

Expression und Charakterisierung des c-Myb Protoonkogenproduktes

Dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

vorgelegte Dissertation
von

Dipl. Biochem. Reinhard Sokolowski
geboren am 30.04.1967 in Ostercappeln

Hannover 1998

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit vom 01.03.1995 bis zum 01.02.1998 unter der Leitung von Prof. Dr. J. Alves angefertigt

Referent: Prof. Dr. J. Alves

Korreferent: Priv. Doz. Dr. W. Müller

Tag der Promotion: 06. 02. 1998

„Wenn's beim ersten Mal nicht funktioniert, Mr. Kidd...“

„...versucht man's noch mal, Mr. Wint.“

James Bond - Diamantenfieber [1971]

DANKSAGUNG

Prof. Dr. J. Alves für die Möglichkeit, meine Dissertation unter seiner Leitung anfertigen zu können, für die Finanzierung und für konstruktive Kritik.

PD. Dr. W. Müller für die Übernahme des Korreferats.

Dr. H. Wolfes für seine Betreuung, die Betriebsausflüge und die Arbeitssessen.

Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“ für die Finanzierung der Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen.

Frau Dr. R. Gerady-Schahn und Herrn PD. Dr. B. Lüscher für die Ko-Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Dr. Thomas Heuer für die Unterweisungen im Dasein eines Yeti (*Yeast experimenter with totally incompetence*) und den zur Verfügung gestellten Hefestamm.

Dr. A. Kiewitz für lange Gespräche, *non-stop* Unterhaltung und die Warnung vor dem Beruf des Pharmaberaters.

Wolfgang „Wolle“ Küster, dem Anwärter auf die Ehren-Myb Anwartschaft.

Thomas Dobat geb. Schmidt für das Erlernen des „Drei-Satzes“.

Hella Scharnhorst und Claudia Thiel für *lab assistance*.

Meinen sieben Großversuchs-Praktikanten, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 DEUTSCH	1
1.1.1 SCHLAGWORTE	2
1.2 ENGLISCH	2
1.2.1 KEYWORDS	2
2 EINLEITUNG	3
2.1 DIE KRANKHEIT KREBS UND IHRE ENTSTEHUNG	3
2.2 DAS PROTOONKOGEN C-MYB	6
2.2.1 DIE DNA-BINDUNGSDOMÄNE	9
2.2.2 DIE TRANSAKTIVIERUNGSDOMÄNE	13
2.2.3 DIE NEGATIV REGULIERENDE DOMÄNE	14
2.2.4 PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN	16
2.2.5 KOFAKTOREN	17
2.3 ZIEL DER ARBEIT	19
3 MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 CHEMIKALIEN , ENZYME UND VERBRAUCHSMATERIAL	20
3.2 ZUSAMMENSETZUNG VON PUFFERN UND MEDIEN	20
3.3 ARBEITEN MIT PROKARYONTEN	25
3.3.1 PLASMIDE FÜR <i>E. COLI</i>	25
3.3.2 VERWENDETE STÄMME	28
3.3.2.1 LK111(λ)	28
3.3.2.2 BL21(DE3)	28
3.3.2.3 TG I	28
3.3.2.4 GI 698 bzw. GI 724	28
3.3.2.5 GI 826	29
3.3.3 HERSTELLUNG UND TRANSFORMATION KOMPETENTER ZELLEN	29
3.3.4 ANZUCHT- UND INDUKTIONSBEDINGUNGEN	29

3.3.4.1 pQE30, bzw. pGex2T	29
3.3.4.2 pFliTrx	30
3.3.4.3 pTrxFus	30
3.3.5 ZELLAUFSCHLUSS	30
3.3.6 DOT-BLOT MIT LEBENDEN ZELLEN	31
3.4 ARBEITEN MIT EUKARYONTEN	31
3.4.1 <i>PICHIA PASTORIS</i>	31
3.4.1.1 Plasmide für <i>Pichia pastoris</i>	34
3.4.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	35
3.4.1.3 Anzucht- und Induktionsbedingungen	36
3.4.1.3.1 Bedingungen für die Sekretion von Proteinen	36
3.4.1.3.2 Bedingungen für die intrazelluläre Expression	36
3.4.1.4 Präparation von Hefe-Zell-Lysaten	36
3.4.2 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	37
3.4.2.1 Plasmide für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
3.4.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen	38
3.4.2.3 Anzucht- und Induktionsbedingungen	38
3.4.2.4 Herstellung von Zell-Lysaten für Western-Blots	38
3.4.3 COS-ZELLEN	39
3.4.3.1 Plasmide für Cos-Zellen	40
3.4.3.2 Transfektion und Kulturbedingungen	40
3.4.3.3 Herstellen von Zellkernextrakten	41
3.4.4 ARBEITEN MIT PHAGEN	41
3.4.4.1 Plasmide	43
3.4.4.2 Herstellung rekombinanter Phagen	43
3.4.4.3 <i>Panning</i> der rekombinanten Phagen	44
3.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE ARBEITEN	44
3.5.1 PCR-MUTAGENESE	44
3.5.2 ELUTION VON DNA AUS POLYACRYLAMID-GELEN	47
3.5.3 BESCHICHTUNG VON MICROTITERPLATTEN	48
3.5.4 PROTEINREINIGUNG	48

3.5.4.1 (His) ₆ -getaggte Proteine	48
3.5.4.2 GST-Fusionsproteine	48
3.5.5 ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)	49
3.5.6 CD-SPEKTROSKOPIE VON MUTANTEN DER DNA-BINDENDEN DOMÄNE	49
4 ERGEBNISSE	50
4.1 EXPRESSIONSSTUDIEN	50
4.1.1 COEXPRESSION EINES CBP- FRAGMENTES	50
4.1.2 KOEXPRESSION VON THIOREDOXIN	53
4.1.3 EXPRESSION ALS THIOREDOXIN-FUSIONSPROTEIN	55
4.1.4 EXPRESSION IN <i>PICHIA PASTORIS</i>	56
4.1.5 EXPRESSION IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	61
4.1.6 EXPRESSION IN COS-ZELLEN	63
4.2 MUTAGENESESTUDIEN	67
4.2.1 RANDOM-MUTAGENESE IM <i>PHAGE DISPLAY</i>	68
4.2.2 RANDOM-MUTAGENESE IM FLITRX-SYSTEM	71
4.2.3 ZIELGERICHTETE MUTAGENESE	73
5 DISKUSSION	79
5.1 EXPRESSION VON <i>FULL-LENGTH C-MYB</i>	79
5.1.1 EXPRESSION VON C-MYB IN PROKARYONTEN (<i>E. COLI</i>)	79
5.1.2 EXPRESSION VON C-MYB IN EUKARYONTEN	81
5.2 MUTAGENESESTUDIEN	82
5.2.1 RANDOM-MUTAGENESE	83
5.2.2 ZIELGERICHTETE MUTAGENESE	84
6 LITERATUR	90
7 ANHANG	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Amp.	Ampicillin
AOX	Alkoholoxidase
AS	Aminosäure
bidest	bidestilliertes H ₂ O
Bp	Basenpaare
d	desoxy
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxynukleotid
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Dinatriummethylenediamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -galactopyranosid
k	Kilo-
K	Assoziationskonstante
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria-Bertani
m	milli-
M	Molar
β -MESH	β -Mercaptoethanol
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	Milliliter
n	nano
NTA	Nitrilotriacetat
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
pfu	<i>plaque forming units</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
ss	einzelsträngig
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
μ	mikro-
λ	Wellenlänge

Aminosäuren werden mit dem international üblichen Ein-, bzw. Drei-Buchstaben Code abgekürzt.

Die Abkürzung der Basen entspricht den *IUB tentative rules*.

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 DEUTSCH

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die Expression und Charakterisierung des Protoonkogenproduktes c-Myb aus der Maus (*mus musculus*).

C-Myb ist ein kernständiges, spezifisch DNA-bindendes Protein, das die Transkription von Zielgenen verstärken oder reduzieren kann. Es besitzt eine evolutionär hochkonservierte N-terminale DNA-Bindungsdomäne aus drei homologen Regionen (*Repeats*), die sich durch jeweils drei in definiertem Abstand auftretende Tryptophanreste auszeichnen. Neben der DNA-Bindungsdomäne konnten transaktivierende und negativ regulierende Bereiche identifiziert werden.

Das c-Myb Protein sollte in voller Länge (*full-length*) exprimiert und charakterisiert werden. Dazu wurden verschiedene prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme getestet. In allen untersuchten prokaryontischen Systemen war das Protein proteolytisch degradiert, so daß eine Aufreinigung nicht sinnvoll erschien. Im eukaryontischen System, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte keine Expression detektiert werden.

In der Hefe *Pichia pastoris* konnte c-Myb produziert und aufgereinigt werden, allerdings ließen sich die Experimente nicht reproduzieren. Erst die Expression in Cos-Zellen brachte den gewünschten Erfolg. Das Protein wird in diesen Zellen löslich produziert und ist proteolytisch nicht degradiert. Sowohl die intrazelluläre Expression als auch die Sekretion ins Kulturmedium wurden erfolgreich getestet.

Weiterhin wurden einzelne Aminosäuren der DNA-Bindungsdomäne, die nach einem Strukturmodell des DNA-Protein Komplexes nahe den Basenpaaren der Erkennungssequenz stehen, auf ihre Beteiligung bei der Erkennung der spezifischen DNA-Sequenz untersucht. Dazu wurden insgesamt elf Mutanten erzeugt, zur Homogenität aufgereinigt und auf ihre Affinität zur Myb-Erkennungssequenz getestet. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß drei der untersuchten Aminosäuren (N179, K182, N183) notwendig für die DNA-Erkennung sind, zwei weitere Aminosäuren (N186, S187) entbehrlich sind.

1.1.1 SCHLAGWORTE

c-Myb, Expression, Mutagenese

1.2 ENGLISCH

The objective of this thesis was the expression and characterization of the murine c-Myb proto-oncogene product.

C-Myb is a nuclear protein with DNA binding specificity and negative or positive transcription regulation capacity. It contains an evolutionary conserved N-terminal DNA-binding domain consisting of three imperfect repeats. In each of these repeats, three tryptophans are spaced by 18 or 19 amino acids. In addition to the DNA-binding domain, a transactivation domain and a negative regulatory domain have been identified.

In order to express the full-length c-Myb protein, different procaryotic and eucaryotic expression systems were evaluated. However, in all procaryotic expression systems tested, the protein was proteolytically degraded, thus prohibiting a purification. Furthermore, in the eucaryotic yeast system *Saccharomyces cerevisiae* no expression was detected.

In the yeast *Pichia pastoris*, c-Myb could be expressed and purified, but the results were not reproducible. Finally, expression in Cos-cells led the way to success. C-Myb was produced as a soluble, non-degraded protein. Intracellular expression as well as secretion into the culture media was successfully tested.

In site directed mutagenesis experiments, distinct amino acids of the DNA-binding domain were probed for their ability to contact the bases of the recognition sequence. Therefore, eleven mutants (single and double mutations) were generated, purified to homogeneity and screened for their affinity to the Myb recognition sequence. From the results it could be concluded, that three amino acids (N179, K182 and N183) are necessary for DNA recognition, whereas two others (N186 and S187) are dispensable.

1.2.1 KEYWORDS

c-Myb, expression, mutagenesis

2 EINLEITUNG

2.1 DIE KRANKHEIT KREBS UND IHRE ENTSTEHUNG

Die Ursache für die Entstehung von Krebs ist die kontinuierliche und unregulierte Proliferation von Zellen. Der vollkommene Verlust, auf innere bzw. äußere Kontrollmechanismen der Proliferation reagieren zu können, ist nicht das Produkt eines einzigen Ereignisses, sondern das Resultat von akkumulierten Abnormitäten in multiplen regulatorischen Systemen der Zelle.

Krebs kann aus jedem Zelltypus des Körpers entstehen, wobei zwischen benignen und malignen Tumoren unterschieden werden kann. Benigne Tumore bleiben begrenzt auf den Ort ihrer Entstehung, während maligne Tumore fähig sind, in umgebendes Gewebe einzudringen und sich über das Kreislauf- und lymphatische System im Körper auszubreiten.

Die Entwicklung von Krebs ist ein klonaler Vorgang, das heißt, alle Zellen eines Tumors lassen sich auf eine Ursprungszelle zurückführen. Dabei ist die Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle kein Vorgang der sich in einem Schritt vollzieht, sondern ein Prozeß, der sich durch eine fortschreitende Serie von Modifikationen auszeichnet [Fearon und Vogelstein 1990].

Den ersten Schritt in der Entwicklung von Krebs (Tumorinitiation) stellt eine genetische Veränderung dar, die zu abnormaler Proliferation einer einzelnen Zelle führt. Durch die vermehrte Nachkommenzahl dieser Zellen steigt die Wahrscheinlichkeit, daß eine dieser Zellen Ziel einer zweiten Veränderung wird. Im weiteren Verlauf der Krebsentwicklung (Tumorprogression) kommt es zu zusätzlichen Mutationen, die zu einem Selektionsvorteil gegenüber den umgebenden nicht transformierten Zellen beitragen und auf diese Weise dominante Tumorzellklone entstehen lassen (siehe Abbildung 2-1). Nur diese dominante Proliferation läßt die vielfältigen Mutationsereignisse, von denen alle Körperzellen betroffen sind, sichtbar werden.

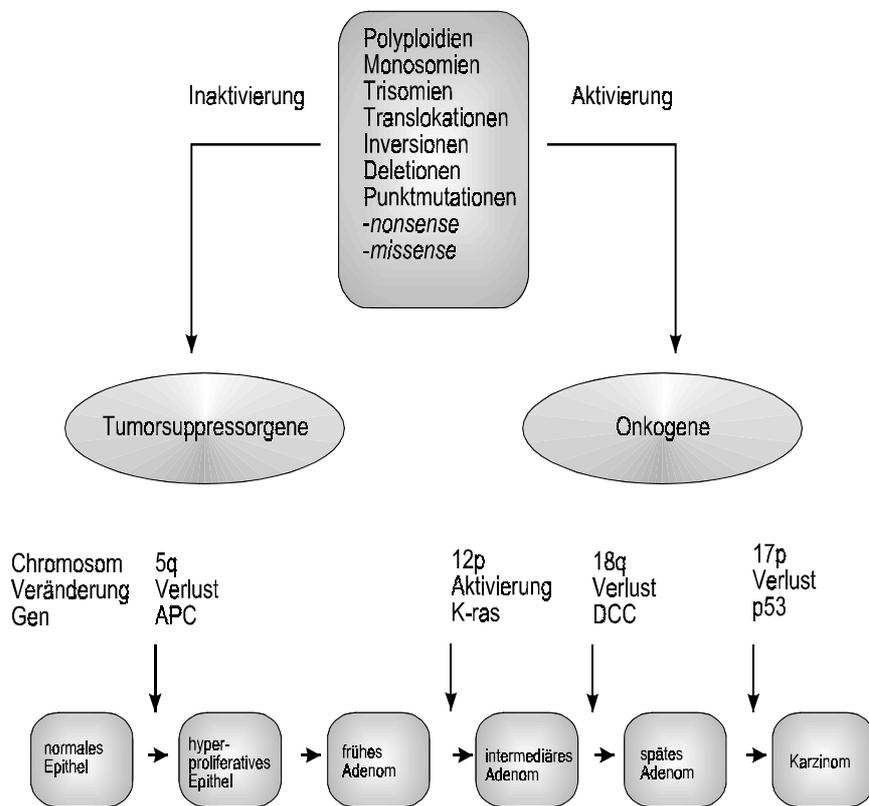


Abbildung 2-1 Mehrstufenmodell der Karzinogenese, modifiziert nach [Fearon und Vogelstein 1990]

Die Gene, die von proliferationssteigernden Mutationen betroffen sind, lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Proto-Onkogene (z.B. *abl*, *fos*, *jun*, *myb*, *myc*, *src*, *bcl-2*, *erbB-2*) und Tumorsuppressorgene (z.B. *p53*, *p16*, *APC*, *DCC*, *NF1*, *Rb*, *WT1*), [Cooper 1997]. Während bei Proto-Onkogenen eine Mutation auf einem Allel zur Transformation genügt und somit dominant ist, reicht bei Tumorsuppressorgenen meist ein Allel für die Aufrechterhaltung seiner Funktion aus, eine Mutation ist also rezessiv. Zu den Proto-Onkogenprodukten zählen Membranrezeptoren, Proteine der Signaltransduktionskaskade und Transkriptionsfaktoren. Die Expression von Tumorsuppressorgenen sorgt für einen Proliferationsstopp und Apoptose. Aufgrund der Mutationsdominanz konnten viele Proto-Onkogene durch die Charakterisierung von tumorauslösenden Retroviren entdeckt werden. Die dabei gefundenen Onkogene leiten sich von ihren zellulären Homologen ab, die durch Transduktionsereignisse in das Genom des Virus gelangt sind

(siehe Tabelle 2-1). Die Proliferationssteigerung der Wirtszelle verhilft den Viren zu einer schnellen Vermehrung und Verbreitung. Eines dieser Onkogene ist v-myb.

Onkogen	Virus	Spezies
abl	Abelson leukemia	Maus
crk	CT10 sarcoma	Huhn
erbA	Avian erythroblastosis-ES4	Huhn
erbB	Avian erythroblastosis-ES4	Huhn
ets	Avian erythroblastosis-E26	Huhn
fos	FBJ murine osteogenic sarcoma	Maus
jun	Avian sarcoma-17	Huhn
mos	Moloney sarcoma	Maus
mpl	Myeloproliferative leukemia	Maus
myb	Avian myeloblastosis	Huhn
myc	Avian myelocytomastosis	Huhn
raf	3611 murine sarcoma	Maus
rasH	Harvey sarcoma	Ratte
rasK	Kirsten sarcoma	Ratte
sis	Simian sarcoma	Affe
ski	Avian SK	Huhn
src	Rous sarcoma	Huhn
yes	Y73 sarcoma	Huhn

Tabelle 2-1 Beispiele für retrovirale Onkogene, nach [Cooper 1997]

2.2 DAS PROTOONKOGEN C-MYB

Das Onkogen v-myb und das korrespondierende Protoonkogen c-myb kodieren für kernständige, spezifisch DNA-bindende Proteine, die die Transkription von Zielgenen verstärken oder reduzieren [Biedenkapp et al., 1988; Majello et al., 1986; Weston und Bishop 1989]. Entdeckt wurde das myb-Onkogen ursprünglich als transformierendes Gen des *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV).

Das Protoonkogen c-myb wurde unter anderem in den Spezies Mensch (*homo sapiens*) [Majello et al., 1986], Maus (*mus musculus*) [Gonda et al., 1985], Huhn (*gallus gallus*) [Gerondakis und Bishop 1986], Taufliege (*Drosophila melanogaster*) [Peters et al., 1987], Getreide (*Hordeum vulgare*, *Zea mays*) [Marocco et al., 1989; Paz-Ares et al., 1987; Wissenbach et al., 1993] und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) [Tice-Baldwin et al., 1989] gefunden. Die Einordnung von Proteinen in die Familie der Myb-Proteine erfolgt dabei über folgende Konsensussequenz:

W-[ST]-(X)₂-E-[DE]-X₂-[LIV] [Swiss-Protein-Bank *Prosite*]

Eine Datenbanksuche mit dieser Konsensussequenz ergibt 33 Myb-verwandte Proteine, z.B. die der ets-Familie [Laget et al., 1993] und den eukaryontischen Transkriptionsterminationsfaktor TTF-1 [Evers und Grummt 1994].

C-myb kodiert in seiner Hauptpleißvariante ein Protein aus 636 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 75 kD. Es wird vor allem in erythroiden, myeloiden bzw. lymphoiden Vorläuferzellen exprimiert. In reifen, ausdifferenzierten Zellen ist c-myb m-RNA nicht, oder nur in geringem Maße nachweisbar [Golay et al., 1992; Gonda et al., 1982; Westin et al., 1982]. Transiente Transfektionen von c-myb mit retroviralen Promotoren in hämatopoetische Zellen inhibieren die Differenzierung und steigern die Proliferationsrate dieser Zellen [Clarke et al., 1988; McClinton et al., 1990]. Ferner kann die Expression von c-myb in embryonalen Hirnzellen, in verschiedenen Tumorzelllinien und verschiedenen humanen Melanomen nachgewiesen werden [Hijiya et al., 1994; Thiele et al., 1988]. Diese Ergebnisse legen eine wichtige

Rolle von c-Myb bei der Proliferation und Differenzierung nahe [Caracciolo et al., 1990; Golay et al., 1991]. C-myb deletierte (*knock out*) Mäuse zeigen bereits am 15. Tag ihrer Embryonalentwicklung eine letale Anämie, die auf ein Versagen der adulten Erythropoese zurückzuführen ist [Mucenski et al., 1991].

Aus einer T-Zellen c-DNA-Bibliothek wurden durch Hybridisierung zwei weitere Gene mit begrenzter Homologie zu c-myb kloniert (A-myb und B-myb) [Nomura et al., 1988]. A-myb scheint in der Spermatogenese eine proliferationsstimulierende Funktion zu besitzen, analog der Funktion c-myb in der Hämatopoese [Mettus et al., 1994].

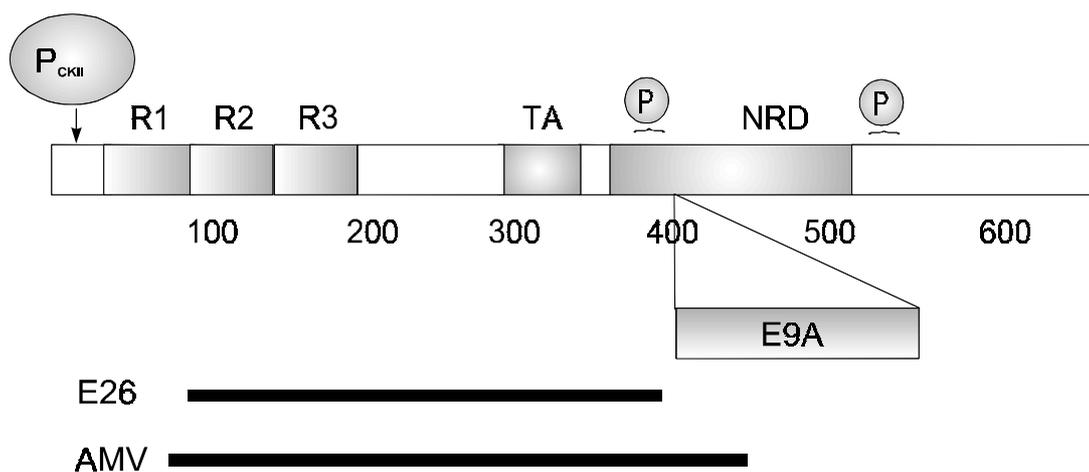


Abbildung 2-2 Schematischer Aufbau des c-Myb Proteins modifiziert nach [Lüscher und Eisenman 1990]

P _{CKII} :	Phosphorylierungsstellen für Casein-Kinase II
R1,R2,R3:	DNA-Bindungsregion
TA:	Transaktivierungsdomäne
P:	Phosphorylierungsstellen
NRD:	negativ regulierende Domäne
E9A:	alternatives c-Myb aus Maus (enthält zusätzliches Exon und ist damit 85 kD groß \triangleq 760 AS.)
E26:	Länge des Myb-Anteils am p135 ^{gag-myb-ets} Protein
AMV:	Länge von v-Myb aus AMV

Die viralen, krebsauslösenden Formen von Myb (AMV, E26) wurden als verkürzte Versionen des Transkriptionsfaktors c-Myb erkannt [Weston und Bis-

hop 1989]: ihnen fehlen wesentliche Bestandteile wie die Casein-Kinase II Phosphorylierungsstelle und die negativ regulierende Domäne (siehe Abbildung 2-2). Zur onkogenen Aktivierung von Myb scheint ein Verlust seiner negativ regulierenden Bestandteile und eine konstitutive Expression in dieser verstümmelten Form notwendig zu sein.

Myb erkennt und bindet spezifisch DNA. Man konnte als Erkennungssequenz (MRE: *Myb Responsive Element*) für das Myb-Protein die Sequenz YAACKG mittels *DNAse Footprinting* identifizieren [Biedenkapp et al., 1988]. Diese Sequenz konnte in einem Selektions-Experiment (*Site-Selection Assay*) auf YAACKGHH erweitert werden [Weston 1992]. Alle folgenden Versuche, die Bindungssequenz genauer zu definieren bzw. zu erweitern, untermauerten lediglich die Bedeutung des Kernmotivs AAC [Howe und Watson 1991; Nakagoshi et al., 1990; Weston 1992].

Gen	Spezies	Aktivität	Ref.
Adenosin Rezeptor 2 B	Huhn	A	[Worpenberg et al., 1997]
CD 34	Mensch	A	[Melotti et al., 1994]
mim-1	Huhn	A	[Ness et al., 1989]
cdc-2	Mensch	A	[Furukawa et al., 1990]
ADA	Mensch	A	[Ess et al., 1995]
c-myb	Mensch	A	[Nicolaidis et al., 1991]
c-myc	Maus	A	[Evans et al., 1990]
c-myc	Mensch	A	[Nakagoshi et al., 1992]
CD13/APN	Mensch	A	[Shapiro 1995]
CD4	Maus	A	[Siu et al., 1992]
HTLV-1 LTR	Viral	A	[Dasgupta et al., 1990]
lck type I	Mensch	A	[McCracken et al., 1994]
Pax6/Pax-QNR	Wachtel	A	[Plaza et al., 1995]
SV40 Enhancer	Affe	A	[Nakagoshi et al., 1990]
TCR delta Enhancer	Mensch	A	[Hernandez-Munain und Krangel 1994]
BMRF 1(EBV)	viral	A	[Kenney et al., 1992]
Hsp 70	Mensch	A	[Foos et al., 1993]
GATA-1	Maus	A	[Aurigemma et al., 1992]
IGF-I	Maus	A	[Reiss et al., 1991]
Rem-I	Huhn	A	[Kraut et al., 1995]
c-erbB-2	Mensch	R	[Mizuguchi et al., 1995]
c-fms	Mensch	R	[Reddy et al., 1994]
	Maus		

Tabelle 2-2 Liste der potentiell von Myb-Proteinen regulierten Genen. A=Aktivierung; R=Repression. Modifiziert nach [Ness 1996].

In Tabelle 2-2 sind einige der Gene aufgeführt, deren Promotoren Bindungsstellen für c-Myb enthalten und potentiell durch c-Myb reguliert werden. Nachgewiesen (z. B. durch differentielle Expression) sind dabei lediglich die Regulation des *mim-1* und Adenosin Rezeptors 2 B.

2.2.1 DIE DNA-BINDUNGSDOMÄNE

Im aminoterminalen Bereich des Proteins befinden sich drei zueinander homologe Regionen (*Repeats*) (R1; R2; R3) von je 51-52 Aminosäuren, die die DNA-Bindungsregion bilden. In jedem dieser *Repeats* kommen drei, durch jeweils 18 bzw. 19 Aminosäuren voneinander getrennte, Tryptophanreste vor. R2 und R3 zeichnen sich durch einen relativ hohen Anteil (23%) an basischen Aminosäuren aus.

In Jahre 1994 wurde die Struktur des zweiten und dritten *Repeats* im Komplex mit DNA gelöst [Ogata et al., 1994]. R3 besteht aus drei α -Helices, von denen die beiden carboxyterminal gelegenen ein *Helix-Turn-Helix* Motiv ausbilden. Zwei der konservierten Tryptophanreste bilden zusammen mit einem Histidin einen hydrophoben Kern und stabilisieren so die *Helix-Turn-Helix* Struktur [Kanei-Ishii et al., 1990; Ogata et al., 1992]. In der dritten Helix des zweiten *Repeats* und in der dritten Helix des dritten *Repeats* liegen die für die spezifische DNA Erkennung verantwortlichen Aminosäuren [Gabrielsen et al., 1991; Ogata et al., 1994]. Wie in Abbildung 2-3 dargestellt, liegen die Erkennungshelices in der großen Grube und überlappen teilweise, was an dem sehr geringen Abstand liegt, den beide *Repeats* zueinander einnehmen [Ness 1996].

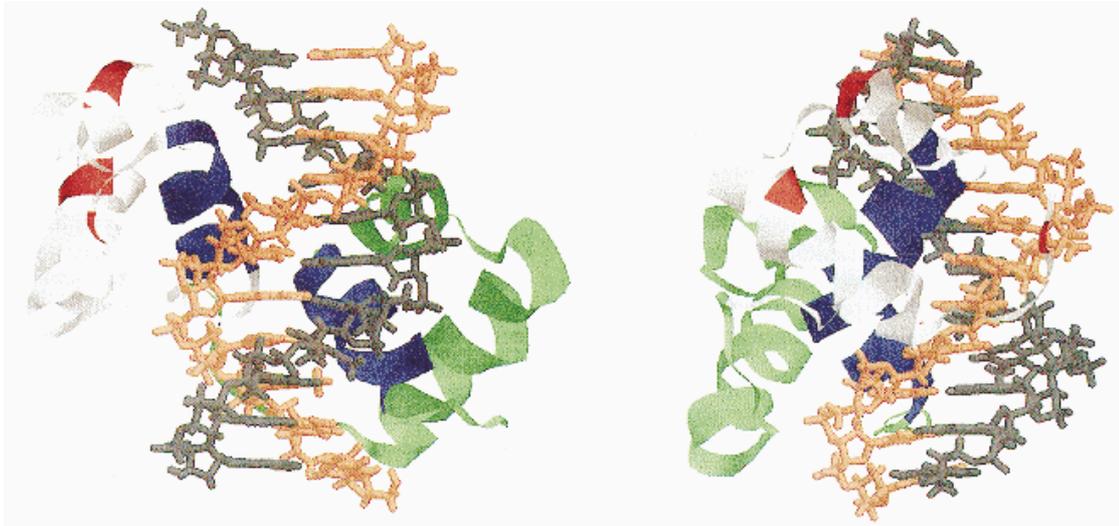


Abbildung 2-3 Struktur des R2R3-DNA-Komplexes. R2 ist in weiß, R3 in grün dargestellt. Die dritte Helix beider *Repeats* ist blau eingefärbt. Entnommen aus [Ness 1996].

Wie in Abschnitt 2.2 erwähnt, bindet das c-Myb Protein spezifisch an die Sequenz YAACKGHH. Ogata et al. identifizierten durch NMR-Experimente die an der Erkennung der Basensequenz- (*direct read out*) und an Kontakten zum Zucker-Phosphat-Rückgrat (*indirect read out*) beteiligten Aminosäuren aus *Repeat* zwei und drei. Das Kernmotiv AAC wird dabei hauptsächlich von *Repeat* 3 (siehe Abbildung 2-4) erkannt, und zwar mit den Aminosäuren N179, K182, N183, N186, S187, sowie E132 und N136 aus dem zweiten *Repeat* [Ogata et al., 1994].

