A., and Parry,H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* *81*, 95-105.
- Graham,F.L. and van der Eb,A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* *52*, 456-467.
- Gruss,O.J., Carazo-Salas,R.E., Schatz,C.A., Guarguaglini,G., Kast,J., Wilm,M., Le Bot,N., Vernos,I., Karsenti,E., and Mattaj,I.W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* *104*, 83-93.
- Gruss,O.J., Wittmann,M., Yokoyama,H., Pepperkok,R., Kufer,T., Sillje,H., Karsenti,E., Mattaj,I.W., and Vernos,I. (2002). Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat. Cell Biol.* *4*, 871-879.
- Guarente,L. (1993). Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 1639-1641.
- Guthrie, C. and Fink, G. R. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology* (Academic Press, San Diego) *194*, 1-932. 1991.
Ref Type: Magazine Article
- Hall,P.A., Richards,M.A., Gregory,W.M., d'Ardenne,A.J., Lister,T.A., and Stansfeld,A.G. (1988). The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol.* *154*, 223-235.

- Hambor, J.E., Mennone, J., Coon, M.E., Hanke, J.H., and Kavathas, P. (1993). Identification and characterization of an Alu-containing, T-cell-specific enhancer located in the last intron of the human CD8 alpha gene. *Mol. Cell Biol.* *13*, 7056-7070.
- Harrington, M.A., Jones, P.A., Imagawa, M., and Karin, M. (1988). Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 2066-2070.
- Hedrick, L., Cho, K.R., Fearon, E.R., Wu, T.C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1994). The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev.* *8*, 1174-1183.
- Heidebrecht, H.-J., Adam-Klages, S., Szczepanowski, M., Pollmann, M., Buck, F., Endl, E., Kruse, M.-L., Rudolph, P., and Parwaresch, R. (2003). repp86, a human protein associated in the progression of mitosis. *Molecular Cancer Research* *1*, 271-279.
- Heidebrecht, H.J., Buck, F., Sprenger, R., Wacker, H.H., and Parwaresch, R. (1997a). p100: Ein bisher unbekanntes proliferationsassoziiertes Kernprotein. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* *81*, 632.
- Heidebrecht, H.J., Buck, F., Haas, K., Wacker, H.H., and Parwaresch, R. (1996). Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif.* *29*, 413-425.
- Heidebrecht, H.J., Buck, F., Steinmann, J., Sprenger, R., Wacker, H.H., and Parwaresch, R. (1997b). p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. *Blood* *90*, 226-233.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* *61*, 761-807.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., and Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *77*, 1783-1786.
- Heslot, H. Gaillardin C. *Molecular biology and genetic engineering of yeasts*. CRC Press, Inc. 1992.
Ref Type: Magazine Article
- Hirama, T. and Koeffler, H.P. (1995). Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* *86*, 841.
- Hochstrasser, M. (1995). Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 215-223.
- Hochstrasser, M. (1996). Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* *84*, 813-815.
- Horton, P. and Nakai, K. (1996). A probabilistic classification system for predicting the cellular localization sites of proteins. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* *4*, 109-115.
- Hough, R., Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1986). Ubiquitin-lysosome conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates. *J Biol. Chem.* *261*, 2400-2408.
- Hu, G., Chung, Y.L., Glover, T., Valentine, V., Look, A.T., and Fearon, E.R. (1997a). Characterization of human homologs of the *Drosophila* seven in absentia (*sina*) gene. *Genomics* *46*, 103-111.
- Hu, G. and Fearon, E.R. (1999). Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Mol. Cell Biol.* *19*, 724-732.
- Hu, G., Zhang, S., Vidal, M., Baer, J.L., Xu, T., and Fearon, E.R. (1997b). Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* *11*, 2701-2714.
- Huang, L.H., Wang, R., Gama-Sosa, M.A., Shenoy, S., and Ehrlich, M. (1984). A protein from human placental nuclei binds preferentially to 5-methylcytosine-rich DNA. *Nature* *308*, 293-295.

- Huberman, J.A. and Riggs, A.D. (1968). On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol. Biol.* 32, 327-341.
- Hyman, A.A. and Karsenti, E. (1996). Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* 84, 401-410.
- Ikeda, K., Halle, J.P., Stelzer, G., Meisterernst, M., and Kawakami, K. (1998). Involvement of negative cofactor NC2 in active repression by zinc finger-homeodomain transcription factor AREB6. *Mol. Cell Biol.* 18, 10-18.
- Ikeda, K. and Kawakami, K. (1995). DNA binding through distinct domains of zinc-finger-homeodomain protein AREB6 has different effects on gene transcription. *Eur. J Biochem.* 233, 73-82.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., and Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8, 1693-1696.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D. (2000). The lore of the RINGS: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10, 429-439.
- Kelleher, J.E. and Raleigh, E.A. (1991). A novel activity in *Escherichia coli* K-12 that directs restriction of DNA modified at CG dinucleotides. *J Bacteriol.* 173, 5220-5223.
- Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., and Hirano, T. (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro. *Science* 282, 487-490.
- Kladde, M.P. and Simpson, R.T. (1996). Chromatin structure mapping in vivo using methyltransferases. *Methods Enzymol.* 274, 214-233.
- Kornberg and Baker (1992). DNA replication. (New York: Freeman).
- Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9, 5233-5262.
- Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 12, 857-872.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15, 8125-8148.
- Kozak, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol.* 115, 887-903.
- Kreipe, H., Wacker, H.H., Heidebrecht, H.J., Haas, K., Hauberg, M., Tiemann, M., and Parwaresch, R. (1993). Determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphomas by monoclonal antibody Ki-S5 directed against a formalin-resistant epitope of the Ki-67 antigen. *Am. J Pathol.* 142, 1689-1694.
- Kufer, T.A., Sillje, H.H., Korner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P., and Nigg, E.A. (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol.* 158, 617-623.
- Kunkel, T.A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 488-492.
- Lane, H.A. and Nigg, E.A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol.* 135, 1701-1713.
- Li, B. and Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J* 7, 957-963.
- Ling, M., Merante, F., and Robinson, B.H. (1995). A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 23, 4924-4925.

- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., and Weissman, A.M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 11364-11369.
- Lowe, M., Rabouille, C., Nakamura, N., Watson, R., Jackman, M., Jamsa, E., Rahman, D., Pappin, D.J., and Warren, G. (1998). Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis. *Cell* *94*, 783-793.
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* *252*, 1162-1164.
- Ma, J. and Ptashne, M. (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* *55*, 443-446.
- Manda, R., Kohno, T., Matsuno, Y., Takenoshita, S., Kuwano, H., and Yokota, J. (1999). Identification of genes (SPON2 and C20orf2) differentially expressed between cancerous and noncancerous lung cells by mRNA differential display. *Genomics* *61*, 5-14.
- Maniatis, T. (1999). A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev.* *13*, 505-510.
- Marx, J. (1991). The cell cycle: spinning farther afield. *Science* *252*, 1490-1492.
- Matsuzawa, S., Takayama, S., Froesch, B.A., Zapata, J.M., and Reed, J.C. (1998). p53-inducible human homologue of *Drosophila* seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *EMBO J* *17*, 2736-2747.
- Maupin-Furlow, J.A. and Ferry, J.G. (1995). A proteasome from the methanogenic archaeon *Methanosarcina thermophila*. *J Biol. Chem.* *270*, 28617-28622.
- Mayor, T., Meraldi, P., Stierhof, Y.D., Nigg, E.A., and Fry, A.M. (1999). Protein kinases in control of the centrosome cycle. *FEBS Lett.* *452*, 92-95.
- McDonnell, M.W., Simon, M.N., and Studier, F.W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* *110*, 119-146.
- Meraldi, P. and Nigg, E.A. (2001). Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase and phosphatase activities. *J Cell Sci.* *114*, 3749-3757.
- Molnar, A., Wu, P., Largespada, D.A., Vorkamp, A., Scherer, S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Bruns, G., and Georgopoulos, K. (1996). The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J Immunol.* *156*, 585-592.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *13*, 261-291.
- Morris, D.R. (1995). Growth control of translation in mammalian cells. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *51*, 339-363.
- Morris, D.R. and Geballe, A.P. (2000). Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol. Cell Biol.* *20*, 8635-8642.
- Morris, E.S., Elston, C.W., Bell, J.A., Galea, M., Blamey, R.W., and Ellis, I.O. (1995). An evaluation of the cell cycle-associated monoclonal antibody Ki-S1 as a prognostic factor in primary invasive adenocarcinoma of the breast. *J Pathol.* *176*, 55-62.
- Nan, X., Campoy, F.J., and Bird, A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* *88*, 471-481.
- Nemani, M., Linares-Cruz, G., Bruzzoni-Giovanelli, H., Roperch, J.P., Tuynder, M., Bougueleret, L., Cherif, D., Medhioub, M., Pasturaud, P., Alvaro, V., der, S.H., Cazes, L., Le Paslier, D., Le, G., I, Israeli, D., Dausset, J., Sigaux, F., Chumakov, I., Oren, M., Calvo, F., Amson, R.B., Cohen, D., and Telerman, A. (1996). Activation of the

human homologue of the *Drosophila* *sin3* gene in apoptosis and tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 9039-9042.

Nietfeld, W. and Meyerhans, A. (1996). Cloning and sequencing of *hIk-1*, a cDNA encoding a human homologue of mouse *Ikaros/LyF-1*. *Immunol. Lett.* 49, 139-141.

Nigg, E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17, 471-480.

Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 21-32.

Nunn, M.F., Seeburg, P.H., Moscovici, C., and Duesberg, P.H. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306, 391-395.

Okayama, H. and Berg, P. (1982). High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell Biol.* 2, 161-170.

Peter, M. and Herskowitz, I. (1994). Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* 79, 181-184.

Pileri, S., Gerdes, J., Rivano, M., Tazzari, P.L., Magnani, M., Gobbi, M., and Stein, H. (1987). Immunohistochemical determination of growth fractions in human permanent cell lines and lymphoid tumours: a critical comparison of the monoclonal antibodies OKT9 and Ki-67. *Br. J Haematol.* 65, 271-276.

Pines, J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* 1, E73-E79.

Prendergast, G.C. and Ziff, E.B. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 251, 186-189.

Pringle, J. R., Roach, J. R., Jones, E. W., and eds. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Cell cycle and cell biology.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) . 1997.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23, 4878-4884.

Quinn, C.M. and Wright, N.A. (1990). The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol.* 160, 93-102.

Ramchandani, S., Bhattacharya, S.K., Cervoni, N., and Szyf, M. (1999). DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 6107-6112.

Razin, A. and Riggs, A.D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science* 210, 604-610.

Razin, A. and Szyf, M. (1984). DNA methylation patterns. Formation and function. *Biochim. Biophys. Acta* 782, 331-342.

Reddy, E.S. and Rao, V.N. (1988). Structure, expression and alternative splicing of the human *c-ets-1* proto-oncogene. *Oncogene Res.* 3, 239-246.

Roberts, T. and Cowell, J.K. (1997). Cloning of the human *Gfi-1* gene and its mapping to chromosome region 1p22. *Oncogene* 14, 1003-1005.

Rott, A. Repp86: ein fuer die hyperdiploiden Zellzyklusphasen spezifisches Protein. 1999. CAU Kiel, Dissertation, 86 Seiten Standort: Zentralbibliothek der Universität Kiel, Signatur: TK4076, ausleihbar.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Roy, P.H. and Smith, H.O. (1973). DNA methylases of *Hemophilus influenzae* Rd. II. Partial recognition site base sequences. *J Mol. Biol.* 81, 445-459.

