

**Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am
Transkriptionsfaktor c-Myb und seinem
Kofaktor Rcd1+**

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

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Chem. André Schürmann
geboren am 26.07.1969 in Neubeckum

Hannover 2000

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit vom 10.09.1997 bis zum 06.11.2000 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Alves angefertigt.

Referent:

Prof. Dr. rer. nat. J. Alves

Abteilung Biophysikalische Chemie

Zentrum Biochemie

Medizinische Hochschule Hannover

Koreferent:

Prof. Dr. rer. nat. W. Müller

Abteilung Physiologische Chemie

Zentrum Biochemie

Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 29.11.2000

Ein Loch hatte sich eben in der Galaxis geöffnet. Es war exakt ein Nichtstigstel einer Sekunde lang, ein Nichtstigstel eines Zentimeters breit und ziemlich viele Millionen Lichtjahre von einem Ende zum anderen. [...] Dieses Nichtstigstel einer Sekunde, währenddessen das Loch existierte, hallte auf höchst unwahrscheinliche Art und Weise durch die Zeit vorwärts und rückwärts. Irgendwo in einer weit zurückliegenden Vergangenheit schockierte es eine kleine Ansammlung von Atomen, die dort zufällig gerade durch die leere Lebloigkeit des Universums schwebten, so ernstlich, daß sie sich zu den allerngewöhnlichsten Mustern zusammenschlossen. Diese Muster lernten schnell, sich zu reproduzieren (das war ein Teil dessen, was so ungewöhnlich an ihnen war), und verursachten auf jedem Planeten, auf dem sie landeten, jede Menge Ärger. So begann das Leben im Universum.

[Per Anhalter durch die Galaxis, Douglas Adams, Verlag Ullstein GmbH, Frankfurt/M - Berlin, 1995]

Publikationsliste

Wissenschaftliche Artikel

Schürmann, A., Sokolowski, R., Haas, M., Wolfes, H. (2000) Characterization of direct readout contacts of the Myb DNA binding domain. *Blood Cells, Molecules and Disease*. In press

Posterbeiträge

Kersten, C., Scharnhorst, H., Scholz, M., Schürmann, A., Siegert, M., Thiel, C., Wolfes, H. (1999) Isolation and characterization of proteins interacting with the c-Myb protein
Fifteenth Annual Meeting on Oncogenes and Tumor Suppressors, Frederick, Maryland

Schürmann, A., Sokolowski, R., Scholz, M., Wolfes, H. (2000) Characterization of direct readout contacts of the Myb DNA binding domain
51. Mosbacher Kolloquium, Mosbach

Schürmann, A., Sokolowski, R., Ackermann, K., Scholz, M., Wolfes, H. (2000)
Characterization of direct readout contacts of the Myb DNA binding domain
Sixteenth Annual Meeting on Oncogenes and Tumor Suppressors, Frederick, Maryland

Danksagung

Prof. Dr. J. Alves für die Möglichkeit, meine Dissertation unter seiner Leitung anfertigen zu können, für konstruktive Kritik, ständige Diskussionsbereitschaft und CD-Spektren.

Prof. Dr. W. Müller für die Übernahme des Koreferats.

PD Dr. H. Wolfes für seine kompetente Betreuung der Arbeit, viele anregende Diskussionen, das ausgezeichnete Arbeitsklima und die Arbeitsessen.

Prof. Dr. C. Urbanke für ständige Gesprächsbereitschaft und die UZ.

Dr. B. Sodeik für die Einweihung in die Geheimnisse der Immunfluoreszenz.

Dr. R. „Soko“ Sokolowski für die engagierte Einführung in den Laboralltag.

Hella Scharnhorst und Claudia Thiel für ihre geduldigen Erklärungen und *lab assistance*.

Kathrin Ackermann, Martin Haas, Cathleen Kersten, Michaela Siegert und Mike Stöver für ein angenehmes Laborklima und ein freundliches Miteinander.

Michael Scholz für Hunderte von Gesprächen und seine Bereitschaft zu helfen, als es nötig war.

Allen Mitarbeitern der *EcoRI*- und *SSB*- Arbeitsgruppen und allen, die ich bis jetzt noch nicht erwähnt habe, für die freundliche Atmosphäre, die schon sprichwörtlich ist.

Meinen Großversuchspraktikanten, die ihren Teil zur Arbeit beigesteuert haben.

Meinen Eltern für ihre Bestätigung und Unterstützung, durch die diese Arbeit ermöglicht wurde.

Anja... für den Rest.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Krankheit Krebs	1
1.2	Die myb-Familie.....	3
1.3	Das Proto-Onkogen <i>c-myb</i>	4
1.3.1	Die DNA-Bindungsdomäne.....	6
1.3.2	Die Transaktivierungsdomäne	10
1.3.3	Die Negativ Regulatorische Domäne	10
1.3.4	Phosphorylierungsstellen.....	12
1.4	c-Myb und Kofaktoren	12
1.5	Das <i>Phage-Display</i> -System.....	14
1.5.1	Biologische Grundlagen	14
1.5.2	Methodische Grundlagen.....	15
1.6	Das <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -System	17
1.7	Ziele der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Puffer und Lösungen	20
2.1.1	Puffer und Lösungen für mikrobiologische Arbeiten	20
2.1.1.1	Puffer und Lösungen für Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> (chemische Methode).....	20
2.1.1.2	Puffer und Lösungen zur Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> (Elektroporation)	21
2.1.2	Puffer und Lösungen für das <i>Two-Hybrid</i> -System	21
2.1.2.1	Puffer und Lösungen für die Hefetransformation	21
2.1.2.2	Puffer und Lösungen für β -Galaktosidase- <i>Colony-Lift-Filter-Assay</i>	22
2.1.2.3	Puffer und Lösungen für Plasmid-DNA-Präparationen aus Hefen	22
2.1.3	Puffer und Lösungen für das <i>Phage-Display</i> -System.....	23
2.1.4	Puffer und Lösungen für die Zellkultur	23
2.1.4.1	Puffer und Lösungen für das Reporter- <i>gen-Assay</i>	24
2.1.4.1.1	β -Galaktosidase- <i>Assay</i>	24
2.1.4.1.2	Luziferase- <i>Assay</i>	25
2.1.4.2	Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz.....	26
2.1.4.3	Puffer und Lösungen für die Frackelton-Extraktion	27
2.1.5	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten.....	28
2.1.5.1	Puffer und Lösungen für Plasmid-DNA Präparationen aus <i>E.coli</i> (Qiagen).....	28
2.1.5.2	Puffer und Lösungen für die Präparation genomischer DNA	29
2.1.5.3	Puffer für Restriktionsenzyme	29
2.1.5.3.1	Puffer von MBI-Fermentas.....	30
2.1.5.3.2	Puffer von New England Biolabs	31
2.1.5.4	Puffer für Ligation, Dephosphorylierung, Auffüllreaktion und PCR.....	32
2.1.5.5	Puffer und Lösungen die Sequenzierreaktion	33
2.1.5.6	Puffer für das <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	34
2.1.5.7	Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung.....	35
2.1.5.8	Puffer und Lösungen für den DNA-Zellulose-Bindungs- <i>Assay</i>	35
2.1.6	Puffer und Lösungen für Gelelektrophoresen.....	36
2.1.6.1	Agarosegele	36
2.1.6.2	Polyacrylamidgele	36
2.1.6.3	SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli	37
2.2	Medien.....	38
2.2.1	Medien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	38
2.2.2	Medien zur Aufzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2.2.3	Medien für die Zellkultur.....	40
2.3	Mikrobiologisches Material.....	40
2.3.1	Verwendete Bakterienstämme	40
2.3.2	Verwendeter Hefestamm	41
2.3.3	Verwendete Zelllinien.....	43
2.4	Verwendete Vektoren.....	44
2.4.1	Vektoren für <i>Escherichia coli</i>	44
2.4.2	Vektoren für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
2.4.3	Vektoren für die Zellkultur.....	48
2.4.3.1	Vektoren des <i>Mercury™ Pathway Profiling</i> -Systems	54

2.5	Verwendete Antikörper	58
2.6	Mikrobiologische Methoden.....	58
2.6.1	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	58
2.6.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	58
2.6.1.2	Chemische Transformation	59
2.6.1.3	Elektroporation.....	59
2.6.1.4	Proteinexpression	60
2.6.1.4.1	Fermentation.....	61
2.6.1.5	Amplifikation der cDNA-Bibliothek.....	61
2.6.2	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
2.6.2.1	<i>Working Stock</i> und Glycerinkultur	62
2.6.2.2	Kultivierung	62
2.6.2.3	Elektroporation.....	63
2.6.2.4	Chemische Transformation in Gegenwart von Lithiumacetat.....	63
2.6.2.5	β -Galaktosidase- <i>Colony-Lift-Filter-Assay</i>	65
2.6.3	Arbeiten im Rahmen des <i>Phage-Display</i> -Systems	65
2.6.3.1	Vermehrung von M13KO7-Helferphagen	65
2.6.3.2	Produktion rekombinanter Phagen	65
2.6.3.3	Isolierung rekombinanter Phagen und deren Konzentrationsbestimmung	66
2.6.3.4	Beschichtung der Mikrotiterplatten.....	66
2.6.3.5	<i>Panning</i>	67
2.6.4	Arbeiten mit euykariontischen Zelllinien.....	68
2.6.4.1	Passagieren von Zellen.....	68
2.6.4.2	Lagerung von Zellen	69
2.6.4.3	Transfektion	70
2.6.4.4	Transfektion mit <i>Effectene</i>	71
2.6.4.5	Ernten von Zellen.....	72
2.6.4.6	β -Galaktosidase- <i>Assay</i>	72
2.6.4.7	Luziferase- <i>Assay</i>	73
2.6.4.8	Fluoreszenzmikroskopie GFP-exprimierender Zellen.....	73
2.6.4.9	Immunfluoreszenzmikroskopie adhärenter Zellen	73
2.6.4.9.1	Vorbereitungen und Optimierung der Zelldichte.....	74
2.6.4.9.2	Fixierung und Permeabilisierung der Zellen.....	74
2.6.4.9.3	Immunmarkierung	75
2.6.4.9.4	Einbettung.....	76
2.6.4.10	Frackelton-Extraktion.....	76
2.6.4.11	Modifizierte Frackelton-Extraktion.....	76
2.7	Molekularbiologische Methoden	77
2.7.1	Plasmidpräparation	77
2.7.2	Präparation genomischer DNA	80
2.7.2.1	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	80
2.7.3	DNA-Modifikationen.....	80
2.7.3.1	Restriktionsspaltung von DNA	80
2.7.3.2	Ligation linearer DNA	82
2.7.3.3	Dephosphorylierung von DNA	82
2.7.3.4	Auffüllen von Überhängen nach der Restriktionsspaltung.....	82
2.7.4	PCR.....	83
2.7.5	Sequenzierung von DNA	84
2.7.6	Gel-Elektrophoresen	85
2.7.6.1	Agarosegel-Elektrophorese	85
2.7.6.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAAGE)	86
2.7.6.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAAGE)	86
2.7.6.4	<i>Shadow Cast</i> -Gel-Elektrophorese	87
2.7.6.5	Sequenziergel	88
2.7.6.6	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	89
2.7.7	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	90
2.7.8	Aufreinigung von (His) ₆ - <i>tag</i> -Proteinen.....	91
2.7.8.1	Affinitätschromatographie	91
2.7.8.2	Ionenaustauscherchromatographie	92
2.7.9	DNA-Zellulose-Bindungs- <i>Assay</i>	92
3	Durchführung und Ergebnisse	93
3.1	Etablierung eines modifizierten <i>Phage-Display</i> -Systems.....	93

3.1.1	Schematischer Ablauf eines <i>Phage-Displays</i>	93
3.1.2	Klonierung der Phagemid-Vektoren	95
3.1.3	Effizienzbestimmung des neuen Systems	98
3.1.4	Untersuchung intra- und intermolekularer Wechselwirkungen	100
3.1.5	Grenzen und Vorteile des Systems	105
3.2	Screening einer cDNA-Bibliothek mittels <i>Two-Hybrid-System</i>	105
3.2.1	Fließschema eines <i>Two-Hybrid-Screening</i>	106
3.2.2	Klonierung des Köderplasmids	106
3.2.3	Transformation und Kultivierung von Hefezellen	108
3.3	Untersuchung des Proteins rcd1+	110
3.3.1	Aufreinigung und Charakterisierung des His ₆ -Fusionsproteins von Rcd1+	111
3.3.2	Lokalisation des Proteins Rcd1+ in eukaryontischen Zellen	118
3.3.3	Versuche zur Bestimmung der wechselwirkenden Region	123
3.4	Auswirkung von Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne des Proteins c-Myb bei <i>in vivo</i> Experimenten	125
4	Diskussion	129
4.1	Das modifizierte <i>Phage-Display-System</i>	129
4.2	<i>Two-Hybrid-Screening</i>	131
4.3	Das Protein Rcd1+	131
4.4	Bindungs- und Transaktivierungsverhalten von c-Myb-Mutanten	135
5	Zusammenfassung	139
5.1	Deutsch	139
5.2	English	140
6	Literaturverzeichnis	141
7	Anhang	150

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
A	2'-Desoxyadenosin-5'-monophosphat
A	Ampere
Å	10 ⁻¹⁰ m
AA	Acrylamid
AAP	Agaroseauftragspuffer
Ac	Acetat
AD	Aktivierungsdomäne
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
C	2'-Desoxycytidin-5'-monophosphat
c	Konzentration
C-	Carboxyl-
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD	Circulardichroismus
cfu	<i>colony forming units</i>
Ci	Curie
CKII	Caseinkinase II
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	desoxy
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
DBD	Bindungsdomäne
dd	didesoxy
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
ds	doppelsträngig
DTE	1,4-Dithioerythriol
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
G	2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
His	Histidin
(His) ₆ -tag	His-Hexapeptid
HTH	<i>Helix-Turn-Helix</i>
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid

k	Kilo
Kan	Kanamycin
K_{ass}	Assoziationskonstante
K_{Diss}	Dissoziationskonstante
kb	Kilobasen
l	Liter
LAP	Laemmliauftragspuffer
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
log	dekadischer Logarithmus
m	milli
M	molar
mA	Milliampère
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
β -MESH	β -Mercaptoethanol
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	Milliliter
n	nano
N-	Amino-
nd	nicht detektierbar
Ni^{2+} -NTA	Nickel ²⁺ -Nitrilotriacetat
NLS	<i>Nuclear localisation sequence</i>
NRD	Negativ Regulatorische Domäne
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid
PAA	Polyacrylamid
PAAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Ketten Reaktion)
PDL	Phosphat-DTT-Lubrol-Puffer
PEG	Polyethylenglycol
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.pombe</i>	<i>Saccharomyces pombe</i>
SAP	Sequenzierauftragspuffer
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS
SM	<i>Medium for storage and dilution of phages</i>
ss	einzelsträngig
T	2'-Desoxythymidin-5'-monophosphat
t	Zeit
T	Temperatur
TAD	Transaktivierungsdomäne
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin

TPE	Tris-Phosphat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TTE	Tris-Taurin-EDTA-Puffer
U	Unit (Aktivitätseinheit für Enzyme)
UAS	<i>Upstream activating site</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprözent
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
μ	mikro
λ	Wellenlänge

Aminosäuren werden mit dem internationalen Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt. Eine Zahl hinter der Bezeichnung gibt die Position der Aminosäure im Protein an.

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

1 Einleitung

1.1 Die Krankheit Krebs

Während ihrer Entwicklung werden eukaryontische Zellen durch Regulationsprozesse in Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Apoptose gesteuert. Eine Vielzahl von inneren und äußeren Signalen hat die Aufgabe, den Ablauf des Zellzyklus zu regulieren. Als molekularer Zeitgeber fungiert der Faktor MPF (*Maturation Promoting Factors, Meiotic Progression Factor*), der einen aktiven Komplex aus Cyclinen und cyclinabhängigen Proteinkinasen (*Cyclin Dependent Kinases, Cdk*s) darstellt. MPF reguliert die Aktivität von Proteinen, die als Proto-Onkogenprodukte steuernde Einflüsse auf Prozesse des Zellzyklus haben, durch Phosphorylierung.

Krebs entsteht durch kontinuierliche und unregulierte Proliferation von Zellen. Die Ursache hierfür ist der Verlust der Zelle, auf innere beziehungsweise äußere Kontrollmechanismen der Proliferation reagieren zu können. Es ist nicht ein einzelnes Ereignis, das zum Verlust der Kontrolle führt, sondern eine Akkumulation von Mutationen in mehreren regulatorischen Genen der Zelle. Man unterscheidet zwei Arten von Tumoren: benigne Tumore, welche auf den Ort ihrer Entstehung begrenzt sind, und maligne Tumore, die fähig sind, in umgebendes Gewebe einzudringen und sich über den Blutkreislauf und das lymphatische System im Körper auszubreiten.

Die Klassifizierung von Tumoren erfolgt nach dem Ort ihrer Entstehung. Man unterscheidet Karzinome (epitheliales Gewebe), Sarkomen (mesenchymales Stütz- und Bindegewebe), Leukämien (blutbildendes Gewebe) und Lymphome (lymphatisches Gewebe). Karzinome bilden mit 90 % aller Tumoren die häufigste Krebsart.

Da die Entstehung von Krebs ein klonaler Vorgang ist, lassen sich alle Zellen eines Tumors auf eine Ursprungszelle zurückführen. Die Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle ist ein Mehrstufenprozeß, die Entwicklung findet also nicht in einem Schritt statt, sondern es müssen mehrere Einzelereignisse zusammentreffen (Fearon and Vogelstein, 1990). Am Anfang der Entwicklung von Krebs (Tumorinitiation) steht eine genetische Veränderung, die zu abnormaler Proliferation einer einzelnen Zelle führt. Die damit verbundene höhere Vermehrungsrate potenziert die Wahrscheinlichkeit, daß es in einer dieser Zellen zu einer zweiten Veränderung kommen wird. Die weitere Krebsentwicklung (Tumorprogression) ist

von zusätzlichen Mutationen geprägt, die einen Selektionsvorteil von Tumorzellen gegenüber normalen Zellen entstehen lassen (siehe Abbildung 1).