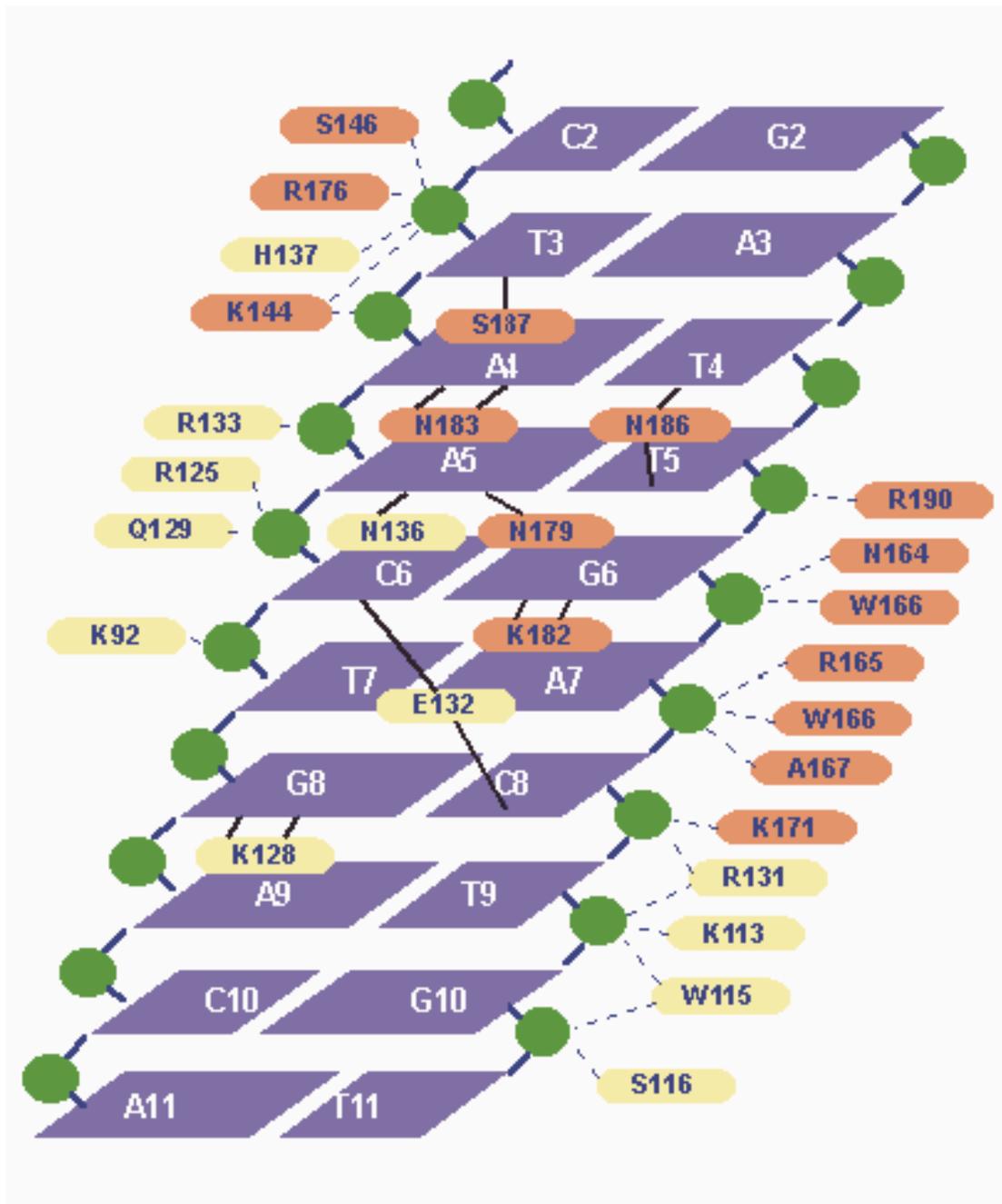


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung der c-Myb R2R3-DNA Interaktionen. Dargestellt sind die Basen (blau), Phosphate (grün), Aminosäuren von *Repeat 2* (gelb) und *Repeat 3* (rot). Modifiziert nach [Ogata et al., 1994].

Aminosäure	kontaktierte Base	Abstand[Å]
K128	G8	2,8
E132	C8	3,3
E132	C6	2,8
N136	A5	4,0
N179	A5	4,7
K182	G6	2,8
N183	A4	2,8
N186	T4	4,8
N186	T5	5,4
S187	T3	3,2

Tabelle 2-3 Abstand der am *direct read out* beteiligten Aminosäuren von den von ihnen kontaktierten Basen (gemessen als Abstand der Heteroatome möglicher Wasserstoffbrücken). Die Nummerierung der Basen bezieht sich auf Abbildung 2-4.

Obwohl in einem Vergleich der Primärstrukturen von R2 und R3 große Homologien zu erkennen sind, besitzt R2 eine flexiblere Struktur als R3 [Ebneht et al., 1994; Jamin et al., 1993]. Das *Helix-Turn-Helix* Motiv von R2 wird vermutlich erst bei der DNA-Bindung ausgebildet. Innerhalb von R2 findet man einen konservierten Cysteinrest (Cys 130), dessen Thiol-Gruppe frei zugänglich ist. Die Reduktion dieses Cystein-Restes ist essentiell für die Fähigkeit des Myb-Proteins DNA zu binden und wird durch den Redoxfaktor Ref-1 kontrolliert. Offensichtlich verhindert ein oxidiertes Cystein 130 die korrekte Faltung der dritten Helix des zweiten *Repeats* während der DNA-Bindung [Ebneht et al., 1994; Guehmann et al., 1992]. Die DNA-Bindung kann ebenfalls durch Nitrosylierung des Cysteins 130 und durch GTP (>2 mM) inhibiert werden, wobei der Mechanismus der GTP-Inhibition ungeklärt ist [Gabrielsen 1997].

In Denaturierungsexperimenten wurde R1 als thermisch stabilster *Repeat* identifiziert. Durch Mutationsanalysen stellte man fest, daß er für die Bindung von Myb an DNA entbehrlich ist [Howe et al., 1990]. Allerdings konnten in Anwesenheit von R1 höhere Bindungskonstanten der spezifischen Protein-DNA-Wechselwirkung bestimmt werden als ohne diesen *Repeat*, wogegen die Bindungsaffinität zur unspezifischen DNA unverändert blieb. Hieraus wurde geschlossen, daß R1 die Diskriminierung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung verstärkt. CD-Experimente zeigen, daß der α -Helix-

Anteil der DNA-Bindungsdomäne R123 bei spezifischer Bindung um ca. 10% steigt [Ebnet et al., 1994]. Bei der Bindung an unspezifische DNA ist dieses Verhalten nicht zu finden. Die Sekundärstruktur von R23 bleibt sowohl bei spezifischer, als auch bei unspezifischer Bindung unverändert, daraus wurde die Hypothese aufgestellt, daß R1 die Konformationsumwandlung von R2 während der Bindung stabilisiert. Wie auch für andere Transkriptionsfaktoren beschrieben, führt die spezifische Bindung von c-Myb zu einer Biegung (*bending*) der DNA [Saikumar et al., 1994].

2.2.2 DIE TRANSAKTIVIERUNGSDOMÄNE

Zwischen den Aminosäuren 275 und 325 befindet sich eine Transaktivierungsdomäne (TA), die durch Aktivierungsstudien eines Fusionsproteins aus der DNA-Bindungsdomäne von Gal4 und verschiedenen Varianten des transaktivierenden Bereiches aus c-Myb eingegrenzt werden konnte [Bortner und Ostrowski 1991; Lane et al., 1990; Sakura et al., 1989]. Die Transaktivierungsdomäne weist einen hydrophilen und leicht aziden Charakter auf, wie er auch bei vielen anderen Transkriptionsfaktoren zu beobachten ist [Ptashne 1988]. Es ist nicht geklärt, ob die Azidität der Region zur Transaktivierung ausreicht, eine besondere Struktur notwendig ist, oder beide Eigenschaften gleichzeitig erforderlich sind. Eine Deletion von elf Aminosäuren in dieser Region, die die Gesamtladung nur wenig verändert, zerstört die Fähigkeit von Myb zur Transaktivierung vollständig [Weston und Bishop 1989].

Eine maximale Transaktivierung durch c-Myb erfordert noch weitere C-terminal gelegene Aminosäuren [Chen et al., 1995], die durch die saure Region von VP16 ersetzt werden können [Frampton et al., 1993]. Kürzlich konnte der Bereich auf 10 Aminosäuren EFAETLQF(I/L)D eingegrenzt werden, dem sogenannten FAETL-Motiv [Fu und Lipsick 1996].

2.2.3 DIE NEGATIV REGULIERENDE DOMÄNE

Der Bereich zwischen Aminosäure 350 und 500 verringert sowohl die Transaktivierung [Sakura et al., 1989], als auch die Transformation [Kanei-Ishii et al., 1992] und die DNA-Bindung [Ramsay et al., 1991]. Eine Deletion dieser negativ regulierenden Domäne (NRD) bewirkt einen zehnfachen Anstieg der Myb-spezifischen Transaktivierung [Hu et al., 1991; Kalkbrenner et al., 1990; Ramsay et al., 1991; Sakura et al., 1989]. Auf welche Weise diese negative Regulation zustande kommt, ist nicht bekannt. Es wird die Möglichkeit eines zellulären Inhibitors diskutiert, der die Affinität von Myb zu seiner spezifischen Erkennungssequenz moduliert. Versuche, in denen eine Kotransfektion verschiedener c-Myb- und v-Myb-Konstrukte mit dem carboxyterminalen Ende von Myb durchgeführt wurden, zeigten eine Stimulation der Transaktivierung. Dieser Befund wäre durch einen Inhibitor erklärbar, der von der kotransfizierten NRD gebunden wird [Vorbrueggen et al., 1994]. Ein alternatives Modell diskutiert die Interaktion des C-Terminus von c-Myb mit der DNA-Bindungsdomäne (siehe Abbildung 2-6 A). Es konnte nämlich mit den Aminosäuren 541 bis 567 ein Bereich identifiziert werden, der in der Lage ist, mit der DNA-Bindungsdomäne wechselzuwirken [Kiewitz und Wolfes 1997]. Nur wenige Aminosäuren N-terminal von diesem Bereich befindet sich das von Dash entdeckte EVES-Motiv. Dieser unter den Myb-Proteinen hochkonservierte Bereich findet sich ebenfalls im Protein p100 (siehe Abbildung 2-5) und ist in der Lage, mit der DNA-Bindungsdomäne zu interagieren (siehe Kapitel 2.2.5 und Abbildung 2-6 B). Die Bindungsfähigkeit dieses Motivs wird durch Phosphorylierung des Serin 532 moduliert [Dash et al., 1996].

2.2.4 PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN

Aminoterminal sind Phosphorylierungsstellen der Casein Kinase II (CKII) lokalisiert. Eine Phosphorylierung an Ser-11 bzw. Ser-12 bewirkt *in vivo* eine Verringerung der Bindungsaffinität von Myb an seine Erkennungssequenz [Lüscher et al., 1990]. Ein Protein, in dem die Serine 11 und 12 zu Alanin (ähnliche Raumerfüllung wie Serin, aber keine Ladung) mutiert wurden, bindet um den Faktor sechs besser als bei Aspartat (Carboxylgruppe des Aspartat imitiert die negative Ladung des phosphorylierten Zustandes) an dieser Position [Oelgeschläger et al., 1995]. Es existieren jedoch auch Berichte, nach denen eine Phosphorylierung in diesem Bereich die DNA-Bindung verbessern soll [Ramsay et al., 1995]. Trotz der geringen Effekte auf die Bindungsstärke könnte die Phosphorylierung an Ser-11 bzw. Ser-12 ein Regulationselement der Transkriptionsaktivität von Myb darstellen, da die Aktivität der CKII von Wachstumsfaktoren abhängig ist. Die Regulation könnte auf einer Modulation der Auswahl von Bindungsplätzen beruhen, die alle zu der relativ unbestimmten Konsensussequenz passen.

Im Bereich der negativ regulierenden Domäne wurden weitere Phosphorylierungsstellen (Serin- und Threoninreste) für die zellzyklusspezifische p34^{cdc2}-Kinase [Pines und Hunter 1990] gefunden. Es konnte ferner demonstriert werden, daß Myb-Proteine zellzyklusspezifischen Phosphorylierungen unterliegen, speziell Phosphorylierungen während der Mitose [Lüscher und Eisenman 1992]. Phosphorylierungsstellen (z.B. Serin 532) der p42^{mapk}-Kinase [Aziz et al., 1993] stellen außerdem eine Verbindung zwischen dem MAP Kinase Weg und dem Myb-Protein her. Obwohl eine Mutation von Serin 532 zu Alanin c-Myb nicht in ein transformierendes Protein konvertiert, führt es doch zu verstärkter Transaktivierungsaktivität in Transfektionsstudien. Daher wird ein negativ regulierender Effekt der Phosphorylierung diskutiert [Aziz et al., 1995]. Ob die Phosphorylierung an dieser Position *in vivo* eine Rolle spielt, und durch welche Kinase aus der MAPK-Familie sie katalysiert wird, ist nicht bekannt.

2.2.5 KOFAKTOREN

Die Proteine NF-M, C/EBP β , p100, p300 und CBP wurden als Kofaktoren von c-Myb nachgewiesen.

NF-M (*nuclear factor of myoid cells*) ist ein DNA-bindendes Protein mit C-terminal lokalisierter Dimerisierungsdomäne (*leucine zipper*) und DNA-Bindungsdomäne. Das Protein bewirkt *in vivo* eine Verstärkung der von Myb modulierten Aktivierung des mim-Promotors. NF-M, bzw. das ihm homologe C/EBP β (*CCAAT-Box Enhancer Binding Protein beta*), werden von Antikörpern gegen Myb kopräzipitiert, direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen konnten allerdings nicht nachgewiesen werden [Ness 1996; Ness et al., 1993].

Vor kurzem [Akimaru et al., 1997] wurden mit p300 und CBP Proteine entdeckt, die durch Protein-Protein Interaktionen einen ternären Komplex mit zwei weiteren Proteinen ausbilden, also quasi eine Brücke zwischen den Faktoren darstellen (*bridging proteins*).

CBP (*Creb binding protein*) wurde als Wechselwirkungspartner des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP responsive-binding-protein*) identifiziert [Arias et al., 1994; Crivia et al., 1993; Eckner et al., 1994; Kwok et al., 1994]. CREB kann am Serin 133 durch die Proteinkinase A phosphoryliert werden, was die Bindung an CBP induziert und zu einer gesteigerten Transaktivierung führt [Crivia et al., 1993; Gonzales und Montminy 1989]. CBP besitzt mehrere Wechselwirkungsdomänen, mit denen es verschiedene Proteine kontaktieren kann. Am N-Terminus ist eine Domäne lokalisiert, die mit dem TATA-Bindungsprotein wechselwirkt [Swope et al., 1996]. Im Bereich zwischen Aminosäure 462 und 661 liegen die Bindungsdomänen für CREB, c-Jun und c-Myb, die zwar überlappen, aber nicht identisch sind [Oelgeschläger et al., 1996]. Weiter C-terminal in CBP findet man ein Zinkfinger-Motiv, das mit den Bindungsdomänen für c-Fos und TFIIB überlappt [Kwok et al., 1994]. Von Kiewitz konnte 1997 die Myb-Wechselwirkungsdomäne mit CBP auf den Bereich zwischen Aminosäure 317 und 342 eingegrenzt werden [Kiewitz und Wolfes 1997]. Im Gegensatz zu CREB ist die Bindung von Myb an CBP un-

abhängig vom Phosphorylierungszustand des Proteins [Oelgeschläger et al., 1996]. Das Protein p300 kann sowohl in der Bindung zu c-Myb, als auch in der zu CREB, CBP substituieren [Mink et al., 1997].

Ferner konnte der Faktor p100 identifiziert werden, der Affinität sowohl zu NF-M, als auch zu Myb aufweist. p100 wurde ursprünglich identifiziert als EBNA-2 (Epstein-Barr Virus) bindendes Protein [Tong et al., 1995] und zeigt Homologien zu einem Bereich des C-Terminus von c-Myb. Sowohl das Protein p100 als auch der C-Terminus von Myb können an die DNA-Bindungsdomäne von c-Myb binden, was einen Regulationsmechanismus über intra- und intermolekulare Konkurrenz nahelegt [Dash et al., 1996]. Da p100 ebenfalls an den Transkriptionsfaktor TFIIE bindet, könnte das Protein eine Brücke zur basalen Transkriptionsmaschinerie darstellen [Tong et al., 1995].

Durch Untersuchung der Proteine aus Zellkernextrakten, die an immobilisiertes c-Myb binden (*pull down assays*) wurden die Proteine (p27, p34, p45, p67, p75, p160) identifiziert, die als mögliche Kofaktoren für Myb diskutiert werden [Favier und Gonda 1994; Gonda et al., 1996]. Ihre Charakterisierung steht noch aus.

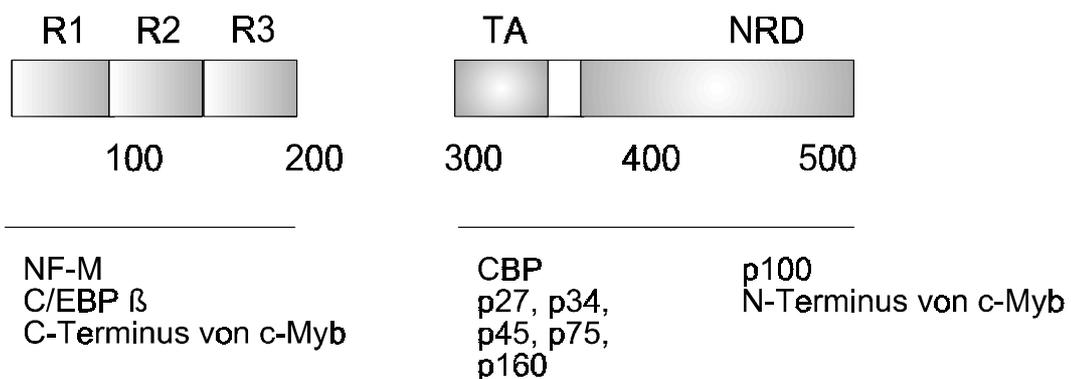


Abbildung 2-7 Darstellung der putativen Wechselwirkungen von c-Myb

2.3 ZIEL DER ARBEIT

Die hier vorgelegte Arbeit verfolgte zwei Ziele:

Expression von *full-length* c-Myb:

Bis heute ist es nicht gelungen, das c-Myb Protein in seiner vollständigen Länge zu exprimieren und in Mengen aufzureinigen, die für biophysikalische Untersuchungen ausreichen. Die Charakterisierung des Proteins bezieht sich immer nur auf isolierte Domänen. Ein Ziel der Arbeit war daher die Etablierung eines Expressionssystems, das die Herstellung von c-Myb ermöglicht.

Charakterisierung der DNA-Bindungsdomäne:

Die Struktur der *Repeats* zwei und drei der c-Myb DNA-Bindungsdomäne wurde vor kurzem durch NMR-Spektroskopie gelöst. Die in diesem Modell vorgeschlagene Zuordnung von Kontakten zwischen den Basen der DNA und den Aminosäuren des Proteins sollte durch Mutagenesestudien überprüft werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

In diesem Kapitel werden die für die Durchführung der Arbeit wichtigen Methoden beschrieben. Molekularbiologische Methoden, wie Agarose-Gelelektrophorese, DNA-Sequenzierungen, Restriktionsspaltungen, Phosphorylierungen von Oligodesoxynukleotiden, Ligationen, etc. wurden wie in Standardwerken beschrieben ausgeführt [Ausubel et al., 1996]. Für Plasmidpräparation, Elution von DNA aus Agarosegelen und Aufreinigung von PCR-Produkten wurden Materialien der Fa. Qiagen eingesetzt und nach deren Vorschriften verwendet [Qiagen 1996].

3.1 CHEMIKALIEN , ENZYME UND VERBRAUCHSMATERIAL

Verwendet wurden Chemikalien vom Reinheitsgrad *pro analysi* der Firmen Amersham-Life Science, AppliChem, AppligeneOncor, Biomol, Biozym, Clontech, Fluka, ICN, Merck, Pharmacia, Qiagen, Riedel-de-Haën, Serva, Stratagene und Sigma.

Restriktionsendonukleasen, Modifikationsenzyme und Polymerasen stammten von Amersham-Life Science, Boehringer-Mannheim, MBI-Fermentas, New England Biolabs, Stratagene und Qiagen.

Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Beckman, Boehringer, Eppendorf, Gilson, Kodak, Millipore, Nunc, Pharmacia, Qiagen, Schleicher & Schüll und Whatman bezogen.

3.2 ZUSAMMENSETZUNG VON PUFFERN UND MEDIEN

<u>100 x AA:</u>	5 mg/ml L-Glutamat
	5 mg/ml L-Methionin
	5 mg/ml L-Lysin
	5 mg/ml L-Isoleucin

<u>500 x B</u>	0,2 mg/ml Biotin
<u>BMGY</u>	1 %(w/v) <i>Yeast extract</i> 2 %(w/v) Pepton 0,67 %(w/v) <i>Yeast Nitrogen Base</i> 0,2 %(v/v) 500 x B 10 %(v/v) 10 x GY 10 %(v/v) 1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,0
<u>BMMY</u>	1 %(w/v) <i>Yeast extract</i> 2 %(w/v) Pepton 0,67 %(w/v) <i>Yeast Nitrogen Base</i> 0,2 %(v/v) 500 x B 10 %(v/v) 10 x M 10 %(v/v) 1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,0
<u>Break-Puffer</u>	50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4 1 mM PMSF 1 mM EDTA 5 % (v/v) Glycerin
<u>10 x GY</u>	10 % (v/v) Glycerin
<u>High-salt Puffer</u>	20 mM HEPES, pH 7,9 bei 4°C 25 %(v/v) Glycerin 0,5 M KCl 0,2 mM EDTA 0,2 mM PMSF 0,5 mM DTT

IM 1 x M9-Salze
 0,2 % (w/v) Caseinhydrolysat
 0,5 % (w/v) Glucose
 1 mM MgCl₂

LB-Medium: 1 % (w/v) Caseinhydrolysat
 1 % (w/v) Yeast-Extrakt
 0,5 % (w/v) NaCl

pH auf 7,5 einstellen und autoklavieren

für Agarplatten 1,5 % Agar vor dem Autoklavieren zusetzen

Lysispuffer: 20 mM Tris pH 8,0
 150 mM NaCl
 1% (v/v) NP40
 5 mM EDTA
 1 mM PMSF

10 x M 5 % (v/v) Methanol

10 x M9-Salze 420 mM Na₂HPO₄
 220 mM KH₂PO₄
 85 mM NaCl
 180 mM NH₄Cl

MD 1 %(w/v) D-Glucose
 0,67 %(w/v) YNB
 3 %(w/v) Agar
 0,2 %(v/v) 500 x B

<u>MGY</u>	0,67 % (w/v) YNB
	0,2 % (v/v) 500 x B
	10 % (v/v) 10 x GY
<u>MM</u>	0,67 % (w/v) YNB
	0,2 % (v/v) 500 x B
	10 % (v/v) 10 x M
<u>PBS</u>	136 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	4,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
<u>Puffer A</u>	1 M Sorbitol
	10 mM Bicin pH 8,35
	3 % (w/v) Ethylenglycol
<u>Puffer B</u>	40 % (w/v) Polyethylenglycol 1000
	0,2 M Bicin pH 8,35
<u>Puffer C</u>	0,15 M NaCl
	10 mM Bicin pH 8,35
<u>RM</u>	1 x M9-Salze
	2 % (w/v) Caseinhydrolysat
	1 % (v/v) Glycerin
	1 mM MgCl ₂

SDGlu

0,67	%(w/v)	YNB
1	%(w/v)	D-Glucose
10	µg/ml	Adeninsulfat
40	µg/ml	Arginin
20	µg/ml	Histidin
60	µg/ml	Isoleucin
60	µg/ml	Leucin
50	µg/ml	Lysin
20	µg/ml	Methionin
50	µg/ml	Phenylalanin
200	µg/ml	Threonin
50	µg/ml	Tyrosin

für Agarplatten 3 % Agar vor dem Autoklavieren zusetzen

SDGal

0,67	%(w/v)	YNB
1	%(w/v)	Galactose
10	µg/ml	Adeninsulfat
40	µg/ml	Arginin
20	µg/ml	Histidin
60	µg/ml	Isoleucin
60	µg/ml	Leucin
50	µg/ml	Lysin
20	µg/ml	Methionin
50	µg/ml	Phenylalanin
200	µg/ml	Threonin
50	µg/ml	Tyrosin

<u>TFBI:</u>	30 mM	Kaliumacetat
	100 mM	RbCl
	50 mM	CaCl ₂
	15 % (v/v)	Glycerin

pH auf 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

<u>TFBII:</u>	10 mM	MOPS
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	RbCl
	15 % (v/v)	Glycerin

<u>YPD</u>	1 % (w/v)	Yeast extract
	2 % (w/v)	Pepton
	3 % (w/v)	Agar (für Festmedien)

3.3 ARBEITEN MIT PROKARYONTEN

3.3.1 PLASMIDE FÜR *E. COLI*

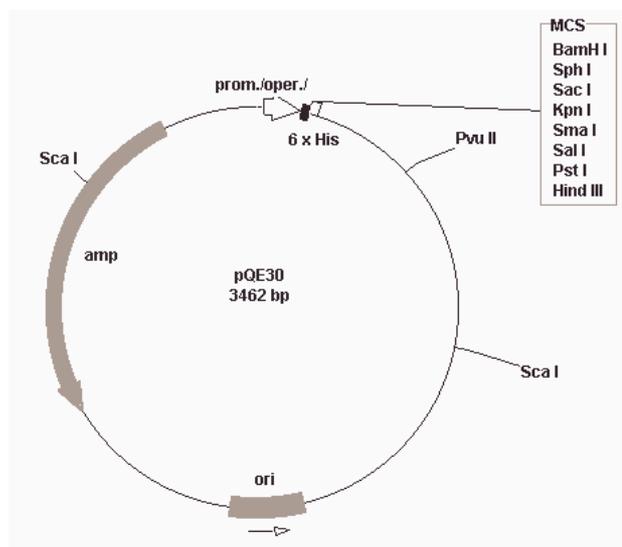


Abbildung 3-1 pQE 30

Dieser Vektor wird von der Fa. Qiagen vertrieben und enthält das Ampicillin-Resistenzgen, den Col E1-Ori, einen T5-Promotor, eine *multiple cloning site* (MCS) und die für sechs Histidine kodierende Sequenz. Der T5-Promotor besteht aus dem T5-Phagen Promotor P_{N25} und dem lac Operator, er ist mit IPTG induzierbar. Die mit dem

exprimierten Protein fusionierten sechs Histidine ermöglichen eine affinitätschromatographische Aufreinigung mit Ni^{2+} NTA-Agarose. Ferner wurde das Plasmid pQE3 verwendet, das keinen $(\text{His})_6$ -tag und eine andere MCS besitzt.

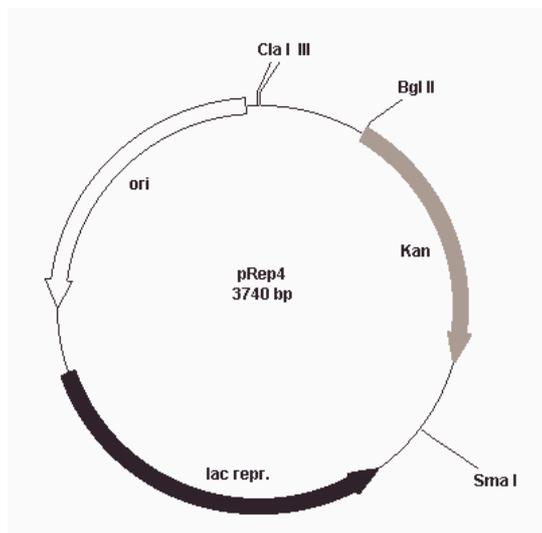


Abbildung 3-2 pRep4

Das Plasmid pRep4 wird ebenfalls von der Fa. Qiagen vertrieben. Es besitzt eine Kanamycin-Resistenz und kodiert einen konstitutiv exprimierten lac-Repressor. Das Plasmid ist kompatibel zu allen ColE1-Ori enthaltenden Plasmiden und wird in *E.coli*-Stämmen eingesetzt, die nicht genügend Repressor zur Regulation IPTG induzierter Promotoren produzieren.

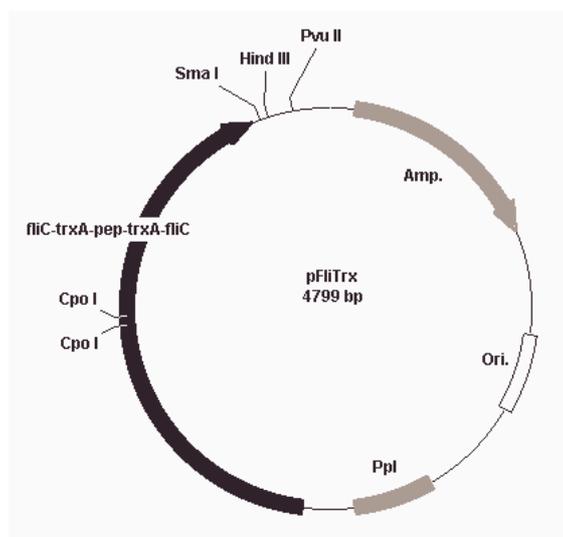


Abbildung 3-3 pFliTrx

Das Plasmid pFliTrx stammt von der Fa. Invitrogen. Außer der Ampicillin-Resistenz enthält das Plasmid die Sequenz eines Fusionsproteins, bestehend aus dem N-terminalen Domäne von FliC dem aktiven Zentrum von Thioredoxin und dem C-terminalen Ende von FliC. Das Fusionsprotein steht unter der Kontrolle des P_L -Promotors. Im aktiven Zentrum des Thiore-

doxin werden 12 Aminosäuren lange *random* Peptide exprimiert. Das Fusionsprotein wird auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert.

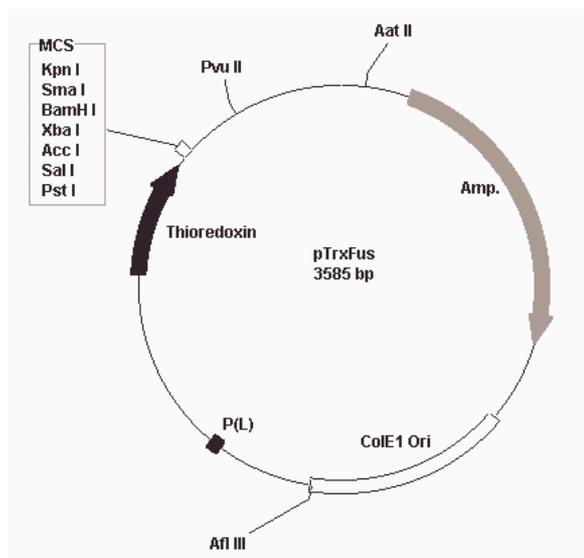


Abbildung 3-4 pTrxFus

Das Plasmid pTrxFus stammt von der Fa. Invitrogen. Außer der Ampicillin-Resistenz und em ColE1 Ori enthält das Plasmid die für Thioredoxin kodierende Sequenz unter der Kontrolle des P_L -Promotors. Dadurch ist es möglich, Fusionsproteine zu erzeugen, die anschließend über eine Affinitätsmatrix (Thibond, Fa. Invitrogen) aufgereinigt werden können. Zwischen Fusionsanteil und Zielprotein befindet sich eine Enterokinase-Spaltstelle. Neben dem pTrxFus wird auch noch das Plasmid pTrx benutzt, das weder eine *multiple cloning site* noch die Enterokinase-Spaltstelle besitzt, ansonsten jedoch identisch ist. Es wird für die Konstruktion eines Plasmids zur Koexpression von Thioredoxin benutzt.