- Rudolph,P., Alm,P., Heidebrecht,H.J., Bolte,H., Ratjen,V., Baldetorp,B., Ferno,M., Olsson,H., and Parwaresch,R. (1999). Immunologic proliferation marker Ki-S2 as prognostic indicator for lymph node-negative breast cancer. *J Natl. Cancer Inst.* *91*, 271-278.
- Ruiz-Echevarria,M.J. and Peltz,S.W. (2000). The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames. *Cell* *101*, 741-751.
- Russell,P. (1998). Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 399-402.
- Saiki,R.K., Chang,C.A., Levenson,C.H., Warren,T.C., Boehm,C.D., Kazazian,H.H., Jr., and Erlich,H.A. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N. Engl. J Med.* *319*, 537-541.
- Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A., and Arnheim,N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-1354.
- Saluz,H.P., Jiricny,J., and Jost,J.P. (1986). Genomic sequencing reveals a positive correlation between the kinetics of strand-specific DNA demethylation of the overlapping estradiol/glucocorticoid-receptor binding sites and the rate of avian vitellogenin mRNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *83*, 7167-7171.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *74*, 5463-5467.
- Santourlidis,S., Trompeter,H.I., Weinhold,S., Eisermann,B., Meyer,K.L., Wernet,P., and Uhrberg,M. (2002). Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol.* *169*, 4253-4261.
- Saraste,M., Sibbald,P.R., and Wittinghofer,A. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 430-434.
- Saurin,A.J., Borden,K.L., Boddy,M.N., and Freemont,P.S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* *21*, 208-214.
- Saxton,W.M., Stemple,D.L., Leslie,R.J., Salmon,E.D., Zavortink,M., and McIntosh,J.R. (1984). Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J Cell Biol.* *99*, 2175-2186.
- Schaadt,M., Diehl,V., Stein,H., Fonatsch,C., and Kirchner,H.H. (1980). Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* *26*, 723-731.
- Scholey,J.M., Neighbors,B., McIntosh,J.R., and Salmon,E.D. (1984). Isolation of microtubules and a dynein-like MgATPase from unfertilized sea urchin eggs. *J Biol. Chem.* *259*, 6516-6525.
- Scott,R.J., Hall,P.A., Haldane,J.S., van Noorden,S., Price,Y., Lane,D.P., and Wright,N.A. (1991). A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. *J Pathol.* *165*, 173-178.
- Sekido,R., Murai,K., Funahashi,J., Kamachi,Y., Fujisawa-Sehara,A., Nabeshima,Y., and Kondoh,H. (1994). The delta-crystallin enhancer-binding protein delta EF1 is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Mol. Cell Biol.* *14*, 5692-5700.
- Sen,S., Zhou,H., and White,R.A. (1997). A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* *14*, 2195-2200.
- Sherr,C.J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* *73*, 1059-1065.
- Sherr,C.J. and Roberts,J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* *13*, 1501-1512.

- Shi,S.R., Cote,R.J., and Taylor,C.R. (2001). Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem. Cytochem.* *49*, 931-937.
- Shinshi,H., Miwa,M., Kato,K., Noguchi,M., Matsushima,T., and Sugimura,T. (1976). A novel phosphodiesterase from cultured tobacco cells. *Biochemistry* *15*, 2185-2190.
- Skowyra,D., Craig,K.L., Tyers,M., Elledge,S.J., and Harper,J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* *91*, 209-219.
- Southern,E. (1979a). Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.* *68*, 152-176.
- Southern,E.M. (1979b). Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* *100*, 319-323.
- Stargell,L.A. and Struhl,K. (1996). Mechanisms of transcriptional activation in vivo: two steps forward. *Trends Genet.* *12*, 311-315.
- Suggs,S.V., Wallace,R.B., Hirose,T., Kawashima,E.H., and Itakura,K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *78*, 6613-6617.
- Swenson,K.I., Farrell,K.M., and Ruderman,J.V. (1986). The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* *47*, 861-870.
- Taylor,J.W., Ott,J., and Eckstein,F. (1985). The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA. *Nucleic Acids Res.* *13*, 8765-8785.
- Thompson,J. and Gillespie,D. (1987). Molecular hybridization with RNA probes in concentrated solutions of guanidine thiocyanate. *Anal. Biochem.* *163*, 281-291.
- Tobias,J.W., Shrader,T.E., Rocap,G., and Varshavsky,A. (1991). The N-end rule in bacteria. *Science* *254*, 1374-1377.
- Valiron,O., Caudron,N., and Job,D. (2001). Microtubule dynamics. *Cell Mol. Life Sci.* *58*, 2069-2084.
- Vandeyar,M.A., Weiner,M.P., Hutton,C.J., and Batt,C.A. (1988). A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide- directed mutants. *Gene* *65*, 129-133.
- Vasquez,R.J., Gard,D.L., and Cassimeris,L. (1994). XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J Cell Biol.* *127*, 985-993.
- Vasquez,R.J., Gard,D.L., and Cassimeris,L. (1999). Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro. *Cell Motil. Cytoskeleton* *43*, 310-321.
- Vernos,I. and Karsenti,E. (1996). Motors involved in spindle assembly and chromosome segregation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *8*, 4-9.
- Virbasius,J.V., Virbasius,C.A., and Scarpulla,R.C. (1993). Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.* *7*.
- Walker,J.E., Saraste,M., Runswick,M.J., and Gay,N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* *1*, 945-951.
- Watanabe,Y., Kawakami,K., Hirayama,Y., and Nagano,K. (1993). Transcription factors positively and negatively regulating the Na,K- ATPase alpha 1 subunit gene. *J Biochem. (Tokyo)* *114*, 849-855.
- Watson,D.K., McWilliams,M.J., Lapis,P., Lautenberger,J.A., Schweinfest,C.W., and Papas,T.S. (1988). Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 7862-7866.

- Werner, M.H., Clore, M., Fisher, C.L., Fisher, R.J., Trinh, L., Shiloach, J., and Gronenborn, A.M. (1995). The solution structure of the human ETS1-DNA complex reveals a novel mode of binding and true side chain intercalation. *Cell* 83, 761-771.
- Whitehead, T.P., Kricka, L.J., Carter, T.J., and Thorpe, G.H. (1979). Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 25, 1531-1546.
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., and Axel, R. (1978). Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 14, 725-731.
- Wilkins, M.R. and Williams, K.L. (1997). Cross-species protein identification using amino acid composition, peptide mass fingerprinting, isoelectric point and molecular mass: a theoretical evaluation. *J. Theor. Biol.* 186, 7-15.
- Wilkinson, K.D., Urban, M.K., and Haas, A.L. (1980). Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol. Chem.* 255, 7529-7532.
- Williams, T.M., Moolten, D., Burlein, J., Romano, J., Bhaerman, R., Godillot, A., Mellon, M., Rauscher, F.J., III, and Kant, J.A. (1991). Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression. *Science* 254, 1791-1794.
- Wittmann, T., Boleti, H., Antony, C., Karsenti, E., and Vernos, I. (1998). Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J Cell Biol.* 143, 673-685.
- Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E., and Vernos, I. (2000). TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol.* 149, 1405-1418.
- Wolf, E., Kim, P.S., and Berger, B. (1997). MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci.* 6, 1179-1189.
- Yang, M., Wu, Z., and Fields, S. (1995). Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Res.* 23, 1152-1156.
- Ye, Q. and Worman, H.J. (1995). Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp. Cell Res.* 219, 292-298.
- Zhang, Y., Heidebrecht, H., Rott, A., Schlegelberger, B., and Parwaresch, R. (1999). Assignment of human proliferation associated p100 gene (C20orf1) to human chromosome band 20q11.2 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 84, 182-183.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R., and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat. Genet.* 20, 189-193.