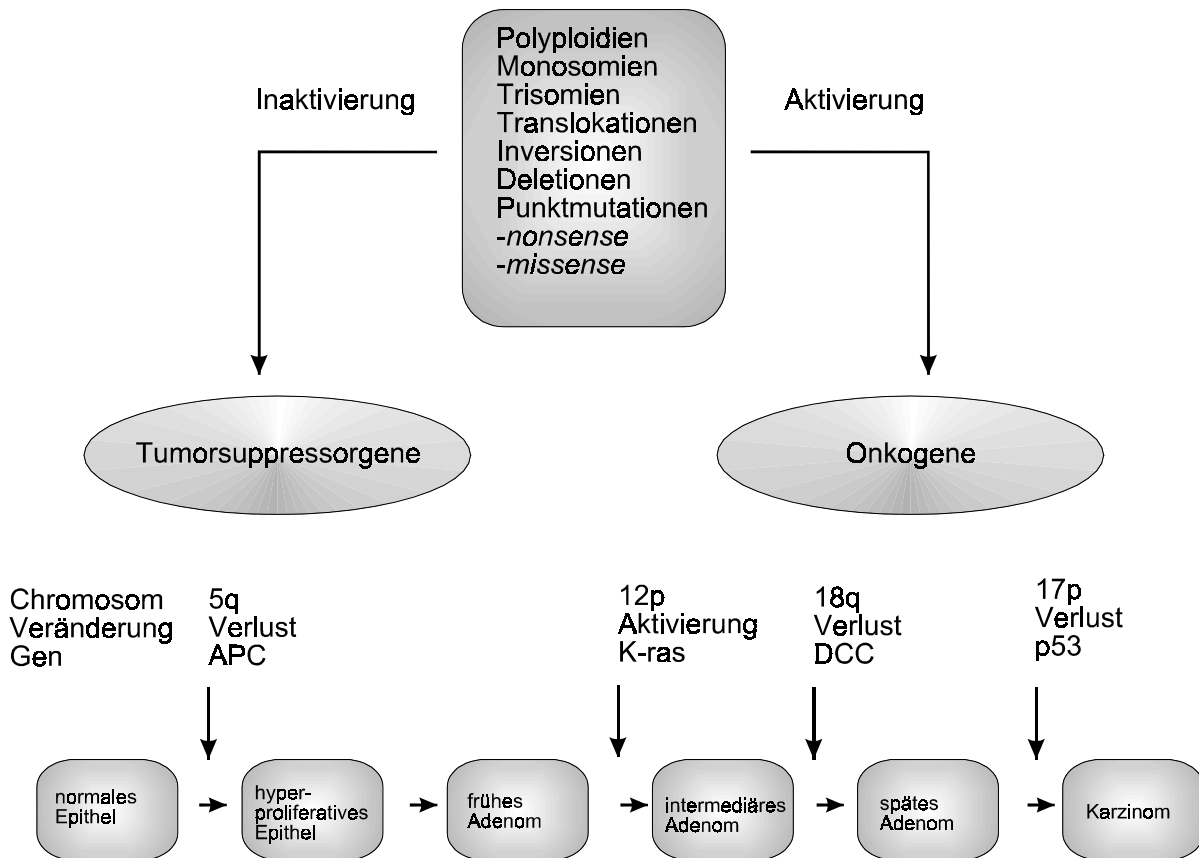


Abbildung 1: Mehrstufenmodell der Karzinogenese nach (Fearon and Vogelstein, 1990)

Diese Mutationen betreffen zwei Gruppen von Genen: Proto-Onkogene (zum Beispiel *abl*, *fos*, *jun*, *myb*, *myc*, *src*, *bcl-2*, *erbB-2*) und Tumorsuppressorgene (zum Beispiel *p53*, *p16*, *APC*, *DCC*, *NF1*, *Rb*, *WT1*) (Cooper, 1997). Bei Proto-Onkogenen ist eine Mutation auf einem Allel zur Transformation ausreichend, das heißt sie ist dominant. Zu den Proto-Onkogenprodukten zählen Membranrezeptoren, Proteine der Signaltransduktionskaskade und Transkriptionsfaktoren. Da die Mutation bei Proto-Onkogenen dominant ist, konnten viele durch die Charakterisierung von tumorerzeugenden Retroviren ermittelt werden. Viele dieser Onkogene (siehe Tabelle 1) leiten sich von Proto-Onkogenen ab, die durch Transduktionsereignisse in das Genom von Retroviren gelangt sind.

Tabelle 1: Beispiele für retrovirale Onkogene nach (Cooper, 1997)

Onkogen	Virus	Spezies
<i>abl</i>	<i>Abelson leukemia virus</i>	Maus
<i>crk</i>	<i>CT10 sarcoma virus</i>	Huhn
<i>erbA</i>	<i>Avian erythroblastosis-ES4 virus</i>	Huhn
<i>fes</i>	<i>Gardner-Arnstein feline sarcoma virus</i>	Katze
<i>myb</i>	<i>Avian myeloblastosis virus</i>	Huhn
<i>myc</i>	<i>Avian myelocytomatosis virus</i>	Huhn
<i>src</i>	<i>Rous sarcoma virus</i>	Huhn
<i>yes</i>	<i>y73 sarcoma virus</i>	Huhn

Nach der Entdeckung viraler Onkogene wurden aus nicht-virusinduzierten Tumoren auch genomische Onkogene isoliert (siehe Tabelle 2), deren Entstehung aus Proto-Onkogenen durch physikalische und chemische Karzinogene initiiert wurde.

Tabelle 2: Beispiele für Onkogene humaner Tumoren nach (Cooper, 1997)

Onkogen	Tumorart
<i>PRAD1</i>	Adenom der Parathyreoidea
<i>c-myc</i>	Burkitt Lymphom
<i>ret</i>	Schilddrüsenkarzinom
<i>gli</i>	Glioblastom
<i>bcl-2</i>	Follikuläres B-Zell-Lymphom

Im Gegensatz dazu müssen bei Tumorsuppressorgenen beide Allele funktionell inaktiv sein, daß heißt die Mutation ist rezessiv. Die Expression von Tumorsuppressorgenen führt zu einem Proliferationsstop und letztendlich zur Apoptose.

1.2 Die myb-Familie

Die Erforschung der myb-Familie beginnt mit der Isolierung von Onkogenen aus Retroviren. Das virale Onkogen *v-myb*, welches bei Hühnern myeloide Leukämien induziert, wurde aus den Retrovirusstämmen AMV (*Avian myeloblastosis virus*) (Hall, 1941; Roussel, 1979) und

E26 (Ivanov, 1962) isoliert. Das zu *v-myb* korrespondierende zelluläre Proto-Onkogen ist *c-myb*. Es wurde in vielen Spezies, unter anderem in Mensch (Majello *et al.*, 1986), Maus (Gonda *et al.*, 1985), Huhn (Gerondakis and Bishop, 1986), Getreide (Marocco *et al.*, 1989) und Hefe (Tice-Baldin *et al.*, 1989) gefunden. Das Onkogen *v-myb* ist das erste identifizierte Mitglied einer großen Familie *myb*-homologer Gene, die unter anderem in Tieren (Nomura *et al.*, 1988), Pflanzen (Leech, 1993; Oppenheimer, 1991; Paz-Ares *et al.*, 1987), Pilzen und Schleimpilzen (Ju *et al.*, 1990; Ohi *et al.*, 1994; Tice-Baldin *et al.*, 1989) zu finden sind. Die überwiegende Anzahl der *myb*-Gene wurde aus Pflanzen isoliert. Dort sind sie ebenfalls an der Regulation der Proliferation von Zellen beteiligt. Hybridisierungsexperimente mit einer T-Zellen-cDNA-Bibliothek führten zur Isolierung der Gene *A-myb* und *B-myb*, die begrenzt homolog zu *c-myb* sind (Nomura *et al.*, 1988).

Ein Charakteristikum für Myb-Proteine ist eine, sich zwei- bis dreimal wiederholende, hochkonservierte N-terminale Aminosäuresequenz, welche als *repeats* bezeichnet werden und die DNA-Bindungsdomäne darstellen. Um Proteine in die Familie der Myb-Proteine einzuordnen, wird folgende Konsensussequenz der DNA-Bindungsdomäne als Zugehörigkeitskriterium herangezogen:

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

Eckige Klammern kennzeichnen alternative Aminosäuren,
Indizes geben die Anzahl der beliebigen Aminosäure X an.

Eine Datenbanksuche mit dieser Konsensussequenz ergibt eine Vielzahl Myb-verwandter Proteine, zum Beispiel den eukaryontischen Transkriptionsterminationsfaktor TTF-1 (Evers *et al.*, 1995) und die Telomer-Bindungsproteine TRF1/TRF2 (Broccoli *et al.*, 1997) und das, den 24 Stunden Rhythmus kontrollierende, *Circadian Clock Associated 1*-Gen (CCA-1) (Sugano, 1998).

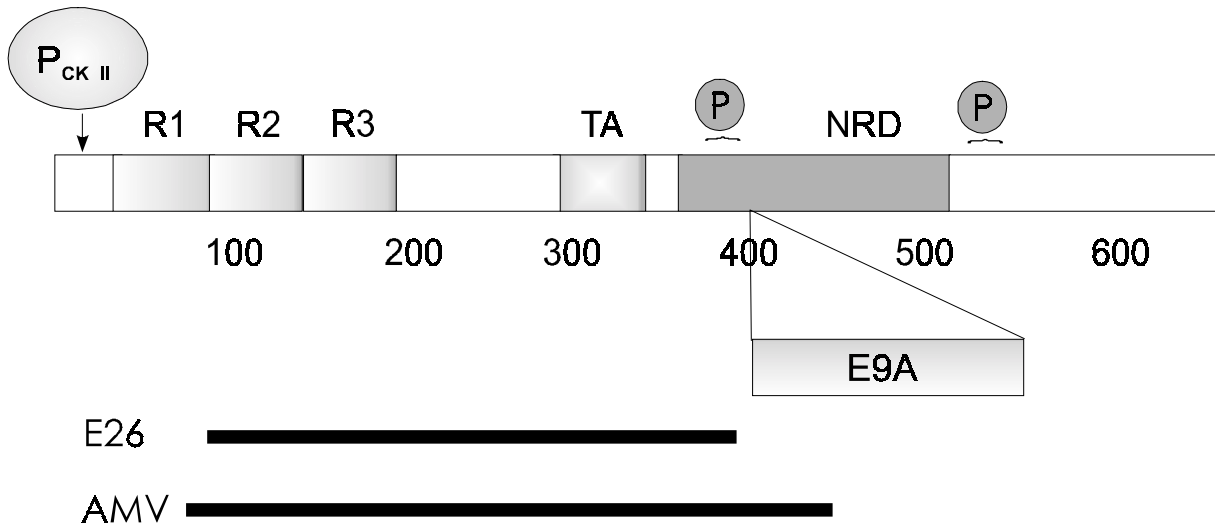
1.3 Das Proto-Onkogen *c-myb*

Das Proto-Onkogen *c-myb* kodiert einen nukleär lokalisierten Transkriptionsfaktor, der an eine spezifische DNA-Sequenz bindet und zusammen mit diversen Kofaktoren die Transkription von Genen reguliert (Ness, 1996). Die DNA-Sequenz (C/T)AAC(G/T)G wird spezifisch erkannt, insbesondere das Kernmotiv AAC ist von Bedeutung (Howe and Watson, 1991; Weston, 1992). Die Hauptpleißvariante (Schuur *et al.*, 1993) des c-Myb-Proteins ist 636 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von 75 kDa. Das Protein findet sich in

vielen verschiedenen Geweben, wobei das hohe Expressionsniveau, das vor allem in myeloiden, erythroiden und lymphoiden Vorläuferzellen der blutbildenden Bahn zu beobachten ist, mit zunehmendem Differenzierungsgrad abnimmt. In differenzierten, adulten Zellen ist das Expressionsniveau niedrig (Golay *et al.*, 1992; Gonda and Metcalf, 1984; Westin *et al.*, 1982). Die mRNA des Proto-Onkogens *c-myb* ließ sich zudem in embryonalen Hirnzellen (Gozes *et al.*, 1987), zahlreichen Tumorzelllinien (Welter *et al.*, 1990) und verschiedenen humanen Melanomen (Dasgupta and Reddy, 1989) nachweisen. Mit *c-myb* transfizierte hämatopoetische Zellen zeigen eine gesteigerte Proliferationsrate und eine Inhibierung ihrer Differenzierung (Clarke *et al.*, 1988; McClinton *et al.*, 1990). Diese Beobachtung und die Tatsache, daß Mäuse mit einer Inaktivierung des *c-myb*-Gens ab dem 15. Tag der Gestation eine letale Anämie zeigen, legen nahe, daß c-Myb eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen, vor allem der Hämatopoese, spielt (Caracciolo *et al.*, 1990; Golay *et al.*, 1991). Die Anämie ist mit schweren Defekten der embryonalen Leberentwicklung und der Proliferation von T-Zellen verbunden. Das Stadium der Embryonalentwicklung, in dem der Tod eintritt, fällt zeitlich mit der Verlagerung der Hämatopoese vom embryonalen Dottersack in die Leber zusammen. Die Abwesenheit von c-Myb führt also zum Versagen der adulten Hämatopoese (Mucenski *et al.*, 1991).

Die Transformation von *c-myb* in seine onkogene Form bedingt eine Deletion 3'- und/oder 5'-terminaler Sequenzen, wie sie im viralen Onkogen *v-myb* beobachtet werden (Dubendorff *et al.*, 1992; Vorbrueggen *et al.*, 1994). Das v-Myb-Protein unterscheidet sich von c-Myb durch den Verlust wesentlicher Bestandteile des zellulären Proteins, wie die Casein-Kinase-II-Phosphorylierungsstelle und die Negativ Regulatorische Domäne (siehe Abbildung 2). Für die Aktivierung onkogener Fähigkeiten von c-Myb scheint die Abwesenheit negativ regulierender Bestandteile essentiell zu sein.

Dem Transkriptionsfaktor c-Myb können verschiedene funktionelle Domänen zugeordnet werden (Review: Ness, 1996), welche in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt sind.



- P_{CKII} : Phosphorylierungsstelle der Casein-Kinase-II
 $R_1R_2R_3$: DNA-Bindungsdomäne
 TA: Transaktivierungsdomäne
 P: weitere Phosphorylierungsstellen
 NRD: Negativ Regulatorische Domäne
 E9A: alternatives c-Myb aus Maus (enthält ein zusätzliches Exon und ist damit 85 kDa (=760 AS) groß)
 AMV: Länge von v-Myb aus AMV
 E 26: Länge des Myb-Anteils am p135^{gag-myb-ets} Protein

Abbildung 2: Schematischer Aufbau des c-Myb-Proteins modifiziert nach (Lüscher *et al.*, 1990)

1.3.1 Die DNA-Bindungsdomäne

Im aminoterminalen Bereich des c-Myb-Proteins ist die DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) lokalisiert. Sie umfaßt einen 155 Aminosäuren langen Bereich aus drei sequenzhomologen Regionen (*Repeats*) R1, R2 und R3 von je 51 beziehungsweise 52 Aminosäuren Länge, der sich von der AS-Position 38 bis 193 erstreckt. Ein charakteristisches Merkmal jeden *Repeats* ist ein hoch konserviertes Muster aus drei Tryptophanresten, die in einem Abstand von 18 beziehungsweise 19 Aminosäuren angeordnet sind. Die Region der *Repeats* 2 und 3 zeichnet sich durch einen relativ hohen Anteil an basischen Aminosäuren (23 %) aus.

Unterstützt durch computerberechnete Strukturen (*Modelling*) und von Mutagenesestudien bestätigt machte Frampton (Frampton *et al.*, 1991) den Vorschlag, daß die drei Tryptophane die Ankerpunkte eines hydrophoben Clusters bilden. Dieser positioniert mit weiteren hydrophoben Aminosäuren die drei α -Helices eines jeden *Repeats* zu einem *Helix-Turn-Helix*-Motiv (HTH). Gabrielsen konnte zur gleichen Zeit (Gabrielsen *et al.*, 1991) durch biochemische Untersuchungen weitere Indizien für das HTH-Motiv liefern. Anhand NMR-

spektroskopischer Untersuchungen an synthetischen Peptiden der getrennten *Repeats* 2 und 3 und einer aus *Repeat* 2 und 3 bestehenden DNA-BD im Komplex mit der spezifischen DNA Sequenz (Ogata *et al.*, 1995; Ogata *et al.*, 1994) wurde ein Modell aufgestellt, in dem *Repeat* 2 und 3 als eigenständige, identische Domänen ein intramolekulares Dimer bilden, das ausreicht, um eine spezifische DNA-Sequenz zu erkennen. In diesem Modell positioniert jeder *Repeat* die Erkennungshelix seines HTH-Motivs in der große Furche. Es werden Wasserstoffbrücken (*Direct Readout*) zu den Basen der spezifischen Sequenz ausgebildet, wobei die Erkennungshelices teilweise überlappen. Die Stabilisierung des Komplexes erfolgt über polare Aminosäuren, die zum Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA Kontakte ausbilden. Nach diesem Modell sind am *Direct Readout* die Aminosäuren Lys128, Glu132 und Asn136 des zweiten *Repeat* und die Aminosäuren Asn179, Lys182, Asn183, Asn186 und Ser187 des dritten *Repeat* beteiligt. Dieses Modell steht allerdings im Widerspruch zu den Untersuchungen von zwei anderen Gruppen. Auch hier sind die Daten einer NMR-spektroskopischen Messung in ein Strukturmodell der Myb DNA-BD umgesetzt worden (Jamin *et al.*, 1993; McIntosh, 1998). Die erhaltenen Daten lassen den Schluß zu, daß *Repeat* 2 und 3 nicht äquivalent sind, sondern daß *Repeat* 2 aus zwei α -Helices besteht und der Rest einer flexiblen Struktur entspricht. Beide Modelle sind in Abbildung 3 gegenübergestellt.