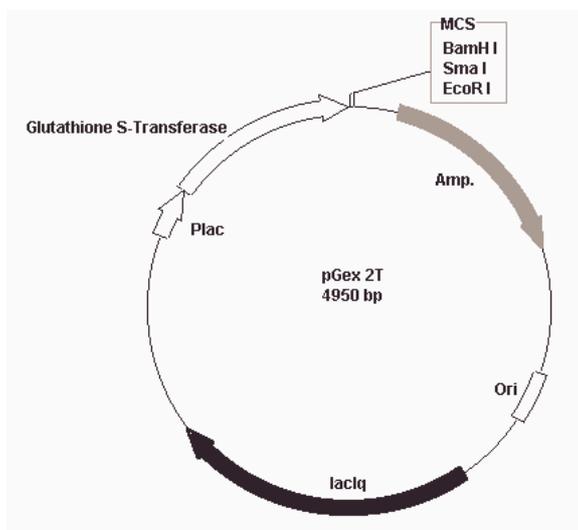
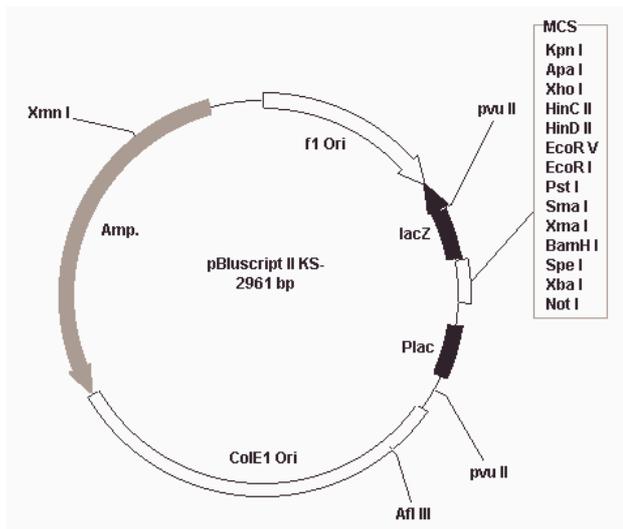


Abbildung 3-5 pGex2T

Das Plasmid pGex2T wurde von der Firma Pharmacia bezogen und dient als Expressionsvektor von GST-Fusionsproteinen unter Kontrolle des lac-Promotors. Die Proteine können über GSH-Sepharose aufgereinigt, und der Fusionsanteil mittels einer Protease (Thrombin) abgespalten werden. Das Plasmid besitzt eine Ampicillin-Resistenz und produziert gleichzeitig den lac-Repressor.

Das Plasmid pGex2T wurde von der Firma Pharmacia bezogen und dient als Expressionsvektor von GST-Fusionsproteinen unter Kontrolle des lac-Promotors. Die Proteine können über GSH-Sepharose aufgereinigt, und der Fusionsanteil mittels einer Protease (Thrombin) abgespalten werden. Das Plasmid besitzt eine Ampicillin-Resistenz und produziert gleichzeitig den lac-Repressor.



Das Plasmid pBluescript (Fa. Pharmacia) wurde als Klonierungsvektor für Zwischenklonierungen benutzt, weil es eine vielseitige *multiple cloning site* enthält. Das Plasmid vermittelt die Ampicillin-Resistenz.

Abbildung 3-6 pBluescript II KS

3.3.2 VERWENDETE STÄMME

3.3.2.1 LK111(λ)

$r_k^- m_k^-$, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *tonA21*, *supE44*, *lacI^qZΔM15*, Hfr, λ^+ .

3.3.2.2 BL21(DE3)

ompT, RB-mB-, *gal* (λ clts857, *ind 1S*, *am7*, *nin5*, *lacUV*, 5-T7, *Gen1*)

3.3.2.3 TG I

K12, $\Delta(lac-pro)$, *supE*, *thi*, *hsdΔ5/F'*, *traD36*, *proA⁺B⁺*, *lacI^q*, *lacZΔM15*

3.3.2.4 GI 698 BZW. GI 724

F, λ^- , *lacI^q*, *lacPL8*, *ampC::P_{trp}cl*, (GI 698 besitzt keine Ribosomenbindungsstelle vor dem *cl* Repressor-Gen, das führt im Vergleich zu GI 724 zu verringerter Repressor-Produktion.)

3.3.2.5 GI 826

F, *lacI^q*, *ampC::P_{trp}cl*, Δ *fliC*, Δ *motB*, *eda::TnIO*.

3.3.3 HERSTELLUNG UND TRANSFORMATION KOMPETENTER ZELLEN

Die Zellen wachsen in 250 ml LB-Medium (+20 mM MgSO₄) bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀=0,5 und werden dann abzentrifugiert (5 min, 4.000 g, 4°C). Das Sediment wird in 100 ml eiskaltem TFBI resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4.000 g, 4°C) werden die Zellen in 10 ml kaltem TFBII aufgenommen und für 15-60 min auf Eis inkubiert. Danach werden sie zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C gelagert.

Zur Transformation wird ein Aliquot mit DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 sec. Hitzeschock bei 42°C setzt man 900 µl LB-Medium zu, inkubiert weitere 60 min bei 37°C und plattiert auf Selektivmedium aus.

3.3.4 ANZUCHT- UND INDUKTIONSBEDINGUNGEN

3.3.4.1 PQE30, BZW. PGEX2T

Diese Plasmide werden in den Stämmen LK111(λ), oder TG I eingesetzt.

Aus einer über Nacht inkubierten Vorkultur werden 500 ml LB^{amp} angeimpft (maximale Zelldichte ca. OD₆₀₀=0,1) und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer Zelldichte von OD₆₀₀=0,7-0,9 setzt man IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1-2 mM (0,1 mM für pGex2T) zu und lässt die Kultur 2 h weiter wachsen. Die Zellen werden abzentrifugiert (10 min, 4.000 g, 4°C), in PBS (unter Zusatz von 1M NaCl) resuspendiert und entweder eingefroren oder aufgeschlossen (siehe Kapitel 3.3.5).

3.3.4.2 PFLITRX

Diese Plasmide werden in Zellen des Stammes GI826 eingesetzt.

Die Zelldichte einer über Nacht inkubierten Vorkultur (RM-Medium, 25°C) wird bestimmt. 1×10^{10} Zellen werden in 50 ml IM-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 100 µg/ml Tryptophan) überführt. Diese Kultur wird für 6 h unter Schütteln inkubiert (25°C) und abzentrifugiert. Die Zellen werden dann auf Expression, bzw. Präsentation des Fremdproteins (siehe Kapitel 3.3.6) untersucht.

3.3.4.3 PTRXFUS

Bei Verwendung des Stammes GI 698 verlaufen alle Inkubationen vor der Induktion bei 30°C, bei Verwendung von GI 724 bei 37°C.

Ein Aliquot einer über Nacht inkubierten Vorkultur (RM-Medium) wird 1:20 mit IM-Medium verdünnt und bis zu einer Zelldichte von $OD_{600}=0,5$ inkubiert. Nach Zugabe des Induktors Tryptophan (Endkonzentration 100 µg/ml) wird ein bis vier Stunden bei 37°C inkubiert.

3.3.5 ZELLAUFSCHLUSS

Nach der Zentrifugation werden die Zellen in PBS (0,1 mM PMSF, 1M NaCl) resuspendiert und unter Eiskühlung mit Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonofier 250, 50% Duty-Cycle, 50% Output, 6 x 15 sec, Spitzendurchmesser 1 cm). Das Zell-Lysat wird durch eine weitere Zentrifugation (30 min, 6.000 g, 4°C) gewonnen.

3.3.6 DOT-BLOT MIT LEBENDEN ZELLEN

Die Zelldichte einer induzierten Kultur wird bestimmt und auf eine Dichte von $OD_{600}=8,0$ eingestellt. Von dieser Zellsuspension werden 10 μ l auf eine Nitrozellulosemembran überführt und 10 min bei 37°C getrocknet. Die Membran wird mit PBS (2% Milchpulver) geblockt. Die Detektion von Proteinen verläuft nach Standard Western-Blot Techniken [Ausubel et al., 1996].

3.4 ARBEITEN MIT EUKARYONTEN

3.4.1 PICHIA PASTORIS

Vor 25 Jahren wurde die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* erstmalig als Alternative zur Expression in *Saccharomyces cerevisiae* benutzt [Review: Romanos et al., 1992]. *Pichia pastoris* kann bis zu hohen Zelldichten (max. bis zu 100 g Trockenmasse/l) fermentiert werden und ist in der Lage, Methanol über einen singulären Stoffwechselweg zu verwerten [Veenuis et al., 1983]. Das erste Enzym dieses Stoffwechselweges ist die Alkoholoxidase (AOX). AOX ist in Zellen, die auf Glycerin, Glucose oder Ethanol als Kohlenstoffquelle kultiviert worden sind, nicht nachweisbar, macht aber bis zu 30% des löslichen Proteins von auf Methanol gewachsenen Zellen aus [Couderc und J. 1980].

Es sind zwei Gene für Alkoholoxidase (AOX1 und AOX2) bekannt. Beide Gene kodieren Proteine, die untereinander zu 97% homolog sind; unter Methanolinduktion macht jedoch das AOX1-Genprodukt 95% der Gesamtmenge an Alkoholoxidase aus [Cregg et al., 1989; Ellis et al., 1985; Koutz et al., 1989].

Die Regulation der Alkoholoxidase-Synthese erfolgt auf Ebene der Transkription [Cregg et al., 1993]. Dies macht den AOX-Promotor besonders attraktiv für die Expressionskontrolle von Fremdgenen, da die Induktion einfach (Wechsel des Mediums) und kostengünstig (Verwendung von Methanol

als Induktionsmittel) ist, sowie hohe Ausbeuten (bis zu 30% des löslichen Proteins) verspricht.

Für die Expression von Fremdproteinen benutzt man einen Hefestamm, bei dem das Gen für die Histidinol-Dehydrogenase deletiert wurde, und einen Vektor, der sowohl das 5' als auch das 3' Ende des AOX1-Gens trägt. Zur Transformation wird der Vektor linearisiert. Er rekombiniert über die homologen Bereiche des AOX-Gens stabil in das Genom (siehe Abbildung 3-7). Mit einer Häufigkeit von 5-35 % erfolgt die Integration in den AOX1-Genlocus [Invitrogen 1993]. Zwischen den beiden flankierenden Sequenzen befinden sich das zu exprimierende Fremdgen, sowie das HIS4-Gen als Selektionsmarker. Der Vektor kann außerdem noch ein Signal enthalten, das für die Sekretion des Proteins ins Medium verantwortlich ist.

Ist ein positiver, das Ziel-Protein exprimierender Klon identifiziert, so wird er in Glycerin-haltigem Medium kultiviert. Die Induktion erfolgt durch Wechsel der Kohlenstoffquelle des Mediums von Glycerin zu Methanol.

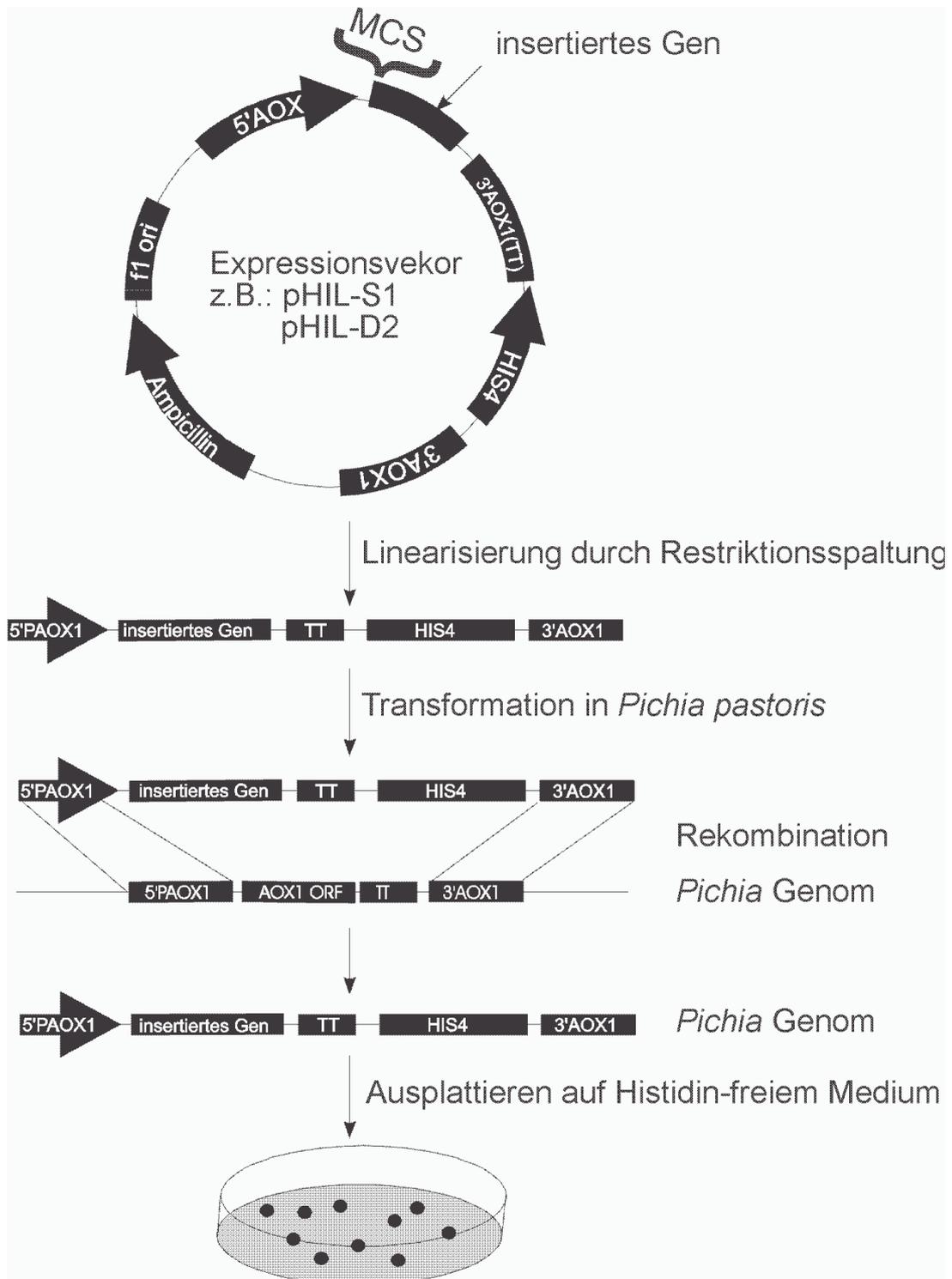


Abbildung 3-7 Schematische Darstellung einer Strategie zur Gewinnung rekombinanter *Pichia pastoris* Klone.

3.4.1.1 PLASMIDE FÜR *PICHTIA PASTORIS*

Sämtliche Plasmide stammen von der Fa. Invitrogen und enthalten eine Ampicillin-Resistenz für die Selektion in *E. coli*, sowie das His 4 Gen für die Selektion in *Pichia pastoris*.

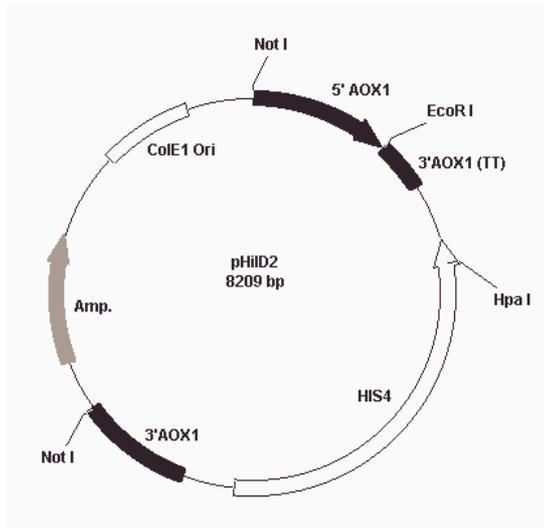


Abbildung 3-8 pHiID2

Der Vektor pHiID2 ist für intrazelluläre Expression von Proteinen entwickelt worden. Als Schnittstelle für die Klonierung von Fremdgenen steht *EcoR* I zur Verfügung.

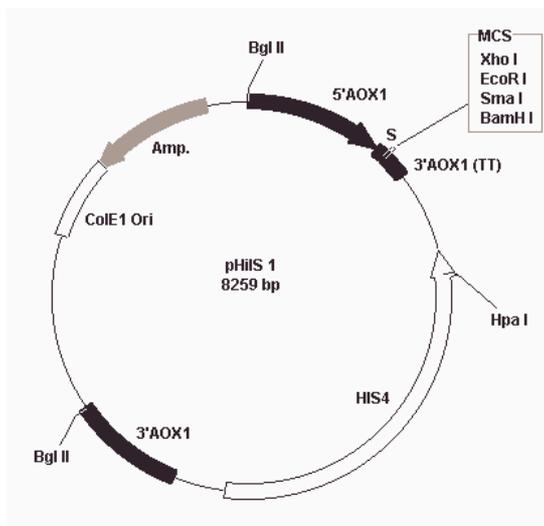
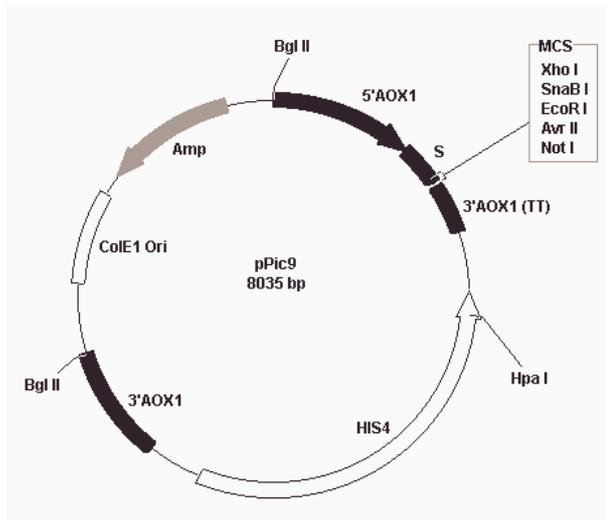


Abbildung 3-9 pHiIS1

Der Vektor pHiIS1 ist ein für sekretorische Expression konstruiertes Plasmid. Er enthält die für das PHO1 Sekretionssignal kodierende Sequenz *upstream* der *multiple cloning site*.



Wie der Vektor pHilS1 ist auch pPic9 entwickelt worden um die Sekretion von Proteinen zu ermöglichen, er kodiert das Sekretionssignal des α -Factors.

Abbildung 3-10 pPic9

3.4.1.2 HERSTELLUNG UND TRANSFORMATION KOMPETENTER ZELLEN

Aus einer über Nacht inkubierten Vorkultur werden 500 ml YPD (maximale Zelldichte ca. $OD_{600}=0,1$) angeimpft und bei 30°C bis zu einer Zelldichte von $OD_{600}=0,5-0,8$ inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert (10 min, 3.000 g, RT) und mit 50 ml Puffer A gewaschen. Danach werden sie in 4 ml Puffer A resuspendiert und in 200 μl Aliquots auf Eppendorfgefäße (2 ml) verteilt. Zu jedem Aliquot setzt man 11 μl DMSO zu und friert sie sofort in flüssigem Stickstoff ein. Die Zellen werden bei -70°C gelagert.

Für die Transformation gibt man 1-3 μg linearisierte DNA auf die noch gefrorenen Zellen und inkubiert 5 min bei 37°C . Nach Zugabe von 1,5 ml Puffer B inkubiert man 60 min bei 30°C . Die Zellen werden abzentrifugiert (10 min, 2.000 g, RT), und in 1,5 ml Puffer C resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 2.000 g, RT) wird der Überstand abgenommen, das Sediment in 200 μl Puffer C resuspendiert und auf MD-Platten ausgebracht.

3.4.1.3 ANZUCHT- UND INDUKTIONSBEDINGUNGEN

3.4.1.3.1 BEDINGUNGEN FÜR DIE SEKRETION VON PROTEINEN

Für Expressionstests werden autoklavierte Zentrifugengläser mit rundem Boden mit 5 ml BMGY gefüllt und mit einem Klon beimpft. Die Zentrifugengläser werden mit Metallkappen verschlossen. Nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C unter Schütteln ist eine optische Dichte von $OD_{600} > 10,0$ erreicht. Die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet (10 min 4.000 g bei RT). Der Überstand wird dekantiert und verworfen, das Sediment wird in 5 ml BMMY resuspendiert. Von den induzierten Kulturen werden nach 2, 4 und 6 Tagen je 1 ml Medium entnommen und analysiert.

Größere Expressionskulturen (Schikanekolben, 250 ml BMGY) werden durch 10 ml Vorkultur (Inkubation über Nacht bei 30°C) angeimpft und 24 h bei 30°C inkubiert. Danach wird abzentrifugiert (10 min 4.000 g bei RT) und zur Induktion mit BMMY resuspendiert, wobei eine optische Dichte von $OD_{600} = 20,0$ eingestellt wird.

3.4.1.3.2 BEDINGUNGEN FÜR DIE INTRAZELLULÄRE EXPRESSION

Die Prozedur entspricht der unter 3.4.1.3.1 beschriebenen Methode und weicht aber in zwei Punkten ab: Die Anzucht erfolgt in MGY, zur Induktion dient MM. Die Induktion erfolgt bei einer optische Dichte von $OD_{600} 1-2$.

3.4.1.4 PRÄPARATION VON HEFE-ZELL-LYSATEN

1 ml der Induktionskultur (siehe 3.4.1.3.2) werden abzentrifugiert (10 min 1.500 g) und mit dem gleichen Volumen *Break*-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Sediment in 200 µl *Break*-Puffer (4°C) resuspendiert und etwa das gleiche Volumen Gaspelchen (Durchmesser 500 µm Fa. Sigma) zugegeben. Der Zellaufschluß erfolgt durch Schütteln dieser Mischung bei (10 min, 4°C). Danach wird zentrifugiert (10 min 10.000 g bei

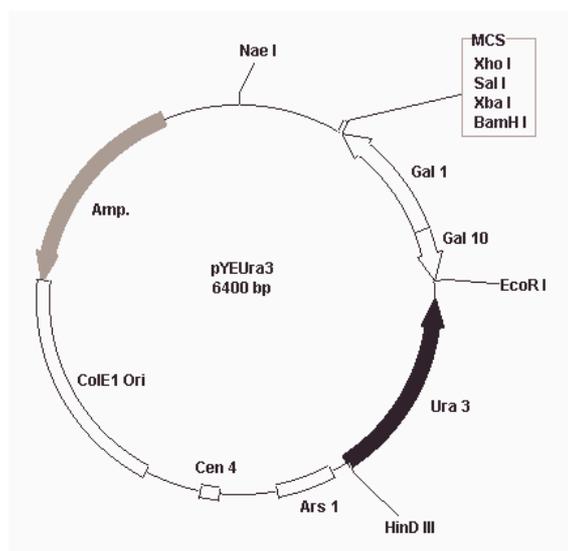
4°C) und der Überstand bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C eingefroren.

3.4.2 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Saccharomyces cerevisiae (Bäckerhefe) sind einzellige, eukaryontische Organismen, mit einem Durchmesser von ca. 3-5 µm. Sie besitzen 16 Chromosomen von denen eine detaillierte Genkarte existiert und die vollständige Sequenz bekannt ist. *Saccharomyces cerevisiae* vermehrt sich durch eine als Zellspaltung (*budding*) bezeichnete asymmetrische Zellteilung. Diploide Zellen können durch Sporulation vier haploide Sporen liefern.

Um in *Saccharomyces cerevisiae* Plasmide extrachromosomal stabil halten zu können, enthalten diese ARS1- und CEN4-Sequenzen. Es handelt sich dabei um die autonome Replikationssequenz und den Centromerbereich von Chromosom IV aus *Saccharomyces cerevisiae* [Belgauts 1990].

3.4.2.1 PLASMIDE FÜR SACCHAROMYCES CEREVISIAE



Der Vektor pYEura 3 wurde von der Fa. Clontech bezogen. Er besitzt eine Ampicillin-Resistenz für die Selektion in *E. coli* sowie das Ura 3 Gen für die Selektion in *Saccharomyces cerevisiae*. Weitere Bestandteile sind Cen4 und Ars1 für die Replikation und Verteilung bei der Mitose.

Abbildung 3-11 pYEura 3

3.4.2.2 HERSTELLUNG UND TRANSFORMATION KOMPETENTER ZELLEN

Die Hefezellen werden in 50 ml YPD bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,5-1$ bei 30°C inkubiert und abzentrifugiert (10 min 1500 g, RT). Das Pellet wird zuerst mit 10 ml TE, dann mit 10 ml TE/LiAc gewaschen, in TE/LiAc resuspendiert, so daß eine Zelldichte von 10^9 resultiert. Anschließend wird bei 30°C 30 min inkubiert.

Pro Transformationsansatz werden 100 µl der Zellen mit 1 µg Vektor-DNA und 10 µg *carrier*-DNA (mit Ultraschall behandelte Heringssperma-DNA) versetzt und 30 min bei 30°C inkubiert. Nach dieser Zeit gibt man 700 µl PEG (40% PEG in TE/LiAc) dazu, mischt vorsichtig und inkubiert erneut 30 min bei 30°C. Daran schließt sich ein *heat-shock* an (5 min bei 37°C). Nachdem die Zellen abzentrifugiert und in 100 µl sterilem Wasser oder SDGlu-Medium resuspendiert wurden, werden sie auf SDGlu-Platten ausgestrichen.

3.4.2.3 ANZUCHT- UND INDUKTIONSBEDINGUNGEN

Zum Test auf exprimierende Klone werden Kolben mit 25 ml SDGlu gefüllt und mit einem Klon beimpft. Ist eine optische Dichte von $OD_{600} > 2$ durch Inkubation bei 30°C unter Schütteln erreicht, werden die Zellen abzentrifugiert (10 min 4.000 g bei RT). Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 25 ml SDGal resuspendiert. Die induzierten Kulturen werden weiter inkubiert, nach ein bis fünf Tagen wird je 1 ml Medium abgenommen analysiert.

3.4.2.4 HERSTELLUNG VON ZELL-LYSATEN FÜR WESTERN-BLOTS

2 ml der induzierten Kultur aus Kapitel 3.4.2.3 werden abzentrifugiert werden (10 min Eppendorffzentrifuge, höchste Drehzahl, RT) und die Zellen in 1 ml 0,25 M NaOH, 1% β-MeSH resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis setzt man 160 µl 50% TCA zu, inkubiert weitere 10 min und zentrifugiert dann ab (10 min Eppendorffzentrifuge, höchste Drehzahl, 4°C). Das Pellet wird in 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. Da-

nach setzt man 100 µl Auftragspuffer zu, inkubiert 10 min bei 95°C auf und trägt die Probe auf das Gel auf.

3.4.3 Cos-ZELLEN

Als Cos-Zellen bezeichnet man eine von der etablierten Affennieren-Zelllinie CV1 abgeleitete Zelllinie, die durch Transformation mit einer Mutante des Affenvirus SV40 entstanden ist. Cos-Zellen enthalten ein ins zelluläre Chromosom integriertes SV40 Genom, von dem aus die Synthese des großen T-Antigens gesteuert wird. Dieses Protein reguliert durch Bindung an spezifische Bindungsstellen der viralen DNA sowohl die virale Genexpression als auch die Replikation der SV40-DNA. Cos-Zellen setzen jedoch kein Virus mehr frei, da eine kleine Deletion im Bindebereich des T-Antigens die Expression der hierfür benötigten viralen Gene verhindert.

In Cos-Zellen verwendete Vektoren setzen sich aus Anteilen bakterieller Plasmide, einem geeigneten Promotorbereich und dem Ori des SV40 Genoms zusammen. Durch das von den Cos-Zellen bereitgestellte T-Antigen können solche Plasmide extrachromosomal gehalten und vermehrt werden [Ibelgaufts 1990].

3.4.3.1 PLASMIDE FÜR COS-ZELLEN

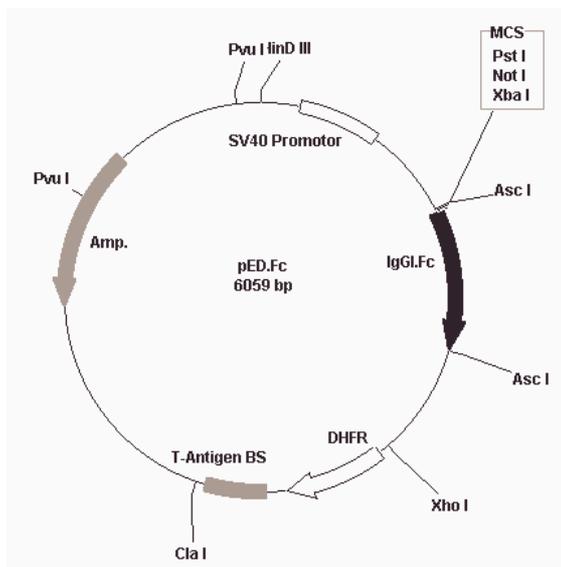


Abbildung 3-12 pEd.Fc

dem Fc-Anteils des humanen IgG erlaubt die Aufreinigung über Protein A - Sepharose, oder Immunpräzipitation.

Das Plasmid PED.Fc wurde von Frau Dr. Rita Gerady-Schan zur Verfügung gestellt. Es enthält die Ampicillin-Resistenz zur Selektion in *E. coli*. Um den Vektor in Cos-Zellen zu propagieren, ist eine Bindungsstelle für das *large T-Antigen* vorhanden. Das DHFR-Gen ermöglicht eine Selektion bei der Erzeugung stabiler Transfektanten, die Fusion des Zielproteins mit

3.4.3.2 TRANSFEKTION UND KULTURBEDINGUNGEN

Um eine Schädigung der in flüssigem Stickstoff lagernden Zellen durch sich bildende Eiskristalle zu verhindern, werden diese möglichst schnell aufgetaut, mit 10 ml DMEM (Fa. Gibco) gewaschen, in 5 ml DMEM (5% FCS, 500 µg/ml Streptomycin, 500 U/ml Penicillin) aufgenommen und in Petrischalen von 90 mm Ø ausgesät. Die Schalen werden bei 37°C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von ca. 50% (~18 h) bebrütet.

Zur Transfektion verdünnt man je Schale 4 µg DNA und 24 µl Lipofectamin (Fa. Gibco) getrennt in jeweils 400µl Optimem (Fa. Gibco). Man vereinigt beide Vorverdünnungen, inkubiert DNA und Lipofectamin 15 min zur Komplexbildung. In dieser Zeit wäscht man die Zellen zwei bis dreimal mit PBS. Anschließend füllt man mit Optimem auf ein Volumen von 5 ml auf und überführt die Mischung aus DNA und Transfektionsreagenz auf die gewa-

schenen Zellen. Nach 6 h Inkubation (37°C, 5% CO₂) wird das Medium gewechselt.

- Bei intrazellulärer Expression benutzt man das Medium DMEM (5% FCS, 500 µg/ml Streptomycin, 500 U/ml Penicillin), inkubiert zwei bis drei Tage (37°C, 5% CO₂) und erntet dann die Zellen ab. Hierzu werden, nach Absaugen des Mediums, die Zellen mit PBS (2 mM EDTA) vom Boden der Petrischale abgelöst.
- Bei sekretorischer Expression wird 24 h nach der Transfektion das Medium gewechselt, es kommt dann SMIF-Medium (GBF-Braunschweig) oder Hybridoma-Medium (Fa. Gibco) zum Einsatz. Nach jeweils weiteren 24 h nimmt man den Medienüberstand ab und lagert ihn bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung.

3.4.3.3 HERSTELLEN VON ZELLKERNEXTRAKTEN

Die abgeernteten Zellen werden abzentrifugiert, in Lysispuffer aufgenommen und 30 min bei 4°C unter gelegentlichem Schütteln (Vibrationsschüttler) inkubiert. Anschließend wird der Ansatz 30 min (Eppendorfszentrifuge, höchste Stufe) abzentrifugiert. Der Überstand bildet die cytosolische Fraktion.

Das Pellet wird in *High-salt* Puffer (500 mM KCl) resuspendiert und 30 min bei 4°C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Danach erfolgt eine weitere Zentrifugation (30 min, Eppendorfszentrifuge, höchste Stufe). Der Überstand bildet die nukleäre Fraktion.

3.4.4 ARBEITEN MIT PHAGEN

Im Jahre 1985 wurde von Smith eine molekularbiologische Technik etabliert, die die Oberfläche von M13-Phagen benutzt, um Fremdproteine zu präsentieren [Smith 1985]. In dieser *Phage Display* genannten Technik erzeugt man rekombinanten Phagen, deren Hüllproteine einen heterologen Fusionsanteil aus Peptiden, Antikörperfragmenten oder Proteindomänen enthalten

[Rasched und Oberer 1986]. Ausgehend von einem Pool unterschiedlicher Fusionsproteine kann man, durch Bindung der Phagen an spezifische Liganden, aktive Fusionsanteile selektieren und durch die Infektion von *E. coli* amplifizieren. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser werden aktive Proteine oder Peptide angereichert. Die Identität der präsentierten Fusionsanteile ist dabei sehr einfach durch Sequenzierung eines bestimmten Anteils des Phagen-genoms zu bestimmen, weil in den Phagen Phänotyp und Genotyp gekoppelt sind.