9 Anhang

9.1 Proteinübersicht

9.1.1 Der genetische Standardcode

| | | | | | | | |
|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|
| UUU | | UCU | | UAU | | UGU | |
| UUC | Phe (F) | UCC | | UAC | Tyr (Y) | UGC | Cys (C) |
| UUA | | UCA | | UAA | | UGA | Stop |
| UUG | Leu (L) | UCG | Ser (S) | UAG | Stop | UGG | Trp (W) |
| CUU | | CCU | | CAU | | CGU | |
| CUC | | CCC | | CAC | His (H) | CGC | |
| CUA | | CCA | | CAA | | CGA | |
| CUG | Leu (L) | CCG | Pro (P) | CAG | Gln (Q) | CGG | Arg (R) |
| AUU | | ACU | | AAU | | AGU | |
| AUC | | ACC | | AAC | Asn (N) | AGC | Ser (S) |
| AUA | Ile (I) | ACA | | AAA | | AGA | |
| AUG | Met (M) | ACG | Thr (T) | AAG | Lys (K) | AGG | Arg (R) |
| GUU | | GCU | | GAU | | GGU | |
| GUC | | GCC | | GAC | Asp (D) | GGC | |
| GUA | | GCA | | GAA | | GGA | |
| GUG | Val (V) | GCG | Ala (A) | GAG | Glu (E) | GGG | Gly (G) |

Symbole für Aminosäuren:

| | | | | | |
|---|-----|----------------|---|-----|------------|
| A | Ala | Alanin | M | Met | Methionin |
| C | Cys | Cystein | N | Asn | Asparagin |
| D | Asp | Asparaginsäure | P | Pro | Prolin |
| E | Glu | Glutaminsäure | Q | Gln | Glutamin |
| F | Phe | Phenylalanin | R | Arg | Arginin |
| G | Gly | Glycin | S | Ser | Serin |
| H | His | Histidin | T | Thr | Threonin |
| I | Ile | Isoleucin | V | Val | Valin |
| K | Lys | Lysin | W | Trp | Tryptophan |
| L | Leu | Leucin | Y | Tyr | Tyrosin |

9.1.2 repp86: cDNA, Aminosäuresequenz und Motive

1 CGCAGGCGCA GGAGACTACA CTCCCAGGA ACTCCGGGCC GCGTTGTTCG CTGGTACCTC
 61 CTTCTGACTT CCGGTATTGC TGCGGTCTGT AGGGCCAATC GGGAGCCTGG AATTGCTTTC
 121 CCGGCGCTCT GATTGGTGCA TTCGACTAGG CTGCTGGGT TCAAATTTTC AACGATACTG
 181 AATGAGTCCC GCGGCGGGTT GGCTCGCGCT TCGTTGT CAG ATCTGA GGCG AGGCTAGGTG
 M S P A A G W L A L R C Q I Stop

 241 AGCCGTGGGA AGAAAAGAGG GAGCAGCTAG GCGCGGGTC TCCCTCCTCC CGGAGTTTGG
 301 AACGGCTGAA GTTCACCTTC CAGCCCCTAG CGCCGTTCGC GCCGCTAGGC CTGGCTTCTG
 361 AGGCGGTTGC GGTGCTCGGT CGCCGCCTAG GCGGGGCAGG GTGCGAGCAG GGGCTTCGGG
 421 CCACGCTTCT CTTGGCGACA GGATTTTGT GTGAAGTCCG TCCGGGAAAC GGAGGAAAAA
 481 AAGAGTTGCG GGAGGCTGTC GGCTAATAAC GGTCTTTGAT ACATATTTGC CAGACTTCAA
 541 GATTTCAGAA AAGGGGTGAA AGAGAAGAT GCAACTTTGA GTCAGACCTE TAGGCCTGAT
 601 AGACTGATTA AACACAGAA GGTGACCTGC TGAGAAAAGT GGTACAAATA CTGGGAAAAA
 661 CCTGCTCTTC TGCCTTAAGT GGGAGACAT GTCACAAGTT AAAAGCTCTT ATTCTATGA
 M S Q V K S* S* Y S* Y