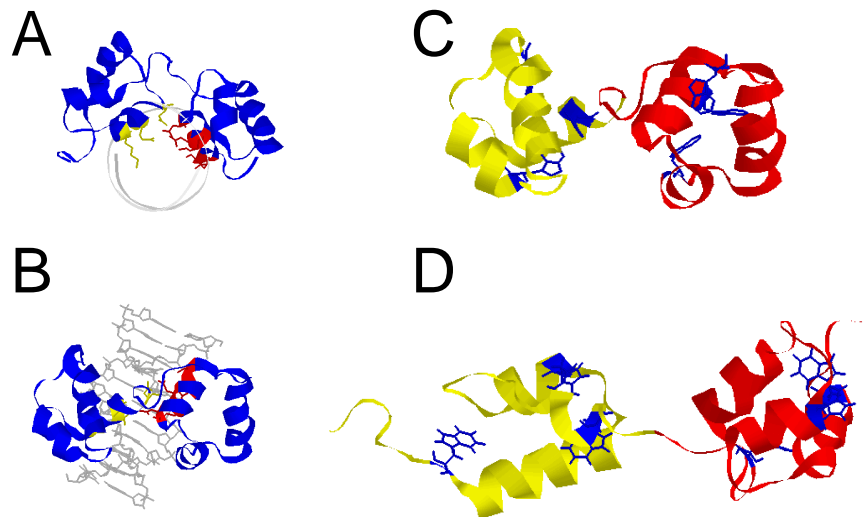
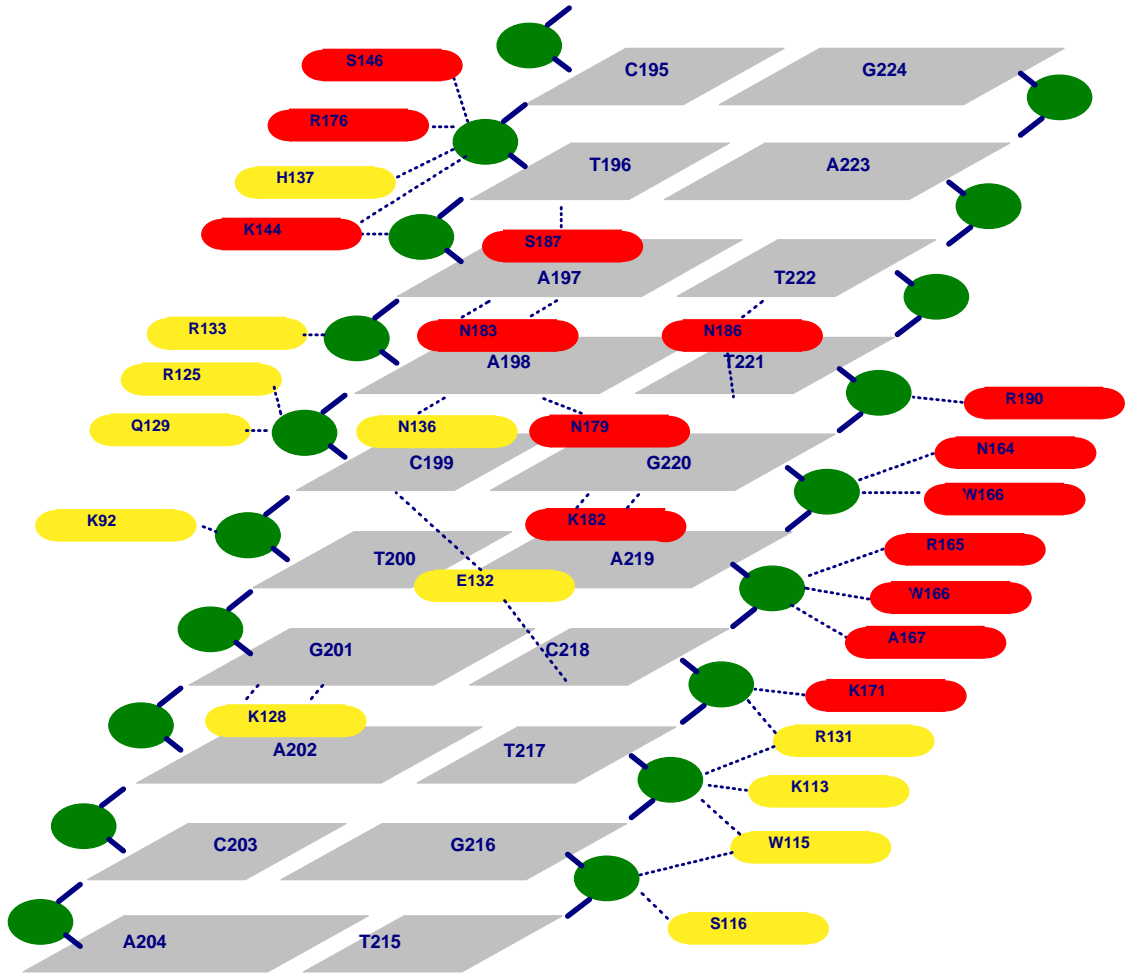


Abbildung 3: Struktur des Myb-DNA Komplexes: (A) Aufsicht auf die Achse der DNA, die *Direct-Readout*-Kontakte sind rot (*Repeat* 3) und gelb (*Repeat* 2) dargestellt. Vergleich der Myb-DNA-Bindungsdomäne nach Ogata (C) und McIntosh (D)

Bei dem Modell der beiden Arbeitsgruppen soll der Hauptanteil der Myb-Sequenz durch *Repeat 3* erkannt werden, wobei durch *Repeat 2* eine Unterstützung der Erkennung und Bindung erfolgt. Daten aus mehreren Arbeitsgruppen (Myrset *et al.*, 1993; Zargarian L., 1999; Ebneith *et al.*, 1994b) untermauern diese Vorstellung. Durch zielgerichtete Mutagenese der DNA-BD wurden die Aminosäuren, die nach Ogata am *Direct Readout* beteiligt sind, ausgetauscht und die DNA-Bindung der Mutanten *in vitro* untersucht (Sokolowski, 1998). In Denaturierungsexperimenten wurde der erste *Repeat* als thermostabilster Bereich ermittelt, der sich jedoch in Mutationsexperimenten als für die Bindung von Myb an DNA entbehrlich erwies (Howe *et al.*, 1990). Es gibt jedoch Hinweise, daß er durch Konformationsänderungen den spezifischen Protein-DNA-Komplex stabilisiert (Ebneith *et al.*, 1994b).

Repeat 2 enthält einen hoch konservierten Cystein-Rest (Cys-130), dessen Thiol-Gruppe frei zugänglich ist, und weist die flexibelste Struktur auf. Die Reduktion des Cystein-Restes, die unter Kontrolle des Redoxfaktors Ref-1 steht, ist wesentlich für die Myb-DNA-Bindung. Ein oxidiertes Cys-130 verhindert die korrekte Positionierung der dritten Helix von *Repeat 2* während der Bindung (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.

Repeat 3 ist die für die DNA-Bindung von elementarer Bedeutung. Er enthält die Aminosäuren Asn179, Lys182, Asn183, Asn186 und Ser187, welche für die spezifische Identifizierung des zentrale Myb-Erkennungsmotivs AAC essentiell sind (siehe Abbildung 4).



Basen sind grau, Phosphate grün, AS von Repeat 2 gelb, AS von Repeat 3 rot dargestellt.

Abbildung 4: Schematische Darstellung der c-Myb-R2R3-DNA-Interaktionen nach (Ogata *et al.*, 1996)

Tabelle 3: Abstand der am *Direct Readout* beteiligten Aminosäuren zu den von ihnen kontaktierten Basen (gemessen als Abstand der Heteroatome möglicher Wasserstoffbrücken). Die Numerierung der Basen bezieht sich auf Abbildung 4 (Sokolowski, 1998).

Aminosäure	kontaktierte Base	Abstand [\AA]
K128	G201	2,8
E132	C218	3,3
E132	C199	2,8
N136	A198	4,0
N179	A198	4,7
K182	G220	2,8
N183	A197	2,8
N186	T222	4,8
N186	T221	5,4
S187	T196	3,2

Es konnte bisher eine Vielzahl Myb-regulierter Gene identifiziert werden, denen ein Promotor mit der Myb-Erkennungssequenz AACGT gemein ist. Dazu zählen unter anderem *mim-1* (Ness *et al.*, 1989), *c-myc* (Evans *et al.*, 1990; Zobel *et al.*, 1991), *cdc2* (Ku *et al.*, 1993), *CD13/APN* (Shapiro, 1995), *c-myb* (Nicolaidis *et al.*, 1991), *Neutrophile Elastase* (Oelgeschläger *et al.*, 1996b) und *tom-1* (Burk *et al.*, 1997). Die aufgeführten Gene sind an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt und werden spezifisch in lymphoiden beziehungsweise myeloiden Zellen exprimiert.

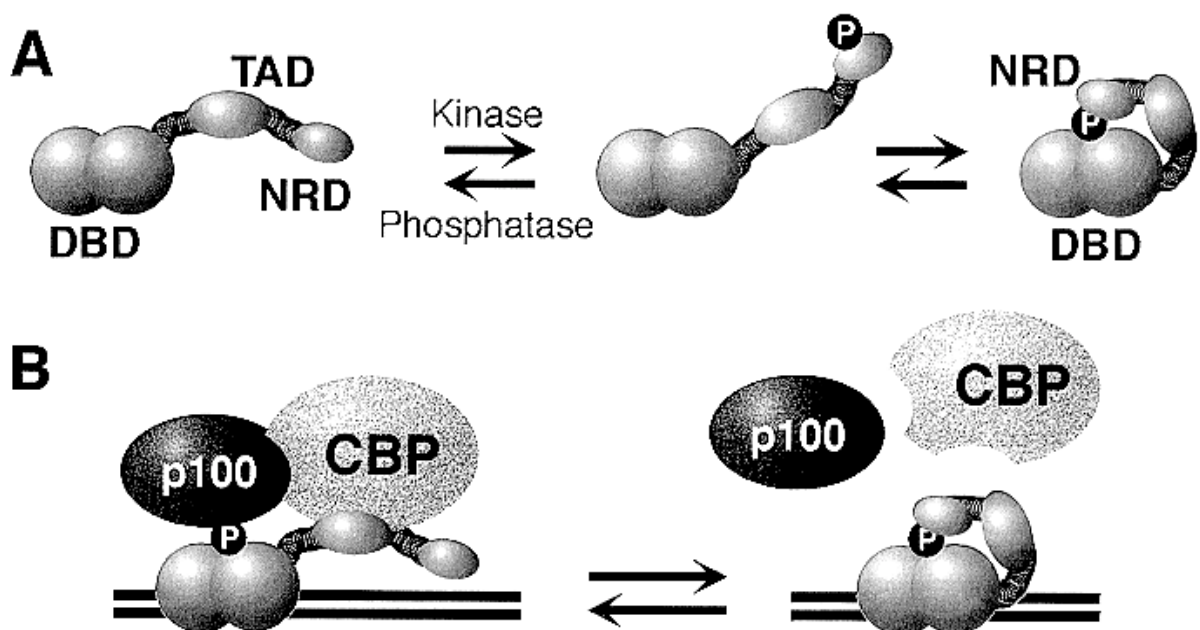
1.3.2 Die Transaktivierungsdomäne

Die Transaktivierungsdomäne (TAD) von c-Myb befindet sich zwischen den Aminosäuren 275 und 325. Sie wurde durch Aktivierungsstudien eines Fusionsproteins aus der DNA-Bindungsdomäne von Gal4 und diversen Fragmenten des transaktivierenden Bereiches aus c-Myb eingegrenzt (Bortner and Ostrowski, 1991; Lane *et al.*, 1990; Sakura *et al.*, 1989) und besitzt einen hydrophilen und schwach aziden Charakter, wie er auch bei anderen Transkriptionsfaktoren zu beobachten ist (Ptashne, 1988). Es ist nicht geklärt, welche Eigenschaften der Region zur Transaktivierung erforderlich sind. Eine vollständige Inaktivierung ist jedoch durch die Deletion von elf Aminosäuren in dieser Region möglich (Weston and Bishop, 1989). Maximale Transaktivierung durch c-Myb erfordert neben der genannten Region einen kürzlich auf die zehn Aminosäuren EFAETLQF(IL)D eingegrenzten, C-terminal gelegenen Bereich, dem sogenannten FAETL-Motiv (AS 392-396) (Fu and Lipsick, 1996). Die TAD weist eine geringere Homologie zu den einzelnen Mitglieder der Myb-Familie auf als die hoch konservierte DNA-Bindungsdomäne.

1.3.3 Die Negativ Regulatorische Domäne

Die Negativ Regulatorische Domäne (NRD) umfaßt den C-terminalen Bereich zwischen Aminosäure 350 und 500. Sie inhibiert die Transaktivierung (Sakura *et al.*, 1989) und die Transformation (Kanei-Ishii *et al.*, 1992) und scheint die DNA-Bindung (Ramsay *et al.*, 1991) von c-Myb zu modulieren. Eine Deletion dieser Region, wie sie unter anderem in viralen Formen des Myb-Proteins vorhanden ist, führt zum zehnfachen Anstieg der Transaktivierung (Hu *et al.*, 1991; Kalkbrenner *et al.*, 1990; Ramsay *et al.*, 1991; Sakura *et al.*, 1989).

Der Mechanismus der negativen Regulation ist bisher ungeklärt. Es werden verschiedene Modelle diskutiert. Zum einen wird über die Bindung eines zellulären Inhibitors an die NRD spekuliert, durch welche die Affinität von Myb zu seiner Erkennungssequenz moduliert wird, zum anderen wird die intramolekulare Interaktion der DNA-BD mit dem C-Terminus von Myb diskutiert (siehe Abbildung 5B) (Ness, 1996). Das erste Modell wird von Versuchen gestützt, in denen eine Kotransfektion verschiedener c-Myb- und v-Myb-Konstrukte mit dem carboxyterminalen Ende von Myb durchgeführt wurde. Sie zeigten eine Stimulation der Transaktivierung, was durch einen Inhibitor erklärbar wäre, der von der kotransfizierten NRD gebunden wird (Vorbrueggen *et al.*, 1994). Die für das zweite Modell erforderliche C-terminale Region konnte auf die Aminosäuren 541-567 eingengt werden (Kiewitz, 1997b), welche in der Lage ist, mit der DNA-Bindungsdomäne zu interagieren. An Position 529 befindet sich das EVES-Motiv, welches ebenfalls im Protein p100 auftritt und phosphorylierungsabhängig mit der DNA-BD interagieren kann (siehe Abbildung 5A) (Dash *et al.*, 1996).



A: Die Transkriptionsaktivität wird inhibiert durch Phosphorylierung im EVES-Motiv.

B: Die Zugänglichkeit für Kofaktoren könnte durch Rückfaltung gestört werden.

Abbildung 5: Modell für Regulation der NRD, modifiziert nach (Ness, 1996)

1.3.4 Phosphorylierungsstellen

Das Protein c-Myb besitzt diverse Phosphorylierungsstellen, am N-Terminus sind Casein-Kinase-II-(CKII)-stellen lokalisiert. Findet dort eine Phosphorylierung an Ser11 beziehungsweise Ser12 statt, so bewirkt das *in vivo* eine verringerte Bindungsaffinität von Myb an seine Erkennungssequenz (Lüscher *et al.*, 1990). Wird in einem Protein Serine 11 und 12 zu Alanin mutiert (ähnliche Raumerfüllung, keine Ladung), bindet es um den Faktor sechs besser als bei einem Austausch gegen Aspartat, dessen Carboxylgruppe die negative Ladung des phosphorylierten Zustandes an dieser Position imitiert (Oelgeschläger *et al.*, 1995). Allerdings existieren auch Berichte, denen zufolge eine Phosphorylierung in diesem Bereich die DNA-Bindung verbessern soll (Ramsay *et al.*, 1995).

Im Bereich der NRD sind weitere Phosphorylierungsstellen für die zellzyklusspezifische p34^{cdc2}-Kinase (Pines and Hunter, 1990) gefunden worden. Ferner konnte gezeigt werden, daß Myb-Proteine während der Mitose zellzyklusspezifischen Phosphorylierungen unterliegen (Lüscher and Eisenman, 1992). Phosphorylierungsstellen (zum Beispiel Serin 532) der p42^{mapk}-Kinase (Aziz *et al.*, 1993) stellen außerdem eine Verbindung zwischen dem MAP-Kinase-Weg und dem Myb-Protein her. Eine Mutation von Serin 532 zu Alanin konvertiert c-Myb nicht in ein transformierendes Protein, dennoch führt es in Transfektionsstudien zu verstärkter Transaktivierungsaktivität. Es wird infolgedessen 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.

1.4 c-Myb und Kofaktoren

Es ist bis jetzt gelungen, die Proteine NF-M, C/EBP β , p100, CBP und p300 als Kofaktoren von c-Myb zu identifizieren. NF-M (*Nuclear Factor Of Myoid Cells*), ein DNA-bindendes Protein mit einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne (*Leucine Zipper*) und einer DNA-Bindungsdomäne, verstärkt *in vivo* die Aktivierung des mim-1-Promotors durch Myb. NF-M sowie das homologe C/EBP β (*CCAAT-Box Enhancer Binding Protein Beta*) werden von Myb-Antikörpern kopräzipitiert. Nachweise für die direkte Interaktion der beiden Proteine stehen noch aus (Ness, 1996; Ness *et al.*, 1993).

CBP beziehungsweise p300 sind Proteine, die als *Bridging Proteins* durch Protein-Protein-Interaktionen einen Komplex mit weiteren Proteinen ausbilden (Akimaru *et al.*, 1997) und weiterhin eine Histonacetyltransferaseaktivität besitzen, die eine Rolle beim Chromatin-remodelling spielt (Kwok *et al.*, 1994).

CBP (*Creb Binding Protein*) wurde als Kofaktor des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP Responsive Binding Protein*) identifiziert (Arias *et al.*, 1994; Chrivia *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 (Chrivia *et al.*, 1993; Gonzales, 1989). CBP (siehe Abbildung 6) besitzt mehrere Wechselwirkungsdomänen, die den Kontakt zu verschiedenen Proteinen ermöglicht. N-terminal befindet sich eine mit dem TATA-Bindungsprotein wechselwirkende Domäne (Swope, 1996), weiter C-terminal Bindungsdomänen für c-Fos und TFIIB (Kwok *et al.*, 1994). Zwischen den Aminosäuren 462 und 661 sind Domänen für CREB, c-Jun und c-Myb lokalisiert (Oelgeschläger *et al.*, 1996a). Die Myb-Wechselwirkungsdomäne konnte auf die Aminosäuren 317 bis 342 eingegrenzt werden (Kiewitz, 1997b).

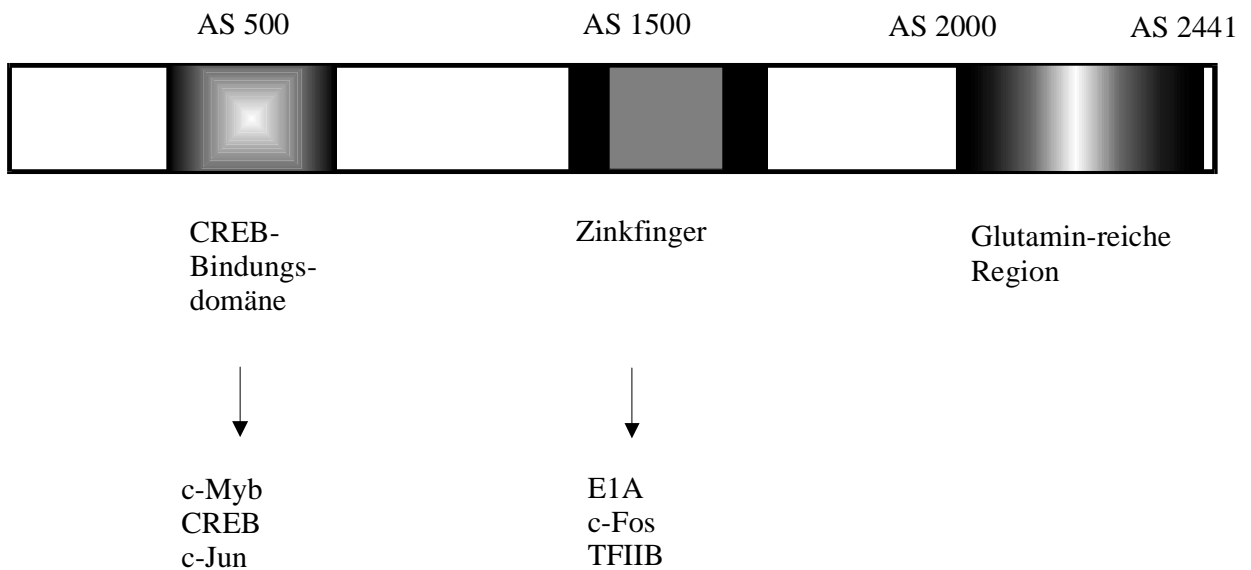


Abbildung 6: Schematische Darstellung von CBP der Maus und seinen putativen Interaktionspartnern [modifiziert nach (Kwok *et al.*, 1994)]
CREB-Bindungsdomäne: AS 462-661
Zinkfinger: AS 1284-1312 und AS 1708-1733
Glutamin-reiche Domäne: AS 1884-2441

Im Gegensatz zu CREB ist die Bindung von Myb an CBP unabhängig vom Phosphorylierungszustand des Proteins (Oelgeschläger *et al.*, 1996a). Das Protein p300 kann sowohl in der Bindung zu c-Myb, als auch in der zu CREB, CBP substituieren (Mink, 1997).