Im *Phage-Display* werden sogenannte hybride Phagemidvektoren verwendet. Sie enthalten sowohl Phagen, als auch Plasmidanteile. Derartige Vektoren besitzen einen M13- und einen *E. coli* Replikationsursprung, lassen sich daher in Bakterien wie Plasmide propagieren, oder mittels eines Helferphagen als einzelsträngige DNA in einen rekombinanten Phagen verpacken (siehe Abbildung 3-13).

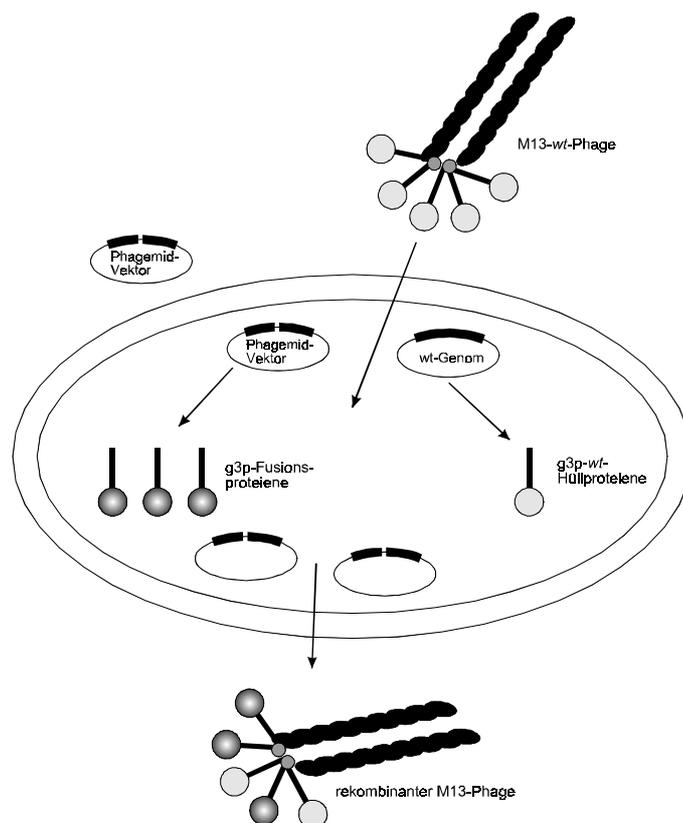


Abbildung 3-13 Schematische Darstellung des *Phage-Rescue*. Nach Transformation mit dem Phagemid-Plasmid wird mit dem Helferphagen infiziert. Der entstehende rekombinante M13-Phage trägt sowohl g3p-wt-, als auch g3p-Fusionsproteine.

3.4.4.1 PLASMIDE

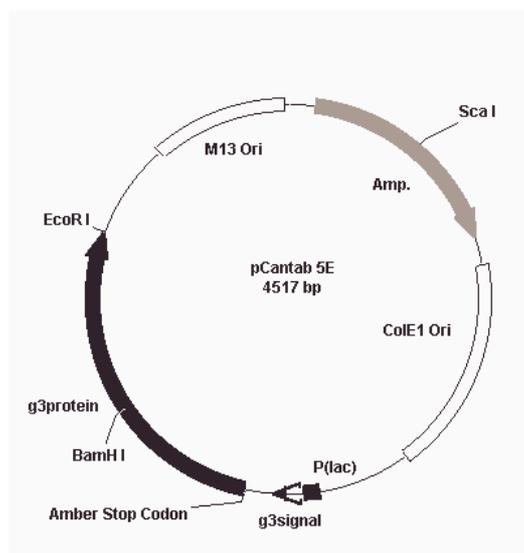


Abbildung 3-14 pCantatab 5E

Der Phagemidvektor pCantab 5E stammt von der Fa. Pharmacia. Er trägt eine Ampicillin-Resistenz und sowohl den ColE1-, als auch den M13-*origin of replication*. Die Expression des g3-Proteins steht unter Kontrolle des lac-Promotors. Außerdem enthält der Vektor noch die g3-Signalsequenz (*peB*) zur Ausschleusung des Proteins ins Periplasma.

3.4.4.2 HERSTELLUNG REKOMBINANTER PHAGEN

Eine ausführliche Darstellung aller Protokolle zum *Phage-Display* findet sich in der Dissertation von A. Kiewitz [Kiewitz 1997]. Es wird daher nur eine kurze Zusammenfassung der Technik zur Gewinnung rekombinanter Phagen beschrieben.

Der Phagemidvektor wird in TG I-Zellen transformiert, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, allerdings setzt man dem LB^{amp}-Medium 2% Glucose zu. 10% des Transformationsansatzes werden auf Agarplatten ausgebracht, der Rest in 15 ml Flüssigkultur gegeben (LB^{amp}-Medium, 2% Glucose). Man inkubiert die Kultur bei 37°C bis die Zellen eine Dichte von OD₆₀₀=0,5 erreicht haben, gibt 3x10¹⁰ pfu M13K07-Helferphagen zu und inkubiert weitere 60 min. Nach dieser Zeit werden die Zellen abzentrifugiert (10 min 1.000 g) und in 10 ml LB^{amp/kann} resuspendiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Zellen abzentrifugiert (20 min 1.000 g), zum Überstand 1/5 des Volumens einer Lösung von PEG und NaCl (20% PEG 6.000, 2,5 M NaCl) zuge-setzt und für 4 h bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (2 h, 6.000 g) wird

das Sediment in PBS (0,1% Triton X 100) resuspendiert und die Lösung sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm).

3.4.4.3 *PANNING* DER REKOMBINANTEN PHAGEN

Nach der Immobilisation von Oligodesoxynukleotiden auf Avidin beschichteten Microtiterplatten, werden pro *Well* 200 µl (1×10^9 pfu/ml) rekombinante Phagen in PBS (2% (w/v) Milchpulver, 0,1% (v/v) Triton X 100) zugegeben und für 4 h bei 4°C inkubiert. Danach wird bis zum Erreichen der notwendigen Stringenz mit PBS (2% (w/v) Milchpulver, 0,1% (v/v) Triton X 100) gewaschen. Aliquots der Waschfraktionen werden zur Infektion von TG I Zellen verwendet, um den Waschverlauf zu beobachten. Danach eluiert man angereicherte Phagen mit PBS (1 M NaCl, 2% (w/v) Milchpulver, 0,1% (v/v) Triton X 100) und infiziert damit TG I Zellen.

3.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE ARBEITEN

3.5.1 PCR-MUTAGENESE

Die hier beschriebene Methode der PCR-Mutagenese lehnt sich an das von [Picard et al., 1994] veröffentlichte Verfahren an. Die Methode beruht auf dem Prinzip, mittels einer PCR mit einem 3' der Zielsequenz gelegenen (*downstream*) Primer und einem Mutagenese Primer ein Produkt herzustellen, das die gewünschte Mutation enthält, und dieses in einem weiteren Schritt als Primer (Megaprimer) zusammen mit einem 5' der Zielsequenz gelegenen (*upstream*) Primer einzusetzen (siehe Abbildung 3-15). Dadurch erhält man ein (je nach Wahl der *upstream* und *downstream* Primer) großes Produkt, das gespalten und kloniert werden kann. Ein Vorteil dieser Methode ist, daß *upstream* und *downstream* Primer unabhängig von der zu erzeugenden Mutante sind, und so in unterschiedlichen Mutagenesen die gleichen Primerpaare benutzt werden können.

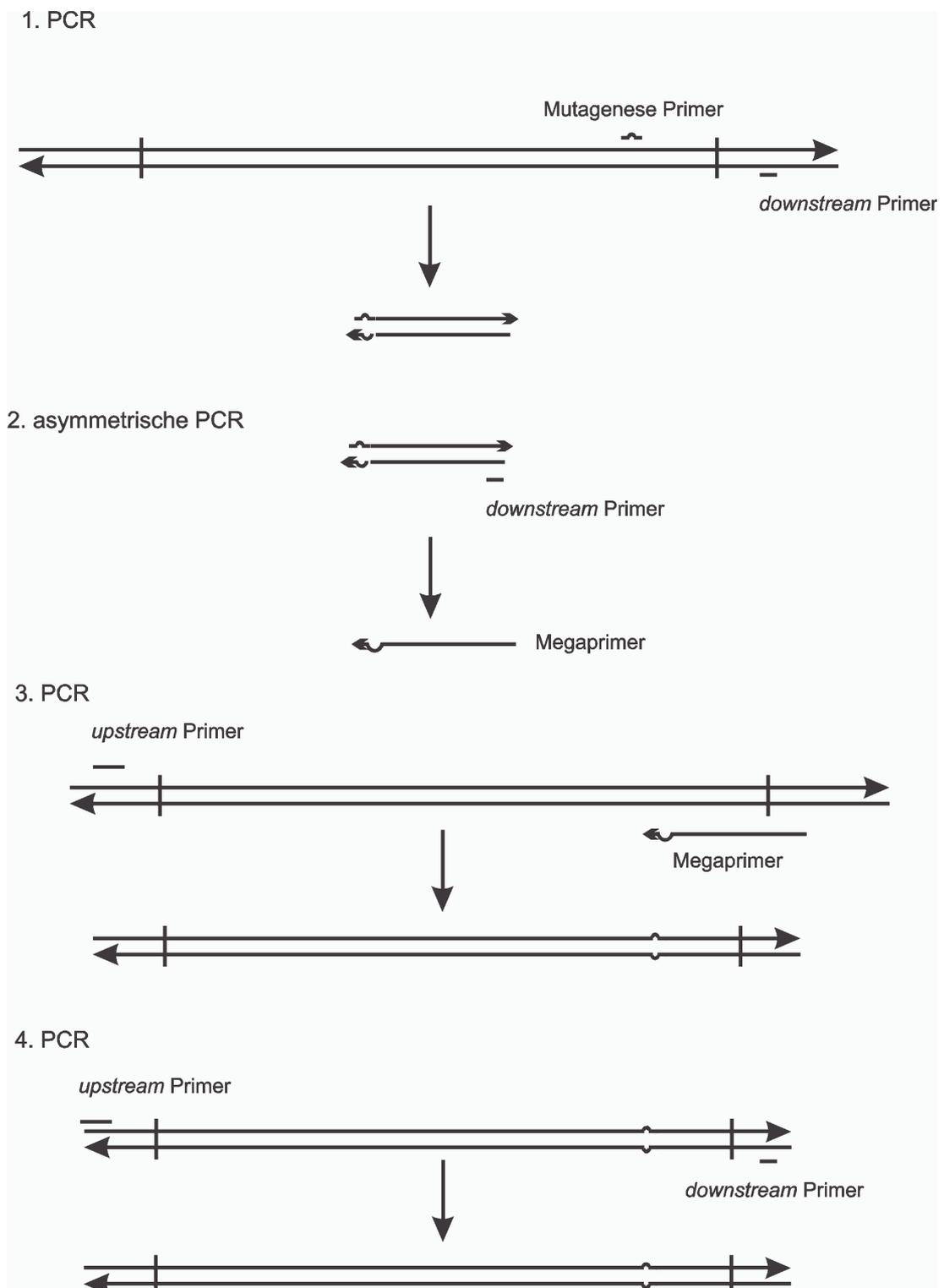


Abbildung 3-15 Schematische Darstellung der Reaktionen einer PCR-Mutagenese

Reaktionsbedingungen und Pipettierschemata für die vier Stufen der Mutagenese:

1.PCR:

10 µl	Reaktionspuffer
10 µl	dNTPs (2 mM)
10 µl	Mutagenese Primer (10 µM)
10 µl	<i>downstream</i> Primer (10 µM)
10 µl	<i>Template</i> (1 ng/µl)
50 µl	H ₂ O
0,8 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)

Das PCR-Produkt wird über Qiaquick PCR-Säulen aufgereinigt und mit 50 µl H₂O eluiert.

2.PCR:

5 µl	Reaktionspuffer
5 µl	dNTPs (2 mM)
10 µl	Eluat der Qiaquick-Säule
5 µl	<i>downstream</i> Primer (10 µM)
25 µl	H ₂ O
0,8 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)

3.PCR:

5 µl	Reaktionspuffer
5 µl	dNTPs (2 mM)
10 µl	<i>upstream</i> Primer (10 µM)
10 µl	<i>Template</i> (1 ng/µl)
20 µl	H ₂ O
0,8 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)
50 µl	Ansatz der 2. PCR

Das Produkt wird über ein Polyacrylamid-Gel vom Template getrennt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert. Die Methode dazu ist in Kapitel 3.5.2 beschrieben.

4.PCR:

10 µl	Reaktionspuffer
10 µl	dNTPs (2 mM)
10 µl	<i>upstream</i> Primer (10 µM)
10 µl	<i>downstream</i> Primer (10 µM)
5 µl	des aufgereinigten PCR-Produktes
55 µl	H ₂ O
0,8 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)

Alle PCR-Reaktionen laufen unter den selben Zyklus-Bedingungen ab:

Denaturierung	Annealing	Extension
94°C	50°C	72°C
60 sec	60 sec	120 sec

pro PCR-Schritt werden 20 dieser Zyklen ausgeführt.

3.5.2 ELUTION VON DNA AUS POLYACRYLAMID-GELEN

Die hier beschriebene Methode ist eine Modifikation des von der Fa. Qiagen veröffentlichten *Qiashredder* Prinzips [Qiagen 1996]. Man schneidet das gewünschte Fragment aus einem Polyacrylamid-Gel aus, zerkleinert das Gel und versetzt es mit 0,1% SDS enthaltenden TE-Puffer. Nach 30 minütiger Inkubation bei 50°C wird zentrifugiert (10 min, Eppendorf-Zentrifuge, höchste Drehzahl) und der Überstand auf eine Qiaquick-Säule gegeben. Alle nachfolgenden Schritte entsprechen der Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen oder PCR-Reaktionen.

3.5.3 BESCHICHTUNG VON MICROTITERPLATTEN

Um biotinylierte Oligodesoxynukleotide auf Microtiterplatten immobilisieren zu können, werden diese zuvor mit Avidin beschichtet (*coating*). Dazu füllt man jedes *Well* mit 100 µl einer Avidinlösung (25 µg/ml in 200 mM NaHCO₃, pH 9,6) und inkubiert die Platten über Nacht bei Raumtemperatur. Danach werden die *Wells* dreimal mit PBS (0,1% (v/v) Triton X 100) gewaschen und dann mit 250 µl PBS (2% (w/v) Milchpulver, 0,1% (v/v) Triton X 100) geblockt (30 min, RT).

3.5.4 PROTEINREINIGUNG

Anschließend an jedes der im folgenden beschriebenen Aufreinigungsprotokollen wurde die Reinheit der Proteine durch Gelelektrophorese überprüft und die Menge photometrisch bestimmt.

3.5.4.1 (HIS)₆-GETAGGTE PROTEINE

Zur Aufreinigung kleinerer Proteinmengen (unter 5 mg) packt man eine Säule aus Ni²⁺-NTA-Agarose und äquilibriert sie mit PBS (unter Zusatz von 1 M NaCl). Nach Auftrag des Zell-Lysates (siehe Kapitel 3.3.5) wäscht man zuerst mit 50 ml PBS (1 M NaCl), danach mit 20 ml PBS und dann mit 20 ml PBS (50 mM Imidazol). Die Elution des Proteins erfolgt durch ansteigende Konzentration von Imidazol in PBS (75 mM bis 500 mM Imidazol).

3.5.4.2 GST-FUSIONSPROTEINE

Dem Zell-Lysat (Kapitel 3.3.5) wird 1 ml GSH-Sepharose zugesetzt und unter Schütteln inkubiert (2 h, RT). Anschließend wird die Sepharose abzentrifugiert, mehrmals mit PBS (1 M NaCl), dann mit PBS gewaschen und in 4-5 ml PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 50 U Thrombin inkubiert man den

Ansatz über Nacht bei 4°C, zentrifugiert am nächsten Morgen ab und friert den Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20°C ein.

3.5.5 ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)

Der EMSA wurde nach bestehenden Protokollen [Schweers 1993] in 0,5xTTE (50 mM Tris-Taurin, pH 8,5, 2 mM EDTA) durchgeführt. Die Komplexe wurden 30 Minuten bei 4°C in Shift-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,9, 50 mM NaCl, 1 mM MeSH, 0,05% (w/v) Magermilchpulver und 5% (v/v) Glycerin) vorinkubiert. Alle Oligodesoxynukleotide wurden mit T4-Polynukleotidkinase und $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP markiert und durch Gelfiltration mit MicroSpinTM-Säulen (Fa. Pharmacia) nach Angaben des Herstellers (Pharmacia 1993) gereinigt.

3.5.6 CD-SPEKTROSKOPIE VON MUTANTEN DER DNA-BINDENDEN DOMÄNE

Die Circular dichroismus (CD)-Experimente wurden von Dr. U. Pieper (Gießen) an einem Jafco J710 Spektrometer in 0,05 cm Küvetten durchgeführt. Als Puffer diente in allen Fällen PBS, jeweils 20 Einzelspektren wurden aufgenommen und anschließend akkumuliert.

4 ERGEBNISSE

4.1 EXPRESSIONSSTUDIEN

Biophysikalische Charakterisierungen des c-Myb-Protoonkogenproduktes beschränken sich auf einzelne Domänen des Proteins, weil es bislang nicht gelungen ist, das vollständige (*full-length*) Protein in ausreichenden Mengen herzustellen. Ein Ziel der Arbeit war daher die Expression des c-Myb-Proteins der Maus, um solche Untersuchungen möglich zu machen.

Eine Reihe von prokaryontischen Expressionssystemen wurden bereits in der Dissertation von Dr. A. Ebneith [Ebneith 1994] als unbrauchbar verworfen. Die Expression von c-Myb in den getesteten bakteriellen Systemen führte zu folgenden Problemen:

- Der größte Teil des exprimierten Proteins lag in unlöslicher Form vor.
- Das Protein unterliegt einer starken Proteolyse.

In dieser Arbeit werden die Expressionsversuche in Bakterien fortgesetzt und auf eukaryontische Systeme ausgedehnt.

4.1.1 COEXPRESSION EINES CBP- FRAGMENTES

Von Dr. M. Oelgeschläger wurde über die Protein-Protein Interaktionen zwischen c-Myb und CBP berichtet [Oelgeschläger et al., 1996]. Gleichzeitig stellte er in Anwesenheit eines CBP-Fragmentes (AS 451-721) einen verminderten proteolytischen Abbau von c-Myb bei *in vitro* Experimenten fest. Um zu untersuchen, ob dieses Ergebnis für die Expression von *full-length* c-Myb ausgenutzt werden kann, wurde ein Plasmid konstruiert, das es ermöglicht, die Aminosäuren 451-721 von CBP gleichzeitig mit c-Myb zu exprimieren. Zu diesem Zweck wurde in das Plasmid pRep4, das zu dem c-Myb Expressionsplasmid kompatibel ist, die Expressionskassette (der Promotor/Operator-Bereich, die Ribosomenbindungsstelle, die *multiple cloning site* und die Transkriptions-Terminations-Sequenz) aus dem Vektor pQE3 ligiert.

In dieses neue Plasmid (pWK1) wurde die Sequenz für das CBP-Fragment ausgehend von einem pGex-Konstrukt, das freundlicherweise von Dr. Oelgeschläger zur Verfügung gestellt wurde, kloniert.

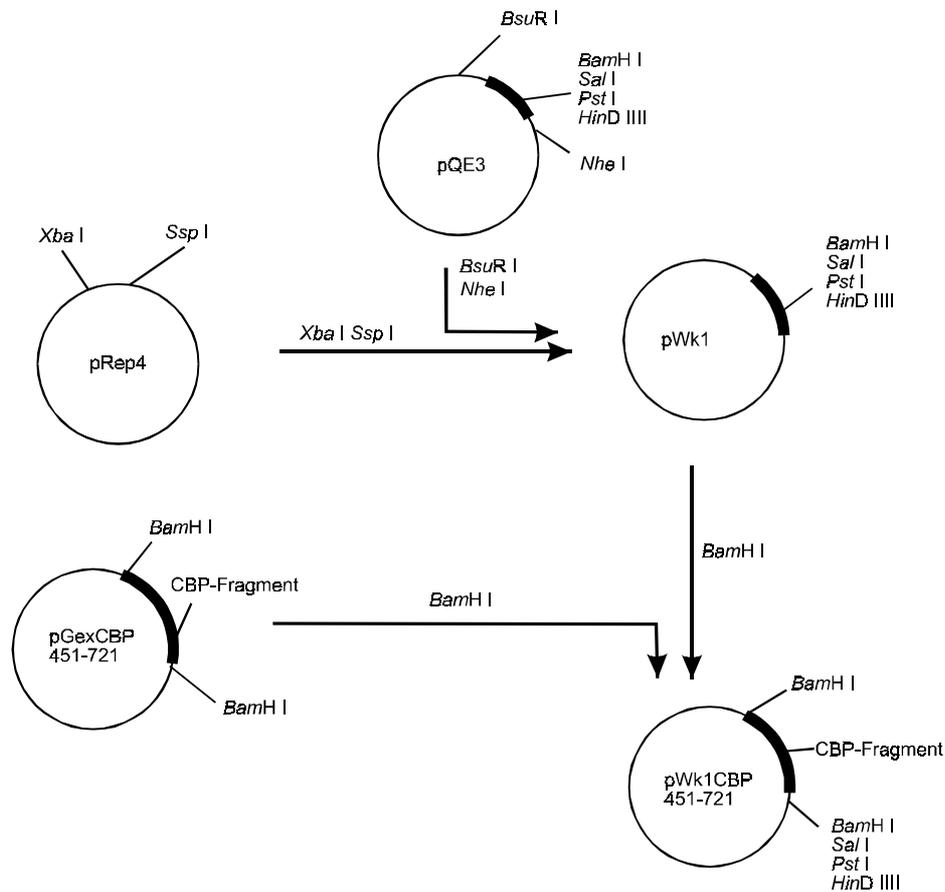


Abbildung 4-1 Klonierungsstrategie des Plasmides zur Coexpression des CBP-Fragmentes AS 451-721. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Die Expressionskassette, bzw. Das CBP-Genfragment sind als schwarze Balken hervorgehoben.

Der Vektor pWk1CBP451-721 wurde dann zusammen mit dem c-Myb-Expressionsplasmid pGexMybHis (siehe [Ebneith 1994]) in LK111(λ) transformiert und beide Plasmide mit IPTG induziert. Die Expression des CBP-Fragmentes konnte bereits im Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel detektiert werden (siehe Abbildung 4-2), der Nachweis der c-Myb Expression gelang nur im deutlich empfindlicheren Western-Blot.

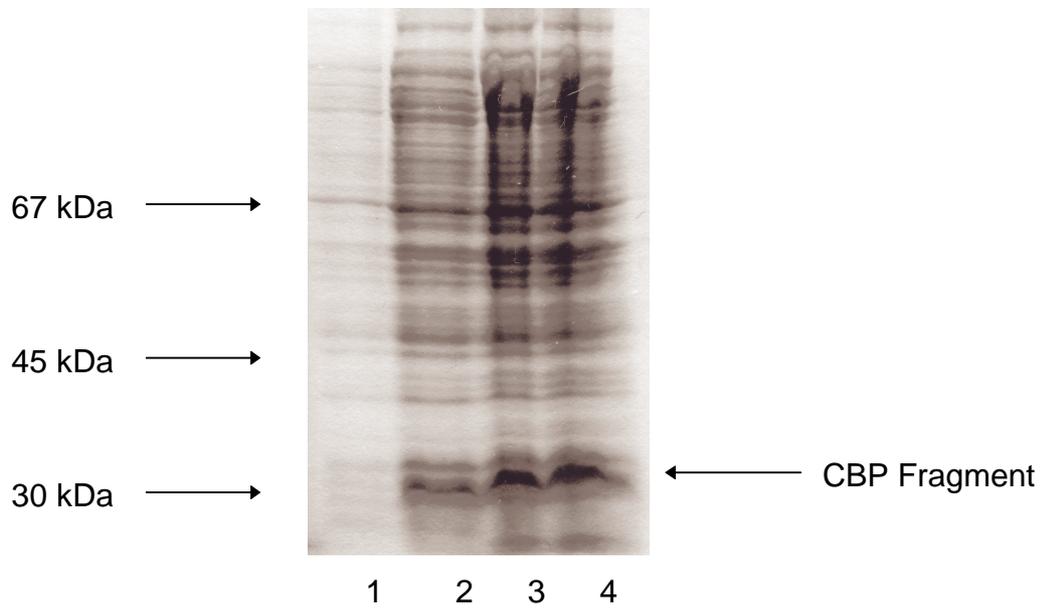


Abbildung 4-2 Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der Induktion von pWk1CBP 451-721 und pGexMybHis inLK111(λ). Bahn 1: vor Induktion, 2: 1 h Induktion, 3: 2 h Induktion, 4: 3 h Induktion

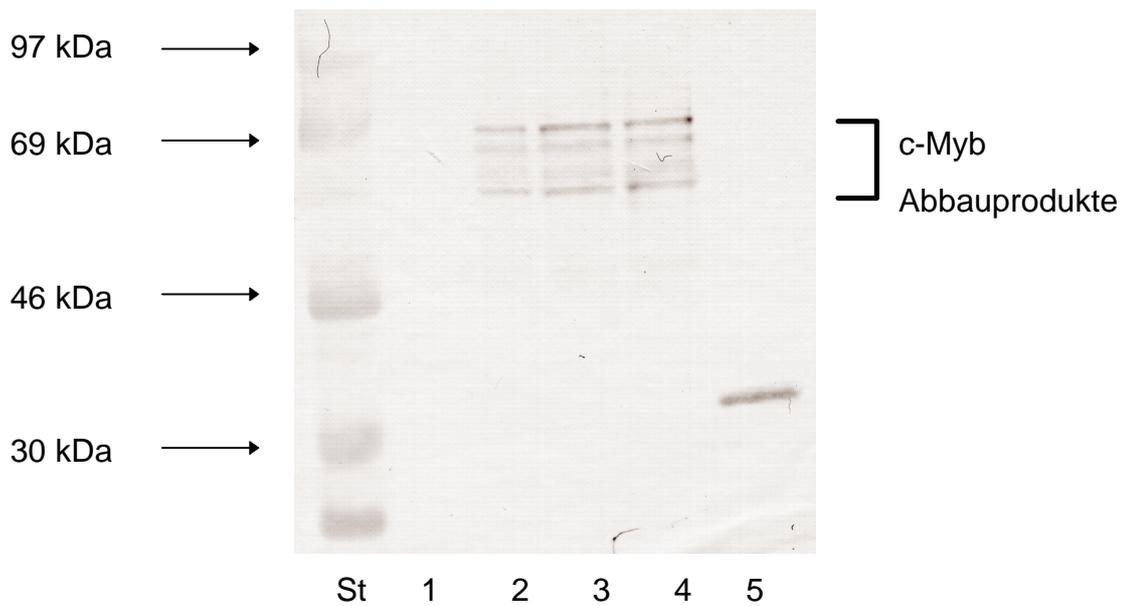


Abbildung 4-3 Western-Blot der Induktion von pWk1CBP 451-721 und pGexMybHis inLK111(λ). St: Rainbow-Marker (Fa. Amersham), Bahn 1: vor Induktion, Bahn 2: 1 h Induktion, Bahn 3: 2 h Induktion, Bahn 3: 3 h Induktion, Bahn 4: Kontrolle (c-Myb R123). Als erster Antikörper diente ein monoklonaler anti-Myb AK (zur Verfügung gestellt von K. H. Klemmner), als zweiter Antikörper ein HRP-gekoppelter *goat-anti-mouse* AK

Auf dem Blot (Abbildung 4-3) sind nur Proteine unterhalb einer Größe von 70 kDa zu erkennen, das von pGexMybHis kodierte GST-Fusionsprotein sollte aber ca. 102 kDa groß sein. Das spricht für eine starke Degradation, die unabhängig von der Induktionsdauer ist. Die Koexpression von Myb-Proteinen mit dem CBP-Fragment AS 451-721 bietet keinen Schutz vor Proteasen.

4.1.2 KOEXPRESSION VON THIOREDOXIN

Yasakuwa beschrieb 1995 [Yasukawa et al., 1995] eine neue Methode, um die Löslichkeit von Fremdproteinen in *E. coli* zu erhöhen. Dabei wird parallel zum Zielprotein das Protein Thioredoxin exprimiert. Diese Methode soll den Redoxstatus der Zelle leicht verändern und eine bessere Löslichkeit überproduzierter Proteine vermitteln.

Es wurde daher ein Plasmid konstruiert, das eine induzierbare Expression von Thioredoxin ermöglicht und kompatibel zu den von Dr. A. Ebneith hergestellten Expressionsplasmiden war.

Dazu wurde die Ampicillinresistenz des Plasmides pTrx gegen die Kanamycinresistenz aus dem Plasmid pRep4 ausgetauscht. Das so erhaltene Plasmid (pTrxKan) wurde zusammen mit dem c-Myb-Expressionsplasmid pGex-MybHis (siehe [Ebneith 1994]) in Zellen der Stämme GI 698 bzw. GI 724 (Die beiden Stämme unterscheiden sich in ihrem Gehalt an Trp-Repressor, siehe Kapitel 3.3.2.4) transformiert. In diesem System ist der Promotor für das Thioredoxin-Gen durch Tryptophan, der Promotor für das GST-Myb(His)₆-Fusionsprotein durch IPTG induzierbar.

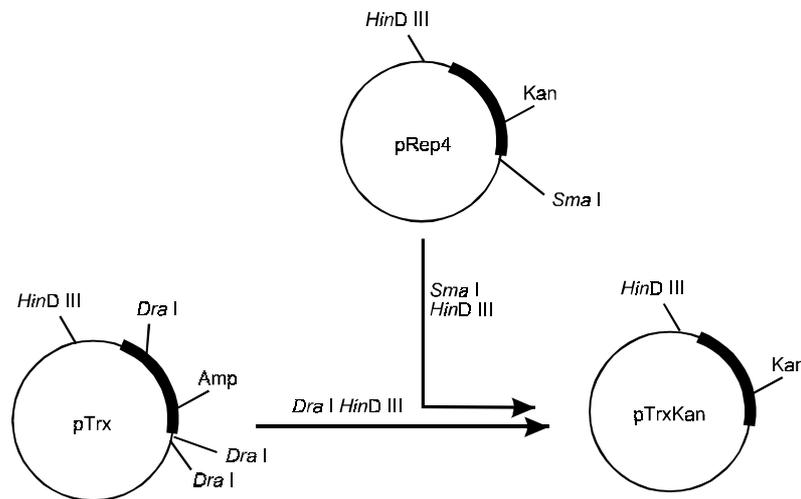


Abbildung 4-4 Klonierungsstrategie des Thiothredoxin-Expressionsplasmids. Angegeben sind nur die für die Klonierung bedeutsamen Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Die beiden Resistenzgene sind als schwarze Balken hervorgehoben.

Da die Promotoren beider Plasmide unterschiedlich induzierbar waren, wurde getestet, ob sich aus der Zeitdifferenz zwischen den Induktionszeitpunkten Unterschiede in der Ausbeute des löslichen Zielproteins ergeben. Daher wurde pTrxKan mit Tryptophan induziert und entweder gleichzeitig, eine, oder zwei Stunden später das pGexMybHis mit IPTG. Es konnte in Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen keine Expression des GST-Myb(His)₆-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Im Westernblot konnte das Protein detektiert werden, es war jedoch fast vollständig proteolytisch abgebaut. Ein Unterschied zwischen den Stämmen GI 698 und GI 724, die den Tryptophanpromotor unterschiedlich stark reprimieren, sowie zwischen 30°C und 37°C als Wachstumstemperatur konnte nicht beobachtet werden. Da Yasakuwa in der Lage war, mit seinem System auch c-Myb zu exprimieren, wurde mit dem von ihm zur Verfügung gestellten Plasmid pT-Trx und dem Plasmid pGMH (siehe [Ebneht 1994]) ein weiterer Versuch unternommen. pGMH basiert auf dem Expressionsvektor pET23 (Fa. Novagen), den auch Yasakuwa benutzte. Auf beiden Plasmiden dient der T7-Promotor zur Induktion der Expression. Als *E. coli* Stamm diente hierbei BI21DE3. In meinen Händen konnte auch unter den beschriebenen Bedingungen [Yasukawa et al., 1995] nur proteolytisch degradiertes Protein detektiert

werden. Die veröffentlichten Ergebnisse konnten in keiner Weise nachvollzogen werden.