 721 TGCCCCCTCG GATTTTCATCA ATTTTTCATC CTTGGATGAT GAAGGAGATA CTCAAAACAT
 D A P S D F I N F S* S L D D E G D T Q N

 781 AGATTCATGG TTTGAGGAGA AGGCCAATTT GGAGAATAAG TTACTGGGGA AGAATGGAAC
 I D S* W F E E K A N L E N K L L G K N G

 841 TGGAGGGCTT TTTCAGGGCA AACTCCTTT GAGAAAGGCT AATCTTCAGC AAGCTATTGT
 T G G L F Q G K L P L R K A N L Q Q A I

 901 CACACCTTTG AAACCAGTTG ACAACACTTA CTACAAAGAG GCAGAAAAAG AAAATCTTGT
 V T P L K P V D N T Y Y* K E A E K E N L

 961 GGAACAATCC ATTCCGTCAA ATGCTTGTTT TCCCTGGAA GTTGAGGCAG CCATATCAAG
 V E Q S I P S N A C S S* L E V E A A I S*

 1021 AAAAACTCCA GCCCAGCCTC AGAGAAGATC TCTTAGGCTT TCTGCTCAGA AGGATTTGGG
 R K T* P A Q P Q R R S* L R L S* A Q K D L

 1081 ACAGAAAGAA AAGCATCATG TAAAAATGAA AGCCAAGAGA TGTGCCACTC CTGTAATCAT
 E Q K E K H H V K M K A K R C A T P V I

 1141 CGATGAAAT CTACCCTCTA AGAAAATGAA AGTTTCTAAC AACAAAAAGA AGCCAGAGGA
 I D E I L P K R M K V S N N K K K P E

 1201 AGAAGGCAGT GCTCATCAAG ATACTGCTGA AAAGAATGCA TCTTCCCAG AGAAAGCCAA
 E E G S A H Q D T A E K N A S* S* P E K A

 1261 GGGTAGACAT ACTGTGCCTT GTATGCCACC TGCAAAGCAG AAGTTTCTAA AAAGTACTGA
 K G R H T V P C M P P A K Q K F L K S* T

 1321 GGAGCAAGAG CTGGAGAAGA GTATGAAAAT GCAGCAAGAG GTGGTGGA GTCGGAAAAA
 E E Q E L E K S* M K M Q Q E V V E M R K

 1381 GAATGAAGAA TTCAAGAAC TTGCTCTGGC TGAATAGGG CAACCTGTGA AGAAATCAGT
 K N E E F K K L A L A G I G Q P V K K S

 1441 GAGCCAGGTC ACCAAATCAG TTGACTTCCA CTCCGCACA GATGAGCGAA TCAAACAACA
 V S Q V T K S* V D F H F R T D E R I K Q

 1501 TCCTAAGAAC CAGGAGGAAT ATAAGGAAGT GAACCTTACA TCTGAACTAC GAAAGCATCC
 H P K N Q E E Y* K E V N F T S E L R K H

 1561 TTCATCTCCT GCCCGAGTGA CTAAGGGATG TACCATTGTT AAGCCTTTCA ACCTGTCCCA
 P S* S P A R V T* K G C T I V K P F N L S

 1621 AGGAAAGAAA AGAACATTTG ATGAAACAGT TTCTACATAT GTGCCCTTG CACAGCAAGT
 Q G K K R T F D E T V S T Y V P L A Q Q

 1681 TGAAGACTTC CATAAACGAA CCCCTAACAG ATATCATTG AGGAGCAAGA AGGATGATAT
 V E D F H K R T P N R Y H L R S* K R D D

 1741 TAACCTGTTA CCCTCCAAT CTTCTGTGAC CAAGATTGTC AGAGACCCAC AGACTCCTGT
 I N L L P S K S S V T K I C R D P Q T* P

 1801 ACTGCAACC AACACCGTG CACGGCTGT GACCTGCAA AGTACAGCAG AGCTGGAGGC
 V L Q T K H R A R A V T* C K S* T A E L E

1861 TGAGGAGCTC GAGAAATTGC AACAAATACAA ATTCAAAGCA CGTGAAGCTG ATCCCAGAAT
A E E L E K L Q Q Y K F K A R E L D P R

1921 ACTTGAAGGT GGGCCCATCT TGCCCAAGAA ACCACCTGTG AAACCACCCA CCGAGCCTAT
I L E G G P I L P K K P P V K P P T E P

1981 TGGCTTTGAT TTGGAATTG AGAAAAGAAT CCAGGAGCGA GAATCAAAGA AGAAAACAGA
I G F D L E I E K R I Q E R E **S* K K K T**

2041 GGATGAACAC TTTGAATTC ATTCCAGACC TTGCCCTACT AAGATTTTGG AAGATGTTGT
E D E H F E F H S R P C P T K I L E D V

2101 GGGTGTTCCT GAAAAGAAGG TACTTCCAAT CACCGTCCCC AAGTCACCAG CCTTTGCATT
V G V P E K K V L P I T V **P K S* P** A F A

2161 GAAGAACAGA ATTCGAATGC CCACAAAGA AGATGAGGAA GAGGACGAAC CGGTAGTGAT
L K N R I R M P T* K E D E E E D E P V V

2221 AAAAGCTCAA CCTGTGCCAC ATTATGGGGT GCCTTTTAAG CCCCAAATCC CAGAGGCAAG
I K A Q P V P H Y G V P F K P Q I P E A

2281 AACTGTGGAA ATATGCCCTT TCTCCTTTGA TTCTCGAGAC AAAGAACGTC AGTTACAGAA
R T V E I C P F S F D S R D K E R Q L Q

2341 GGAGAAGAAA ATAAAAGAAC TGCAGAAAGG GGAGGTGCC AAGTTCAAGG CACTTCCCTT
K E K K I K E L Q K G E V P K F K A L P

2401 GCCTCATTTT GACACCATTA ACCTGCCAGA GAAGAAGGTA AAGAATGTGA CCCAGATTGA
L P H F D T I N L **P E K K V K N V** T Q I

2461 ACCTTTCTGC TTGGAGACTG ACAGAAGAGG TGTCTGAAG GCACAGACTT GGAAGCACCA
E P F C L E T D R R G A L K A Q T W K H

2521 GCTGGAAGAA GAACTGAGAC AGCAGAAAGA AGCAGCTTGT TTCAAGGCTC GTCCAAACAC
Q L E E E L R Q Q K E A A C F K A R P N

2581 CGTCATCTCT CAGGAGCCCT TTGTTCCCAA GAAAGAGAAG AAATCAGTTG CTGAGGGCCT
T V I **S* Q E P F V P K K E K K S* V** A E G

2641 TTCTGGTTCT CTAGTTCAGG AACCTTTTCA GCTGGCTACT GAGAAGAGAG CCAAAGAGCG
L S G S L V Q E P F Q L A T E K R A K E

2701 GCAGGAGCTG GAGAAGAGAA TGGCTGAGGT AGAAGCCCAG AAAGCCCAGC AGTTGGAGGA
R Q E L E K R M A E V E A Q K A Q Q L E

2761 GGCCAGACTA CAGGAGGAAG AGCAGAAAAA AGAGGAGCTG GCCAGGCTAC ~~GGAGA~~ACT
E A R L Q E E E Q K K E E L A R L R R E

2821 GGTGCATAAG GCAAATCCAA TACGCAAGTA CCAGGGTCTG GAGATAAAGT CAAGTGACCA
L V H K A N P I R K Y Q G L E I K S S D

2881 GCCTCTGACT GTGCTGTAT CTCCAAATT CTCCACTCGA TTCCACTGCT AA~~ACT~~CAGCT
Q P L T V **P V S* P** K F **S* T R** F H C stop

2941 GTGAGCTGCG GATACCGCCC GGCAATGGGA CCTGCTCTTA ACCTCAAACC TAGGACCGTC
3001 TTGCTTTGTC ATTGGGCATG GAGAGAACCC ATTTCTCCAG ACTTTACCT ACCCGTGCCT
3061 GAGAAAGCAT ACTTGACAAC TGTGGACTCC AGTTTGTGTT AGAATTGTTT TCTTACATTA
3121 CTAAGGCTAA TAATGAGATG TAACTCATGA ATGTCTCGAT TAGACTCCAT GTAGTTACTT
3181 CCTTTAAACC ATCAGCCGGC CTTTATATG GGTCTTCACT CTGACTAGAA TTTAGTCTCT
3241 GTGTCAGCAC AGTGAATCT CTATTGCTAT TGCCCTTAC GACTCTCACC CTCTCCCCAC
3301 TTTTTTTAAA AATTTTAACC AGAAAATAAA GATAGTTAAA TCCTGGAAAA AAAAAAAAAA
3361 AAAAAAA