Ein weiteres Protein; das an c-Myb bindet; ist der Faktor p100, der auch Wechselwirkungen zu NF-M ausbildet. p100 galt ursprünglich als EBNA-2 (*Epstein-Barr Virus*) bindendes Protein (Tong *et al.*, 1995) und enthält ein EVES-Motiv, das sich im C-Terminus von c-Myb befindet. Das Protein kann gleichermaßen an die DNA-Bindungsdomäne von c-Myb binden, was einen gemeinsamen intra- und intermolekularen Regulationsmechanismus vermuten läßt (Dash *et al.*, 1996). p100 interagiert weiterhin mit dem Transkriptionsfaktor TFIIF, was eine Funktion als *Bridging Factor* zum basalen Transkriptionsapparat nahe legt (Tong *et al.*, 1995). Es wurden zudem mehrere Proteine (p27, p34, p45, p67, p75 und p160) *in vitro* aus Zellkernextrakten durch *Pull-Down-Assays* mit immobilisiertem c-Myb gefunden. Sie werden als mögliche Kofaktoren diskutiert (Favier and Gonda, 1994; Gonda *et al.*, 1996). Ob ihre Wechselwirkung mit c-Myb auch *in vivo* von Bedeutung sind, ist unklar.

1.5 Das *Phage-Display*-System

Das *Phage-Display*-System wurde 1985 als molekularbiologische Technik von Smith etabliert (Smith, 1985). Hierbei werden Peptide und kleine Proteine als heterologe Hüllproteine des filamentösen Bakteriophagen M13 exprimiert und anschließend auf dessen Kapsid verankert. Diese exponierten Proteine können im weiteren Verlauf des *Phage-Displays* zusammen mit immobilisierten Proteinen auf mögliche Interaktionen untersucht werden.

Für das Verständnis von Regulationsprozessen ist es unabdingbar, die daran beteiligten Proteine und ihre Wechselwirkungspartner zu identifizieren und den Wirkungsmechanismus aufzuklären. Hierzu bietet das *Phage-Display*-System eine Möglichkeit, da es einen Nachweis für Interaktion liefert und eine Kartierung der wechselwirkenden Regionen der Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht. Für die Suche neuer Interaktionspartner wird die Kopplung des Genotyps der Phagen mit ihrem Phänotyp, der durch die auf ihrer Oberfläche präsentierten Fusionsproteine bestimmt ist, genutzt. Man erhält mit den bindungsfähigen Phagen auch gleichzeitig die Sequenzinformation.

1.5.1 Biologische Grundlagen

Der Phage M13 gehört zu den, einen nicht lytischen Infektionszyklus durchlaufenden, temperenten Bakteriophagen. Die Infektion erfolgt durch Anheften des Phage an den F-Pilus eines *E.coli*-Bakteriums. Das zirkulare, einzelsträngige, 6047 bp große Genom kodiert zehn

verschiedene Proteine, von denen die Hüllproteine des Phagen, g3p, g6p, g7p, g8p und g9p eine wichtige Rolle bei Anwendungen in *Phage-Display*-Systemen spielen [Review: (Makowski, 1993)]. Der Kontakt wird über das Hüllprotein g3p hergestellt und anschließend das einzelsträngige Genom über den F-Pilus in das Bakterium eingeschleust. Dort wird es in die doppelsträngige replikative Form (dsRF) überführt, die als *Template* bei der anschließenden Transkription der Phagenproteine dient. Zur Bildung neuer Phagen ist es notwendig, daß die dsRF nach der Replikation, durch Phagenproteine vermittelte *Rolling-Circle*-Replikation, in das einzelsträngige Phagen-Genom überführt wird. Die Phagen-Hüllproteine werden mit Hilfe von *Leader*-Sequenzen in das Periplasma der *E.coli*-Zelle überführt. Das Phagen-Genom wird beim anschließenden, als *Assembly* bezeichneten, Vorgang des Zusammensetzens eines intakten Virions in den reifen Phagenpartikel verpackt und ohne Lyse des Bakteriums in das Medium freigesetzt. Dieser Infektionszyklus wiederholt sich, bis es aufgrund der Akkumulation von toxischen Phagenproteinen (g3p, g8p) zu einem Absterben des Bakteriums kommt.

1.5.2 Methodische Grundlagen

Das *Phage-Display* nutzt den nicht lytischen Lebenszyklus des Phagen M13, indem zu untersuchende Proteine als N-terminale Fusionsanteile der Phagen-Hüllproteine g3p, g6p beziehungsweise g8p exprimiert, und anschließend beim *Assembly* in das Phagen-Kapsid integriert werden. Die rekombinanten Proteine werden auf der Oberfläche der Phagen präsentiert und sind so für Affinitätsuntersuchungen mit potentiellen Interagenten zugänglich. Rekombinante Phagen-Hüllproteine lassen sich über den M13-Phagemid-Klonierungsvektor exprimieren. Phagemid-Vektoren sind hybride Vektoren, daß heißt ein Teil des M13 Genoms ist mit Plasmidfragmenten kombiniert. Zur Replikation der dsRF besitzt das Plasmid einen *E.coli*-Replikationsursprung (*Ori*, *Origin Of Replication*). Um die dsRF für das *Assembly* in die einzelsträngige Form umzuwandeln, befinden sich die erforderlichen Signalsequenzen ebenfalls auf den Vektoren. Die Gene der zu exprimierenden Proteine werden 5'-terminal zur Sequenz des g3p Proteins entsprechend des Leserasters kloniert.

Ein rekombinanter Phagemid-Vektor kodiert ein einziges Fusionsprotein. Bakterien, die mit solch einem Vektor transformiert werden, sind deshalb nicht in der Lage, Bakteriophagen zu produzieren. Erst die als *Phage Rescue* bezeichneten Infektion mit einem Helferphagen ermöglicht dieses. Die Helferphagen-DNA liefert die fehlende Information zur Expression der

notwendigen Replikationsenzyme, der restlichen Proteine der Phagenhülle sowie für das *Assembly*.

Um beim *Phage-Display* nur rekombinante Phagen mit der verpackten Phagemid-DNA zu produzieren, werden Helferphagen mit mutiertem *Ori* beim *Phage Rescue* eingesetzt. Die DNA des Helferphagen enthält alle notwendigen Informationen, wird aber nur ineffizient in die einzelsträngige Form überführt. Daher wird überwiegend die effektiver amplifizierte und kleinere Phagemid-DNA in die rekombinanten Phagen verpackt. Abbildung 7 stellt das Prinzip der Produktion rekombinanter Bakteriophagen dar.

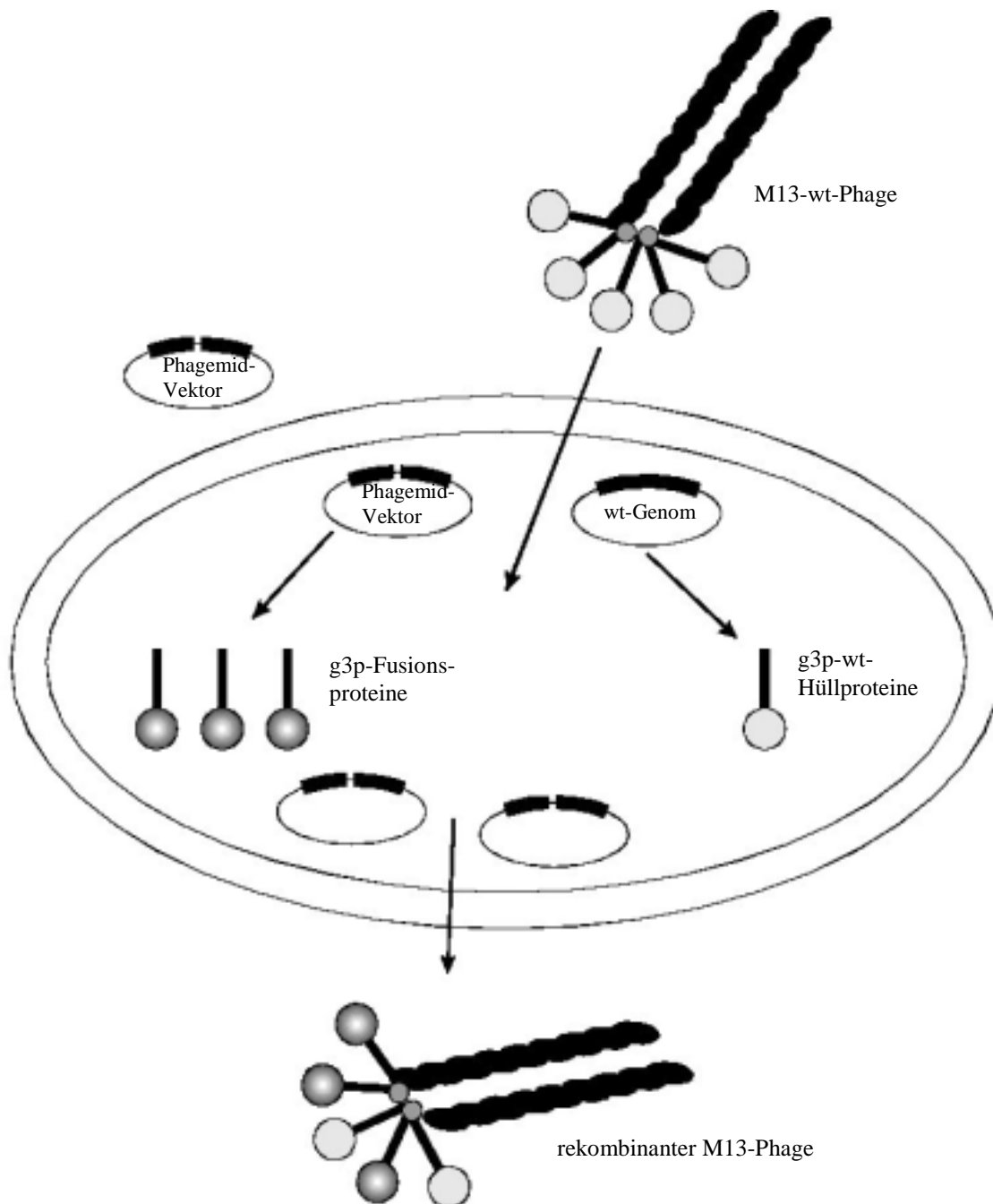


Abbildung 7: Produktion rekombinanter Bakteriophagen

Um die Stärke der Wechselwirkung der rekombinanten Phagen, welche die g3p-Fusionsproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren, mit immobilisierten Wechselwirkungspartnern zu untersuchen, wird ein *Panning* durchgeführt. Dabei werden die Phagen zusammen mit dem Protein inkubiert und unspezifisch bindende Phagen durch anschließende Waschschriffe entfernt. Man kann daher die Wechselwirkung der g3p-Fusionsproteine auf dem Kapsid der Phagen mit den immobilisierten Proteinen über die Anzahl der Bakteriophagen, die nach dem Waschen zurück bleibt, quantifizieren. Die verbleibenden Phagen können durch erneute Infektion von *E.coli* nachgewiesen werden. Die Anzahl, der nach der Infektion auf Selektionsmedium gewachsenen Bakterienklone stellt damit ein Maß für die Größe der Protein-Protein-Interaktion dar.

1.6 Das *Yeast-Two-Hybrid-System*

In den letzten Jahren wurden für den Transkriptionsfaktor c-Myb mehrere direkte und indirekte Wechselwirkungspartner isoliert, wodurch man Hinweise auf den Ablauf der Transkriptionsaktivierung und -inhibierung bei Myb-regulierten Genen erhalten hat (siehe 1.4). Um solche Kofaktoren zu ermitteln, stehen verschiedene *in vitro*-Methoden wie *Cross Linking*, Koimmunopräzipitation oder *Phage-Display* zur Verfügung, die jedoch nicht oder nur unzureichend die Bedingungen in natürlichen biologischen Systemen widerspiegeln.

Ein, den natürlichen Bedingungen in eukaryontischen Zellen nahekommendes, *in vivo*-System zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist das von Fields und Song (Fields and Song, 1989) entwickelte *Two-Hybrid-System*, das auch dem Matchmaker[®] *Yeast-Two-Hybrid-System* der Firma Clontech zugrunde liegt. Durch die Expression der Faktoren in Hefezellen wird die natürliche Proteinkonformation ermöglicht und somit die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der Detektion von transienten oder schwachen Interaktionen erhöht. Molekulare Grundlage des Systems ist die Tatsache, daß eine große Zahl eukaryontischer Transkriptionsfaktoren aus funktionell unabhängigen, separierbaren Domänen besteht, die unter Erhalt ihrer Funktionalität mit Hilfe rekombinanter Vektoren einzeln exprimiert werden können. Die Domänen sind jedoch nicht in der Lage, durch intermolekulare Interaktion ihre ursprüngliche funktionelle Einheit zu rekonstituieren (Brent, 1985). Essentiell erforderlich für die Funktion eines Transkriptionsfaktors ist eine DNA-Bindungsdomäne, die DNA spezifisch erkennt und bindet, sowie eine Transaktivierungsdomäne, welche die Transkription eines Gens durch RNA-Polymerase steuert. Nur die unmittelbare räumliche Nähe beider Domänen, wie sie in einem nativen Transkriptionsfaktor gegeben ist, ermöglicht die Bildung eines

transkriptionsaktiven Komplexes. Im *Two-Hybrid-System* werden beide Domänen als separate Fusionsproteine exprimiert und können nur durch Interaktion ihrer jeweiligen Fusionsanteile in eine räumliche Nähe gelangen, welche die Formierung eines Transkriptionskomplexes bewirkt.

Im Matchmaker[®] *Two-Hybrid-System* sind die DNA-BD und die TAD des Transkriptionsfaktors GAL4 Basis für zwei Vektoren, die der Klonierung der zu untersuchenden Sequenzen dienen. In mit diesen Vektoren transformierten Hefezellen, die eine deletionsbedingte Unterdrückung der GAL4-Expression aufweisen, werden zwei Hybridproteine exprimiert. Eines dieser Fusionsproteine enthält die GAL4-DNA-BD und ein Köderprotein, das andere die GAL4-TAD mit einem potentiellen Wechselwirkungspartner. Bei Interaktion der beiden Proteine kommt es zu einer räumlichen Annäherung der GAL4-Domänen (siehe Abbildung 8), so daß eine Rekonstitution der Funktionalität des Transkriptionsfaktors stattfindet. Die entsprechenden Gene (*lacZ*- und *HIS3*-Reporter Gene) werden transkribiert und führen zu phänotypisch detektierbarer Synthese von Histidin und β -Galaktosidase.

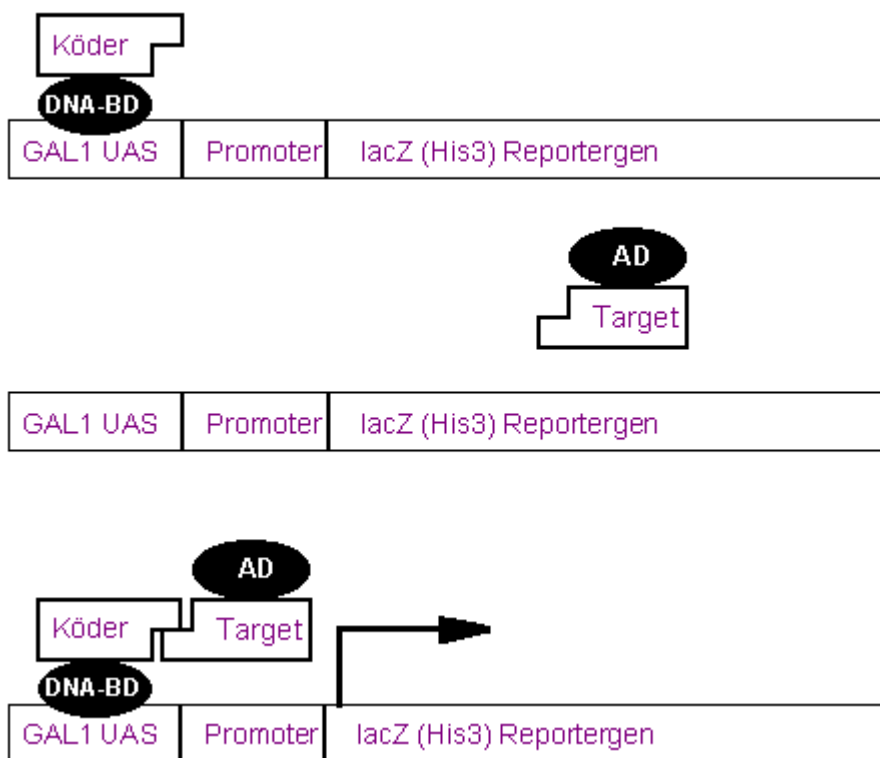


Abbildung 8: Prinzip des Matchmaker[®] GAL4-*Two-Hybrid-Systems* (Firma Clontech, Handbuch, 1997)

Das *Two-Hybrid-System* ist zur Charakterisierung von Wechselwirkungen bekannter Proteine und zur Detektion unbekannter Kofaktoren durch das *Screening* von cDNA-Bibliotheken geeignet.

1.7 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit verfolgt mehrere Ziele. Das *Phage-Display*-System soll soweit modifiziert werden, daß das *Screening* von cDNA-Bibliotheken möglich wird. Bis jetzt ist es aufgrund mangelhafter Transformationseffizienz nur möglich, kleinere DNA-Pools in den Phagemid-Vektor zu klonieren. Veränderungen in der Klonierungsstrategie und der Transformationsmethode sollen entwickelt und auf ihre Wirksamkeit untersucht werden.

Außerdem soll mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-System mit einem modifizierten Köder nach neuen Wechselwirkungspartner von c-Myb gesucht werden und der mit diesem System gefundene Faktor rcd1+ (Siegert, 1998) isoliert und charakterisiert werden. Hierzu ist vor allem die Bestimmung der zellulären Lokalisation des rcd1+-Proteins notwendig. Sie soll durch Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Die entsprechende Technik ist dafür zu etablieren.

2 Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien (Reinheitsgrad *pro analysis*) wurden von den Firmen Alpha, Amersham-Pharmacia-Biotech, AppliChem, Biozym, Clontech, Fluka, GIBCO BRL, ICN, Invitrogen, Merck, Qiagen, Riedel-de-Haën, Stratagene und Sigma bezogen.

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

Verbrauchsmaterialien von den Firmen Beckman, Boehringer, Clontech, Eppendorf, Falcon, Gilson, Greiner, Kodak, Millipore, Nunc, Pharmacia, Qiagen, Schleicher & Schüll und Whatman fanden Verwendung.

Die Sequenzierungen wurden von der Firma gtc und teilweise in Eigenarbeit nach der Methode von Sanger durchgeführt.