4.1.3 EXPRESSION ALS THIOREDOXIN-FUSIONSPROTEIN

Im Zuge der unter 4.1.2 beschriebenen Koexpression von c-Myb und Thioredoxin wurde ebenfalls versucht, c-Myb und Thioredoxin als Fusionsprotein zu exprimieren. Hier wurde das c-myb-Gen aus dem Vektor pHilDF2Myb (siehe Kapitel 4.1.4) ausgeschnitten und in das Plasmid pTrxFus ligiert.

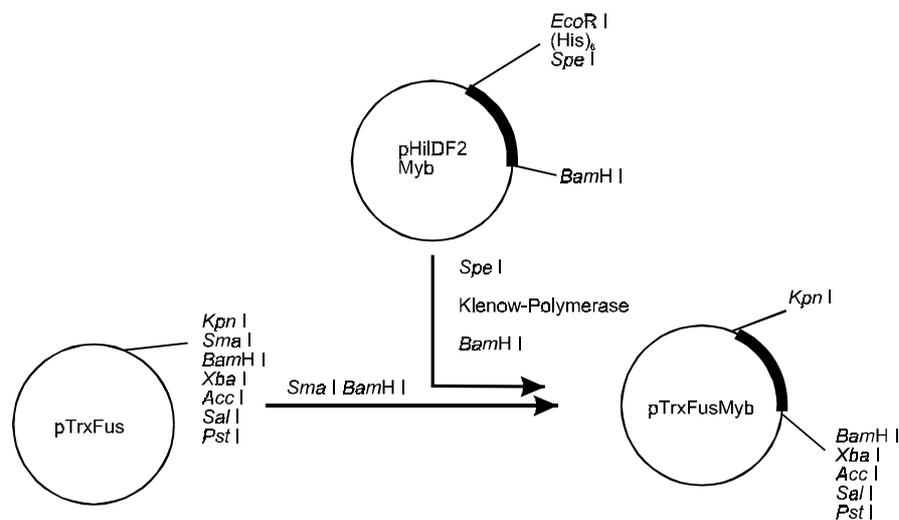


Abbildung 4-5 Klonierungsstrategie des Expressionsplasmides für Thioredoxin-c-Myb Fusionsproteine. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Das c-myb-Gen ist als schwarzer Balken hervorgehoben.

Zellen der Stämme GI 689 und GI 724 wurden mit dem Vektor pTrxFus transformiert und bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Nach zwei bis vier Stunden Induktion wurde die Expression im Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel und im Western-Blot überprüft, erneut wurden nur proteolytische Abbauprodukte entdeckt.

4.1.4 EXPRESSION IN *PICHIA PASTORIS*

Weil keines der getesteten prokaryontischen Expressionssysteme zum Ziel führte, sollten eukaryontische Systeme verwendet werden. Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* wurde von anderen Arbeitsgruppen benutzt, um hohe Ausbeuten an Fremdproteinen zu erzeugen [Clare et al., 1991; Romanos et al., 1991; Sreekrishna et al., 1988; Tschopp et al., 1987].

Das *Pichia pastoris* Expressionssystem der Fa. Invitrogen bietet die Möglichkeit, sowohl intrazellulär wie auch sekretorisch zu exprimieren. Es standen die Vektoren pHilD2, pHilS1 und pPic9 zur Verfügung.

Zunächst wurde ein doppelsträngiges Oligodesoxynukleotid in sämtliche Vektoren ligiert, um die Sequenz eines N-terminalen (His)₆-tag zu generieren, und zusätzliche Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen einzuführen.

Das Gen des murinen c-myb wurde aus einem von Dr. B. Lüscher zur Verfügung gestellten Plasmid herausgeschnitten und in den Vektor pHilDF2 (pHilD2 mit Linker) ligiert. Ausgehend von diesem Plasmid wurde die Sequenz in die anderen beiden Vektoren umgesetzt.

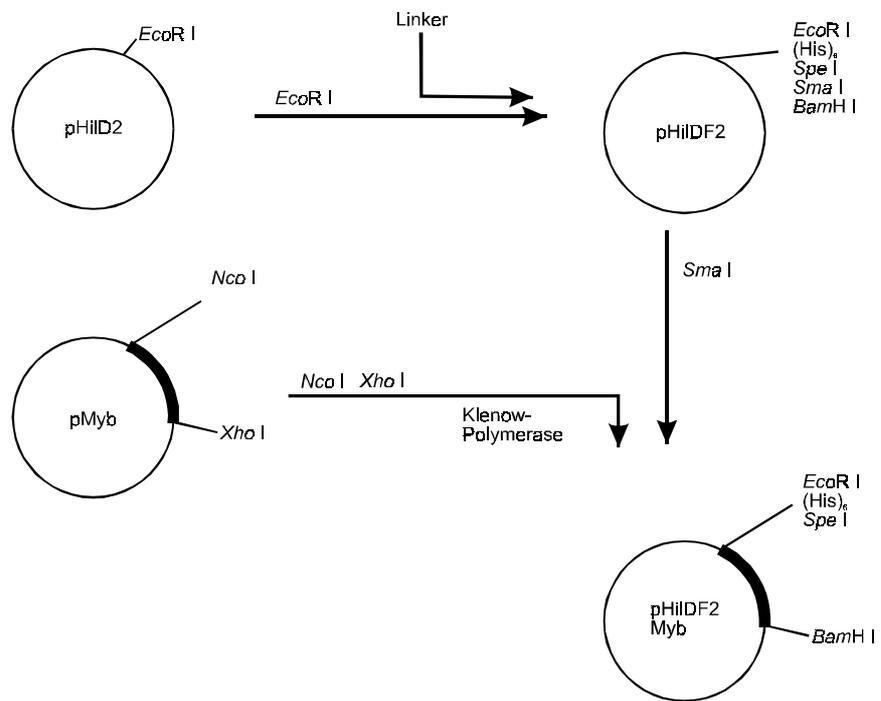


Abbildung 4-6 Klonierungsstrategie für die intrazelluläre Expression von c-Myb in *Pichia pastoris*. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Das c-myb-Gen ist als schwarzer Balken hervorgehoben.

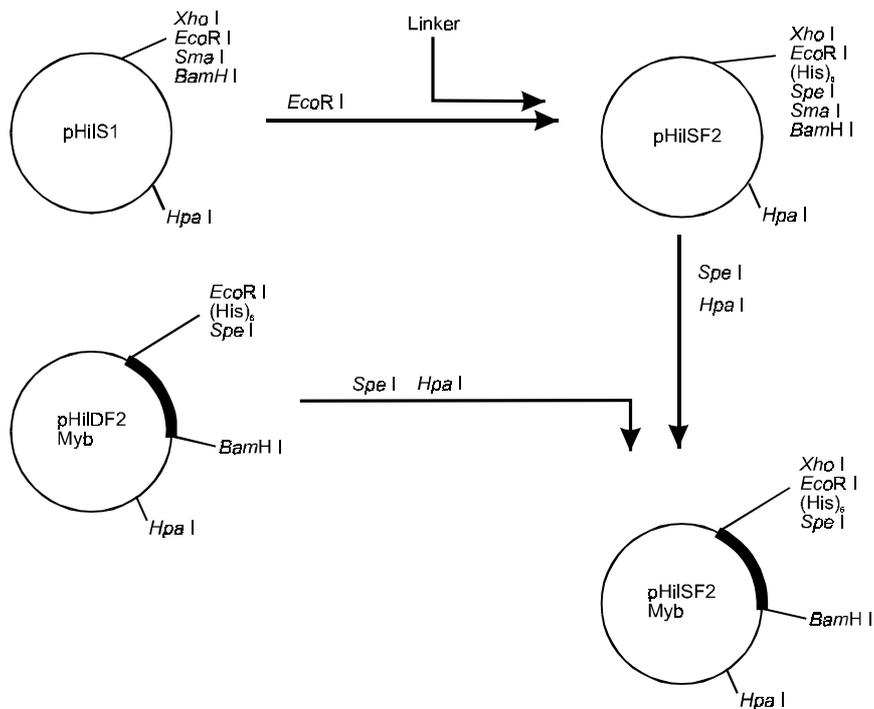


Abbildung 4-7 Klonierungsstrategie für die sekretorische Expression von c-Myb in *Pichia pastoris*. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Das c-myb-Gen ist als schwarzer Balken hervorgehoben.

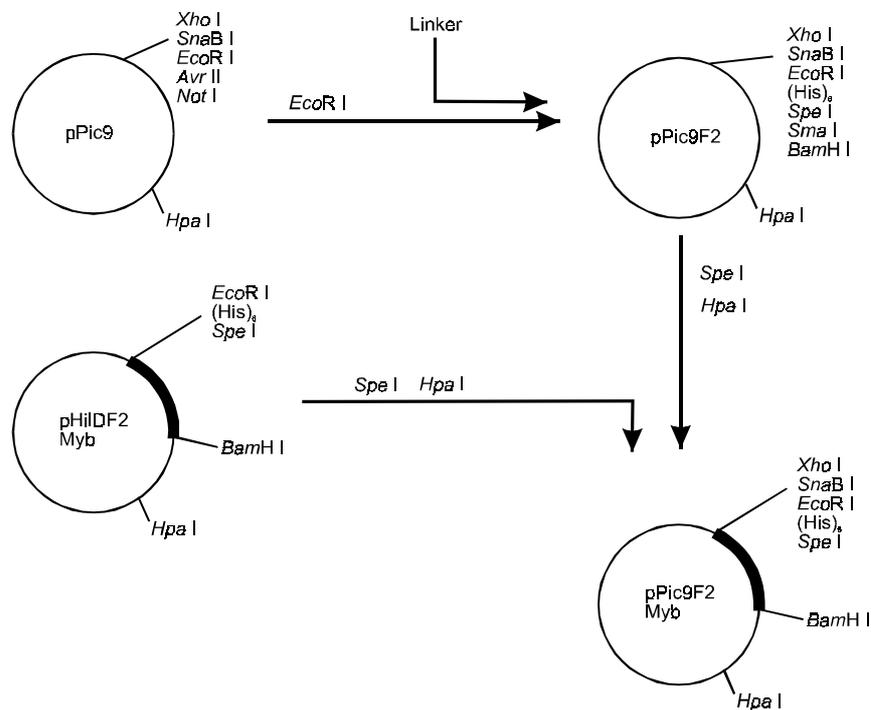


Abbildung 4-8 Klonierungsstrategie für die sekretorische Expression von c-Myb in *Pichia pastoris*. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Das c-myb-Gen ist als schwarzer Balken hervorgehoben.

Alle Konstrukte wurden in die Hefestämme GS115 sowie SMD 1168 transformiert und einzelne Klone auf Expression getestet. Bei Verwendung der Vektoren pHilSF2Myb und pPic9F2Myb wurde im Medium kein ausgeschleustes Protein entdeckt.

Unter den mit dem Plasmid pHilDF2Myb transformierten Hefen konnten dagegen im Western-Blot mehrere c-Myb exprimierende Klone identifiziert werden.

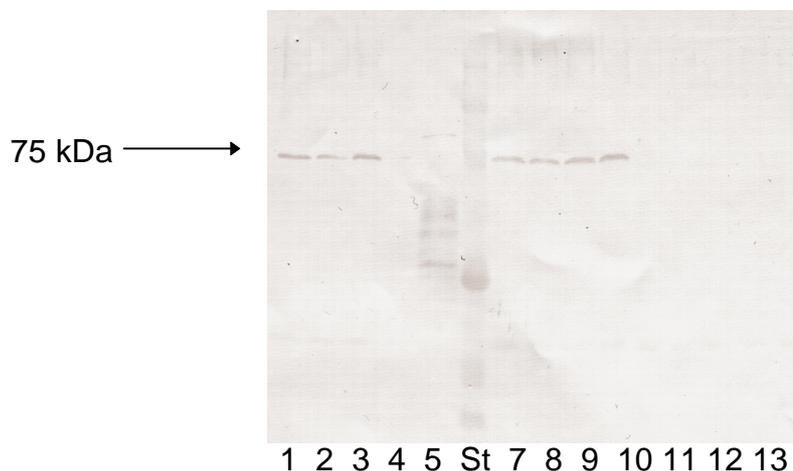


Abbildung 4-9 Westernblot von Zell-Lysaten induzierter Hefeklone. St: Rainbow-Marker (Fa. Amersham), Bahn 1-4 und 7-13: induzierte Klone, Bahn 5: Kontrolle (c-Myb R123). Als erster Antikörper diente ein polyklonaler anti-Myb AK (zur Verfügung gestellt von B. Lüscher) als zweiter Antikörper ein HRP-gekoppelter *goat-anti-rabbit* AK

Wie in Abbildung 4-9 zu sehen, waren mehr als 50% der untersuchten Klone expressionspositiv. Im Gegensatz zur Expression in Prokaryonten sind auch keine, durch proteolytischen Abbau hervorgerufenen, kleineren Banden zu erkennen. Weil im Western-Blot nur die Überstände der Zellaufschlüsse analysiert wurden, kann man schließen, daß das produzierte c-Myb Protein in löslicher Form vorliegt.

Da das für die Expression benutzte Konstrukt die kodierende Sequenz für sechs N-terminale Histidine enthält, wurde das rekombinante Protein über Ni^{2+} NTA-Agarose gereinigt. Es wurde allerdings nur eine schwache Bindung des Proteins an die Säulenmatrix beobachtet, ein großer Teil des Proteins war im Durchlauf nachzuweisen. Es eluierte bei niedrigen Imidazolkonzentrationen (40 - 100 mM Imidazol) von der Säule. Dennoch gelang es, wie in Abbildung 4-10 dargestellt, c-Myb in reiner Form zu präparieren. Das Protein war über 95% sauber, wie von einem Coomassie gefärbtem SDS-Polyacrylamidgel abgeschätzt werden konnte.

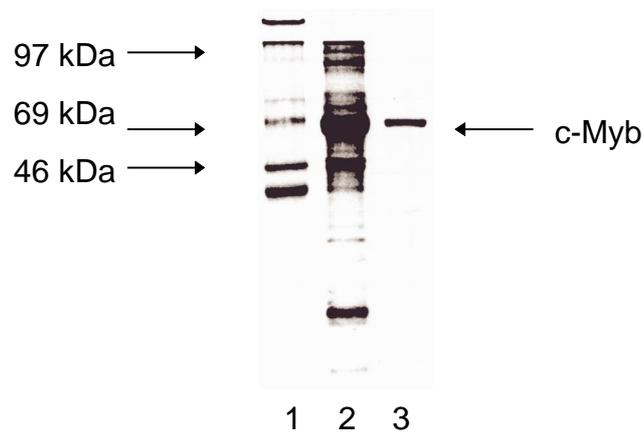


Abbildung 4-10 Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel von Eluaten der Ni^{2+} NTA-Agarose. Bahn 1: Standard (Merck VIII), Bahn 2 und 3: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol.

Um die DNA-Bindungsfähigkeit des rekombinanten Proteins zu untersuchen, wurden EMSA-Experimente durchgeführt.

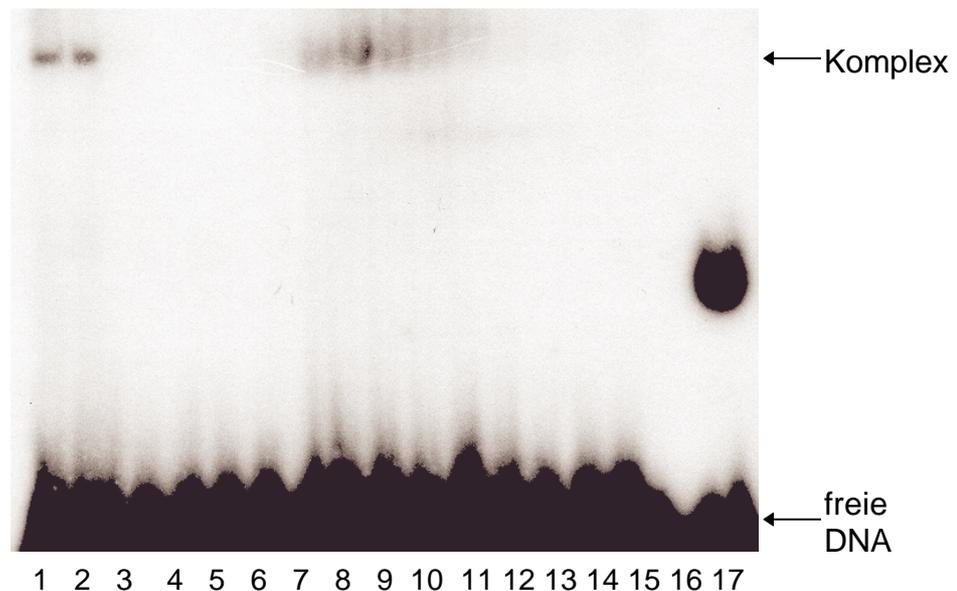


Abbildung 4-11 Autoradiographie des Gelshifts von verschiedenen Fraktionen nach Elution von der Ni^{2+} NTA-Agarose. Bahn 1: Zell-Lysat vor Aufreinigung, Bahn 2: Durchlauf der Säule, Bahn 3-5: Waschfraktionen, Bahn 6: Elution mit 10 mM Imidazol, Bahn 7-10: Fraktionen mit steigender Imidazolkonzentration (20-80 mM, in Schritten von 20 mM), Bahn 11-15: Fraktionen mit 100 mM Imidazol, Bahn 16: Fraktion mit 500 mM Imidazol, Bahn 17: Kontrolle (c-Myb R123). Die Konzentration des Oligodesoxynukleotids (Sequenz AACAT-TATAACGGTTTTTAAAT) betrug 500 nM in allen Ansätzen.

Wie in Abbildung 4-11 zu sehen, ist das aufgereinigte Protein in der Lage, spezifisch die Myb-Erkennungssequenz zu binden. Die Fraktionen 8 - 10 besitzen die größten Konzentrationen an DNA-bindendem Protein, es handelt sich dabei um Elutionen mit 40, 60 und 80 mM Imidazol.

Alle beschriebenen Experimente wurden aus den bei den Induktionstest gewonnenen Zell-Lysaten, bzw. einem ersten *scale up* von 300 ml durchgeführt. Um die Ergebnisse zu reproduzieren und die Aufreinigung zu verbessern, wurden die Klone in größerem Kulturmaßstab herangezogen. In keiner der folgenden Induktionen konnte c-Myb nachgewiesen werden, obwohl die neuen Ansätze aus derselben Glycerinkultur angeimpft wurden. Erneute Transformationen, Variation der Induktions- und Aufschlußbedingungen brachten ebenfalls keine Veränderung, so daß die Arbeiten mit diesem Expressionssystem eingestellt wurden.

4.1.5 EXPRESSION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Als weiteres eukaryontisches Expressionssystem wurde die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* getestet. Im Gegensatz zu *Pichia pastoris* liegt die transformierte DNA extrachromosomal vor und integriert nicht ins Genom. Die Induktion erfolgt ebenfalls durch den Wechsel des Mediums, hier von Glucose zu Galactose.

Da eine direkte Klonierung aufgrund von inkompatiblen Schnittstellen nicht möglich war, wurde das c-myb Gen zunächst im Plasmid pBluescript II KS zwischenkloniert. Dazu wurde aus dem Vektor pHIDF2Myb das Gen mit *Pvu* II und einen limitierten Verdau mit *EcoR* I herausgeschnitten und in das mit *EcoR* I und *HinC* II geöffnete Plasmid pBluescript II KS einligiert.

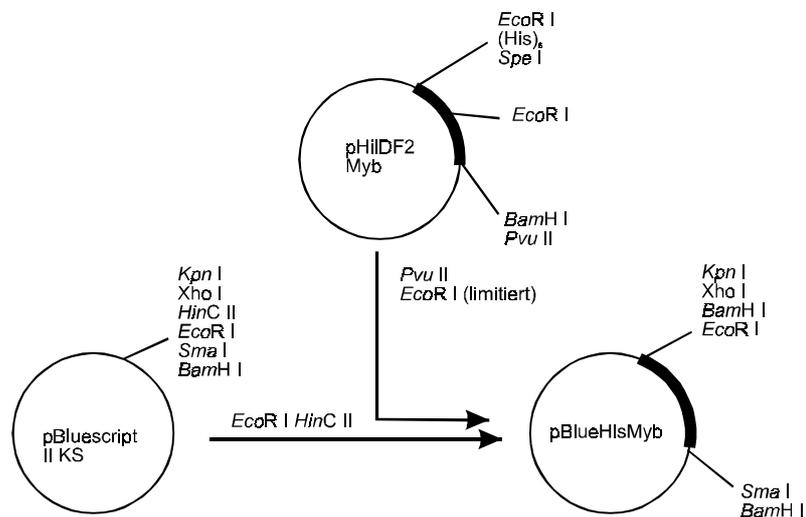


Abbildung 4-12 Klonierungsstrategie für die Zwischenklonierung von c-myb. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Das c-myb-Gen ist als schwarzer Balken hervorgehoben.

Aus dem so erhaltenen Plasmid pBlueHisMyb konnte das Gen dann über die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *BamH I* in den Expressionsvektor pYEUra3 ligiert werden.

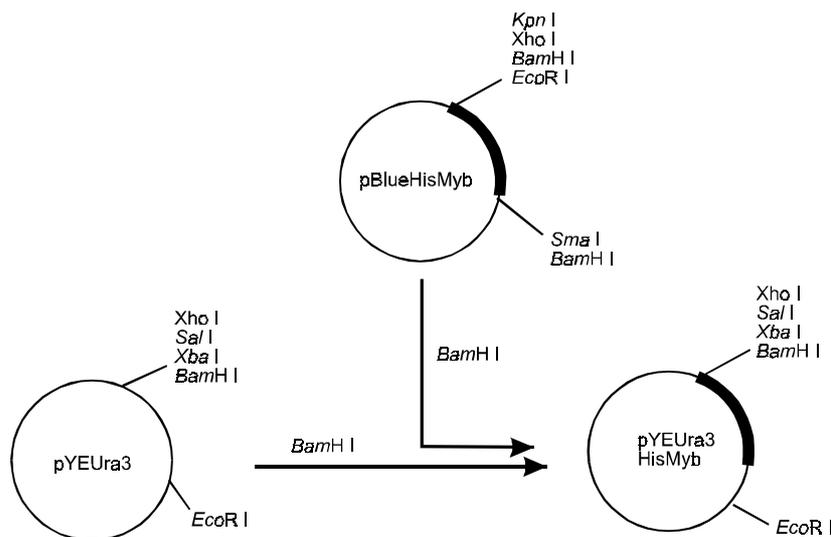


Abbildung 4-13 Klonierungsstrategie für die intrazelluläre Expression von c-Myb in *Saccharomyces cerevisiae*. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Das c-myb-Gen ist als schwarzer Balken hervorgehoben.

Das entstandene Plasmid wurde in Zellen des Stammes AB1380 transformiert und die gewonnenen Klone auf Expression getestet. Dazu wurden die Klone in 25 ml Kulturen angezogen, durch Medienwechsel induziert und nach 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden ein Aliquot entnommen. Die in diesen

Proben enthaltene Zellen wurden aufgeschossen und auf exprimiertes c-Myb untersucht, allerdings konnte das Protein weder im Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel noch im Westernblot nachgewiesen werden .

4.1.6 EXPRESSION IN COS-ZELLEN

Es wurde die Expression von *full-length* c-Myb in Cos-Zellen, einer eukaryontischer Zellkultur getestet. Als Vektor diente das Plasmid pEd.Fc, das von Frau Dr. R. Gerady-Schahn zur Verfügung gestellt wurde. In diesen Vektor wurde zunächst ein Linker einligiert, der es ermöglicht, das c-myb Gen ohne Stop-Codon 5' vor das Gen für den Fc-tag zu klonieren. Das c-myb Gen selbst wurde aus dem Plasmid pBlueHisMyb gewonnen (siehe Abbildung 4-12).

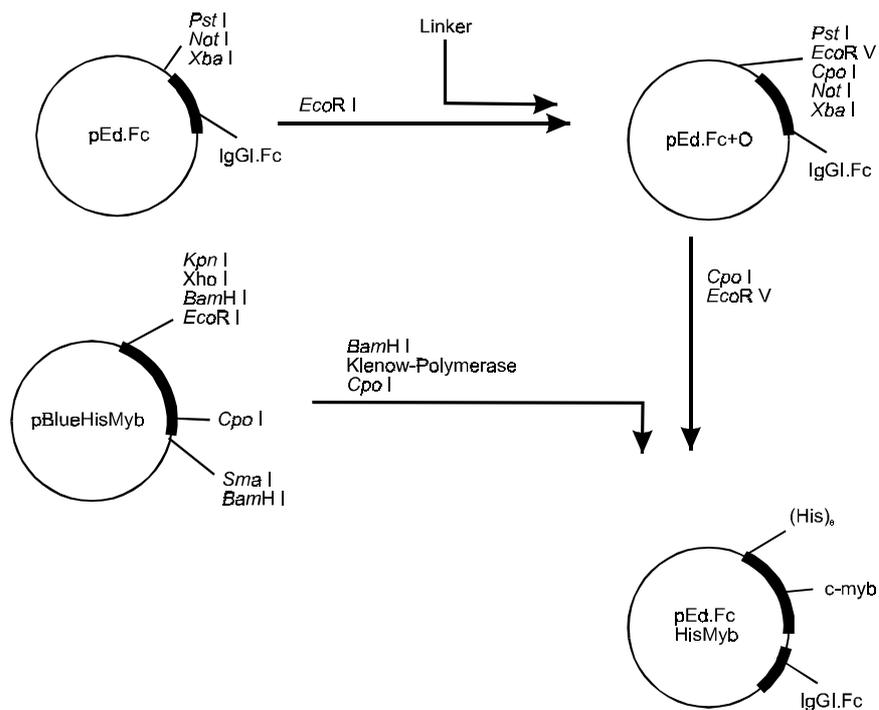


Abbildung 4-14 Klonierungsstrategie für die intrazelluläre Expression von c-Myb in Cos-Zellen. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Das c-myb-Gen und das Gen für den Fc-tag sind als schwarze Balken hervorgehoben.

Der Vektor pEd.FcHisMyb wurde in Cos-Zellen transfiziert und die Zellen nach zwei bzw. drei Tagen aufgearbeitet. Der Nachweis des c-Myb Proteins erfolgte dabei im Westernblot.

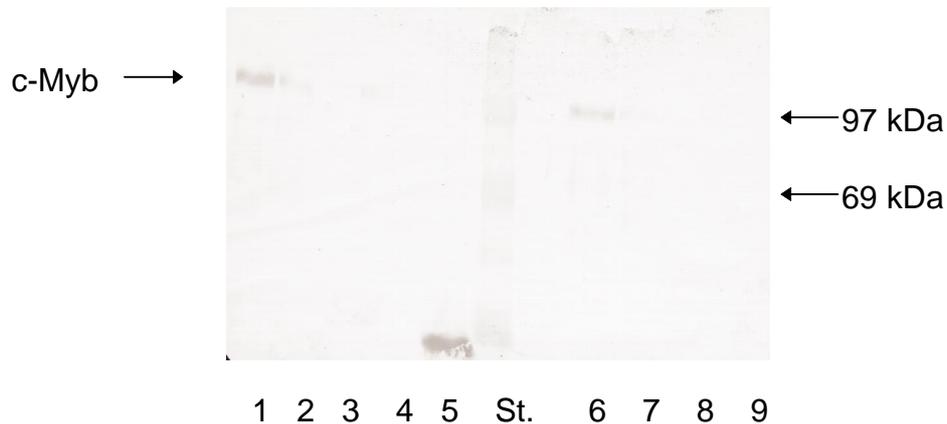


Abbildung 4-15 Westernblot von Cytosol- und Zellkernextrakten transfizierter Cos-Zellen. St: Rainbow-Marker (Fa. Amersham), Bahn 1-4 6µl Lipofectamin pro µg DNA und 6-10: 10 µl Lipofectamin pro µg DNA, Bahn 5: Kontrolle (c-Myb R123). Bahn 1+6: cytosolische Fraktion nach 2 d Kultur, Bahn 2+7: Zellkernextrakt nach 2 d Kultur, Bahn 3+8: cytosolische Fraktion nach 3 d Kultur, Bahn 4+9: Zellkernextrakt nach 3 d Kultur. Als erster Antikörper diente ein monoklonaler anti-Myb AK (zur Verfügung gestellt von K.-H. Klempnauer) als zweiter Antikörper ein HRP-gekoppelter *goat-anti-mouse* AK

Wie in Abbildung 4-15 zu erkennen, konnte das c-Myb Protein ohne proteolytische Degradation exprimiert werden. Ein hohes Verhältnis von Lipofectamin zu DNA war dabei eher kontraproduktiv, die bessere Expression war bei einem DNA/Lipofectamin-Verhältnis von 1:6 zu beobachten. Auch eine verlängerte Kulturzeit führte nicht zu besseren, sondern zu schlechteren Ausbeuten. Das Protein war in der Zelle hauptsächlich im Cytosol lokalisiert, während ein geringer Anteil im Zellkern nachgewiesen wurde.

Wie bei *Pichia Pastoris* (Kapitel 4.1.4) wurde auch für die Expression in Cos-Zellen getestet, ob sich das Protein sekretieren läßt. Zu diesem Zweck wurde die für ein Signalpeptid (Transin-Signalpeptid) codierende Sequenz 5' vor das c-myb-Gen kloniert. Dazu wurde die für das Peptid kodierende Sequenz in die Schnittstellen *EcoR* I und *HinD* III des Plasmides pBluescript II KS ligiert. Über die *EcoR* I Schnittstelle wurde dann ein den (His)₆-tag und die DNA-Bindungsdomäne enthaltendes Fragment einkloniert. Unter Benutzung

der Schnittstellen *Spe* I und *Pau* I wurde dann das benötigte Fragment in den Vektor pEd.FcHisMyb umgesetzt.

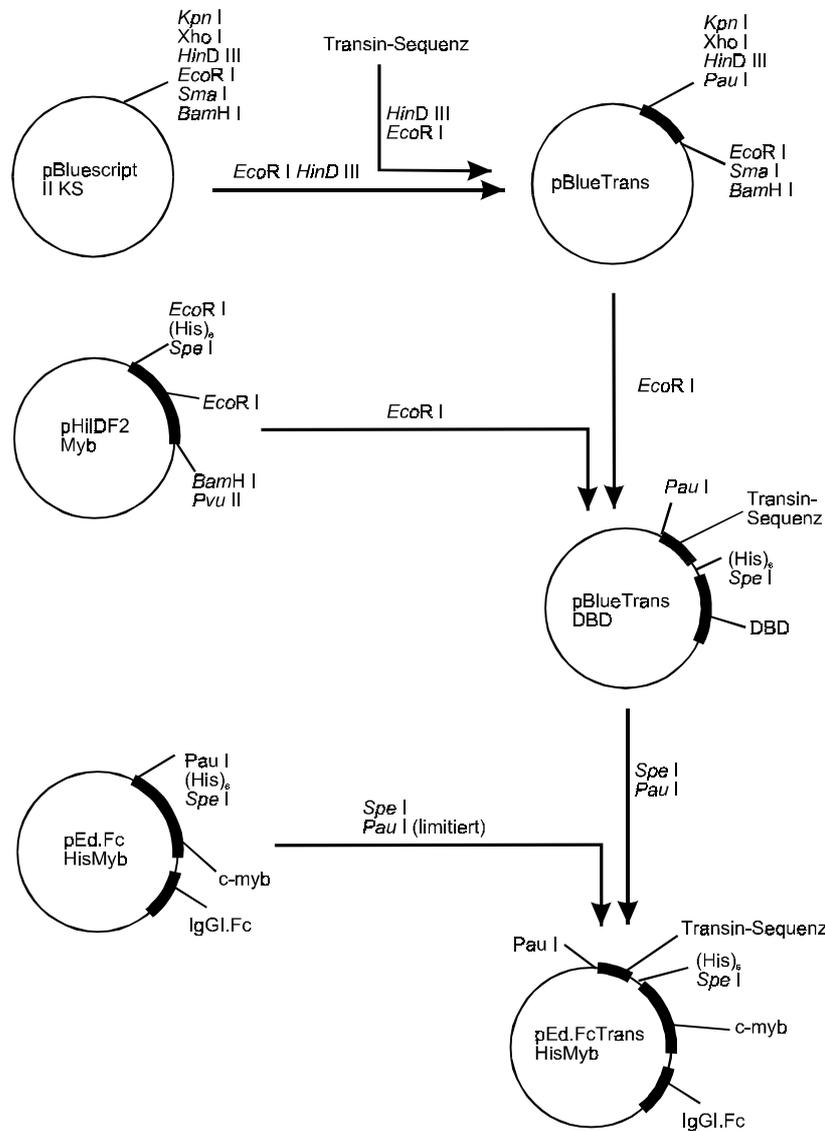


Abbildung 4-16 Klonierungsstrategie für die sekretorische Expression von c-Myb in Cos-Zellen. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen. Das *c-myb*-Gen, die *Transin*-Sequenz und das Gen für den Fc-tag sind als schwarze Balken hervorgehoben.