Legende:**ATG . . TGA**

uORF

ATG

repp86-Translationsstart

S* S L D D

Caseinkinase II

S* K K

Proteinkinase C

| | |
|-----------------------------|--|
| K K K T | cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase |
| K P V D N T Y Y* | Tyrosinkinase |
| S*,T*, Y* | Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungsstellen, p>0,7 |
| T P L K | cdc2-Kinase (S/T P X K/R) |
| P V S*P | MAP-Kinase (P X S/T P) |
| Q L A T... | <i>coiled coil</i> -Domäne, <i>PairCoil</i> p = 100 % |
| ... R Q E L ... | “ <i>intermediate filament protein motif</i> ” (<i>ProfileScan</i> , <i>Isrec</i>) |
| G G L F Q G K T | P-Loop |
| P E K K V K N | Nukleäres Lokalisationssignal |
| K S* T E E Q E L E K | potentielle PEST-Sequenz (score 9,94 bei RunPEST) |

9.1.3 uORF, cDNA und Aminosäuresequenz

```

ATG AGT CCC GCG GCG GGT TGG CTC GCG CTT CGT TGT CAG ATC TGA
  M  S  P  A  A  G  W  L  A  L  R  C  Q  I Stop

```

9.1.4 SIAH2: Aminosäuresequenz

```

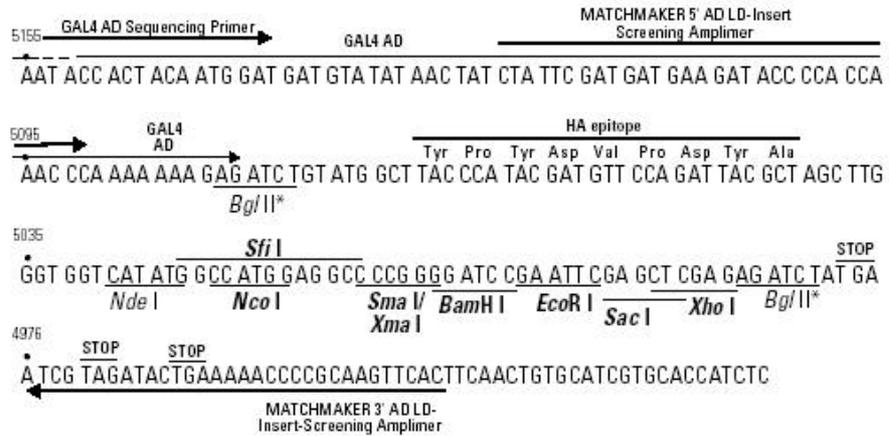
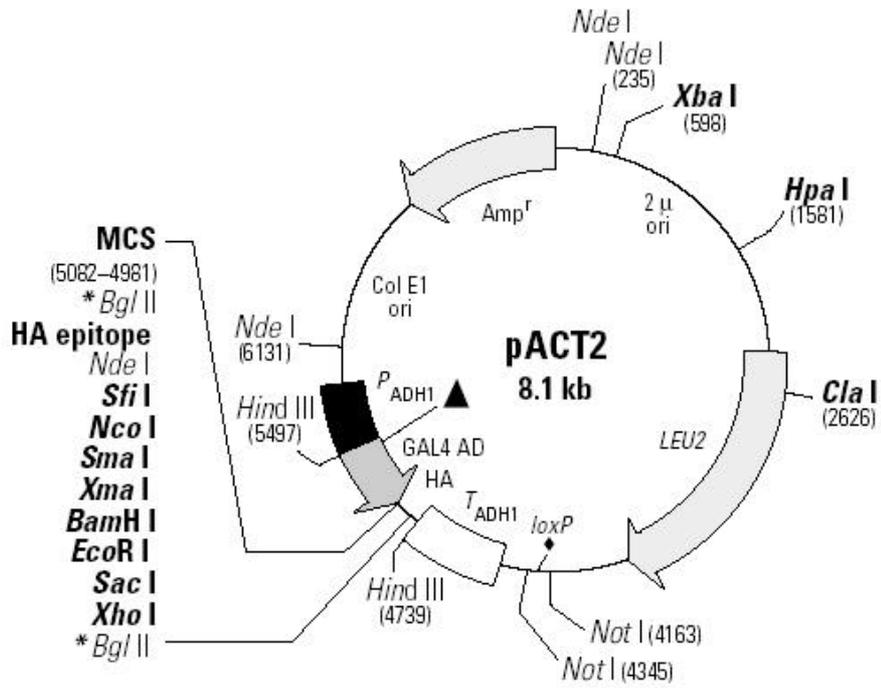
1  MSRPSSTGPS ANKPCSKQPP PQPQHTPSPA APPAAATISA AGPGSSAVPA AAAVISGPGG

                                     RING-Finger-Domäne
61  GGGAGPVSPQ HHELTSLFEC PVCFDYVLPP ILQCQAGHLV CNQCRQKLSC CPTCRGALTP
121  SIRNLAMEKV ASAVLFPCKY ATTGCSLTLH HTEKPEHEDI CEYRPPYSCPC PGASCRWQGS
181  LEAVMSHLMH AHKSITTLQG EDIVFLATDI NLPGAVDWVM MQSCFGHHFM LVLEKQEKYE
241  GHQOFFAIVL LIGTRKQAEF FAYRLELNGN RRRLTWEATP RSIHDGVAAA IMNSDCLVFD
301  TAI AHLFADN  GN LGINVTIS  TCCP

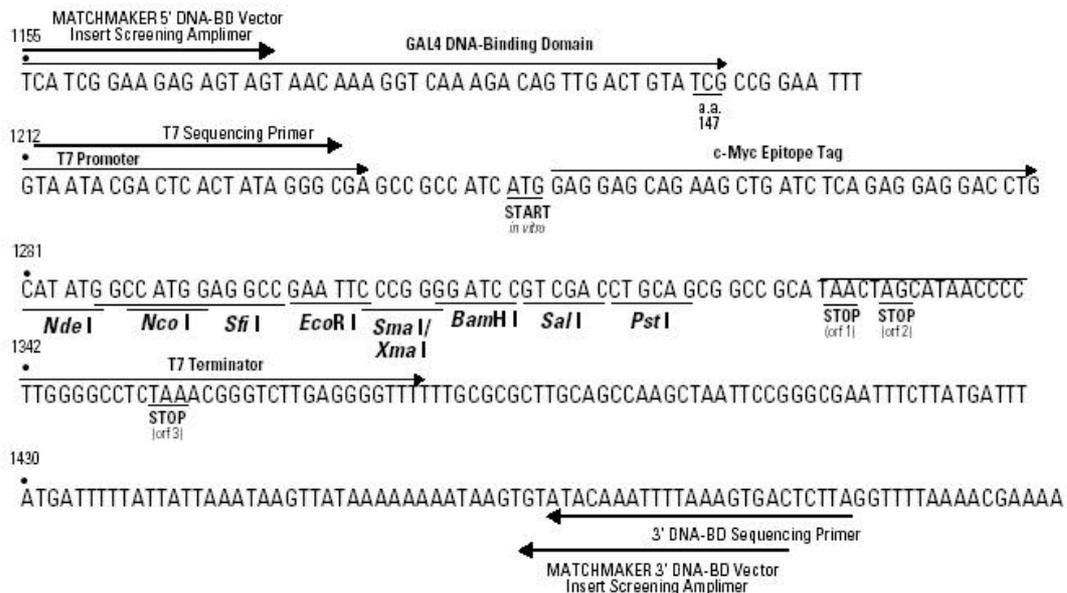
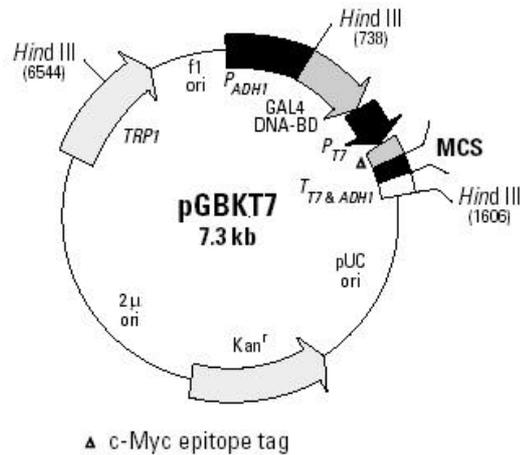
```