2.1 Puffer und Lösungen

2.1.1 Puffer und Lösungen für mikrobiologische Arbeiten

2.1.1.1 Puffer und Lösungen für Herstellung kompetenter *E.coli* (chemische Methode)

TFBI

30 mM K-Acetat

100 mM RbCl

50 mM CaCl₂

15 % (v/v) Glycerin

pH 5,8 einstellen, autoklavieren

TFBII

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15 % (v/v) Glycerin
pH 5,8 einstellen, autoklavieren

2.1.1.2 Puffer und Lösungen zur Herstellung kompetenter *E.coli* (Elektroporation)***Resuspensionspuffer***

10 % (v/v) Glycerin in ddH₂O
autoklavieren

2.1.2 Puffer und Lösungen für das *Two-Hybrid*-System**2.1.2.1 Puffer und Lösungen für die Hefetransformation*****TE-Puffer (10x)***

100 mM Tris/HCl, pH 7,5
10 mM EDTA
autoklavieren

Lithiumacetat (10x)

1 M Lithiumacetat
pH 7,5 einstellen, autoklavieren

PEG/LiAc-Lösung

40 % (w/v) Polyethylenglycol 6000
1 x TE
1 x Lithiumacetat

carrierDNA

10 mg/ml Heringssperma *carrierDNA*

bei 100°C für 20 Minuten erhitzen und auf Eis abschrecken

2.1.2.2 Puffer und Lösungen für β -Galaktosidase-Colony-Lift-Filter-Assay**Z-Puffer**

60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

10 mM KCl

1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

pH 7,0 einstellen, autoklavieren

X-Gal-Lösung

20 mg/ml X-Gal in DMF lösen

im Dunkeln lagern

Z-Puffer/X-Gal-Lösung

98 % (v/v) Z-Puffer

0,26 % (v/v) β -Mercaptoethanol

1,64 % (v/v) X-Gal-Lösung

2.1.2.3 Puffer und Lösungen für Plasmid-DNA-Präparationen aus Hefen**Lyticase/Sorbitol-Lösung**

1,2 M Sorbitol

0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4

5 U/ μ l Lyticase

2.1.3 Puffer und Lösungen für das *Phage-Display*-System

PBS-Puffer

136 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,5 mM Na₂HPO₄
pH 7,4 einstellen

SM-Puffer

100 mM NaCl
10 mM MgSO₄
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
0,01 % Gelatine
sterilfiltrieren 0,45 µm Porengröße

PEG/NaCl

20 % (w/v) Polyethylenglycol 6000
14,6 % (w/v) NaCl
autoklavieren

Blockpuffer

PBS
1 % BSA
0,1 % Triton X-100

Phage-Display Waschpuffer

PBS
0,1 % (v/v) Triton X-100

2.1.4 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

PBS : *Phosphat Buffered Saline, steril, für die Zellkultur (Gibco)*

0,2 g/l KCl
8,0 g/l NaCl
0,2 g/l KH₂PO₄
1,15 g/l Na₂HPO₄

Penicillin/Streptomycin-Lösung (Sigma)

100 U/ml Penicillin

10 mg/ml Streptomycin

in 0,9 % NaCl-Lösung

sterilfiltriert

Die Lösung wird in 5 ml Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Trypsin/EDTA-Lösung (10x) (Sigma)

5 g/l Trypsin

2 g/l EDTA

in 0,9 % NaCl.

sterilfiltriert

Die Lösung wird mit sterilem PBS 1:10 verdünnt, in sterilen 15 ml Falcon-Gefäßen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Angebrochene Aliquots werden bei 4°C gelagert.

L-Glutamin-Lösung (100x) (Gibco)

200 mM L-Glutamin

sterilfiltriert

Die Lösung wird in 5 ml Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.1.4.1 Puffer und Lösungen für das Reporteragen-Assay**2.1.4.1.1 β -Galaktosidase-Assay*****Extraktionspuffer***

25 mM Tris/H₃PO₄, pH 7,8

2 mM EDTA

10 % Glycerin

1 % Triton X-100

vor Gebrauch Zugabe von 100 μ l 1 M DTT-Lösung auf 10 ml Puffer.

Z-Puffer

60 mM	Na ₂ HPO ₄
40 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	KCl
1 mM	MgSO ₄

Lagerung bei Raumtemperatur, kurz vor der Messung werden 35 µl β-Mercaptoethanol pro 10 ml Puffer zugegeben.

ONPG-Lösung

4 mg/ml o-Nitrophenyl-D-pyranogalactosid (Sigma) in ddH₂O
Lösung wird zu 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Na₂CO₃-Lösung

1 M Na₂CO₃

2.1.4.1.2 Luziferase-Assay

ATP-Lösung

100 mM ATP
0,2 M Tris
aufbewahren bei -20°C

Luziferin-Stammlösung

25 mM Luziferin-Natriumsalz (Sigma) in ddH₂O
aliquotiert und bei -20°C gelagert, zum Gebrauch 1:100 mit Meßpuffer verdünnt

Meßpuffer

25 mM Glycylglycin
15 mM MgSO₄

vor Gebrauch ATP zusetzen (Endkonzentration 5 mM)

2.1.4.2 Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz

PFA 3 % in PBS (Fixierlösung)

12 g Paraformaldehyd (PFA)
40 ml 10 x PBS

Mit ddH₂O auf etwa 300 ml auffüllen und unter dem Abzug unter Rühren erhitzen, bis sich alles gelöst hat. Sollte sich nicht alles lösen, NaOH-Plätzchen zugeben, bis der Lösungsvorgang beendet ist. Während des Rührens 40 µl 1 M CaCl₂ und 40 µl 1 M MgCl₂ zugeben. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur den pH-Wert auf 7,4 einstellen und die Lösung auf 400 ml auffüllen und in Aliquots zu 12 ml bei -20°C lagern.

Permeabilisierungslösung

0,1 % (v/v) Triton X-100
in PBS

Neutralisationslösung

50 mM NH₄Cl
in PBS

Blockpuffer

5 % (v/v) hitze-inaktiviertes Ziegenserum
in PBS

Mowiol (Eindeckungsmittel)

6 g Glycerin
2,4 g Mowiol
6 ml ddH₂O
12 ml 0,2 mM Tris/HCl, pH 8,5

Glycerin in ein 50 ml Falcon-Röhrchen geben, mit dem Mowiol versetzen und durchmischen. Das Wasser dazugeben, mischen und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen. 12 ml Tris zugeben und 10 min bei 50°C rühren (oder länger, das Mowiol muß sich vollständig lösen). Anschließend 20 min bei 6500 g zentrifugieren und in Aliquots zu 1 ml bei -20°C lagern. Die Lösung ist etwa ein Jahr haltbar.

2.1.4.3 Puffer und Lösungen für die Frackelton-Extraktion

Frackelton-Ready-Mix

10 mM Tris/HCl, pH 7,07

50 mM NaCl

30 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

50 mM NaF

5 μM ZnCl_2

1 % (w/v) Triton X-100

ad 500 ml ddH₂O, bei 4°C lagern

Stammlösungen

- 100 μM Natriumorthovanadat in ddH₂O
- 5 U/ml α_2 -Macroglobulin in ddH₂O
- 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin in EtOH
- 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin in ddH₂O
- 0,15 mM Benzamidin in ddH₂O
- 2,8 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin in ddH₂O
- 0,5 mM PMSF in EtOH

bei -20°C lagern

Frackelton-Puffer

3 ml Frackelton-Ready-Mix

3 μl Natriumorthovanadat

3 μl α_2 -Macroglobulin

15 μl Pepstatin

3 μl Leupeptin

3 μl Benzamidin

6 μl Aprotinin

15 μl PMSF

Puffer erst kurz vor Benutzung ansetzen und auf Eis aufbewahren.

2.1.5 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

2.1.5.1 Puffer und Lösungen für Plasmid-DNA Präparationen aus *E.coli* (Qiagen)

Puffer P1

50 mM Tris/HCl pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase H

Lagerung bei 4°C

Puffer P2

200 mM NaOH

1 % (w/v) SDS

Puffer P3

3 M Kalium-Acetat, pH 5,5

Puffer N3

4,09 M Guanidiniumhydrochlorid

0,759 M Kalium-Acetat, pH 4,2

Puffer PE

70 % (v/v) EtOH

100 mM NaCl

10 mM Tris/HCl, pH 7,0

1 mM EDTA, pH 7,5

Puffer EB "Elution-Buffer" (Elutionspuffer für Minipräparation)

10 mM Tris/HCl, pH 8,5

Puffer QBT

750 mM	NaCl
50 mM	MOPS, pH 7,0
15 % (v/v)	Isopropanol
0,15 % (w/v)	Triton X-100

Puffer QC

1 M	NaCl
50 mM	MOPS, pH 7,0
15 % (v/v)	Isopropanol

Puffer QF

1,25 M	NaCl
50 mM	Tris/HCl, pH 8,5
15 % (v/v)	Isopropanol

2.1.5.2 Puffer und Lösungen für die Präparation genomischer DNA**DNAzol®**

Guanidiniumthiocyanat-haltige Lösung

TE-Puffer

10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
0,1 M	EDTA

2.1.5.3 Puffer für Restriktionsenzyme

Die Firmen MBI-Fermentas und New England Biolabs haben für die von ihren Firmen vertriebenen Restriktionsenzyme ein aus vier beziehungsweise fünf Puffern bestehendes System entwickelt, das mit fast alle Enzyme verwendet werden kann. Für einige wenige Enzyme sind jedoch Spezialpuffer erforderlich. Die Enzyme wurden jeweils im empfohlenen Puffer verwendet.

2.1.5.3.1 Puffer von MBI-Fermentas

Puffer B+ (*blue*)

10 mM Tris/HCl, pH 7,5 bei 37°C
10 mM MgCl₂
0,1 mg/ml BSA

Puffer G+ (*green*)

10 mM Tris/HCl, pH 7,5 bei 37°C
10 mM MgCl₂
50 mM NaCl
0,1 mg/ml BSA

Puffer O+ (*orange*)

50 mM Tris/HCl, pH 7,5 bei 37°C
10 mM MgCl₂
100 mM NaCl
0,1 mg/ml BSA

Puffer R+ (*red*)

100 mM Tris/HCl, pH 8,5 bei 37°C
10 mM MgCl₂
100 mM KCl
0,1 mg/ml BSA

Puffer Y+/Tango (*yellow*)

33 mM Tris/Acetat, pH 7,9 bei 37°C
10 mM MgAc₂
66 mM KAc
0,1 mg/ml BSA

***EcoRI / NotI* Puffer**

50 mM	Tris/HCl, pH 7,5 bei 37°C
10 mM	MgCl ₂
100 mM	NaCl
0,02 %	Triton X-100
0,1 mg/ml	BSA

***BamHI* Puffer**

10 mM	Tris/HCl, pH 8,0 bei 37°C
5 mM	MgCl ₂
100 mM	KCl
0,02 %	Triton X-100
0,1 mg/ml	BSA

2.1.5.3.2 Puffer von New England Biolabs

NEBuffer 1 (*yellow*)

10 mM	Bis-(Tris)-Propan/HCl, pH 7,0 bei 25°C
10 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT

NEBuffer 2 (*blue*)

10 mM	Tris/HCl, pH 7,9 bei 25°C
50 mM	NaCl
10 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT

NEBuffer 3 (*red*)

50 mM	Tris/HCl, pH 7,9 bei 25°C
100 mM	NaCl
10 mM	MgCl ₂
1 mM	DTT

NEBuffer 4 (green)

20 mM	Tris/Acetat, pH 7,9 bei 25°C
50 mM	KAc
10 mM	MgAc ₂
1 mM	DTT

2.1.5.4 Puffer für Ligation, Dephosphorylierung, Auffüllreaktion und PCR**T4 DNA Ligase-Puffer (10x) (MBI-Fermentas)**

400 mM	Tris/HCl, pH 7,8
100 mM	MgCl ₂
100 mM	DTT
5 mM	ATP

CIAP-Puffer (10x) (MBI-Fermentas)

0,1 M	Tris/HCl, pH 7,5 bei 25°C
0,1 M	MgCl ₂

Klenow-Puffer (10x) (MBI-Fermentas)

500 mM	Tris/HCl, pH 8,0 bei 25°C
50 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT

Taq DNA-Polymerase-Puffer (10x) (MBI-Fermentas)

100 mM	Tris/HCl, pH 8,3
500 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂
0,8 %	Nonidet P40

2.1.5.5 Puffer und Lösungen die Sequenzierreaktion

Annealing-Puffer für Sequenzierreaktion

1 M	Tris/HCl, pH 7,6
100 mM	MgCl ₂
160 mM	DTT

Labelling-Mix

1,374 µM	dATP
1,374 µM	dCTP
1,374 µM	dGTP
1,374 µM	dTTP
334 mM	NaCl

Read-Short-Gemische

A-, T- und G-Mix

1,87 µl	dATP (dTTP bzw. dGTP), 5 mM
je 16,8 µl	dTTP, dGTP und dCTP, 5 mM
bzw.	dATP, dGTP und dCTP, 5 mM
bzw.	dATP, dTTP und dCTP, 5 mM
2,8 µl	ddATP (ddTTP bzw. ddGTP) 0,5 mM
2 µl	Tris/HCl, 2 M, pH 7,6
1 µl	NaCl, 5 M
41,9 µl	ddH ₂ O

C-Mix

1,87 µl	dCTP, 5 mM
16,8 µl	dATP, dTTP und dGTP, 5 mM
3,4 µl	ddCTP, 5 mM
2 µl	Tris/HCl, 2 M, pH 7,6
1 µl	NaCl, 5 M
41,3 µl	ddH ₂ O

T7 DNA-Polymerase-Verdünnungspuffer

20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
5 mM	DTT
100 µg/ml	BSA
5 % (v/v)	Glycerin

2.1.5.6 Puffer für das *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)**TTE 20x**

1,8 M	Tris-Base
0,575 mM	Taurin
2,7 mM	EDTA

„Anderter“-Shift-Puffer

10 mM	Tris/HCl, pH 7,9
50 mM	NaCl
1 mM	β-MESH
0,05 % (w/v)	Magermilchpulver
5 % (v/v)	Glycerin

„Hamburger“-Shift-Puffer

10mM	Tris/HCl, pH 7,9
50 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	DTT
0,05 % (w/v)	Magermilchpulver
5 % (v/v)	Glycerin

2.1.5.7 Puffer und Lösungen für die Proteinaufreinigung

KP_i

Stammlösungen:

1 M K₃PO₄

1 M K₂HPO₄

Stammlösungen so mischen, daß sich der gewünschte pH-Wert einstellt.

PDL-Puffer

30mM KP_i, pH 7,5

100mM DTT

0,01 % (v/v) Lubrol

2.1.5.8 Puffer und Lösungen für den DNA-Zellulose-Bindungs-Assay

Puffer Z1

50 mM Tris/HCl, pH 7,9

1 mM DTT

20 % (v/v) Glycerin

0,1 % (v/v) NP 40

Puffer Z2

50 mM Tris/HCl, pH 7,9

1 mM DTT

20 % (v/v) Glycerin

0,1 % (v/v) NP 40

2 M KCl

2.1.6 Puffer und Lösungen für Gelelektrophoresen

2.1.6.1 Agarosegele

TPE-Puffer (10x)

0,9 M Tris-Base

20 mM EDTA

pH 8,0 einstellen

Auftragspuffer für Agarosegele (MBI) 6x

50 mM EDTA

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol FF

30 % (v/v) Glycerin

Längenmarker für Agarosegele

- *1 kb DNA-Leiter, MBI-Fermentas*

Der Marker enthält 14 definierte Fragmente mit einer Länge von 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 und 250 Basenpaaren.

- *λ DNA/HindIII-Marker, MBI-Fermentas*

Der Marker enthält 7 definierte Fragmente mit einer Länge von 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 und 564 Basenpaaren.

2.1.6.2 Polyacrylamidgele

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

30 %ige Lösung von Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 zu 1

TTE-Puffer (20x)

1,8 M Tris-Base

0,575 M Taurin

8,25 M EDTA

pH 9,0 einstellen

Azorubinauftragspuffer (AAP) für Acrylamidgele (2x)

50 % (v/v) Glycerin
0,1 % (w/v) Azorubinfarbstoff
in 1x TPE-Puffer

Längenmarker für Acrylamidgele

- **100 bp DNA-Leiter, MBI-Fermentas**

Der Marker enthält 11 definierte Fragmente mit einer Länge von 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 und 80 Basenpaaren.

- **pTR54/HinfI-Marker**

Der Marker enthält 13 definierte Fragmente mit einer Länge von 1061, 796, 719, 517, 396, 338, 298, 255, 221, 191, 154, 105 und 75 Basenpaaren.

2.1.6.3 SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli***Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung***

30 %ige Lösung von Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 zu 1

Laufpuffer (10x)

250 mM Tris/HCl, pH 8,3
1,9 M Glycin
1 % SDS

Coomassie-Färbelösung

0,2 % (w/v) Coomassie Blue R 250
0,05 % (w/v) Coomassie Blue G 250
42,6 % EtOH
5 % MeOH
10 % Essigsäure

Entfärbelösung

7 % (w/v) Essigsäure

Laemmliauftragspuffer (LAP) (3x)

0,2 M Tris-Base
33 % Glycerin
3 % SDS
auffüllen auf 60 ml; pH 6,8 einstellen,
3,2 % β -Mercaptoethanol
1,6e⁻³ % (w/v) Bromphenolblau
 Σ 62 ml

Protein-Größenstandard (10 kDa Protein Ladder, Gibco BRL)

Der Marker enthält zwölf definierte Fragmente der Größe 200, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 und 10 kDa.

2.2 Medien**2.2.1 Medien zur Kultivierung von *Escherichia coli******Luria Bertani-Kulturmedium (LB) für *E.coli****

1 % (w/v) Pepton
1 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
pH 7,0 einstellen, autoklavieren

LB^{Amp}-Platten für *E.coli*

1 % (w/v) Pepton
1 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
2 % (w/v) Agar
pH 7,0 einstellen, autoklavieren, auf 50°C abkühlen und
75 mg/l Ampicillin dazugeben

LBG-Medium für *E.coli*

LB-Medium mit 2 % Glukose

M9-Festplatten

42 mM Na_2HPO_4

22 mM KH_2PO_4

8,5 mM NaCl

18 mM NH_4Cl

2 % (w/v) Agar

pH 7,4 einstellen, autoklavieren, auf 50°C abkühlen und

0,1 mM CaCl_2

2 mM MgSO_4 , autoklaviert

0,2 % (v/v) Glukoselösung, autoklaviert

50 mg/l Ampicillin

1 mM Thiamin-HCl, sterilfiltriert

2 % (v/v) 10x *DO-Solution* mit benötigter AS-Zusammensetzung (autoklaviert)

dazugeben. Für HB101 Zellen zusätzlich eine Lösung von

40 mg/l Prolin (sterilfiltriert) hinzufügen.

2.2.2 Medien zur Aufzucht von *Saccharomyces cerevisiae****YPD-Medium und YPD-Festplatten***

2 % (w/v) Pepton

1 % (w/v) Hefeextrakt

2 % (w/v) Agar (nur für Festplatten)

pH 5,8 einstellen, autoklavieren, auf 50°C abkühlen und

2 % (v/v) autoklavierte Glukoselösung dazugeben

SD-Medium und SD-Festplatten

0,67 % (w/v) *Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids*

2 % (w/v) Agar (nur für Festplatten)

2 % (v/v) 10x *Dropout solution* mit den jeweils benötigten Aminosäuren

pH 5,8 einstellen, autoklavieren, auf 50°C abkühlen und

2 % (v/v) autoklavierte Glukoselösung dazugeben

Dropout solution (DO) (10 x)

0,62 % (w/v) SD/-Trp/-Leu/-His,

0,64 % (w/v) SD/-Trp/-Leu,

0,69 % (w/v) SD/-Leu oder

0,74 % (w/v) SD/-Trp

2.2.3 Medien für die Zellkultur

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (High Glucose) (Gibco)
(Dulbecco and Freeman, 1959)

4500 mg/l D-Glucose

Natriumpyruvat

ohne L-Glutamin,

gelagert bei 4°C

FCS : *Fetal Calf Serum*, fötales Kalberserum (Gibco)

Vor der Verwendung wird das FCS durch Erhitzen auf 54°C für 30 Minuten dekomplementiert. Es wird gelagert in 50 ml Portionen bei -20 °C.