Das Plasmid pEd.FcTansHisMyb wurde in Cos-Zellen transfiziert und die Überstände der Kulturen über einen Zeitraum von 8 d gesammelt. Es kamen dabei zwei unterschiedliche Medien zum Einsatz:

- SMIF: Serumfreies Medium (GBF Braunschweig)
- Hybridoma-Medium: FCS-haltiges Medium (Fa. Gibco)

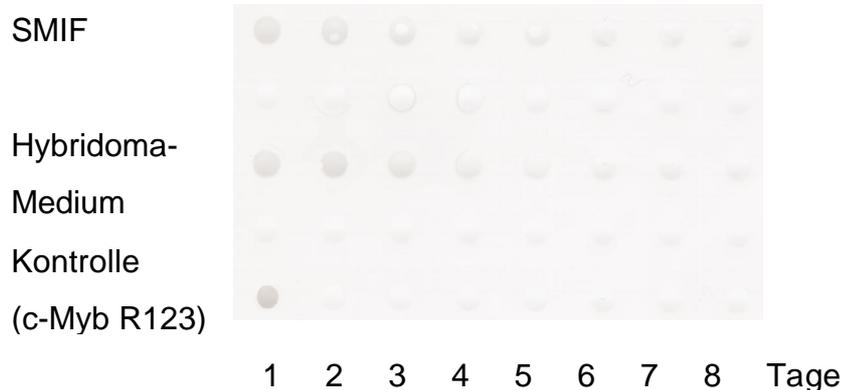


Abbildung 4-17 Dot-Blot der Überstände von mit pEd.FcTransHisMyb transfizierten Cos-Zellen. Aufgetragen wurden 200 μ l Medium pro *Well*. Als erster Antikörper diente ein monoklonaler anti-Myb AK (zur Verfügung gestellt von K.-H. Klemnauer) als zweiter Antikörper ein HRP-gekoppelter *goat-anti-mouse* AK.

Wie aus Abbildung 4-17 zu ersehen ist, wurde das c-Myb-Protein von Cos-Zellen nach Transfektion mit pEd.FcTransHisMyb produziert und sekretiert. Dabei konnte die Sekretion nur innerhalb der ersten drei bis vier Tage beobachtet werden, danach war das Protein nicht mehr, oder kaum noch nachzuweisen. Außerdem ist zu bemerken, daß bei Cos-Zellen in Hybridoma-Medium die Sekretion einen Tag länger aufrechterhalten blieb, als bei Zellen, die in SMIF gehalten wurden.

Ein Versuch das rekombinante Protein über Ni²⁺NTA-Agarose aufzureinigen, scheiterte: Vermutlich war der (His)₆-tag nicht zugänglich, was für N-terminale (His)₆-tag Varianten von c-Myb nicht bekannt ist, oder der Fusionsanteil wurde während der Sekretion abgespalten. Versuche mit klassischen Ionenaustauschern waren bei Abgabe dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen.

4.2 MUTAGENESESTUDIEN

Mit der von Ogata et al. [1994] veröffentlichten NMR-Struktur des zweiten und dritten *Repeats* der DNA-Bindungsdomäne im Komplex mit DNA wurde ein Modell für die am *direct* und *indirect read out* beteiligten Aminosäuren aufgestellt. Die Evidenz dieser Kontakte sollte durch zielgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) und Charakterisierung der DNA-Bindungs-fähigkeit der Mutanten, bzw. ungerichtete Mutagenese (*random mutagenesis*) mit anschließender Selektion der entstandenen Mutanten auf die Fähigkeit, die spezifische Erkennungssequenz zu binden, überprüft werden.

Zu diesem Zweck wurde in flankierenden Bereichen der für die dritte Helix des dritten *Repeats* kodierenden Sequenz durch PCR-Mutagenese je eine neue Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen *Sca* I und *Bsi*W I durch stumme Mutationen generiert (beschrieben in Kapitel 4.2.1). Dadurch wurde es möglich, durch die Insertion von doppelsträngigen Oligodesoxynukleotidkassetten, die gewünschten Mutationen zu erzeugen.

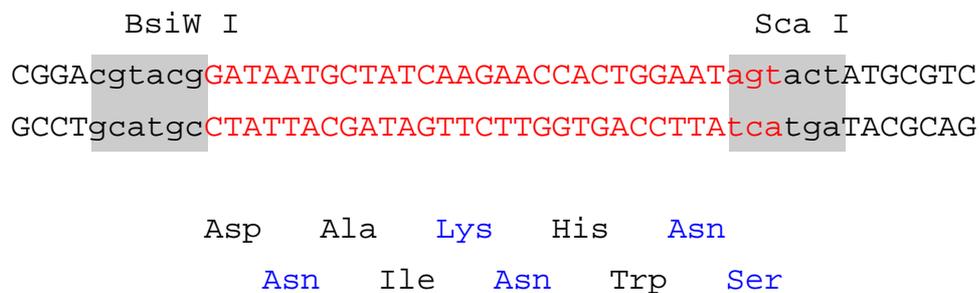


Abbildung 4-18 Schematische Darstellung der dritten Helix im dritten *Repeat* nach Generierung neuer Schnittstellen durch PCR-Mutagenese. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen sind grau hinterlegt, der für die α -Helix kodierende Bereich ist rot dargestellt. Unter der Nukleinsäure-Sequenz sind die die Helix formierenden Aminosäuren dargestellt, am *direct read out* beteiligte Aminosäuren sind blau gekennzeichnet.

4.2.1 RANDOM-MUTAGENESE IM PHAGE DISPLAY

Das in unserem Labor etablierte *Phage-Display* [Kiewitz 1997] sollte als System für die *random*-Mutagenese an der DNA-Bindungsdomäne getestet werden. Dazu wurde der Vektor pCantab 5E derart modifiziert, daß durch eine stumme Mutation die Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Sca* I, im Bereich des β -Lactamase Gens, deletiert wurde. Die Mutagenese zur Deletion wurde im Plasmid pQE 30 (siehe Kapitel 4.2.3) durchgeführt und in pCantab 5E umgesetzt.

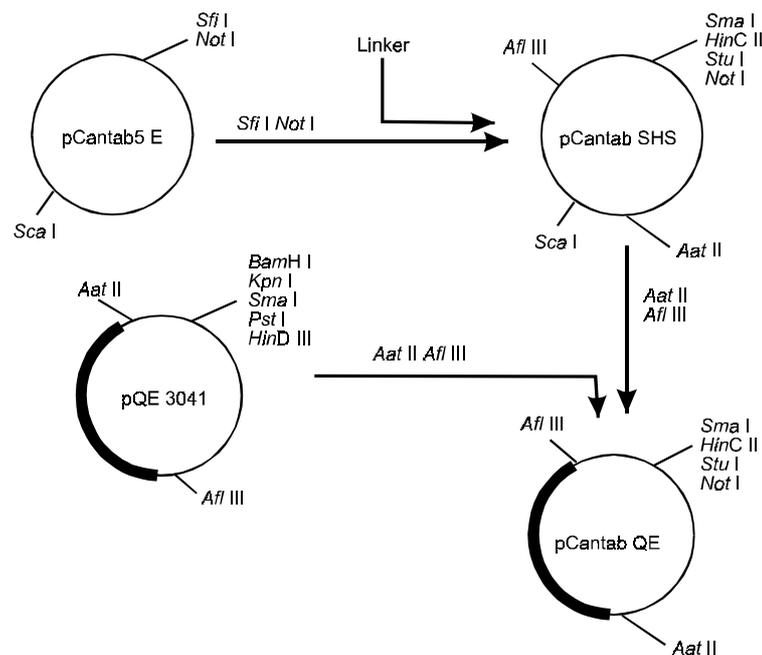


Abbildung 4-19 Klonierungsstrategie zur Deletion der *Sca* I Schnittstelle im Vektor pCantab 5E. Das mit dem Linker versehene Plasmid wurde von Dr. A. Kiewitz zur Verfügung gestellt. Die mit schwarzen Balken hervorgehobene Bereiche enthalten die Ampicillin-Resistenz, sowie den *origin-of-replication*.

Anschließend wurde der für die Aminosäuren 1 bis 198 des c-Myb Proteins kodierende Bereich (im folgenden DNA-Bindungsdomäne bzw. DBD genannt) einligiert, und die beiden Schnittstellen (siehe Abbildung 4-18) über PCR-Mutagenese generiert. Das PCR-Produkt wurde dabei über die beiden Schnittstellen *Bst*XI und *Not* I kloniert.

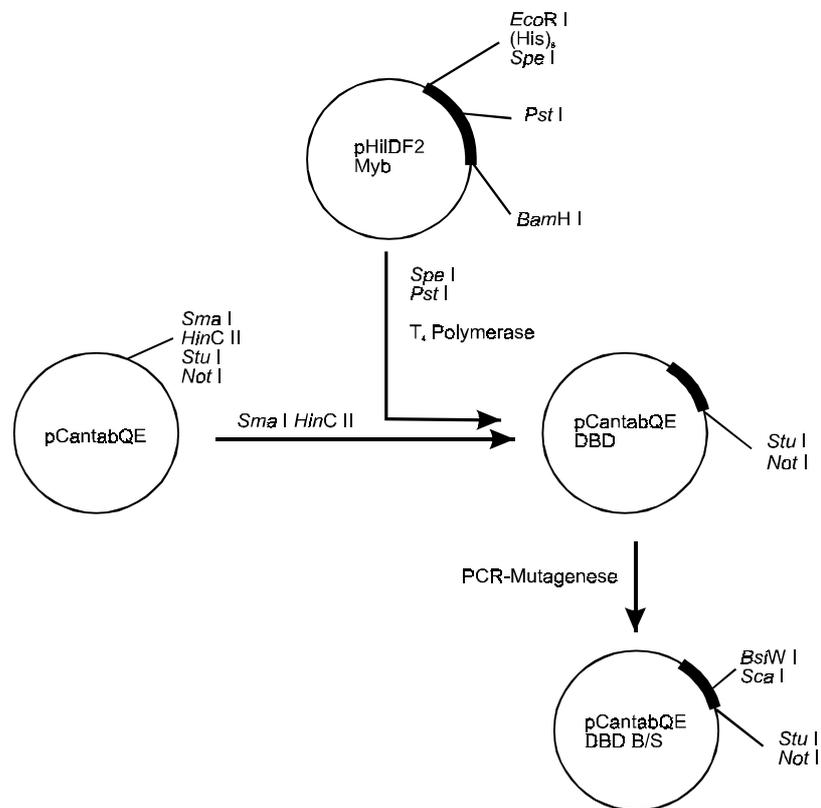


Abbildung 4-20 Klonierungsstrategie zur Generierung eines für die *random*-Mutagenese der c-Myb DBD tauglichen Vektors. Das c-myb-Gen bzw. der für die Aminosäuren 1-198 codierende Bereich ist als schwarzer Balken hervorgehoben.

Der Vektor pCantabQE DBD B/S wurde in Zellen des Stammes TG I transformiert und durch *Phage-Rescue* rekombinante Phagen erzeugt (siehe Kapitel 3.4.4.2). Die Phagen wurden im Dot-Blot auf Exposition der c-Myb DNA-Bindungsdomäne getestet, wobei jedoch kein Signal zu erkennen war. Als weiterer Test wurden auf einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte (Fa. Xenopore) Biotin-gekoppelte Oligodesoxynukleotide mit der Myb-Erkennungsequenz immobilisiert und versucht, die rekombinanten Phagen daran zu binden. Nach mehreren Waschvorgängen wurden mit den verbliebenen Phagen TG I-Zellen infiziert. Bei diesem Experiment konnte zwischen den *Wells* mit immobilisierter DNA und den *Wells* ohne DNA kein Unterschied in der Infektionsrate festgestellt werden. Um einen Einfluß der Mikrotiterplatte auszuschließen, wurden Platten mehrerer anderer Hersteller getestet und selbst mit Avidin beschichtet. Auch in diesen Fällen zeigte sich kein Unterschied zwischen der Probe mit spezifischer DNA und der Nullprobe. Es

mußte also davon ausgegangen werden, daß die rekombinanten Phagen die Myb DNA-Bindungsdomäne nicht auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Für die Präsentation des Fremdproteins auf der Phagenoberfläche ist es notwendig, daß sowohl der Übergang von der *peIB-leader*-Sequenz ins Fremdgen, als auch der vom Fremdgen zum g3p-Gen im Leseraster liegt. Um sicher zu sein, auf jeden Fall das richtigen Leseraster zu besitzen, wurden im Übergang zwischen *peIB-leader*-Sequenz und dem Bereich der DNA-Bindungsdomäne alle drei Leseraster generiert. Dies geschah durch Schneiden des Vektors mit *Nco* I, Auffüllen (pCantabQE DBD B/S N+) bzw. Abdauen (pCantabQE DBD B/S N-) der Überhänge und Religation. Die neuen Plasmide wurden in TG I-Zellen transformiert und rekombinante Phagen gewonnen. Auch die neuen Phagen wurden im Dot-Blot auf Oberflächenpräsentation der DNA-Bindungsdomäne getestet.

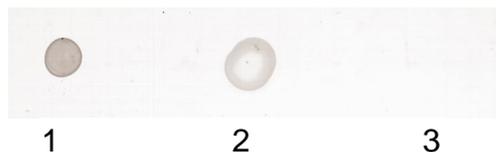


Abbildung 4-21 Dot-Blot von rekombinanten Phagen mit verschobenem Leseraster. 1: Kontrolle (c-Myb R123), 2: pCantabQE DBD B/S N+, 3: pCantabQE DBD B/S N-. Als erster Antikörper diente ein monoklonaler anti-Myb AK (zur Verfügung gestellt von K.-H. Klemnauer) als zweiter Antikörper ein HRP-gekoppelter *goat-anti-mouse* AK

Wie zu erkennen, ist die c-Myb DNA-Bindungsdomäne auf den mit dem Phagemid pCantabQE DBD B/S N+ erzeugten Phagen nachzuweisen. Mit dieser Phagenpräparation wurde die Fähigkeit DNA zu binden wie oben beschrieben getestet, allerdings konnten wiederum keine Unterschiede in der Infektionsrate zwischen Probe und Negativkontrolle festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Versuch der *random*-Mutagenese unter Verwendung des *Phage-Display* Systems eingestellt.

4.2.2 RANDOM-MUTAGENESE IM FLITRX-SYSTEM

Das von der Fa. Invitrogen vertriebene FliTrx-System dient dazu, die Affinität kurzer randomisierter Peptide zu einem Zielkonstrukt zu ermitteln. Das Peptid befindet sich dabei in einem aus Teilen des Thioredoxin geformten *Loop*, der wiederum in das FliC-Genprodukt (Flagellin) eingebettet ist (siehe Abbildung 4-22).

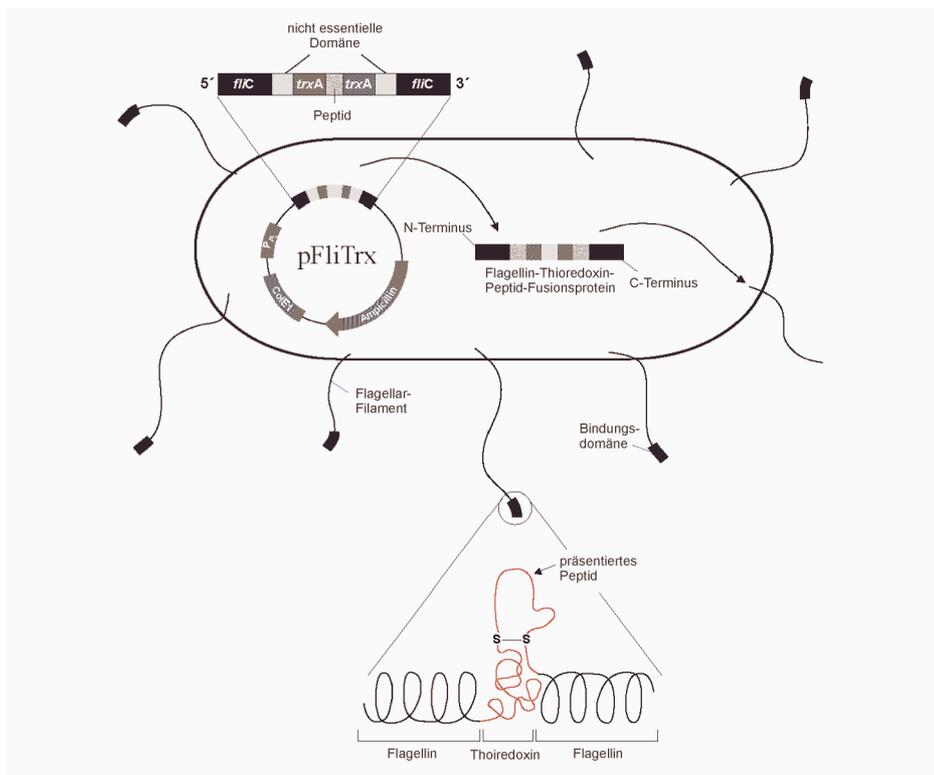


Abbildung 4-22 Schematische Darstellung des FliTrx-Peptid-Display-Systems modifiziert nach [Invitrogen 1997]

Weil auf den C-terminalen Teil des FliC-Genproduktes verzichtet werden kann [Weigel 1997], wurde getestet, ob es möglich ist, die DNA-Bindungsdomäne von c-Myb mit der N-terminalen Hälfte des FliC-Genproduktes zu fusionieren und ob ein derartiges rekombinantes Protein auf der Oberfläche präsentiert wird. Damit wäre ein System zur *random*-Mutagenese entwickelt, das ohne den Umweg über Phagen direkt die Kopplung von Genotyp und Phänotyp erlaubt. Zu diesem Zweck wurden die

für das *random*-Peptid und die C-terminalen Anteile von Thioredoxin und Flagellin kodierenden Sequenzen aus dem Plasmid pFliTrx entfernt (*Rsr* II und *Pvu* II) und durch ein Oligodesoxynukleotid ersetzt. Dieser Linker enthält die für die Klonierung der DNA-Bindungsdomäne notwendigen Schnittstellen und Stop-Kodons für die Beendigung der Translation. Die für die DNA-Bindungsdomäne kodierende Sequenz wurde aus dem Vektor pCantabQE DBD B/S über *Nco* I und *Stu* I ausgeschnitten und in die *Nco* I und *Sma* I Schnittstellen des pFliTrx+O ligiert.

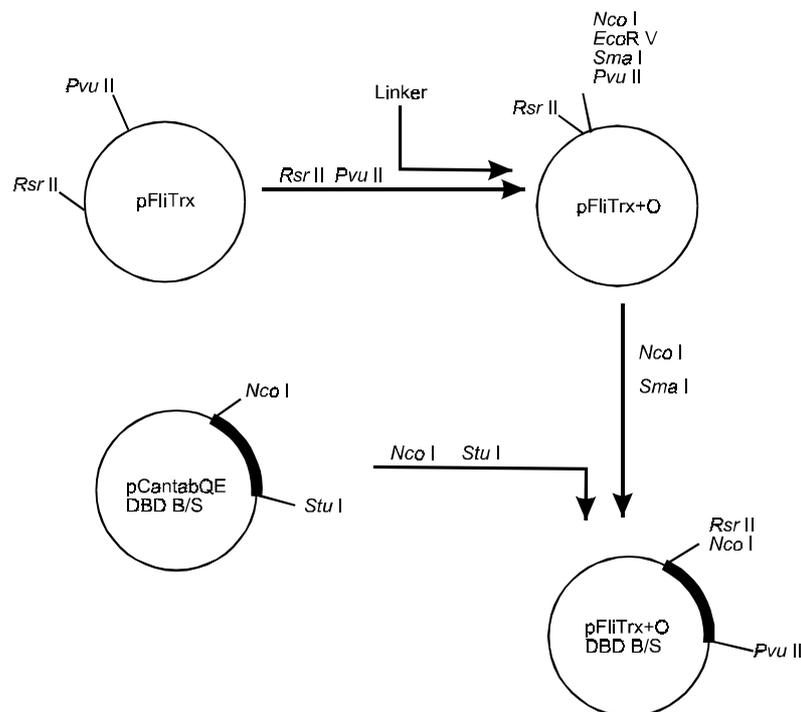


Abbildung 4-23 Klonierungsstrategie zur Präsentation der c-Myb DBD auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen, der für die DNA-Bindungsdomäne codierende Bereich ist als schwarzer Balken hervorgehoben.

Das Plasmid pFliTrx+O DBD B/S wurde in Zellen des Stammes GI 826 transformiert und die Expression mit Tryptophan induziert. Die Zellen wurden auf Expression des Fusionsproteins untersucht. Im Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel konnte die Expression nicht zweifelsfrei belegt werden, aber im Western-Blot war die Produktion des Fusionsproteins nachzuweisen.

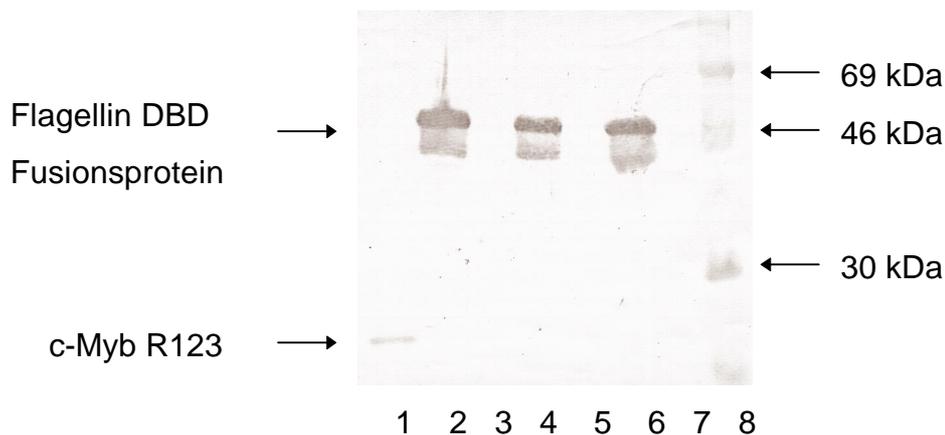


Abbildung 4-24 Western-Blot der Zell-Lysate von drei unabhängigen Klonen. Bahn 1: Kontrolle (c-Myb R123), Bahn 2: Klon A nach Induktion, Bahn 3: Klon A vor Induktion, Bahn 4: Klon B nach Induktion, Bahn 5: Klon B vor Induktion, Bahn 6: Klon C nach Induktion, Bahn 7: Klon C vor Induktion, Bahn 8: Standard (Rainbow-Marker Fa. Amersham). Als erster Antikörper diente ein monoklonaler anti-Myb AK (zur Verfügung gestellt von K.-H. Klemnauer) als zweiter Antikörper ein HRP-gekoppelter *goat-anti-mouse* AK

Zum Nachweis der Oberflächenexposition des Fusionsprotein wurde ein Dot-Blot mit lebenden Zellen angefertigt. Hierbei war kein Signal zu erhalten, so daß davon ausgegangen werden muß, daß sich das rekombinante Protein nicht auf der Zelloberfläche befindet.

4.2.3 ZIELGERICHTETE MUTAGENESE

Neben den Versuchen, ein System zur *random*-Mutagenese aufzubauen, wurden die für den *direct-read-out* postulierten Aminosäuren gezielt gegen andere ausgetauscht. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pQE30 derart modifiziert, daß über die durch stumme Mutationen in die Gensequenz der DNA-Bindungsdomäne eingeführten Schnittstellen Oligodesoxynukleotide kloniert werden konnten, die die Mutationen einführen.

Dazu mußten zwei Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Sca* I deletiert werden. Die im β -Lactamasegen liegende Schnittstelle wurde durch PCR-Mutagenese entfernt, die zweite Schnittstelle ging durch Religation des *Sca* I und *Pvu* II geschnittenen Plasmids verloren.

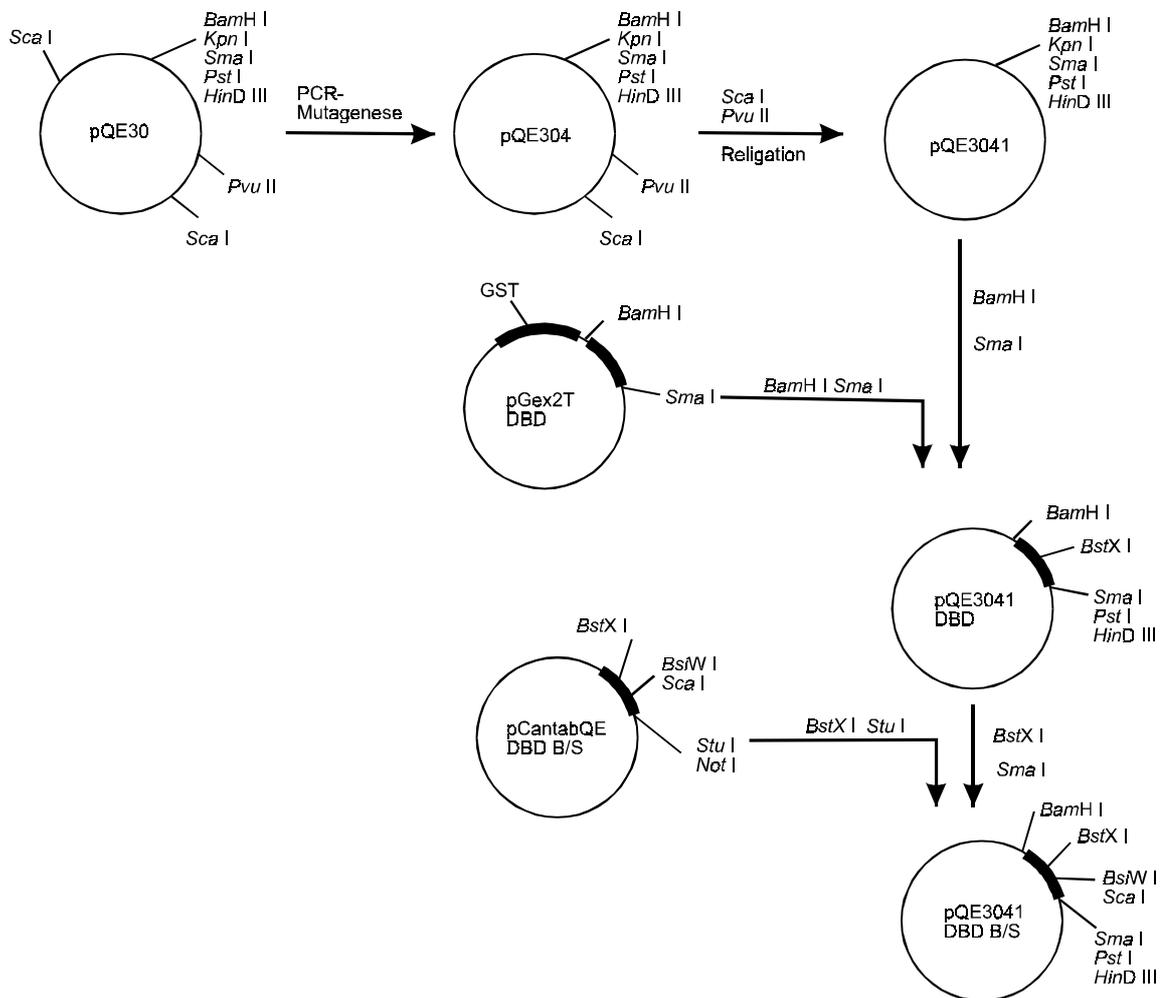


Abbildung 4-25 Klonierungsstrategie für den Expressionsvektor pQE3041DBD B/S für die zielgerichtete Mutagenese der c-Myb DNA-Bindungsdomäne. Angegeben sind nur die wichtigsten Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen, der für die DNA-Bindungsdomäne bzw. GST codierende Bereich ist als schwarzer Balken hervorgehoben.

Sämtliche Aminosäuren in der dritten Helix des dritten *Repeats*, denen nach der NMR-Struktur Kontakte zu den Basen der Erkennungssequenz zugeordnet werden konnten, waren Ziel der Mutagenese. Es wurden 10 Einzelmutanten und eine Doppelmutante erzeugt, die in der Tabelle 4-1 zusammengefaßt sind.

Position	179	182	183	186	187					
Wildtyp	Asp	Asn	Ala	Ile	Lys	Asn	His	Trp	Asn	Ser
N179A	Ala									
N179D	Asp									
K182A		Ala								
K182E		Glu								
N183A			Ala							
N183D			Asp							
N183A/N186A			Ala			Ala				
N186A						Ala				
N186D						Asp				
S187A										Ala
S187N										Asn

Tabelle 4-1 Aufzählung der innerhalb des dritten *Repeats* erzeugten Mutanten. Die in der ersten Spalte stehenden Abkürzungen werden im folgenden benutzt.

Die klonierten Vektoren wurden in Zellen des Stammes TG I transformiert, induziert und die rekombinanten Proteine aufgereinigt. Die Affinität der Proteine zur spezifischen DNA-Sequenz wurde im Gelshift (siehe Kapitel 3.5.5) gemessen. Um nachzuweisen, ob alle Proteine korrekt gefaltet sind, wurden CD-Spektren der Mutanten aufgenommen. Da das für die Elution von der Ni²⁺NTA-Agarose benutzte Imidazol selbst in geringen Mengen derartige Untersuchungen stört, wurde alle Mutanten in den Vektor pGex2T umgesetzt, das Protein an GSH-Sepharose gebunden und der Fusionsanteil abgespalten. Alle hier dargestellten Untersuchungen wurden mit den im GST-System exprimierten Proteinen durchgeführt.