9.2 Vektorkarten

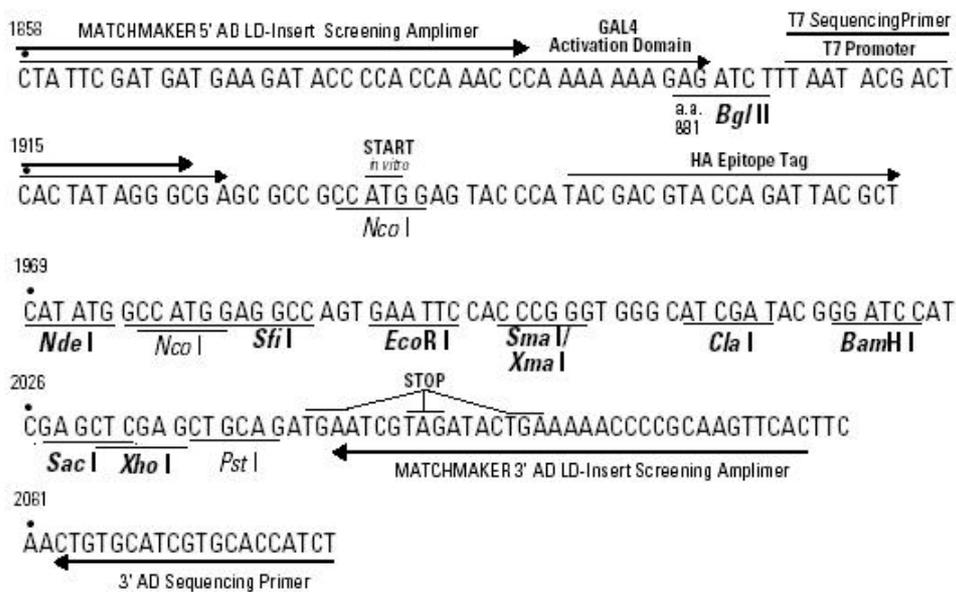
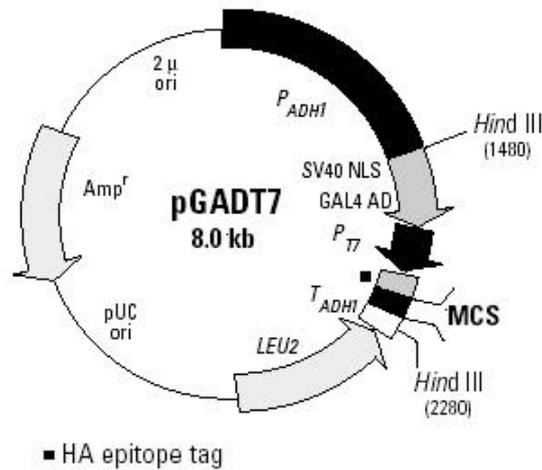
9.2.1 *pACT2*: Vektor mit der humanen Lymphknotenbibliothek (Fa. Clontech)



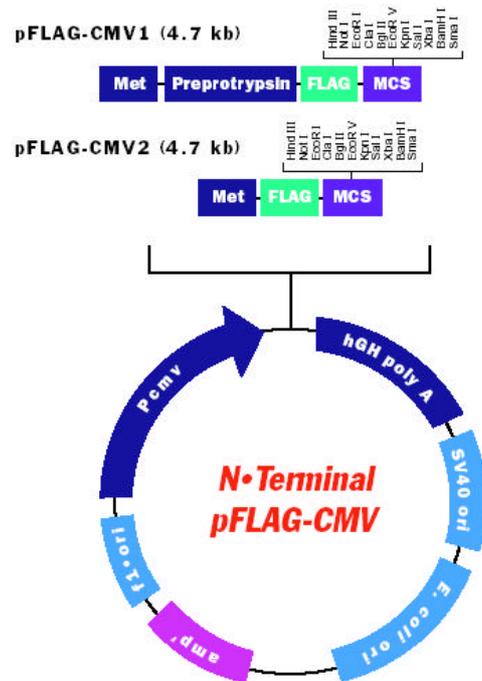
9.2.2 *pGBKT7*: Vektor mit der „Köderprotein“-cDNA (Fa. Clontech)