2.3 Mikrobiologisches Material**2.3.1 Verwendete Bakterienstämme**

Bei den im Folgenden beschriebenen *Escherichia coli*-Stämmen handelt es sich um K12-Sicherheitsstämme, welche für Arbeiten mit Plasmid-DNA eingesetzt wurden.

TG1

Genotyp: K12, $\Delta(lac-pro)$, *supE*, *thi*, *hsd* Δ 5/F', *tra* Δ 36, *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15.

Escherichia coli TG1 wurde für diverse Arbeiten mit Plasmid-DNA eingesetzt. Hauptsächlich fand er Verwendung im *Phage-Display* zur Amplifikation von Phagen.

HB101

Genotyp: F⁻, *thi-1*, *hsdS20* (*r_B⁻*, *m_B⁻*), *recA13*, *ara-14*, *leuB6*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20* (*str^r*), *xyl-5*, *mtl-1*, *supE44*, λ^- .

Escherichia coli HB101 wurde zur Amplifikation von aus Hefezellen präparierten Plasmiden eingesetzt.

LK111(λ)

Genotyp: *r_K⁻m_K⁻*, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *tonA21*, *supE44*, *lacI^qZ Δ M15*, Hfr, λ^+ .

Escherichia coli LK111(λ) wurde zur Plasmidamplifikation und bei Expressionsversuchen verwendet.

DH5(α)

Genotyp: ϕ 80d, *lacZ Δ M15*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (*r_K⁻m_K⁺*), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*), U169, F⁻.

Escherichia coli DH5(α) fand Anwendung bei der Amplifikation der cDNA-Bibliothek und bei Versuchen zur Elektroporation.

Top10F'

Genotyp: F' {*lacI^qTn10*(Tet^R)}, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ Δ M15*, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*

Escherichia coli Top10F' wurde zur Vermehrung des Plasmids pcDNA1.1/Amp und aller daraus abgeleiteten Plasmide verwendet. Es handelt sich um einen rekombinationsdefizienten Stamm für die stabile Replikation von *High Copy Number*-Plasmiden. Der Stamm ist *recA1* für eine erhöhte Stabilität des Inserts, *endA* für eine bessere Plasmid-Qualität bei Minipräparation und *hsdRMS* für geringe Spaltungsaktivität endogener Nukleasen. *Blue/White-Screening* wird durch den *lacZ Δ M15* Genotyp ermöglicht. Der Stamm enthält eine Tetracyclin-Resistenz auf dem F-Episom und benötigt Tetracyclin in einer Konzentration von 15 μ g/ml im Medium.

2.3.2 Verwendeter Hefestamm

Das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus einem haploiden Satz von 16 Chromosomen mit einer Gesamtlänge von 14000 kb und einem kernständigen 2 μ m-Ring-

Plasmid mit eigenem Replikationsursprung. In der Wildtyp-Hefezelle werden die für die β -Galaktosidase-Expression verantwortlichen Gene von den beiden Proteinen GAL4 und GAL80 reguliert. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die Kohlenstoffquelle des verwendeten Mediums. Wenn es Galaktose enthält, bindet GAL4 am Promotor des β -Galaktosidase-Gens und aktiviert die Transkription. In Abwesenheit von Galaktose bindet GAL80 und blockiert den Promotor. Bei den Stämmen des Matchmaker[®] *Two-Hybrid*-Systems wurden die Gene für GAL4 und GAL80 deletiert. Die Regulation der Expression der verwendeten Reportergene *lacZ* und *HIS3* erfolgt daher über eine intakte *GAL1-Upstream Activating Site* (UAS) mit vier GAL4-Bindungssequenzen oder ein UAS-Konstrukt aus drei Kopien einer 17 bp-langen, palindromen Sequenz (UAS_{G 17mer(3x)}).

Die native *HIS3*-Promotor-Region besteht aus einer UAS, die durch den Transkriptionsfaktor GCN4 erkannt wird und zwei TATA-Boxen (TR und TC). TR steht unter der Kontrolle von GCN4, während TC weder von GCN4 noch GAL1 oder UAS-Konstrukten reguliert werden kann.

Y190-Stamm

Genotyp: *MATa, ura3-52, his3-200, ade 2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , cyh2.*

Saccharomyces cerevisiae Y190 (Firma Clontech), ein Abkömmling des Hefestammes Y153 (Durfee, 1993), ist auxotroph für Tryptophan und Leucin. Das *lacZ*-Reportergen steht unter der Kontrolle eines intakten GAL1-Promotors. Das *HIS3*-Reportergen wird von der GAL1-UAS und einem Minimalpromotor kontrolliert, der beide *HIS3*-TATA-Boxen enthält. Hieraus resultiert eine hohe Expressionsrate bei positiven *Two-Hybrid*-Interaktionen, so daß auch schwache Signale detektiert werden können. Allerdings ist signifikante unkontrollierte Expression auf Grund der unregulierten TC-TATA-Box möglich, daß heißt der Y190-Stamm läßt in Bezug auf *HIS3* zu einem geringen Maß Expression zu. Dieses Verhalten kann durch Zugabe von 3-AT zum Medium minimiert werden, ohne die Empfindlichkeit merkbar zu verschlechtern.

2.3.3 Verwendete Zelllinien

HEK-293: *Human embryonic kidney (kidney transformed)* - humane, embryonale Nierenzelllinie

HEK-293, oder auch nur 293-Zellen, sind mit einem Adenovirus Typ 5 (Ad 5) infiziert und exprimieren stabil das virale E1A-Protein, das in die regulatorischen Prozesse der Wirtszelle eingreift und deren Zellzyklus verändert. Diese Zelllinie fand zu Beginn der Arbeit Verwendung, wurde dann aber durch die robusteren Linien CV-1 und später COS 7 abgelöst. Zur Verfügung gestellt wurde sie von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Martin (Institut für Molekularpharmakologie).

CV-1: *African Green Monkey* Nierenzelllinie - Vorläufer der *COS* Zelllinien

Die Zelllinie wurde von M. Oelgeschläger (Oelgeschläger *et al.*, 1996a) bei der Untersuchung der c-Myb-Wechselwirkungen am *mim-1* Promotor verwendet. Sie wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernhard Lüscher (Institut für Molekularbiologie) zur Verfügung gestellt.

Cos-7:

Cos-7-Zellen sind von der zuvor genannten Affennierenzelllinie CV-1 abgeleitet, die durch Transformation mit einer *Origin*-defekten Mutante des Affenvirus SV40 entstanden ist (Ibelgaufits, 1990). *Cos-7*-Zellen enthalten ein in das zelluläre Chromosom integriertes SV40-Genom, welches die Synthese des großen T-Antigens steuert. Dieses Protein reguliert durch Bindung an spezifische Bindungsstellen der viralen DNA sowohl die virale Genexpression als auch die Replikation der SV40-DNA. *Cos-7*-Zellen setzen jedoch kein Virus mehr frei, da eine Deletion im Bindebereich des T-Antigens die Expression der hierfür benötigten viralen Gene verhindert. In *Cos-7*-Zellen verwendete Vektoren setzen sich aus Anteilen bakterieller Plasmide, einem geeigneten Promotorbereich und dem *Ori* des SV40 Genoms zusammen. Durch das von den *Cos-7*-Zellen bereitgestellte T-Antigen können solche Plasmide extrachromosomal gehalten und vermehrt werden.

2.4 Verwendete Vektoren

2.4.1 Vektoren für *Escherichia coli*

pGEX-Vektoren

Die pGEX-Vektoren wurden von der Firma Pharmacia bezogen und dienen als Expressionsvektoren 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 einen pBR322 *Ori* für die Replikation in *E.coli*, ein Ampicillinresistenzgen für die Selektion und produziert gleichzeitig den *lac*-Repressor. Die Vektoren unterscheiden sich in der *Multiple Cloning Site* (MCS) und in der zu verwendenden Protease. In dieser Arbeit finden die Vektoren pGEX-2T und pGEX-4T3 mit der schon erwähnten Thrombinschnittstelle beziehungsweise pGEX-5X1 Verwendung.

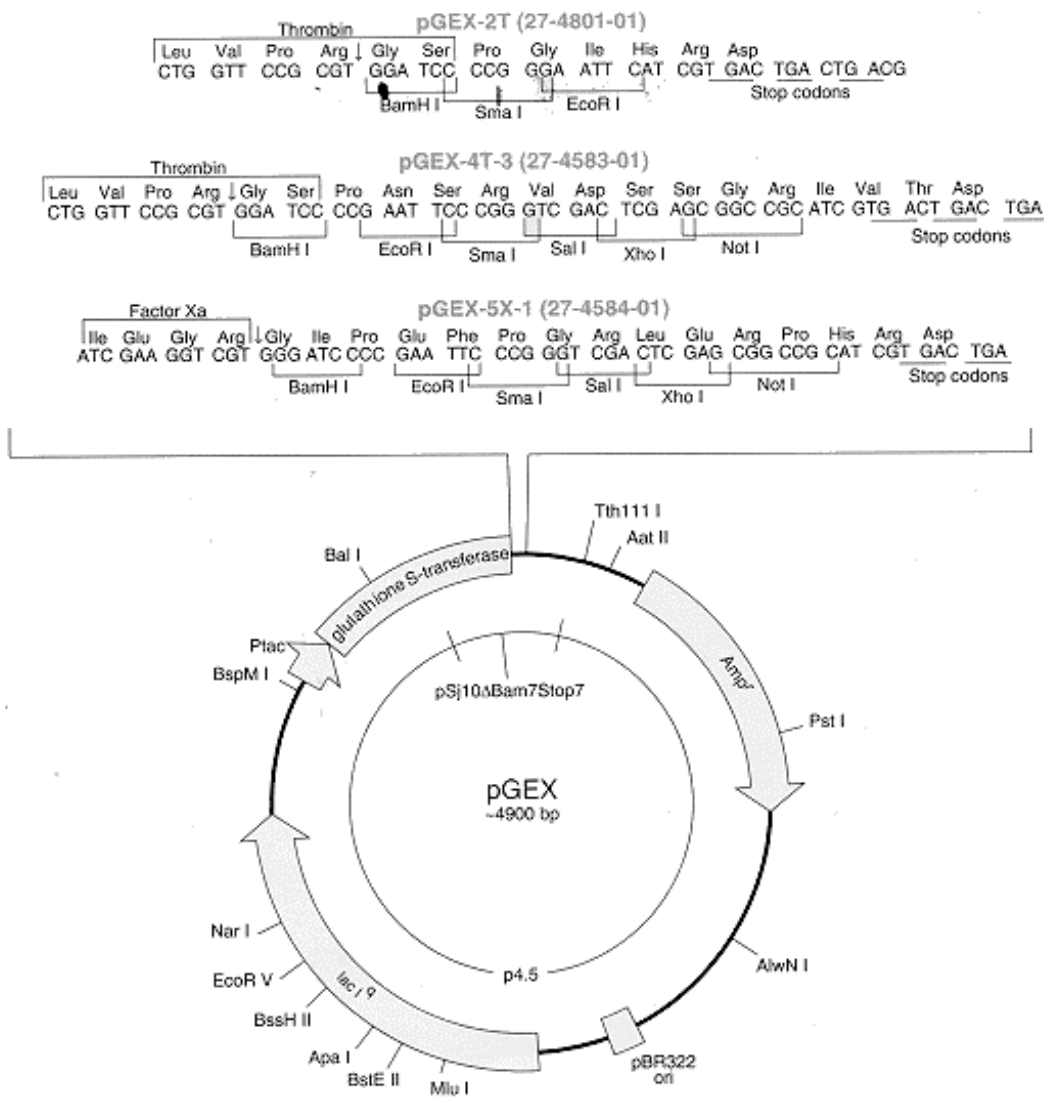


Abbildung 9: Plasmidkarte und MCS der pGEX-Vektoren

pQE-Vektoren

Die Vektoren werden von der Firma Qiagen vertrieben und enthalten das Ampicillinresistenzgen, den ColE1-*Ori*, einen T5-Promotor, eine 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 Ni²⁺-NTA-Agarose. Die einzelnen Plasmide unterscheiden sich durch ihre MCS. Es wurde pQE30 verwendet.

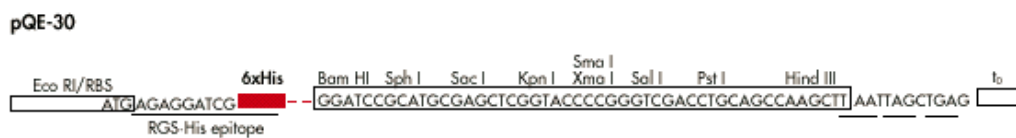
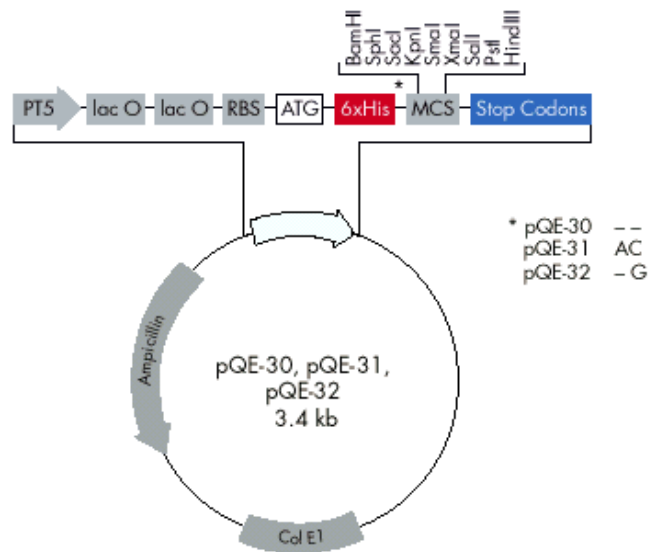


Abbildung 10: Plasmidkarte und MCS des pQE30-Vektors

pCANTAB5E

Der im *Phage-Display*-System als Ausgangspunkt verwendete Vektor ist ein modifiziertes pCANTAB5E-Konstrukt (Kiewitz, 1997a). Er wurde durch Einklonieren eines *Polylinkers* (siehe Anhang) über die *Sfi*I und die *Not*I-Schnittstelle generiert.

Die zu untersuchenden DNA-Fragmente werden zwischen die *pelB*-*Leader*-Sequenz und das M13-g3p-Gen des Vektors kloniert. Die *pelB*-*Leader*-Sequenz codiert das Signal für den Export des Fusionsproteins ins Periplasma der Bakterien. Beim sogenannten *Assembly* wird

das g3p-Fusionsprotein an der Spitze der rekombinanten Phagen verankert. Die Mehrzahl der prozessierten Phagen tragen auf ihrer Oberfläche eine Kopie des Fusionshüllproteins und vier Kopien des nativen g3p-Proteins. Das Pili-Protein ist voll funktionsfähig und ermöglicht den Phagen weiterhin die Infektion von *E.coli*-Bakterien (Makowski, 1993). Der pCANTAB5E Vektor enthält einen induzierbaren *lac*-Promotor. Dieser wird durch den *lacI^q* kodierte *lac*-Repressor reguliert und kontrolliert die Expression des Fusionsproteins. Um bei der Bakterienanzucht die Akkumulation von letalen Mengen des g3p-Fusionsproteins zu verhindern, wird das *lac*-Operon durch Zugabe von 2 % Glukose zum Nährmedium stringent reguliert. Die Infektion mit Helferphagen findet in glukosefreiem LB-Medium statt, wodurch die Bildung der für das *Assembly* benötigten Fusionsproteine induziert wird. Der Phagemid-Vektor trägt als Selektionsmarker die Resistenz gegen Ampicillin. Der verwendete Helferphage M13K07 überträgt eine Kanamycinresistenz. Bakterien, die sowohl mit dem Phagemid-Vektor transformiert als auch mit dem Helferphagen infiziert wurden, können mit LB^{Amp/Kan} selektiert werden.

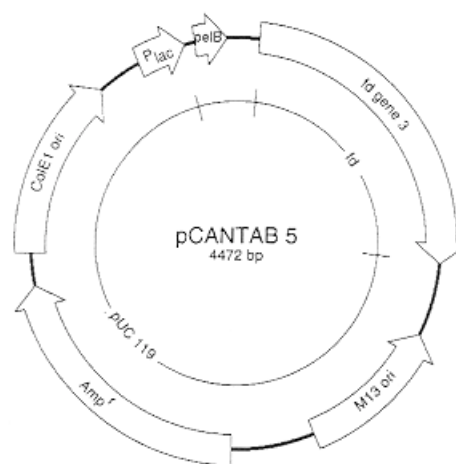


Abbildung 11: Plasmidkarte des Phagemid-Vektors pCANTAB5E

2.4.2 Vektoren für *Saccharomyces cerevisiae*

Die Plasmide des Matchmaker[®] *Two-Hybrid*-System sind *Shuttle*-Vektoren, daß heißt sie können in *S.cerevisiae* und *E.coli* repliziert werden, da sie den ColE1-Replikationsursprung aus *E.coli* und den Replikationsursprung der Hefe *S.cerevisiae* aus dem 2 μ -Ring tragen. Das β -Lactamase-Gen (*bla*) sorgt für Ampicillinresistenz in *E.coli*-Zellen. Als Selektionsmarker für auxotrophe *S.cerevisiae*-Stämme dienen das *TRP1*-Gen beziehungsweise das *LEU2*-Gen.

Die Expression der Fusionsproteine steht unter der Kontrolle des Promotors der Alkoholdehydrogenase 1 (*ADH1*).

pAS2-1

Der pAS2-1-Vektor wird zur Erzeugung eines Fusionsproteins eingesetzt, das aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und einem zu untersuchenden Protein, dessen kodierende Sequenz in die MCS des Vektors kloniert wurde, besteht. Das Hybridprotein wird in Hefezellen unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors exprimiert und durch eine *Nuclear Localization Sequence* (NLS) zum Hefenuklear transloziert. Als Selektionsmarker in tryptophanauxotrophen Hefezellen dient das *TRP1*-Gen.

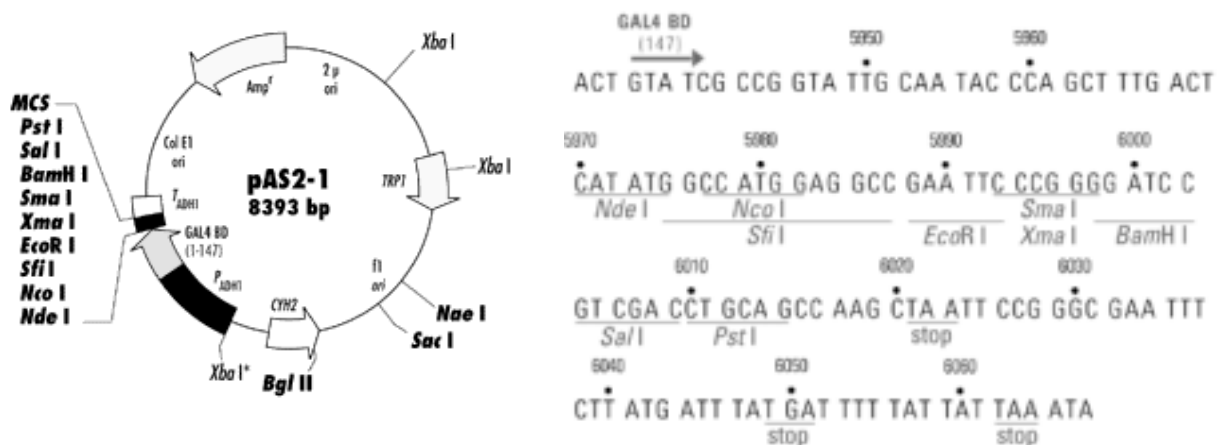


Abbildung 12: Plasmidkarte und MCS des pAS2-1-Vektors

pAS2-1 ist ein Derivat des pAS2 Vektors (Harper, 1993) und wurde durch Deletion des HA Epitops und Austausch der Aminosäure 149 (Glutamin gegen Valin) erzeugt. Diese Veränderungen des Plasmids eliminieren komplett die autonome Aktivierungsaktivität von pAS2.

pGAD10

Der pGAD10-Vektor dient der Erzeugung eines Fusionsproteins bestehend aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und Proteinen beliebig kodierender Sequenzen einer cDNA-Bibliothek. Das Hybridprotein wird in Hefezellen unter der Kontrolle eines verkürzten *ADH1*-Promotors auf niedrigem Niveau exprimiert und durch die SV40-T-Antigen-NLS zum Nukleus geleitet. Als Selektionsmarker in leucinauxotrophen Hefezellen trägt das Plasmid das *LEU2*-Gen.