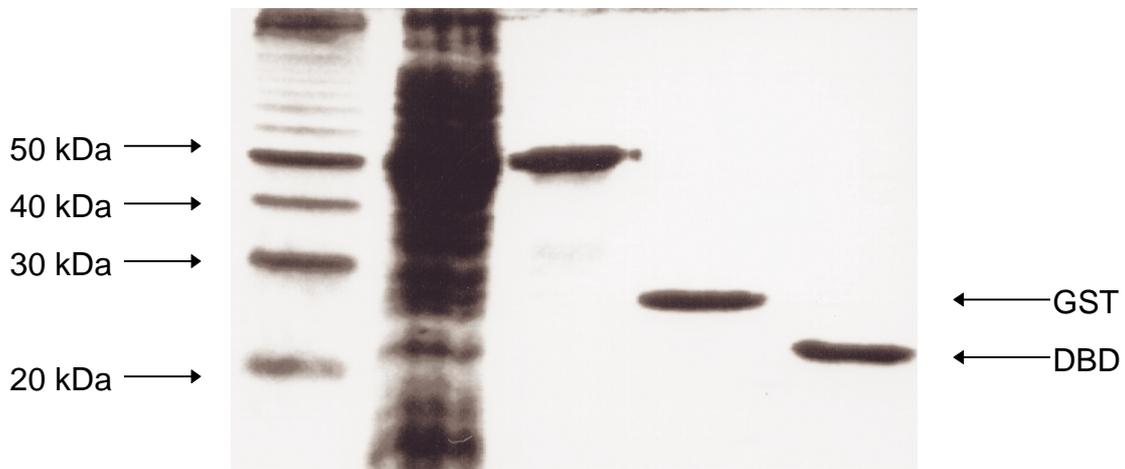


Abbildung 4-26 Ablauf der Proteinaufreinigung am Beispiel der S187A. Dargestellt ist ein Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Bahn 1: 10 kDa-Leiter (Fa. MBI Fermentas), Bahn 2: Zell-Lysat, Bahn 3: Aliquot der GSH-Sepharose vor Thrombin-Spaltung, Bahn 4: Aliquot der GSH-Sepharose nach Thrombin-Spaltung, Bahn 5: Von der GSH-Sepharose eluiertes Protein.

Die Reinheit der Proteine kann nach dem Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel auf mehr als 95% abgeschätzt werden. Die erreichten Konzentrationen lagen je nach Mutante und Aufreinigung im Bereich von 3-4 μM . Anschließend wurden die Proteine durch CD-Spektroskopie auf ihre Strukturanteile hin untersucht. Alle Mutanten zeigen ein sehr ähnliches CD-Spektrum, ihr Gehalt an α -Helix liegt jeweils bei 43% ($\pm 5\%$). Dieser Wert entspricht dem für den Wildtyp bestimmten Daten [Ebneht 1994] und zeigt, daß sich die Gesamtstruktur durch die Einführung der Mutationen nicht geändert hat. Der Verlust der Bindungsfähigkeit einzelner Mutanten beruht also nicht auf einer veränderten Gesamtstruktur, sondern ist auf die Veränderung der spezifischen Kontakte zur DNA zurückzuführen.

Die Mutanten wurden im EMSA auf DNA-Bindung untersucht und die Ergebnisse mit dem Programm EasyWin 32 der Fa. Herolab bestimmt.

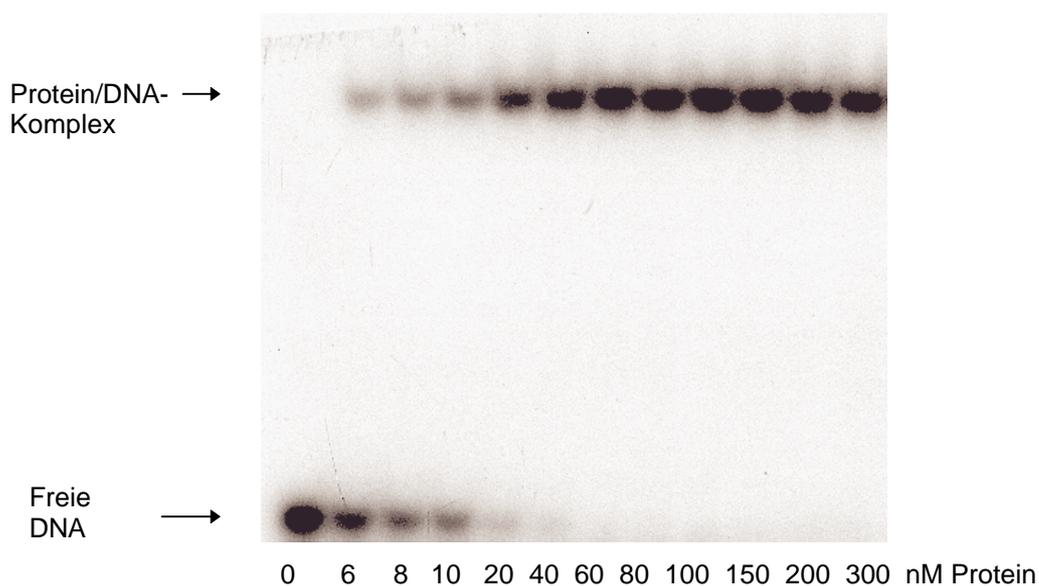


Abbildung 4-27 Autoradiographie eines Gelshifts am Beispiel der Mutante S187N. Die Konzentration des Oligodesoxynukleotids (Sequenz TTACCTAACTGACACACAT) betrug in allen Ansätzen 10 nM.

Die ermittelten Daten sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Mutante	Assoziationskonstante [M^{-1}]
Wildtyp	$3,2 \times 10^8$
N179A	$<10^4$
N179D	nd
K182A	$<10^4$
K182E	nd
N183A	$<10^4$
N183D	nd
N183A/N186A	nd
N186A	$3,4 \times 10^8$
N186D	$<10^4$
S187A	$6,7 \times 10^7$
S187N	$2,8 \times 10^8$

Tabelle 4-2 Ermittelte Bindungskonstante der im Zuge der Arbeit hergestellten Mutanten. nd=DNA-Bindung nicht nachweisbar, $<10^4$ =DNA-Bindung nachweisbar, aber so schwach, daß keine Bindungskonstante berechnet werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Positionen N179, K182 und N183 in ihrer Wichtigkeit für die DNA-Bindung bestätigt werden konnten, während N186 keinen und S187 nur einen geringen Einfluß auf die DNA-Bindung auszuüben scheinen. Die N186A Mutante wie auch die S187N

zeigen im Verhältnis zum Wildtyp keine verminderte Assoziationskonstante, bei Austausch von Serin 187 gegen Alanin ist eine Abnahme der Bindung um weniger als Faktor fünf zu beobachten.

5 DISKUSSION

5.1 EXPRESSION VON FULL-LENGTH C-MYB

In unserem Labor wurden bereits verschiedene prokaryontische Systeme zur Expression von c-Myb getestet. Es kamen dabei unterschiedliche Promotoren (tac, T5, λ und T7), sowie verschiedene *E. coli*-Stämme (Lk 111 (λ), DH5 α , JM 109, M 15, TGE 900, SG 13009 und BL21(DE3)) zum Einsatz. Die beste Proteinausbeute betrug ca. 3 μ g pro Liter Kulturvolumen. Der größte Teil des exprimierten Proteins lag in unlöslicher Form vor, bzw. unterlag einer starken Proteolyse. Auch die Koexpression der Hitzeschockproteine pGroEL und pGroES führte zu keiner Verbesserung der Löslichkeit [Ebneht 1994]. In dieser Arbeit wurden drei prokaryontische (Koexpression eines CBP-Fragmentes bzw. von Thioredoxin, Expression als Thioredoxin-Fusionsprotein) und drei eukaryontische Systeme (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* und Cos-Zellen) für die Expression des c-Myb Proteins getestet.

5.1.1 EXPRESSION VON C-MYB IN PROKARYONTEN (*E. COLI*)

Zwischen einem aus den Aminosäuren 451 bis 721 bestehenden CBP-Fragment und dem von Proteasen schnell degradierten C-Terminus von c-Myb konnten Protein-Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden [Kiewitz und Wolfes 1997]. Ferner konnte von einer anderen Arbeitsgruppe festgestellt werden, daß c-Myb *in vitro* durch dieses Fragment vor Proteasen geschützt werden kann [Oelgeschläger et al., 1996]. Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob ein Schutz vor Proteasen auch *in vivo* aufgebaut und für die Expression von c-Myb ausgenutzt werden kann. Die gleichzeitige Expression von c-Myb und dem CBP-Fragment konnte nachgewiesen werden, allerdings war beim Grad der proteolytischen Degradation von c-Myb kein Unterschied zu Versuchen ohne Koexpression zu beobachten. Der ange-

strebte Schutz vor Proteasen konnte nicht aufgebaut werden. Die Bindung zwischen den Proteinen könnte zu schwach sein, um in der Zelle einen festen Komplex auszubilden. Es könnte aber auch sein, daß die proteolytische Degradation schon beginnt, bevor das für *E. coli* relativ große Multidomänenprotein vollständig synthetisiert ist.

Ein potentes Verfahren zur Gewinnung von Proteinen stellt das Thioredoxin-Expressionssystem dar. Dabei wird das Zielprotein C-terminal mit dem Protein Thioredoxin fusioniert, die Expression steht unter der Kontrolle des P_{trp} -Promotors. Thioredoxin als Fusionsanteil soll die Löslichkeit des exprimierten Proteins erhöhen. Als *E.coli*-Stämme werden GI 698 oder GI 724 verwendet. Sie produzieren den Repressor P_{trpCl} und unterscheiden sich nur in der intrazellulären Repressorkonzentration. Die Expression des Fusionsproteins wurde in beiden Stämmen und bei verschiedenen Inkubationstemperaturen getestet. In allen Ansätzen zeigte sich erneut eine starke proteolytische Degradation, die auch mit diesem System nicht überwunden werden konnte.

Durch die Koexpression von Thioredoxin sollte der Redoxstatus der Bakterienzelle verändert werden, was zu einer erhöhten Löslichkeit exprimierter Fremdproteine führt. Die Expression von löslichem *full-length* c-Myb, das mit diesem System produziert wurde, ist dokumentiert [Yasukawa et al., 1995]. Sowohl mit einem selbst konstruierten Plasmid, als auch mit dem von Yasukawa überlassenen System (Plasmid und *E.coli*-Stamm) konnte kein *full-length* Protein dargestellt werden, was an der wiederum auftretenden vollständigen Proteolyse liegt. Die Löslichkeit der Abbauprodukte von c-Myb wurde nicht weiter untersucht. Die Experimente der anderen Arbeitsgruppe konnten in meinen Händen nicht nachvollzogen werden. Eine plausible Erklärung dafür steht nicht zur Verfügung.

5.1.2 EXPRESSION VON C-MYB IN EUKARYONTEN

Da die Expression in Prokaryonten am Problem der proteolytischen Degradation scheiterte, wurden eukaryontische Systeme auf ihre Eignung zur Produktion von c-Myb untersucht. Hefen sind ein weit verbreitetes System zur Produktion von Fremdproteinen. Sie sind leicht zu transformieren, haben ein relativ schnelles Wachstum (2-4 h Generationszeit) und lassen sich in preisgünstigen Medien kultivieren. In dem Stamm AB 1380 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde die Expression von c-Myb unter der Kontrolle des Gal 1-Promotors getestet. Das System stellte sich allerdings als ungeeignet heraus, da keine Expression nachgewiesen werden konnte.

Als zweites Hefe-Expressionssystem wurde *Pichia pastoris* getestet. C-Myb konnte in diesem Organismus löslich und intakt produziert werden. Das Protein konnte aufgereinigt werden und seine Fähigkeit, die spezifische Erkennungssequenz zu binden, wurde durch EMSA-Experimente bewiesen. Die Expression von c-Myb in dieser Hefe war allerdings nicht reproduzierbar, was an der Homologie zwischen c-Myb und dem Hefetranskriptionsfaktor BAS1 liegen könnte. Es ist bekannt, daß BAS1 in Hefe die Transkription des HIS4-Gens reguliert, das im benutzten System als Selektionsmarker dient. Bei einer Interaktion zwischen c-Myb und dem BAS1-entsprechenden Homologen in *Pichia pastoris* würde dies die mangelnde Reproduzierbarkeit erklären. Ein negativer Effekt von c-Myb würde daher einen Selektionsdruck auf die Zellen ausüben, der zu HIS4-positiven aber c-Myb negativen Klonen führt. Trotz zahlreicher Versuche konnten keine neuen exprimierenden Klone erzeugt werden. Auch der Ansatz, ohne Selektion von Klonen einen vollständigen Transformationsansatz anzuziehen und zu induzieren, zeigte keine Erfolge, so daß die Arbeiten an diesem System schließlich eingestellt wurden. Seit kurzem sind neue Expressionsvektoren für *Pichia pastoris* verfügbar, bei denen die Selektion nicht durch die HIS4-Auxotrophie, sondern eine plasmidkodierte Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin vermittelt wird. Eine Verwendung dieser Vektoren könnte dazu beitragen, die aufge-

tretenen Probleme zu eliminieren. Da mit den Cos-Zellen jedoch inzwischen ein funktionierendes System für die Expression etabliert werden konnte, wurden diese Versuche nicht durchgeführt.

Mit der Verwendung von Cos-Zellen wurde ein System gefunden, das reproduzierbar sowohl für die intrazelluläre, als auch die sekretorische Expression von *full-length* c-Myb benutzt werden kann. Das Protein ist löslich und nicht proteolytisch degradiert. Die Proteinausbeute kann bis jetzt nur abgeschätzt werden, voraussichtlich sind Kulturvolumina von über einem Liter nötig, um 1 mg Myb-Protein zu produzieren. Die (im Vergleich zu Bakterien oder Hefen) langen Generationszeiten der Cos-Zellen sorgen dafür, daß bei Abgabe der Arbeit keine weiteren Daten über Menge und Bindungsfähigkeit des rekombinanten Proteins zur Verfügung stehen. Es sind noch weitere Optimierungen der Transfektions-, Expressions- und Aufreinigungsbedingungen nötig.

5.2 MUTAGENESESTUDIEN

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der an der DNA-Erkennung beteiligten Aminosäuren in der DNA-Bindungsdomäne von c-Myb. Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die dritte Helix des dritten *Repeats* gelegt, da hier der größte Teil der direkten Protein-DNA Kontakte lokalisiert ist.

Um im genannten Bereich möglichst einfach Mutationen einfügen zu können, wurden durch PCR-Mutagenese zusätzliche Schnittstellen (*BsW* I, *Sca* I) generiert. Durch die Insertion von Oligodesoxynukleotiden konnten, sowohl zielgerichtete, als auch ungerichtete Mutagenesen in diesem Bereich eingeführt werden.

5.2.1 RANDOM-MUTAGENESE

Eine *random*-Mutagenese erlaubt mit einem geringen Zeitaufwand viele Mutationen zu untersuchen, allerdings muß dafür ein System zu Verfügung stehen, das eine Kopplung zwischen dem beobachteten Phänotyp und der erzeugten Mutation liefert. Die in dieser Arbeit getesteten Systeme sollten es ermöglichen, durch Selektionszyklen Proteine anzureichern, die eine Spezifität für die angebotene Ziel-DNA zeigen. Auf diese Weise können nicht nur die Evidenzen einzelner Aminosäuren für die Erkennung der DNA-Sequenz bestimmt werden, sondern, allein durch die Wahl einer anderen Zielsequenz, auch Proteine mit einer anderen Spezifität erzeugt werden.

Für das *Screening* von *random*-Mutanten wurde das *Phage-Display*-System getestet. Dazu wurde der für die DNA-Bindungsdomäne kodierende Bereich in eine modifizierte Version des Phagemid-Vektors pCantab 5E kloniert und rekombinante Phagen erzeugt. Die Präsentation der DBD konnte aber erst nachgewiesen werden, nachdem das Leseraster im Übergang zwischen der *pelB*-*leader*-Sequenz und dem Fusionsanteil verschoben wurde. Diese Tatsache stimmt mit einer 1995 veröffentlichten Beobachtung überein [Jacobsson und Frykberg 1995]. Darin wird beschrieben, daß zwischen 90 und 100% der angereicherten Sequenzen nach Selektion gegen einen Liganden nicht im eigentlichen Leseraster des Vektors liegen, sondern eine Leserasterverschiebung (*Frameshift*) aufweisen. Dieses Phänomen ist mit der Möglichkeit einer *ribosomal slippage*, also einem „Stottern“ der Ribosomen während der Translation, zu erklären. Obwohl nach dem Verschieben des Leserasters die Oberflächenpräsentation des Fusionsproteins nachgewiesen werden konnte, war das System für eine *random*-Mutagenese nicht geeignet, da das Fusionsprotein nicht in der Lage war, DNA zu binden. Vermutlich sind sterische Hinderungen der Grund für dieses Verhalten, da es sich um eine C-terminale Fusion direkt hinter dem für die DNA-Bindung verantwortlichen Bereich handelte.

Das zweite im Rahmen der *Random-Mutagenese* getestete System war eine modifizierte Variante des FliTrx *Peptide-Display-System* (Fa. Invitrogen). Dabei befindet sich der Fusionsanteil nicht am C-Terminus (wie im *Phage-Display-System*), sondern am N-Terminus der Myb DNA-Bindungsdomäne. Die Oberflächenpräsentation des Fusionsproteins auf *E. coli*-Zellen gelang jedoch nicht: Das Fusionsprotein wurde zwar produziert, aber den Untersuchungen nach nicht korrekt prozessiert. Vielleicht können unter Verzicht auf den C-Terminus des Flagellin keine größeren Proteine präsentiert werden (bisher sind nur Experimente mit kurzen Peptiden veröffentlicht) [Vanetti 1997; Weigel 1997].

5.2.2 ZIELGERICHTETE MUTAGENESE

Durch zielgerichtete Mutagenese konnten zwei Aminosäuren bestimmt werden, die nur einen kleinen (S187) oder keinen Beitrag (N186) zum *direct-read-out* leisten, obwohl sie nach der NMR-Struktur direkte Kontakte zu den Basen der DNA ausbilden sollten. Die Evidenz von zwei anderen untersuchten Aminosäuren (K182 und N183) konnten bestätigt werden, während die Bedeutung von N179 größer ist als bisher beschrieben.

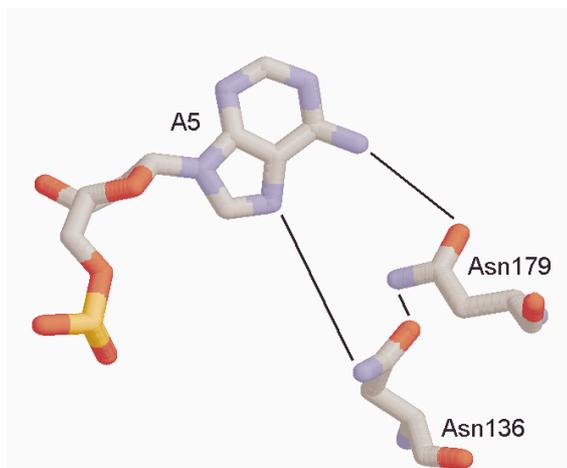
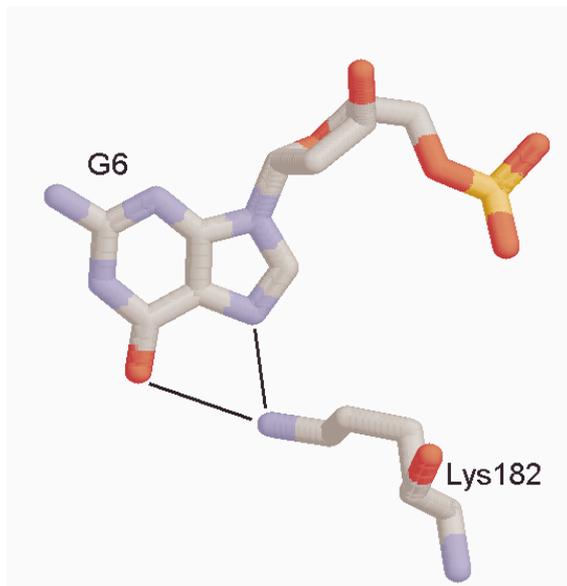


Abbildung 5-1 Asparagin 179 und seine möglichen Kontakte (die Nummerierung bezieht sich auf Abbildung 2-4)

Der Aminosäure N179 wird ein Kontakt zum mittleren Adenin (A5) des AAC-Motivs zugeschrieben. Der Abstand zwischen der Carbonylgruppe des Asparagins und der Aminogruppe des Adenins beträgt 4,7 Å und ist damit eigentlich zu groß für eine gute Wasserstoffbrücke. Die Bindung wird von Ogata et al. [1994] auch zu den schwächeren Interaktionen gerechnet, die von den Autoren nicht

in allen aufgenommenen Einzelstrukturen nachzuweisen war. Die an dieser Position eingeführten Mutationen sprechen dagegen für eine starke Bindung zwischen der Aminosäure und der Base, da die Substitution durch Alanin zu einem nahezu vollständigen Verlust der DNA-Bindung führt. Allerdings soll die gleiche Base zusätzlich durch N136 erkannt werden. Eine Wechselwirkung zwischen diesen beiden Aminosäuren scheint durchaus möglich und würde beide DNA-Kontakte stärken. In der Alaninmutante würde die starke Einbuße in der Bindungsstärke dann auf der gleichzeitigen Schwächung zweier Kontakte zur DNA beruhen.

Lysin182 soll zwei Kontakte mit dem zum Cytosin komplementären Guanin



(G6) des AAC-Motivs ausbilden. Der Abstand beträgt in der veröffentlichten Struktur 2,8 Å, es handelt sich hier um eine starke Wechselwirkung, was durch die beiden Mutanten K182A und K182E belegt werden kann. Beide Mutationen haben drastische Verminderungen der DNA-Bindungs-fähigkeit zur Folge (Faktor 10^4 und mehr).

Abbildung 5-2 Lysin 182 und seine möglichen Kontakte

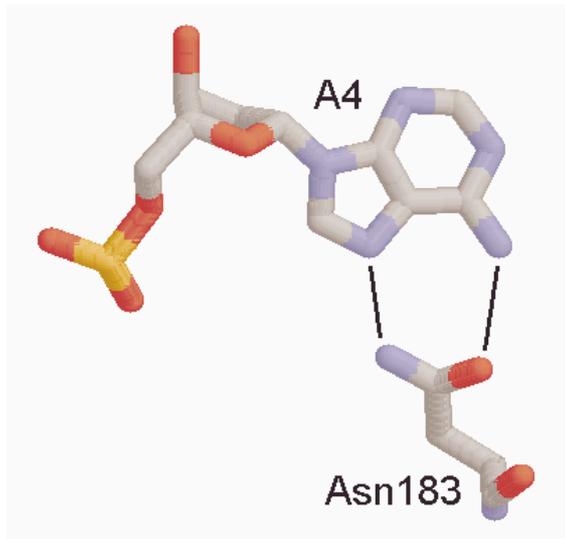


Abbildung 5-3 Asparagin 183 und seine möglichen Kontakte

Auch N183 soll zwei Wasserstoffbrücken gleichzeitig mit einer Base ausbilden und zwar mit dem ersten Adenin (A4) der AAC-Sequenz. Auch diese Kontakte sind als starke Wechselwirkungen einzuordnen, der Abstand zwischen Aminosäure und Base liegt bei 2,8 Å. Ebenso wie bei den beiden zuvor beschriebenen Aminosäuren führt eine Mutation zu Alanin zu einer Reduktion der Bindungsfähigkeit um den Faktor 10^4 , während der

Austausch gegen Aspartat die spezifische Bindung vollständig verhindert.

Nach dem Strukturmodell soll N186 Kontakte zu beiden Thyminen (T4 und

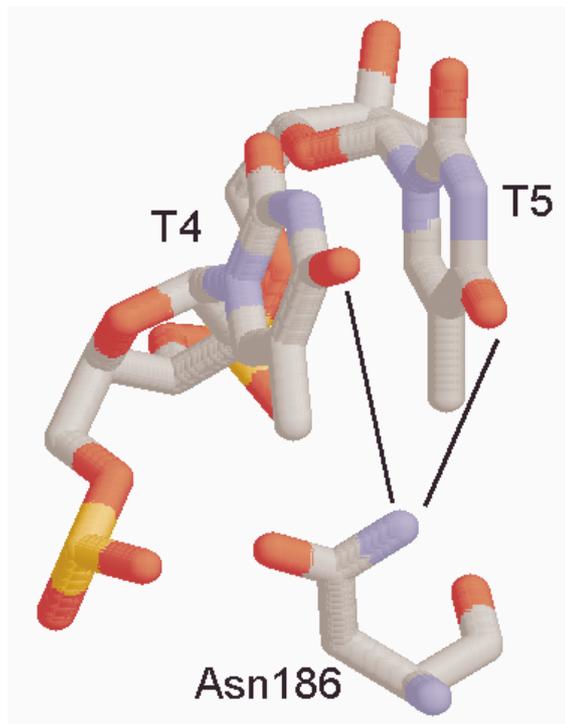
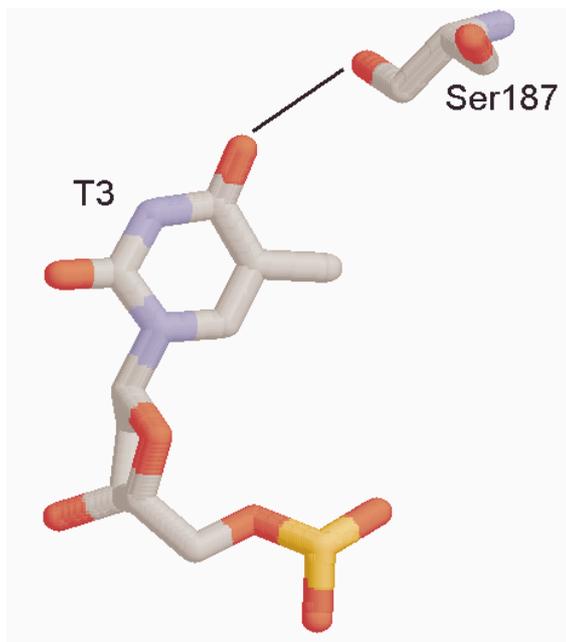


Abbildung 5-4 Asparagin 186 und seine möglichen Kontakte

T5) komplementär zum AAC-Motiv ausbilden. Trotz eines Abstandes von 4,8 Å bzw. 5,4 Å zwischen der Amino-Gruppe des Asparagins und den beiden Carbonyl-Gruppen der Thymine wurde im Modell die Bindung zum T5 den starken Wechselwirkungen zugeordnet. Dieser Aussage widersprechen aber die vorliegenden Ergebnisse, weil eine Mutation zu Alanin keinen Effekt auf die DNA-Bindung hat, und selbst eine Aspartat-Mutante, die eine negative Ladung einbringt, noch eine geringe Bindungsfähigkeit zeigt. Die nachgewiesene ho-

he Affinität der N186A zur spezifischen DNA-Sequenz steht ebenfalls im Widerspruch zu veröffentlichten Daten einer anderen Gruppe [Gabrielsen et al., 1991]. Allerdings muß hier berücksichtigt werden, daß bei diesen Untersuchungen nur verkürzte, aus den *Repeats* 2 und 3 bestehende Proteine zum Einsatz kamen. Da von unserer Arbeitsgruppe ein stabilisierender Effekt von *Repeat* 1 bei der spezifischen DNA-Bindung nachgewiesen wurde [Ebneith et al., 1994], ergibt sich die Notwendigkeit, Untersuchungen zu Struktur-Funktionsbeziehung im Kontext der gesamten DNA-Bindungsdomäne durchzuführen.

Die Interaktion zwischen S187 und dem vor dem AAC-Motiv gelegenen



Thymin (T3) gehört in die Gruppe der schwachen Kontakte, obwohl der Abstand mit 3,2 Å nicht allzu groß ausfällt. Diese Vorhersage konnte durch diese Arbeit bestätigt werden. Die S187A und S187N Mutanten besaßen nämlich eine Affinität zur spezifischen DNA-Sequenz, die in der gleichen Größenordnung lag wie sie für den Wildtyp [Schweers 1993] beschrieben ist. Diese Beobachtung wurde

Abbildung 5-5 Serin 187 und seine möglichen Kontakte

kürzlich auch von einer anderen Gruppe veröffentlicht [Oda et al.,

1997]. Allerdings stellte diese Gruppe in Experimenten mit der S187N Mutante eine um den Faktor zehn verringerte Assoziationskonstante gegenüber dem Wildtyp-Protein fest, wohingegen in dieser Arbeit eine dem Wildtyp entsprechende Assoziationskonstante ermittelt werden konnte.

Der Widerspruch ist erklärbar durch die Verwendung nicht identischer Systeme. Oda et al. untersuchten Proteine, die nur aus den *Repeats* zwei und drei bestanden, während in dieser Arbeit der gesamte N-Terminus von

c-Myb benutzt wurde, also auch *Repeat* 1 enthalten war. Ein zweiter wichtiger Unterschied ist an Position 130 in der DNA-Bindungsdomäne zu finden. Oda et al. arbeiten prinzipiell mit einer Mutante (C130I) an dieser Position, um die Proteinaufreinigung zu vereinfachen. Die Reduktion dieses Cystein-Restes ist essentiell für die Fähigkeit des Myb-Proteins, DNA zu binden. Offensichtlich verhindert ein oxidiertes Cystein 130 die korrekte Faltung der dritten Helix des zweiten *Repeats* während der DNA-Bindung [Ebneht et al., 1994; Guehmann et al., 1992]. Alle von Oda et al. verwendeten Mutanten sind daher Doppelmutanten, während bei den in dieser Arbeit vorgestellten Mutanten das Cystein erhalten blieb.

Die Bedeutung des Kontaktes von S187 zum T3 für die Spezifität der DNA-Bindung ist fraglich, da ein Serin sowohl über die Protonen der OH-Gruppe als auch über ein freies Elektronenpaar des Sauerstoffs Wasserstoffbrücken ausbilden kann. Es ist deshalb in der Lage, mit jeder Base an dieser Position eine Wechselwirkung einzugehen. Deshalb sollte dieser Kontakt nur allgemein zur Bindungsstärke beitragen. Wie die Daten zeigen, ist auch dieser Effekt erstaunlich gering.

Da das Strukturmodell der DNA-Bindungsdomäne nicht durch Mutagenesestudien untermauert ist, sind auch Untersuchungen der Aminosäuren aus *Repeat* zwei (speziell N136) von Interesse. Sinnvoll wäre auch der Versuch, für nicht mehr bindungsfähige Mutanten die weggefallenen Kontakte durch DNA-Substitutionen wieder aufzubauen und so die Relevanz der mutierten Aminosäuren zu belegen.

Grundsätzlich konnte das NMR-Modell nur zum Teil bestätigt werden. Für drei der fünf getesteten Aminosäuren gibt es deutliche Unterschiede zu den postulierten Kontakten. So stellt der Kontakt zwischen N179 und A5 eindeutig keine schwache, sondern eine starke Wechselwirkung dar. Die für S187 postulierten Interaktionen können allenfalls als sehr schwach angesehen werden und die Funktion von N186 sollte vollkommen neu überdacht werden. Keine der für diese Aminosäure beschriebenen Wechselwirkungen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Sie hat allen Ergebnissen zufolge

keinen Anteil an der direkten Bindung der spezifischen DNA-Bindungssequenz.

Es steht außer Frage, daß die Über-Alles-Struktur der *Repeats* mit drei α -Helices korrekt ist. Allerdings erscheint die Feinstruktur im Komplex mit der DNA entgegen der nominellen Auflösung ($1,34 \text{ \AA} \pm 0,22 \text{ \AA}$ für die DNA und das Peptid-Rückgrat, bzw. $1,65 \text{ \AA} \pm 0,18 \text{ \AA}$ für die Seitenketten) noch zu ungenau. Selbstverständlich kann man als Benutzer einer vorgegebenen Struktur kaum ihre Güte im Detail beurteilen. Die biochemischen Daten sprechen aber dafür, daß die Struktur noch überarbeitet werden muß.