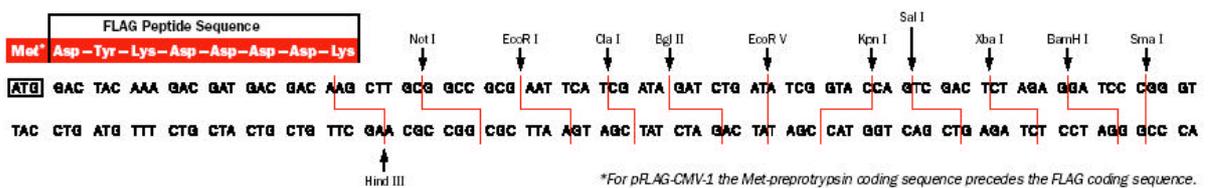
9.2.3 pGADT7: Vektor mit der Interaktor-cDNA (Fa. Clontech)



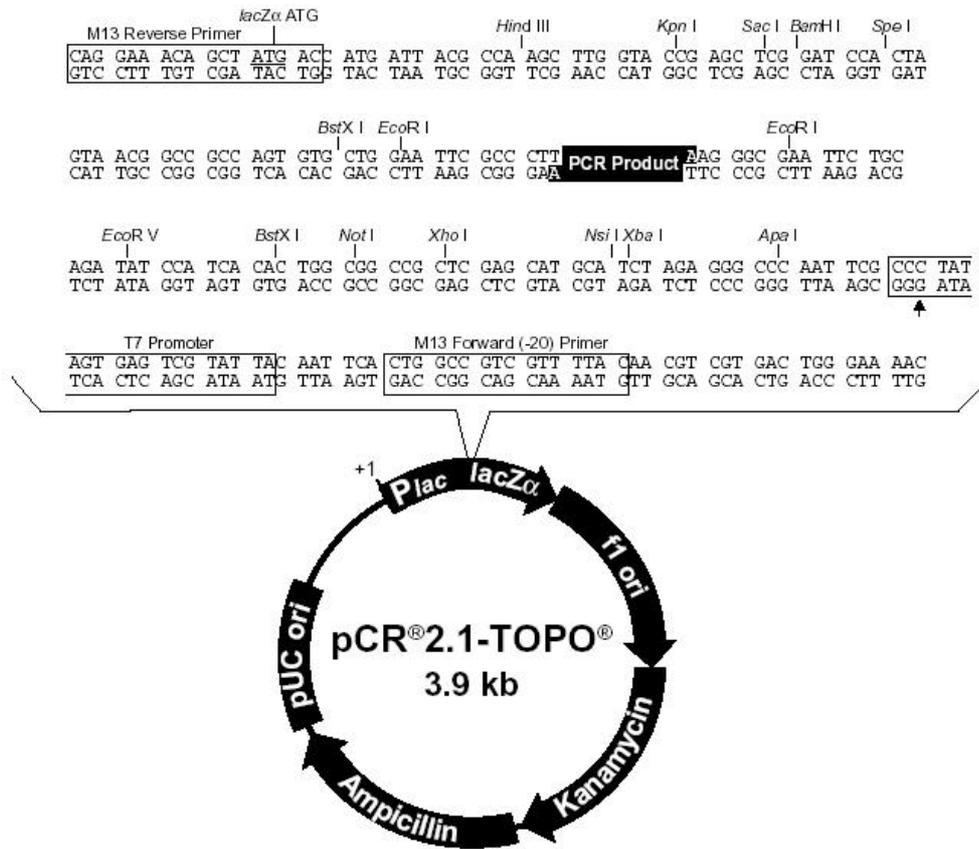
9.2.4 *pFLAG-CMV2*: Expressionsvektor in Koimmunpräzipitationsexperimenten (Fa. Sigma Aldrich)



Multiple Cloning Site (*pFLAG-CMV-1** and *pFLAG-CMV-2*)

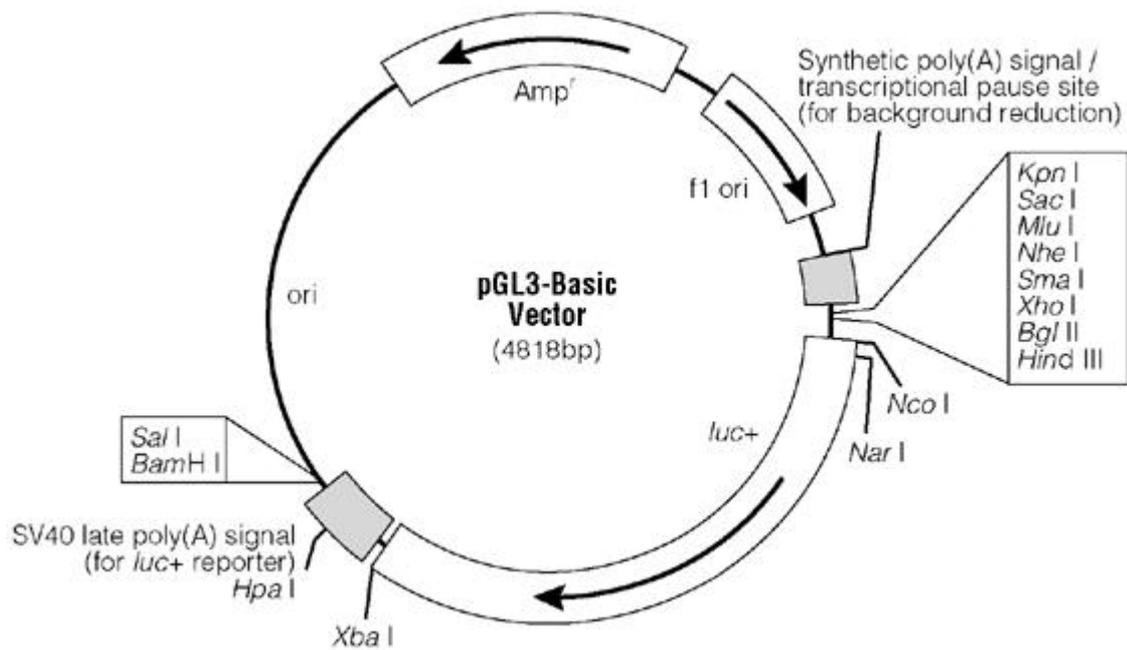


9.2.5 pCR1.2-TOPO: Subklonierung von PCR-Fragmenten (Fa. Invitrogen)



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

9.2.6 pGL3 Basic: Luciferase Assay (Fa. Promega)



9.2.7 pGL3 Control: Luciferase Assay (Fa. Promega)