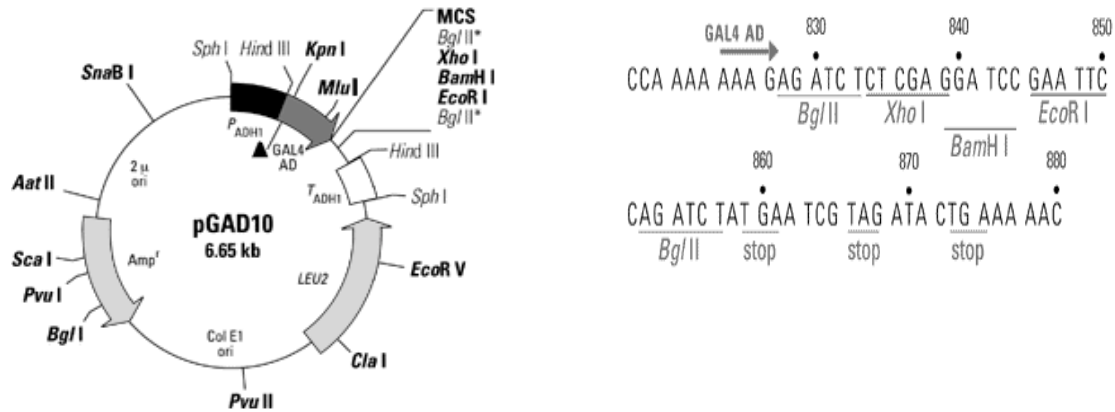


Abbildung 13: Plasmidkarte und MCS des pGAD10-Vektors

pACT2

Der pACT2-Vektor erzeugt ein Fusionsprotein bestehend aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und dem zu untersuchenden Protein. Als Selektionsmarker trägt dieses Plasmid ebenfalls das *LEU2*-Gen.

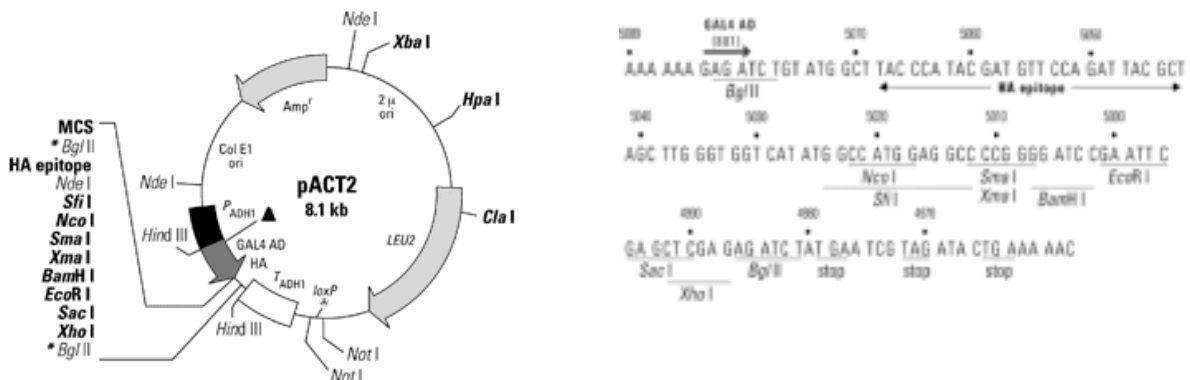


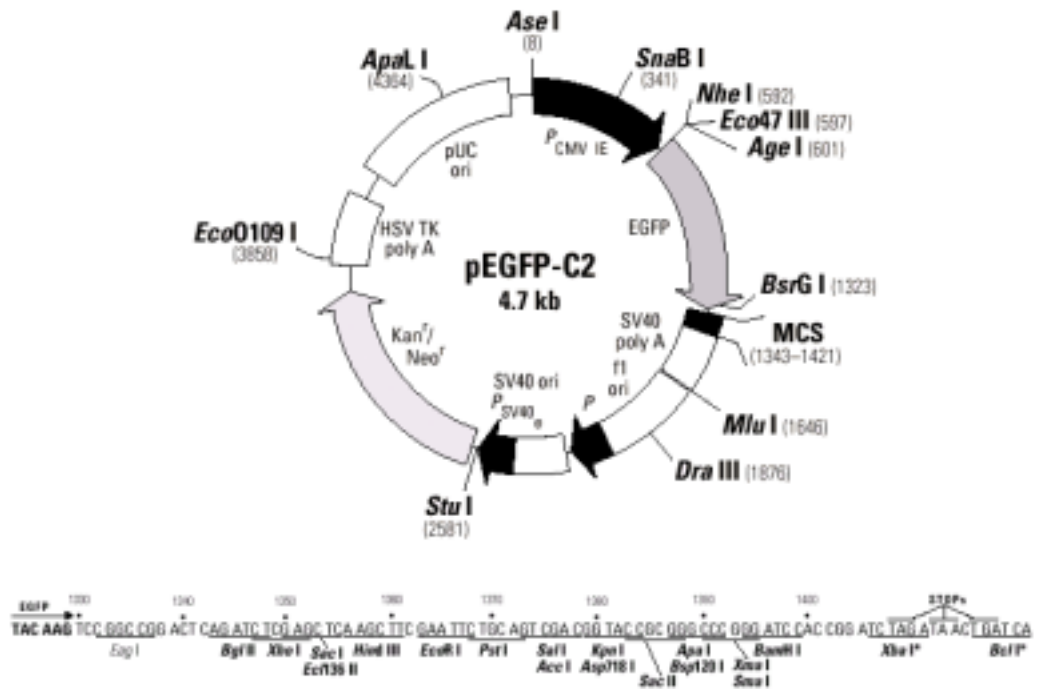
Abbildung 14: Plasmidkarte und MCS des pACT2-Vektors

2.4.3 Vektoren für die Zellkultur

pEGFP-C2, -C3

Der von der Firma Clontech bezogene 4,7 kb große pEGFP-Vektor ist in drei verschiedenen Leserastern erhältlich und dient der Expression von *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP)-Fusionsproteinen. Der Vektor kodiert eine optimierte Variante des Wildtyp-GFP, die sich durch ein höhere Expressionsrate und stärkere Fluoreszenz in eukaryontischen Zelllinien

auszeichnet (Clontech, 1998). Die kodierende Sequenz des EGFP-Gens wird durch den Cytomegalovirus-Promotor (CMV) kontrolliert und wurde der menschlichen *Codon Usage* angepaßt. Die MCS befindet sich zwischen dem C-Terminus von EGFP und dem SV40-Polyadenylierungssignal. In die MCS klonierte Gene werden als C-terminaler Fusionsanteil exprimiert. Durch SV40-Polyadenylierungssignale des *EGFP*-Gens wird die Prozessierung des 3'-Endes der EGFP-mRNA kontrolliert. Ein SV40-Promotor, ein Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen (*TN5*) und Polyadenylierungssignale des *Herpes Simplex-Virus*-Thymidinkinase-Gens (*HSV-TK*) bilden einen *Gencluster*, durch den die Selektion transfizierter eukaryontischer Zellen auf neomycinhaltigem Medium möglich ist. Durch einen, vor dieser Sequenz (*upstream*) gelegenen, bakteriellen Promotor wird das Kanamycin-Resistenzgen in *E.coli*-Zellen transkribiert. Ein pUC-Replikationsursprung sorgt für Propagation in *E.coli*. Ein *f*₁-Ursprung ermöglicht die Produktion einzelsträngiger DNA in Bakterienzellen, welche F-Plasmide enthalten.



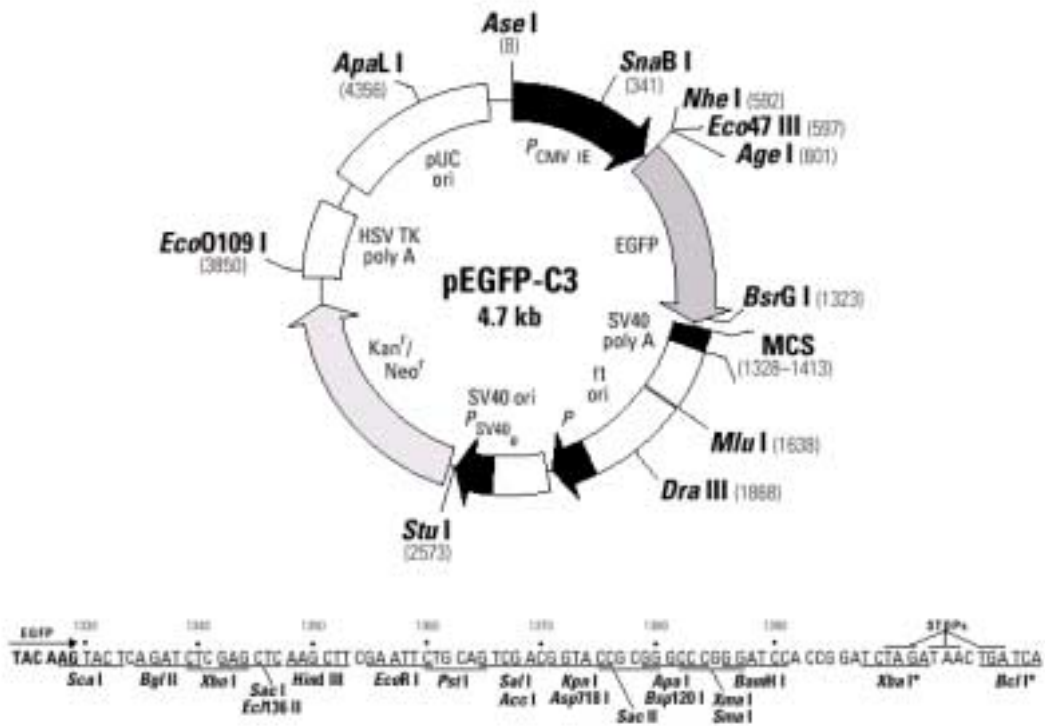


Abbildung 15: Plasmidkarte und MCS der pEGFP-Vektoren

pMim-1Luc

pMim-1Luc ist ein Reportergenkonstrukt. Es besitzt die *mim-1* Promotorregion, gefolgt von dem *Firefly*-Luziferasegen. Das Plasmid besitzt für die Replikation in *E.coli* ein Ampicillin-resistenzgen.

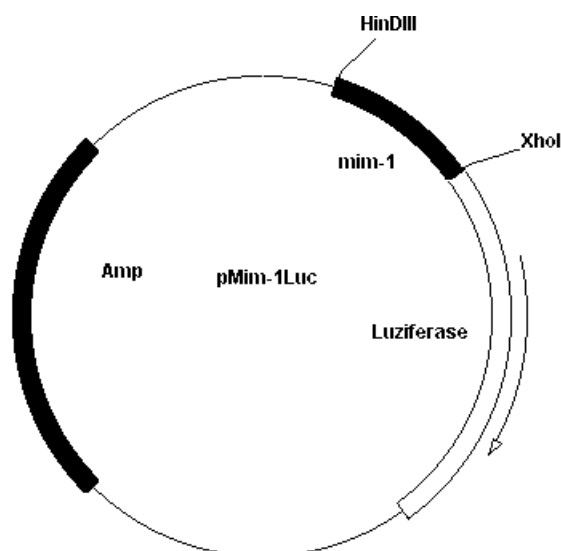


Abbildung 16: Plasmidkarte des pMim-1Luc-Vektors

pQE176

Das Plasmid pEQ176 ist ein Expressionsvektor für β -Galaktosidase in Säugetierzellen. Das β -Galaktosidasegen wird von einem CMV-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungssignal flankiert. Es existiert ein SV40-*Ori* für die Replikation in Zelllinien, die das SV40 T-Antigen exprimieren. Für die Replikation in *E.coli* ist ein pBR322-*Ori* vorhanden und ein Ampicillinresistenzgen ermöglicht die Selektion. Der *f1-Ori* dient der Einzelstrangreplikation.

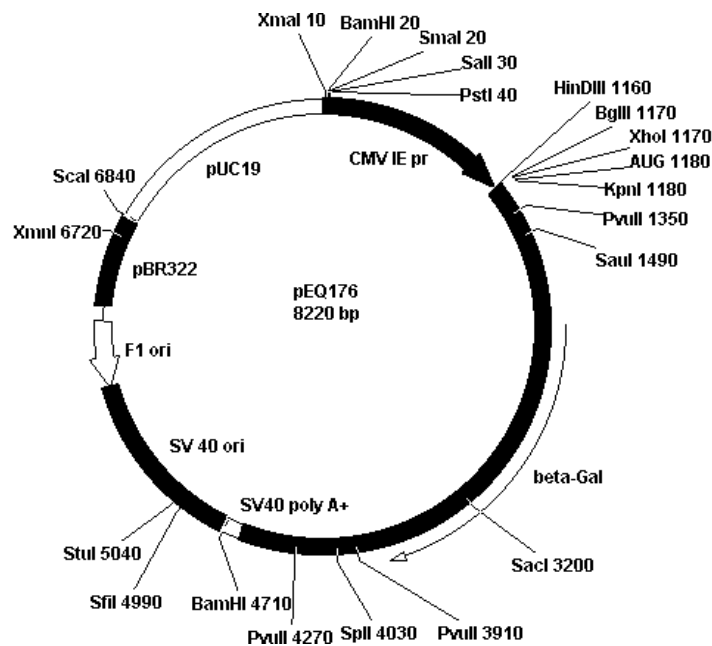


Abbildung 17: Plasmidkarte des pEQ176-Vektors

pQE176P2, pEQ176P2Myb

Das Plasmid pEQ176P2 ist durch eine Deletion des β -Galaktosidasegens aus dem Plasmid pEQ176 hervorgegangen. Mittels *PvuII* wurde das etwa 2900 bp lange Fragment des β -Galaktosidasegens herausgeschnitten und das Plasmid religiert. Das Plasmid zeigt keine β -Galaktosidaseexpression und dient als Kontrollvektor.

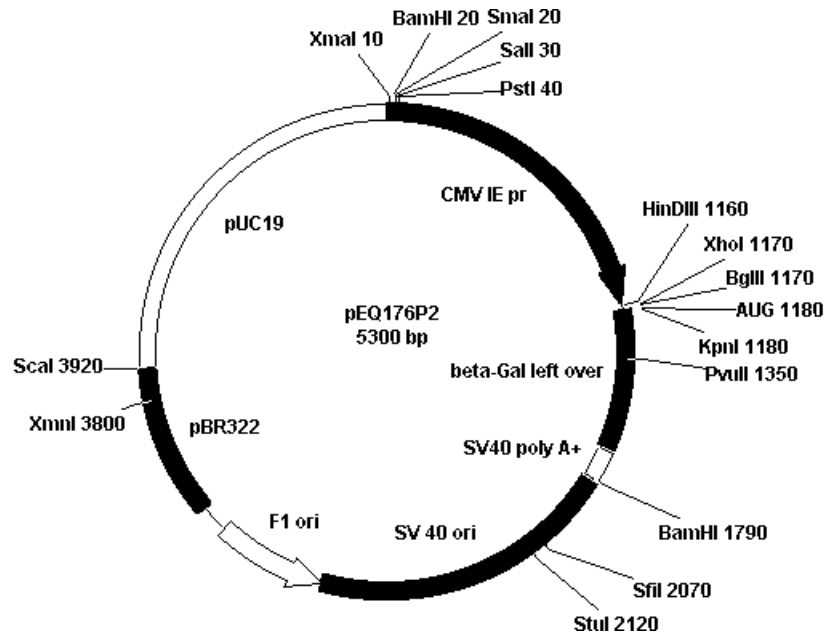


Abbildung 18: Plasmidkarte des pEQ176P2-Vektors

Das Plasmid pEG176P2Myb wurde durch das Einfügen des c-Myb Gens in den Vektor pEQ176P2 kloniert. Der Vektor fungiert als c-Myb Expressionsvektor.

pCMV-CEBP α

Der Vektor pCMV-CEBP α ist ein Expressionsvektor für CEBP α in Säugetierzellen. Das CEBP α -Gen wird durch einen CMV-Promotor kontrolliert. Der Vektor kann in *E.coli* repliziert und durch das Ampicillinresistenzgen selektiert werden.

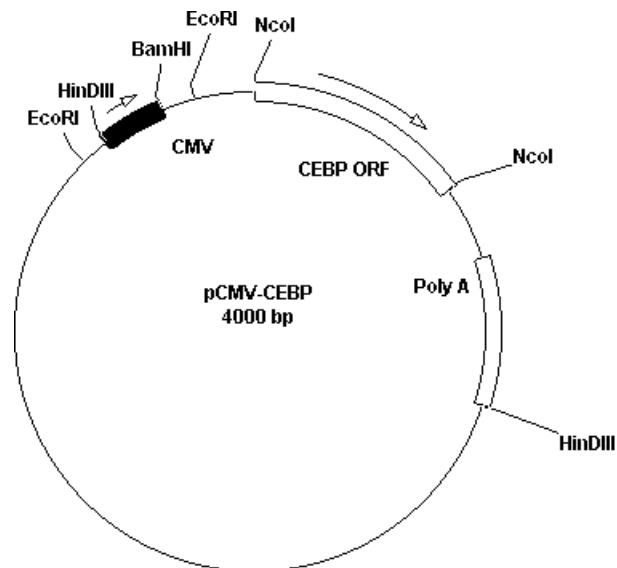


Abbildung 19: Plasmidkarte des pCMV-CEBP-Vektors

pcDNA1.1/Amp-Plasmide

Der Vektor pcDNA1.1/Amp stammt von der Firma Invitrogen und ist ein Expressionsvektor für Säugetierzellen. Zwischen dem CMV-Promotor und dem SV40-Polyadenylierungssignal befindet sich die MCS. Der Vektor besitzt einen SV40-*Ori*, der eine Replikation in SV40 T-Antigen-tragenden eukaryontischen Zellen, ermöglicht. Der ColE1 Replikationsursprung wird für die Replikation des Plasmids in Top10F' benötigt. Für die Selektion in Bakterien besitzt das Plasmid ein Ampicillinresistenzgen.