6 LITERATUR

- Akimaru, H., Y. Chen, P. Dai, D. X. Hou, M. Nonaka, S. M. Smolik, S. Armstrong, R. H. Goodman und S. Ishii. 1997. Drosophila CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *Nature* **386**:735-738.
- Arias, J., A. A. S., P. Brindle, F. X. Claret, T. Smeal, M. Karin, J. Feramisco und M. Monminy. 1994. Activation of c-AMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* **370**:226-229.
- Aurigemma, R. E., D. G. Blair und S. K. Ruscetti. 1992. Transactivation of erythroid transcription factor GATA-1 by a myb-ets-containing retrovirus. *J Virol* **66**:3056-3061.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl. 1996. Current protocols in molecular biology, vol. 1&2. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Aziz, N., M. R. Miglarese, R. C. Hendrickson, J. Shabanowitz, T. W. Sturgill, D. F. Hunt und T. P. Bender. 1995. Modulation of c-Myb-induced transcription activation by a phosphorylation site near the negative regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:6429-6433.
- Aziz, N., J. Wu, J. W. Dubendorff, J. S. Lipsick, T. W. Sturgill und T. P. Bender. 1993. c-Myb and v-Myb are differentially phosphorylated by p42mapk in vitro. *Oncogene* **8**:2259-2265.
- Biedenkapp, H., U. Borgmeyer, A. E. Sippel und K. H. Klempnauer. 1988. Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity. *Nature* **335**:835-837.
- Bortner, D. M. und M. C. Ostrowski. 1991. Analysis of the v-myb structural components important for transactivation of gene expression. *Nucleic Acids Res* **19**:1533-1539.
- Caracciolo, D., D. Venturelli, M. Valtieri, C. Peschle, A. M. Gewirtz und B. Calabretta. 1990. Stage-related proliferative activity determines c-myb functional requirements during normal human hematopoiesis. *J Clin Invest* **85**:55-61.
- Chen, R. H., S. Fields und J. S. Lipsick. 1995. Dissociation of transcriptional activation and oncogenic transformation by v-Myb. *Oncogene* **11**:1771-1779.
- Clare, J. J., M. A. Romanos, F. B. Rayment, J. E. Rowedder, M. A. Smith, M. M. Payne, K. Sreekrishna und C. A. Henwood. 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* **105**:205-212.
- Clarke, M. F., J. F. Kukowska-Latallo, E. Westin, M. Smith und E. V. Prochownik. 1988. Constitutive expression of a c-myb cDNA blocks Friend murine erythroleukemia cell differentiation. *Mol Cell Biol* **8**:884-892.
- Cooper, M. 1997. The Cell a molecular approach. ASM Press

- Couderc, R. und B. J. 1980. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **44**:2279-2289.
- Cregg, J. M., K. R. Madden, K. J. Barringer, G. P. Thill und C. A. Stillman. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* **9**:1316-1323.
- Cregg, J. M., T. S. Vedvick und W. C. Raschke. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* **11**:905-910.
- Crivia, J. C., R. P. S. Kwok, N. Lamb, M. Hagiwara, M. R. Montminy und G. R. H. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**:855-858.
- Dasgupta, P., P. Saikumar, C. D. Reddy und E. P. Reddy. 1990. Myb protein binds to human immunodeficiency virus 1 long terminal repeat (LTR) sequences and transactivates LTR-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:8090-8094.
- Dash, A. B., F. C. Orrico und S. A. Ness. 1996. The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes Dev* **10**:1858-1869.
- Ebneith, A. 1994. Dissertation. Universität Hannover.
- Ebneith, A., O. Schweers, H. Thole, U. Fagin, C. Urbanke, G. Maass und H. Wolfes. 1994. Biophysical characterization of the c-Myb DNA-binding domain. *Biochemistry* **33**:14586-14593.
- Eckner, R., M. E. Ewen, D. Newsome, M. Gerdes, J. A. DeCaprio, J. Bentley-Lawrence und D. Linvinston. 1994. Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300 kDa protein (p300) reveals a protein with the properties of a transcriptional adapter. *Genes Dev.* **8**:869-884.
- Ellis, S. B., P. F. Brust, P. J. Koutz, A. F. Waters, M. M. Harpold und T. R. Gingeras. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* **5**:1111-1121.
- Ess, K. C., T. L. Whitaker, G. J. Cost, D. P. Witte, J. J. Hutton und B. J. Aronow. 1995. A central role for a single c-Myb binding site in a thymic locus control region. *Mol Cell Biol* **15**:5707-5715.
- Evans, J. L., T. L. Moore, W. M. Kuehl, T. Bender und J. P. Ting. 1990. Functional analysis of c-Myb protein in T-lymphocytic cell lines shows that it trans-activates the c-myc promoter. *Mol Cell Biol* **10**:5747-5752.
- Evers, R. und I. Grummt. 1994. persönliche Mitteilung.
- Favier, D. und T. J. Gonda. 1994. Detection of proteins that bind to the leucine zipper motif of c-Myb. *Oncogene* **9**:305-311.
- Fearon, E. R. und B. Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**:759-767.

- Foos, G., S. Natour und K. H. Klempner. 1993. TATA-box dependent trans-activation of the human HSP70 promoter by Myb proteins. *Oncogene* **8**:1775-1782.
- Frampton, J., T. Kouzarides, G. Doderlein, T. Graf und K. Weston. 1993. Influence of the v-Myb transactivation domain on the oncoprotein's transformation specificity. *Embo J* **12**:1333-1341.
- Fu, S. L. und J. S. Lipsick. 1996. FAETL motif required for leukemic transformation by v-Myb. *J Virol* **70**:5600-5610.
- Furukawa, Y., H. Piwnica-Worms, T. J. Ernst, Y. Kanakura und J. D. Griffin. 1990. cdc2 gene expression at the G1 to S transition in human T lymphocytes. *Science* **250**:805-808.
- Gabrielsen, O. S. 1997. persönliche Mitteilung.
- Gabrielsen, O. S., A. Sentenac und P. Fromageot. 1991. Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix- related motif. *Science* **253**:1140-1143.
- Gerondakis, S. und J. M. Bishop. 1986. Structure of the protein encoded by the chicken proto-oncogene c-myb. *Mol Cell Biol* **6**:3677-3684.
- Golay, J., A. Capucci, M. Arsur, M. Castellano, V. Rizzo und M. Introna. 1991. Expression of c-myb and B-myb, but not A-myb, correlates with proliferation in human hematopoietic cells. *Blood* **77**:149-158.
- Golay, J., G. Cusmano und M. Introna. 1992. Independent regulation of c-myc, B-myb, and c-myb gene expression by inducers and inhibitors of proliferation in human B lymphocytes. *J Immunol* **149**:300-308.
- Gonda, T. J., D. Favier, P. Ferrao, E. M. Macmillan, R. Simpson und F. Tavner. 1996. The c-myb negative regulatory domain. *Curr Top Microbiol Immunol* **211**:99-109.
- Gonda, T. J., N. M. Gough, A. R. Dunn und J. de Blaquiére. 1985. Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb proto-oncogene. *Embo J* **4**:2003-2008.
- Gonda, T. J., D. K. Sheiness, L. Fanshier, J. M. Bishop und M. G. Moscovici. 1982. Transcripts from the cellular homologs of retroviral oncogenes: Distribution among chicken tissues. *Mol. Cell Biol.* **2**:617-624.
- Gonzales, G. A. und M. R. Montminy. 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation at serine 133. *Cell* **59**:675-680.
- Guehmann, S., G. Vorbrueggen, F. Kalkbrenner und K. Moelling. 1992. Reduction of a conserved Cys is essential for Myb DNA-binding. *Nucleic Acids Res* **20**:2279-2286.
- Hernandez-Munain, C. und M. S. Krangel. 1994. Regulation of the T-cell receptor delta enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors. *Mol Cell Biol* **14**:473-483.
- Hijiya, N., J. Zhang, M. Z. Ratajczak, J. A. Kant, K. DeRiel, M. Herlyn, G. Zon und A. M. Gewirtz. 1994. Biologic and therapeutic significance of MYB expression in human melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:4499-4503.

- Howe, K. M., C. F. Reakes und R. J. Watson. 1990. Characterization of the sequence-specific interaction of mouse c-myb protein with DNA. *Embo J* **9**:161-169.
- Howe, K. M. und R. J. Watson. 1991. Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by c-myb protein. *Nucleic Acids Res* **19**:3913-3919.
- Hu, Y. L., R. G. Ramsay, C. Kanei-Ishii, S. Ishii und T. J. Gonda. 1991. Transformation by carboxyl-deleted Myb reflects increased transactivating capacity and disruption of a negative regulatory domain. *Oncogene* **6**:1549-1553.
- Ibelgaufits, H. 1990. *Gentechnologie von A bis Z*. VCH Verlagsgesellschaft.
- Invitrogen. 1993. *Pichia Expression Kit A Manual of Methods of Recombinant Proteins in Pichia pastoris*, vol. Instruction Manual Ver. 1.8.
- Invitrogen. 1997. *FliTrxTM Random Peptide Display Library*. Manual Vers. A .
- Jacobsson, K. und L. Frykberg. 1995. Cloning of ligand-binding domains of bacterial receptors by phage display. *Biotechniques* **18**:878-885.
- Jamin, N., O. S. Gabrielsen, N. Gilles, P. N. Lirsac und F. Toma. 1993. Secondary structure of the DNA-binding domain of the c-Myb oncoprotein in solution. A multidimensional double and triple heteronuclear NMR study. *Eur J Biochem* **216**:147-154.
- Kalkbrenner, F., S. Guehmann und K. Moelling. 1990. Transcriptional activation by human c-myb and v-myb genes. *Oncogene* **5**:657-661.
- Kanei-Ishii, C., E. M. MacMillan, T. Nomura, A. Sarai, R. G. Ramsay, S. Aimoto, S. Ishii und T. J. Gonda. 1992. Transactivation and transformation by Myb are negatively regulated by a leucine-zipper structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:3088-3092.
- Kanei-Ishii, C., A. Sarai, T. Sawazaki, H. Nakagoshi, D. N. He, K. Ogata, Y. Nishimura und S. Ishii. 1990. The tryptophan cluster: a hypothetical structure of the DNA-binding domain of the myb protooncogene product. *J Biol Chem* **265**:19990-19995.
- Kenney, S. C., E. Holley-Guthrie, E. B. Quinlivan, D. Gutsch, Q. Zhang, T. Bender, J. F. Giot und A. Sergeant. 1992. The cellular oncogene c-myb can interact synergistically with the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator in lymphoid cells. *Mol Cell Biol* **12**:136-146.
- Kiewitz, A. 1997. Dissertation. Universität Hannover.
- Kiewitz, A. und H. Wolfes. 1997. Mapping of protein-protein interactions between c-myb and its cofactor CBP by a new phage display technique. *FEBS Letters* **415**:258-262.
- Koutz, P., G. R. Davis, C. Stillman, K. Barringer, J. Cregg und G. Thill. 1989. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* **5**:167-177.
- Kraut, N., J. Frampton und T. Graf. 1995. Rem-1, a putative direct target gene of the Myb-Ets fusion oncoprotein in haematopoietic progenitors, is a member of the recoverin family. *Oncogene* **10**:1027-1036.

- Kwok, R. P. S., J. R. Lundblad, J. C. Chrivia, J. P. Ricards, B. C. HP, R. G. Brennan, S. G. E. Roberts, M. R. Green und R. H. Goodman. 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**:223-226.
- Laget, M. P., I. Callebaut, Y. de Launoit, D. Stehelin und J. P. Mornon. 1993. Predicted common structural features of DNA-binding domains from Ets, Myb and HMG transcription factors. *Nucleic Acids Res* **21**:5987-5996.
- Lane, T., C. Ibanez, A. Garcia, T. Graf und J. Lipsick. 1990. Transformation by v-myb correlates with trans-activation of gene expression. *Mol Cell Biol* **10**:2591-2598.
- Lüscher, B., E. Christenson, D. W. Litchfield, E. G. Krebs und R. N. Eisenman. 1990. Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature* **344**:517-522.
- Lüscher, B. und R. N. Eisenman. 1990. New light on Myc and Myb. Part II. Myb. *Genes Dev* **4**:2235-2241.
- Lüscher, B. und R. N. Eisenman. 1992. Mitosis-specific phosphorylation of the nuclear oncoproteins Myc and Myb. *J Cell Biol* **118**:775-784.
- Majello, B., L. C. Kenyon und R. Dalla-Favera. 1986. Human c-myb protooncogene: nucleotide sequence of cDNA and organization of the genomic locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:9636-9640.
- Marocco, A., M. Wissenbach, D. Becker, J. Paz-Ares, H. Saedler, F. Salamini und W. Rohde. 1989. Multiple genes are transcribed in *Hordeum vulgare* and *Zea mays* that carry the DNA binding domain of the myb oncoproteins. *Mol Gen Genet* **216**:183-187.
- McClinton, D., J. Stafford, L. Brents, T. P. Bender und W. M. Kuehl. 1990. Differentiation of mouse erythroleukemia cells is blocked by late up-regulation of a c-myb transgene. *Mol Cell Biol* **10**:705-710.
- McCracken, S., S. Leung, R. Bosselut, J. Ghysdael und N. G. Miyamoto. 1994. Myb and Ets related transcription factors are required for activity of the human Ick type I promoter. *Oncogene* **9**:3609-3615.
- Melotti, P., D. H. Ku und B. Calabretta. 1994. Regulation of the expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34: role of c-myb. *J Exp Med* **179**:1023-1028.
- Mettus, R. V., J. Litvin, A. Wali, A. Toscani, K. Latham, K. Hatton und E. P. Reddy. 1994. Murine A-myb: evidence for differential splicing and tissue-specific expression. *Oncogene* **9**:3077-3086.
- Mink, S., B. Haenig und K. H. Klempnauer. 1997. Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Mol Cell Biol* **17**:6609-6617.
- Mizuguchi, G., C. Kanei-Ishii, T. Takahashi, T. Yasukawa, T. Nagase, M. Horikoshi, T. Yamamoto und S. Ishii. 1995. c-Myb repression of c-erbB-2 transcription by direct binding to the c-erbB-2 promoter. *J Biol Chem* **270**:9384-9389.

- Mucenski, M. L., K. McLain, A. B. Kier, S. H. Swerdlow, C. M. Schreiner, T. A. Miller, D. W. Pietryga, W. J. Scott, Jr. und S. S. Potter. 1991. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* **65**:677-689.
- Nakagoshi, H., C. Kanei-Ishii, T. Sawazaki, G. Mizuguchi und S. Ishii. 1992. Transcriptional activation of the c-myc gene by the c-myb and B-myb gene products. *Oncogene* **7**:1233-1240.
- Nakagoshi, H., T. Nagase, C. Kanei-Ishii, Y. Ueno und S. Ishii. 1990. Binding of the c-myb proto-oncogene product to the simian virus 40 enhancer stimulates transcription. *J Biol Chem* **265**:3479-3483.
- Ness, S. A. 1996. The Myb oncoprotein: regulating a regulator. *Biochim Biophys Acta* **1288**:F123-139.
- Ness, S. A., E. Kowenz-Leutz, T. Casini, T. Graf und A. Leutz. 1993. Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes Dev* **7**:749-759.
- Ness, S. A., A. Marknell und T. Graf. 1989. The v-myb oncogene product binds to and activates the promyelocyte-specific mim-1 gene. *Cell* **59**:1115-1125.
- Nicolaides, N. C., R. Gualdi, C. Casadevall, L. Manzella und B. Calabretta. 1991. Positive autoregulation of c-myb expression via Myb binding sites in the 5' flanking region of the human c-myb gene. *Mol Cell Biol* **11**:6166-6176.
- Nomura, N., M. Takahashi, M. Matsui, S. Ishii, T. Date, S. Sasamoto und R. Ishizaki. 1988. Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, A-myb and B-myb. *Nucleic Acids Res* **16**:11075-11089.
- Oda, M., K. Furukawa, K. Ogata, A. Sarai, S. Ishii, Y. Nishimura und H. Nakamura. 1997. Investigation of the pyrimidine preference by the c-Myb DNA-binding domain at the initial base of the consensus sequence. *J Biol Chem* **272**:17966-17971.
- Oelgeschläger, M., R. Janknecht, J. Krieg, S. Schreek und B. Luscher. 1996. Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb-specific transactivation and on the cooperativity with NF-M. *Embo J* **15**:2771-2780.
- Oelgeschläger, M., J. Krieg, J. M. Luscher-Firzlaff und B. Luscher. 1995. Casein kinase II phosphorylation site mutations in c-Myb affect DNA binding and transcriptional cooperativity with NF-M. *Mol Cell Biol* **15**:5966-5974.
- Ogata, K., H. Hojo, S. Aimoto, T. Nakai, H. Nakamura, A. Sarai, S. Ishii und Y. Nishimura. 1992. Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix-related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6428-6432.
- Ogata, K., S. Morikawa, H. Nakamura, A. Sekikawa, T. Inoue, H. Kanai, A. Sarai, S. Ishii und Y. Nishimura. 1994. Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell* **79**:639-648.

- Paz-Ares, J., D. Ghosal, U. Wienand, P. A. Peterson und H. Saedler. 1987. The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *Embo J* **6**:3553-3558.
- Peters, C. W., A. E. Sippel, M. Vingron und K. H. Klempnauer. 1987. Drosophila and vertebrate myb proteins share two conserved regions, one of which functions as a DNA-binding domain. *Embo J* **6**:3085-3090.
- Picard, V., E. Ersdal-Badju, A. Lu und S. Clark Bock. 1994. A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using *Pfu* DNA-polymerase. *Nucleic Acids Research* **22**:2587-2591.
- Pines, J. und T. Hunter. 1990. p34cdc2: the S and M kinase? *New Biol.* **2**:389-401.
- Plaza, S., N. Turque, C. Dozier, M. Bailly und S. Saule. 1995. C-Myb acts as transcriptional activator of the quail PAX6 (PAX-QNR) promoter through two different mechanisms. *Oncogene* **10**:329-340.
- Ptashne, M. 1988. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* **335**:683-689.
- Qiagen. 1996. Application protocols.
- Ramsay, R. G., S. Ishii und T. J. Gonda. 1991. Increase in specific DNA binding by carboxyl truncation suggests a mechanism for activation of Myb. *Oncogene* **6**:1875-1879.
- Ramsay, R. G., N. Morrice, P. Van Eeden, V. Kanagasundaram, T. Nomura, J. De Blaquiére, S. Ishii und R. Wettenhall. 1995. Regulation of c-Myb through protein phosphorylation and leucine zipper interactions. *Oncogene* **11**:2113-2120.
- Rasched, I. und E. Oberer. 1986. Ff coliphages: structural and functional relationships. *Microbiol. Rev* **50**:401-427.
- Reddy, M. A., B. S. Yang, X. Yue, C. J. Barnett, I. L. Ross, M. J. Sweet, D. A. Hume und M. C. Ostrowski. 1994. Opposing actions of c-ets/PU.1 and c-myb protooncogene products in regulating the macrophage-specific promoters of the human and mouse colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms) genes. *J Exp Med* **180**:2309-2319.
- Reiss, K., A. Ferber, S. Travali, P. Porcu, P. D. Phillips und R. Baserga. 1991. The protooncogene c-myb increases the expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor messenger RNAs by a transcriptional mechanism. *Cancer Res* **51**:5997-6000.
- Romanos, M. A., C. A. Scorer und J. J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**:423-488.
- Romanos, M. A., J. J. Clare, K. M. Beesley, F. B. Rayment, S. P. Ballantine, A. J. Makoff, G. Dougan, N. F. Fairweather und I. G. Charles. 1991. Recombinant Bordetella pertussis pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine* **9**:901-906.
- Saikumar, P., J. L. Gabriel und E. P. Reddy. 1994. The Myb oncogene product induces DNA-bending. *Oncogene* **9**:1279-1287.

- Sakura, H., C. Kanei-Ishii, T. Nagase, H. Nakagoshi, T. J. Gonda und S. Ishii. 1989. Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5758-5762.
- Schweers, O. 1993. Diplomarbeit. Universität Hannover.
- Shapiro, L. H. 1995. Myb and Ets proteins cooperate to transactivate an early myeloid gene. *J Biol Chem* **270**:8763-8771.
- Siu, G., A. L. Wurster, J. S. Lipsick und S. M. Hedrick. 1992. Expression of the CD4 gene requires a Myb transcription factor. *Mol Cell Biol* **12**:1592-1604.
- Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**:1315-1317.
- Sreeriksha, K., R. H. Potenz, J. A. Cruze, W. R. McCombie, K. A. Parker, L. Nelles, P. K. Mazzaferro, K. A. Holden, R. G. Harrison, P. J. Wood und et al. 1988. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Basic Microbiol* **28**:265-278.
- Swope, D. L., C. L. Mueller und J. C. Chrivia. 1996. CREB-binding protein activates transcription through multiple domains. *J Biol Chem* **271**:28138-28145.
- Thiele, C. J., P. S. Cohen und M. A. Israel. 1988. Regulation of c-myb expression in human neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation. *Mol Cell Biol* **8**:1677-1683.
- Tice-Baldwin, K., G. R. Fink und K. T. Arndt. 1989. BAS1 has a Myb motif and activates HIS4 transcription only in combination with BAS2. *Science* **246**:931-935.
- Tong, X., R. Drapkin, R. Yalamanchili, G. Mosialos und E. Kieff. 1995. The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIIE. *Mol. Cell Biol.* **15**:4735-4733.
- Tschopp, J. F., P. F. Brust, J. M. Cregg, C. A. Stillman und T. R. Gingeras. 1987. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res* **15**:3859-3876.
- Vanetti, M. 1997. persönliche Mitteilung.
- Veenuis, M., J. P. van Dijken und W. Harder. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. *Adv. Microb. Physiol.* **2**:41-82.
- Vorbrueggen, G., F. Kalkbrenner, S. Guehmann und K. Moelling. 1994. The carboxyterminus of human c-myb protein stimulates activated transcription in trans. *Nucleic Acids Res* **22**:2466-2475.
- Weigel, C. 1997. persönliche Mitteilung.
- Westin, E. H., R. C. Gallo, S. K. Arya, A. Eva, L. M. Souza, M. A. Baluda, S. A. Aaronson und F. Wong-Staal. 1982. Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA* **79**:2194-2198.

-
- Weston, K. 1992. Extension of the DNA binding consensus of the chicken c-Myb and v-Myb proteins. *Nucleic Acids Res* **20**:3043-3049.
 - Weston, K. und J. M. Bishop. 1989. Transcriptional activation by the v-myb oncogene and its cellular progenitor, c-myb. *Cell* **58**:85-93.
 - Wissenbach, M., B. Uberlacker, F. Vogt, D. Becker, F. Salamini und W. Rohde. 1993. Myb genes from *Hordeum vulgare*: tissue-specific expression of chimeric Myb promoter/Gus genes in transgenic tobacco. *Plant J* **4**:411-422.
 - Worpenberg, S., O. Burk und K. H. Klemmner. 1997. The chicken adenosine receptor 2B gene is regulated by v-myb. *Oncogene* **15**:213-221.
 - Yasukawa, T., C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto und S. Ishii. 1995. Increase of Solubility of Foreign Proteins in *Escherichia coli* by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin. *The Journal of Biological Chemistry* **270**:25328-25331.

7 ANHANG

DNA-Sequenz des Protoonkogens c-myb (*Mus musculus*) sowie der translatierten Proteinsequenz:

1/1	31/11
ATG GCC CGG AGA CCC CGA CAC AGC ATC TAC AGT AGC GAT GAA GAT GAT GAA GAC ATT GAG	
Met ala arg arg pro arg his ser ile tyr ser ser asp glu asp asp glu asp ile glu	
61/21	91/31
ATG TGT GAC CAT GAC TAC GAT GGG CTG CTG CCC AAA TCT GGA AAG CGT CAC TTG GGG AAA	
met cys asp his asp tyr asp gly leu leu pro lys ser gly lys arg his leu gly lys	
121/41	151/51
ACT AGG TGG ACA AGG GAA GAG GAT GAG AAG CTG AAG AAG CTG GTG GAA CAG AAC GGA ACA	
thr arg trp thr arg glu glu asp glu lys leu lys lys leu val glu gln asn gly thr	
181/61	211/71
GAC GAC TGG AAA GTC ATT GCC AAT TAT CTG CCC AAC CGG ACA GAT GTA CAG TGC CAA CAC	
asp asp trp lys val ile ala asn tyr leu pro asn arg thr asp val gln cys gln his	
241/81	271/91
CGG TGG CAG AAA GTG CTG AAC CCT GAA CTC ATC AAA GGT CCC TGG ACC AAA GAA GAA GAT	
arg trp gln lys val leu asn pro glu leu ile lys gly pro trp thr lys glu glu asp	
301/101	331/111
CAG AGA GTC ATA AAG CTT GTC CAG AAA TAT GGT CCG AAG CGT TGG TCT GTT ATT GCC AAG	
gln arg val ile lys leu val gln lys tyr gly pro lys arg trp ser val ile ala lys	
361/121	391/131
CAC TTA AAA GGG AGA ATT GGA AAG CAG TGT CGG GAG AGG TGG CAC AAC CAT TTG AAT CCA	
his leu lys gly arg ile gly lys gln cys arg glu arg trp his asn his leu asn pro	
421/141	451/151
GAA GTT AAG AAA ACC TCC TGG ACA GAA GAG GAG GAC AGA ATC ATT TAC CAG GCA CAC AAG	
glu val lys lys thr ser trp thr glu glu glu asp arg ile ile tyr gln ala his lys	
481/161	511/171
CGT CTG GGG AAC AGA TGG GCA GAG ATC GCA AAG CTG CTG CCC GGA CGG ACT GAT AAT GCT	
arg leu gly asn arg trp ala glu ile ala lys leu leu pro gly arg thr asp asn ala	
541/181	571/191
ATC AAG AAC CAC TGG AAT TCC ACC ATG CGT CGC AAG GTG GAA CAG GAA GGC TAC CTG CAG	
ile lys asn his trp asn ser thr met arg arg lys val glu gln glu gly tyr leu gln	
601/201	631/211
AAG CCT TCC AAA GCC AGC CAG ACG CCA GTG GCC ACG AGC TTC CAG AAG AAC AAT CAT TTG	
lys pro ser lys ala ser gln thr pro val ala thr ser phe gln lys asn asn his leu	

661/221
ATG GGG TTT GGG CAT GCC TCA CCT CCA TCT CAG CTC TCT CCA AGT GGC CAG TCC TCC GTC
met gly phe gly his ala ser pro pro ser gln leu ser pro ser gly gln ser ser val
721/241
AAC AGC GAA TAT CCC TAT TAC CAC ATC GCC GAA GCA CAA AAC ATC TCC AGT CAC GTT CCC
asn ser glu tyr pro tyr tyr his ile ala glu ala gln asn ile ser ser his val pro
781/261
TAT CCT GTC GCA TTG CAT GTT AAT ATA GTC AAC GTC CCT CAG CCG GCT GCG GCA GCC ATC
tyr pro val ala leu his val asn ile val asn val pro gln pro ala ala ala ala ile
841/281
CAG AGA CAC TAT AAC GAC GAA GAC CCT GAG AAG GAA AAG CGA ATA AAG GAG CTG GAG TTG
gln arg his tyr asn asp glu asp pro glu lys glu lys arg ile lys glu leu glu leu
901/301
CTC CTG ATG TCA ACA GAG AAC GAG CTG AAG GGA CAG CAG GCA TTA CCA ACA CAG AAC CAC
leu leu met ser thr glu asn glu leu lys gly gln gln ala leu pro thr gln asn his
961/321
ACT TGC AGC TAC CCC GGG TGG CAC AGC ACC TCC ATT GTG GAC CAG ACC AGA CCT CAT GGG
thr cys ser tyr pro gly trp his ser thr ser ile val asp gln thr arg pro his gly
1021/341
GAT AGT GCA CCT GTT TCC TGT TTG GGA GAA CAC CAT GCC ACC CCA TCT CTG CCT GCA GAT
asp ser ala pro val ser cys leu gly glu his his ala thr pro ser leu pro ala asp
1081/361
CCC GGC TCC CTA CCT GAA GAA AGT GCC TCA CCA GCA AGG TGC ATG ATC GTC CAC CAG GGC
pro gly ser leu pro glu glu ser ala ser pro ala arg cys met ile val his gln gly
1141/381
ACC ATT CTG GAC AAT GTT AAG AAC CTC TTA GAA TTT GCA GAA ACA CTC CAG TTT ATA GAT
thr ile leu asp asn val lys asn leu leu glu phe ala glu thr leu gln phe ile asp
1201/401
TCT TTC TTG AAC ACT TCC AGC AAC CAT GAA AAC TCG GGC TTA GAT GCA CCT ACC TTA CCC
ser phe leu asn thr ser ser asn his glu asn ser gly leu asp ala pro thr leu pro
1261/421
TCC ACT CCT CTC ATT GGT CAC AAA CTG ACA CCA TGT CGA GAC CAG ACT GTG AAA ACC CAG
ser thr pro leu ile gly his lys leu thr pro cys arg asp gln thr val lys thr gln
1321/441
AAG GAA AAT TCC ATC TTT AGA ACT CCA GCT ATC AAA AGG TCA ATC CTC GAA AGC TCT CCT
lys glu asn ser ile phe arg thr pro ala ile lys arg ser ile leu glu ser ser pro
1381/461
CGA ACT CCC ACA CCA TTC AAA CAT GCC CTT GCA GCT CAA GAA ATT AAA TAC GGT CCC CTG
arg thr pro thr pro phe lys his ala leu ala ala gln glu ile lys tyr gly pro leu
1441/481
AAG ATG CTA CCT CAG ACC CCC TCC CAT GCA GTG GAG GAC CTA CAA GAT GTG ATT AAG CCG
lys met leu pro gln thr pro ser his ala val glu asp leu gln asp val ile lys arg

1501/501
GAA TCG GAT GAA TCT GGA ATT GTT GCT GAG TTT CAA GAG AGT GGA CCA CCG TTA CTG AAA
glu ser asp glu ser gly ile val ala glu phe gln glu ser gly pro pro leu leu lys

1561/521
AAA ATC AAG CAG GCG GTG GAG TCG CCA ACT GAG AAA TCG GGA AAC TTC TTC TGC TCA AAC
lys ile lys gln ala val glu ser pro thr glu lys ser gly asn phe phe cys ser asn

1621/541
CAC TGG GCA GAG AAC AGC CTG AGC ACC CAA CTG TTC TCG CAG GCG TCT CCT GTG GCA GAT
his trp ala glu asn ser leu ser thr gln leu phe ser gln ala ser pro val ala asp

1681/561
GCC CCA AAT AIT CTT ACA AGC TCT GIT TTA ATG ACA CCT GTA TCA GAA GAT GAA GAC AAT
ala pro asn ile leu thr ser ser val leu met thr pro val ser glu asp glu asp asn

1741/581
GTC CTC AAA GCC TTT ACC GTA CCT AAG AAC AGG CCC CTG GTG GGT CCC TTG CAG CCA TGC
val leu lys ala phe thr val pro lys asn arg pro leu val gly pro leu gln pro cys

1801/601
AGT GGT GCC TGG GAG CCA GCA TCC TGT GGG AAG ACA GAG GAC CAG ATG ACG GCC TCC GGT
ser gly ala trp glu pro ala ser cys gly lys thr glu asp gln met thr ala ser gly

1861/621
CCG GCT CGG AAA TAC GTG AAC GCG TTC TCA GCT CGA ACT CTG GTC ATG
pro ala arg lys tyr val asn ala phe ser ala arg thr leu val met

1531/511
1591/531
1651/551
1711/571
1771/591
1831/611
1891/631

LEBENS LAUF

Reinhard Sokolowski
Pappelweg 3
30559 Hannover

PERSÖNLICHE DATEN

geboren: 30.04.1967 in Ostercappeln
Eltern: Erwin Sokolowski
Anneliese Sokolowski geb. Aring
Familienstand: ledig

SCHULE

1973 - 1974 Grundschule Brockhausen
1974 - 1977 Grundschule Bad Essen
1977 - 1978 Orientierungsstufe Bad Essen
1978 - 1986 Gymnasium Bad Essen
Juni 1986 Abitur

Juli 1986 - Feb. 1988 Zivildienst beim DRK, Rettungsdienst und Kranken-
transport im Landkreis Osnabrück
März 1988 - Okt. 1989 Angestellter beim DRK, Rettungsdienst und
Krankentransport im Landkreis Hannover Rettungs-
wache Neustadt a. Rbge.

STUDIUM

Okt. 1989 Beginn des Studiums der Biochemie an der
Universität Hannover
Sept. 1991 Abschluß des Vordiploms in Biochemie
Jan. 1995 Abschluß des Diploms in Biochemie an der
Universität Hannover
März 1995 - Feb. 1998 Dissertation am Institut für Biophysikalische
Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
06.02.1998 mündliche Promotionsprüfung