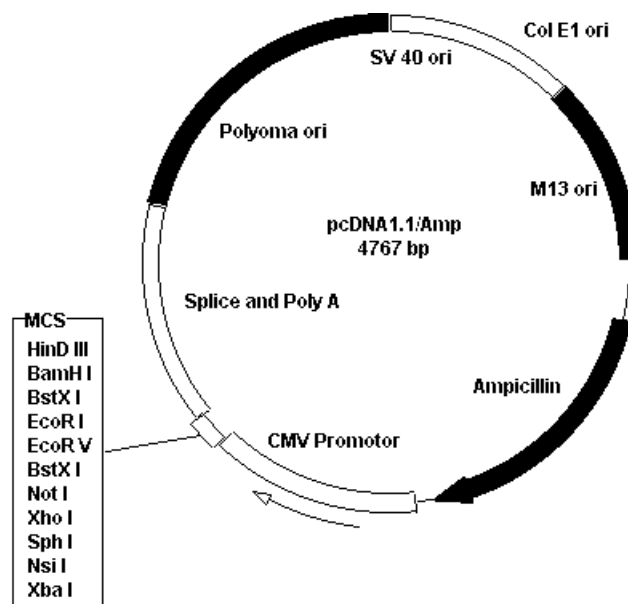


Abbildung 20: Plasmidkarte und MCS des pcDNA1.1/Amp-Vektors

2.4.3.1 Vektoren des *Mercury™ Pathway Profiling-Systems*

pAP1-Luc

pAP1-Luc wurde entwickelt, um Induktion des Aktivatorproteins 1 (AP1) und des streßaktivierten Proteinkinase/Jun N-terminale Kinase (SAPK/JNK) Signal-Transduktionsweges zu detektieren. Er enthält das *Firefly*-Luziferasegen und vier aufeinanderfolgende Kopien des AP1-*Enhancer*, die mit der TATA-ähnlichen Promotorregion (P_{Tal}) des *Herpes Simplex* Thymidinkinasepromotors (*HSV-TK*) fusioniert wurden.

Dem Luziferasegen folgt ein SV40-Polyadenylierungs-Signal. *Upstream* von AP1 befindet sich ein synthetischer Transkriptionsblocker (TB), der den Hintergrund minimiert. Der Vektor

enthält ferner einen *f1-Ori* für die Produktion von einzelsträngiger DNA, einen *pUC-Ori* und ein Ampicillinresistenz für Propagierung und Selektion in *E.coli*.

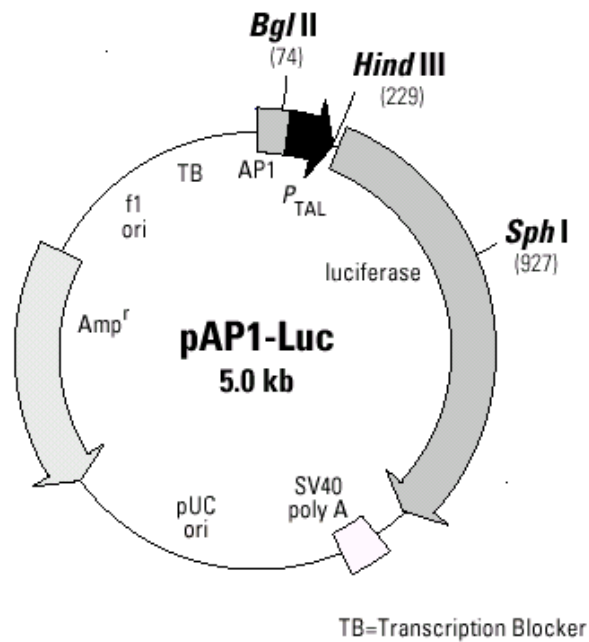


Abbildung 21: Plasmidkarte des pAP1-Luc-Vektors

pCRE-Luc

pCRE-Luc dient dem Nachweis der Aktivierung des cAMP-bindenden Proteins und des cAMP-vermittelten Signaltransduktionsweges. Der Vektor ist analog zu pAP1-Luc, enthält jedoch vor P_{Tal} drei Kopien der CRE-Bindungssequenz.

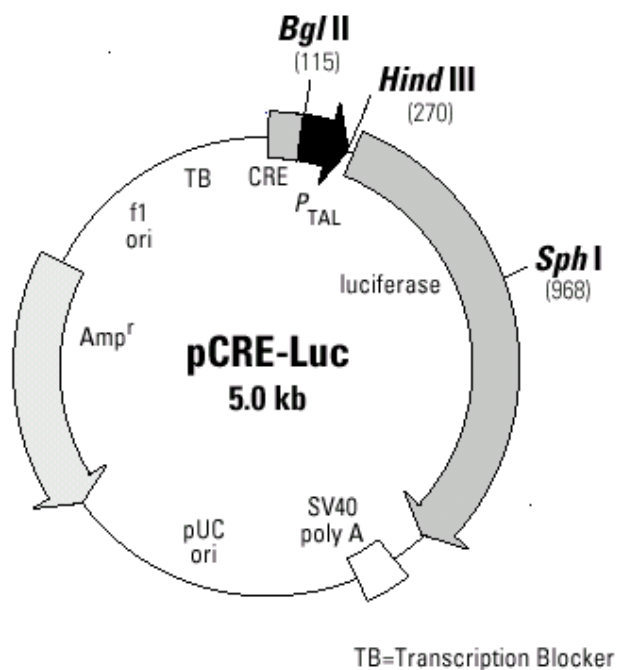


Abbildung 22: Plasmidkarte des pCRE-Luc-Vektors

pE2F-Luc

pE2F-Luc dient dem Nachweis der Aktivierung des E2F-vermittelten Signaltransduktionsweges. Der Vektor ist analog zu pAP1-Luc, enthält jedoch vor P_{Tal} vier Kopien des E2F-Enhancer-Elementes.

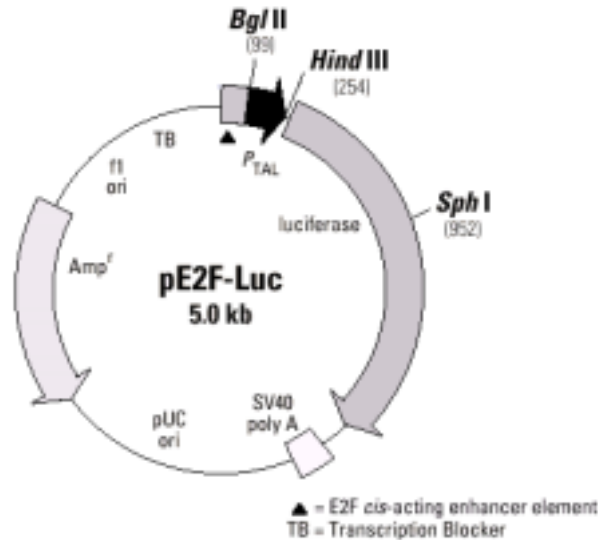


Abbildung 23: Plasmidkarte des pE2F-Luc-Vektors

pISRE-Luc

pISRE-Luc dient dem Nachweis der Aktivierung des durch Interferon (IFN) ausgelösten Signaltransduktionsweges. Der Vektor ist analog zu pAP1-Luc, enthält jedoch vor P_{Tal} fünf Kopien der ISRE-Bindungssequenz.

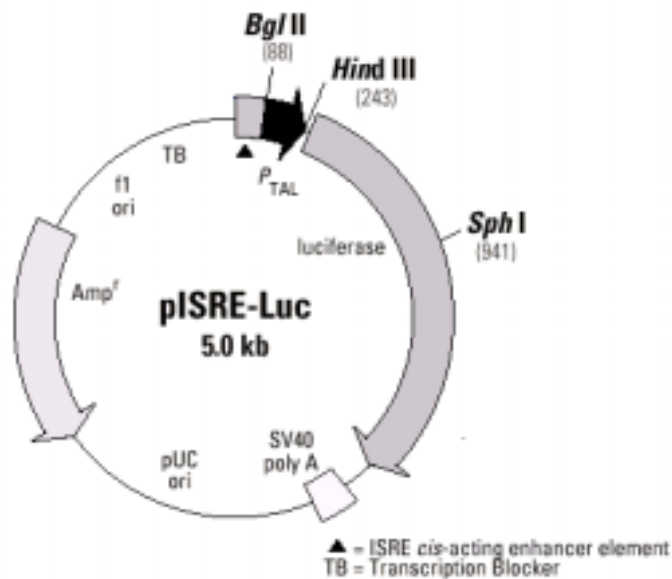


Abbildung 24: Plasmidkarte des pISRE-Luc-Vektors

pSRE-Luc

pSRE-Luc dient dem Nachweis der Aktivierung des *Serum Response Element* (SRE) und des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP) Signaltransduktionsweges. Der Vektor ist analog zu pAP1-Luc, enthält jedoch vor P_{Tal} drei aufeinanderfolgende Kopien des SRE.

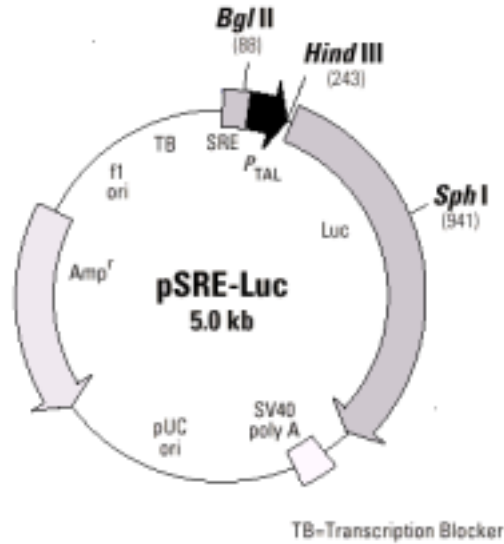


Abbildung 25: Plasmidkarte des pSRE-Luc-Vektors

pTAL-Luc

pTAL-Luc dient der Untersuchung von *Enhancer*-Sequenzen. Der Vektor ist analog zu pAP1-Luc, enthält jedoch vor P_{Tal} eine MCS, in welche die zu testenden Sequenzen kloniert werden können. Ohne Modifikation dient er als Kontrollvektor.

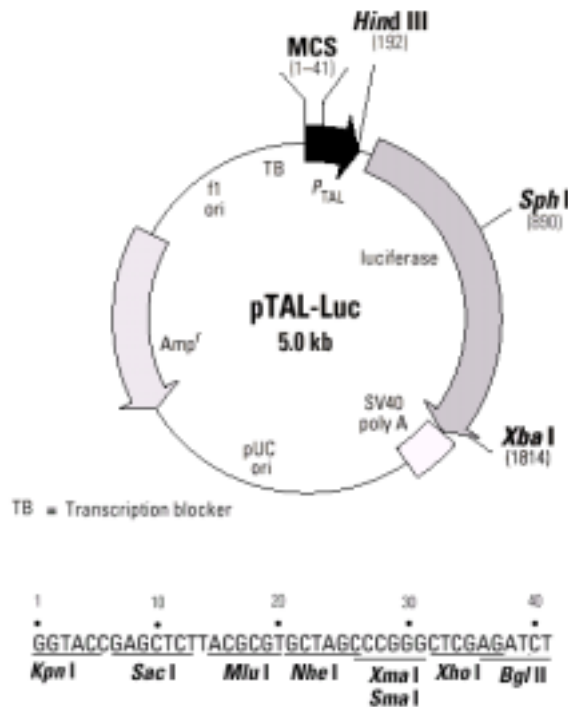


Abbildung 26: Plasmidkarte und MCS des pTAL-Luc-Vektors

2.5 Verwendete Antikörper

Die verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Beate Sodeik (Institut für Physiologische Chemie) zur Verfügung gestellt.

Primäre Antikörper:

- Monoklonaler Antikörper MAb414, spezifisch für das nukleare Kernporenporein; Isotyp IgG₁/k; Katalognummer: MMs-120R, Berkley Antibody Company; aus der Maus
- CI-MPR, cationindependent Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, spezifisch für spätes Endosom/Lysosom; aus dem Kaninchen
- Anti-Calnetin, spezifisch für das Endoplasmatische Retikulum; aus dem Kaninchen
- X22, anti-clatenin, spezifisch für Clatenin/Vesikel; aus der Maus
- EEA1, *Early Endosom Associated Antigen 1*; spezifisch für frühes Endosom; aus der Maus

Sekundäre Antikörper:

- Lissamine Rhodamine-Conjugated Goat Anti Mouse; Dianova
- Lissamine Rhodamine-Conjugated Goat Anti Rabbit; Dianova

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.6.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Escherichia coli wird bei 37°C in LB-Flüssigmedium unter Schütteln oder auf LB-Platten kultiviert, wobei gegebenenfalls Antibiotika zugesetzt werden. Die Kulturdauer beträgt im Allgemeinen 16 bis 20 Stunden.

Tabelle 4: Konzentration der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Flüssigmedien [$\mu\text{g/ml}$]	Festmedien [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin	100	75
Kanamycin	30	35
Tetracyclin	15	15

2.6.1.2 Chemische Transformation

Herstellung kompetenter Zellen

Die Präparation kompetenter Zellen für die chemische Transformation erfolgt nach der RbCl-Methode (Biolabs, 1996), einer modifizierten Vorschrift nach Hannahan (1983). Es werden Transformationseffizienzen von etwa 10^7 cfu pro μg pBR322 erreicht. Die kompetenten Zellen können bis zu einem Jahr bei -70°C gelagert werden.

250 ml LB-Medium werden mit 20 mM MgSO_4 und 2,5 ml einer Vorkultur versetzt. Nach 2-3 Stunden bei 37°C wird eine Zelldichte von $\text{OD}_{600} = 0,4-0,6$ (Beginn der logarithmischen Wachstumsphase) erreicht. Die Zellen werden 5 min bei 4000 g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 100 ml eiskaltem TFBI resuspendiert. Einer fünfminütigen Inkubation auf Eis folgt erneut eine Zentrifugation. Das Pellet wird in 10 ml kaltem TFBII aufgenommen und die Zellen weitere 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension zu 100 μl Aliquots in Eppendorfgefäße gefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Durchführung

Ein Aliquot kompetenter Zellen wird im Eisbad langsam aufgetaut, mit 100 ng Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz versetzt und 30 min inkubiert. Nach 90 s Hitzeschock (42°C) wird der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach schonender Zentrifugation (2 min, 2000 g) wird der Ansatz auf Selektionsplatten ausplattiert beziehungsweise in Flüssigkulturmedium mit dem entsprechendem Antibiotikum überführt.

2.6.1.3 Elektroporation

Herstellung kompetenter Zellen

1 l LB-Medium wird mit 10 ml einer Übernachtskultur versetzt und 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei einer Zelldichte von $\text{OD}_{600} = 0,5$ wird das Kulturgefäß für 30 min auf Eis

gestellt und anschließend die Zellen 15 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 l eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang wird mit 500 ml und 20 ml 10 % Glycerin wiederholt. Anschließend werden die Zellen in 2 bis 3 ml 10 % Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden zu 40 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Durchführung

Ein Aliquot kompetenter Zellen wird mit maximal 4 µl Plasmid-DNA (etwa 100 ng/µl) versetzt und zwei Minuten lang auf Eis inkubiert. Nach Überführung des Ansatzes in eine eisgekühlte 1 mm-Küvette wird mittels eines Elektroporators (Modell 2510, Firma Eppendorf) ein 4 ms langer Spannungsimpuls von 1800 V erzeugt. Die Zellen werden eine Stunde lang in 1 ml LB-Medium bei 37°C inkubiert und anschließend auf Selektionsplatten oder in Flüssigmedium mit Antibiotikum überführt. Die Transformationseffizienz beträgt etwa 10^9 - 10^{10} cfu/µg DNA.

2.6.1.4 Proteinexpression

Mit dem rekombinanten Vektor (pGEX für GST-Fusionsproteine, pQE für (His)₆-tag-Proteine) werden chemisch kompetente TG1-Zellen oder LK111(λ)-Zellen transformiert. Aus einer über Nacht inkubierten Vorkultur werden 500 ml LB^{Amp}-Medium angeimpft ($OD_{600} \approx 0,1$) und bei 37°C bis zum Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,7$ - $0,9$ inkubiert. Anschließend wird mit Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert, die Endkonzentration beträgt bei pGEX-Vektoren 0,1 mM und bei pQE-Vektoren 1 bis 2 mM. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wird die Zellsuspension für 10 Minuten bei 4000 g zentrifugiert und das Pellet bei -20°C aufbewahrt oder wie beschrieben aufgereinigt (siehe 2.7.7 und 2.7.8).

Für einen Expressionstest wird von einer Vorkultur eine 1 ml Probe genommen, sedimentiert (3 min, 13000 g) und das Pellet in LAP aufgenommen. Eine 3 ml Kultur wird von der Vorkultur angeimpft und bis $OD_{600} = 0,7$ - $0,9$ inkubiert, mit IPTG induziert und nach 2 Stunden eine 1 ml Probe genommen. Diese wird wie die Probe vor der Induktion aufgearbeitet und beide Proben auf einem SDS-PAAGE analysiert.

2.6.1.4.1 Fermentation

Die Produktion größerer Mengen Protein erfolgt in einem 10 l-Fermenter unter sterilen Bedingungen. Dazu wird der Fermenter mit 8 l ddH₂O beschickt und 14 Stunden bei 120°C im Wärmeschrank inkubiert.

Nach der Zugabe von 1 l autoklaviertem 10x LB-Medium, den entsprechenden Antibiotika sowie 3 ml Entschäumer (Extran 31, Merck), wird das Medium durch Zugabe von 1 l Vorkultur angeimpft. Es folgt eine Anzucht der Zellen bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,7-0,9. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wird durch Zugabe der erforderlichen Menge IPTG induziert. Nach zweistündiger Expression wird der Fermenterinhalt zentrifugiert (4000 g, 10 min).

Nach Resuspension der Zellen in 500 ml PDL und Aliquotierung auf 50 ml können die Zellen direkt zur Aufarbeitung (siehe 2.7.7 und 2.7.8) eingesetzt oder eingefroren werden (-20°C).

2.6.1.5 Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Eine cDNA-Bibliothek (Mäuseembryo, Swiss Webster, 11. Tag p.c. in *E.coli* DH5(α)) wurde von der Firma Clontech bezogen. Die Bibliothek liegt im pGAD10-Vektor vor, die Insertgröße liegt zwischen 0,5 und 3,5 kb. Die Anzahl unabhängiger Klone beträgt 3×10^6 , der Titer der Originalkultur liegt bei 1×10^8 cfu/ml.

Für den Einsatz im *Two-Hybrid*-System muß die cDNA-Bibliothek nach dem Protokoll der Firma Clontech amplifiziert werden. Dazu werden 1×10^7 cfu der Originalkultur in 10 ml LB-Medium aufgenommen und direkt auf 50 LB^{amp}-Platten (Ø 150 mm) ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht werden sämtliche Kolonien in LB-Flüssigmedium aufgenommen und die Bibliotheksplasmide mittels einer Plasmidpräparationsmethode (Abhängig von der Zellmenge; siehe 2.7.1) isoliert.

2.6.2 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

2.6.2.1 Working Stock und Glycerinkultur

Es gibt zwei unterschiedliche Strategien zur Aufbewahrung von Hefen, den *Working Stock* und die Glycerinkultur. Zum Anlegen eines *Working Stocks* werden 50 µl einer tiefgefrorenen Hefekultur auf eine YPD-Agarplatte aufgetragen und 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Diese Platte dient als Grundlage für weitere Hefekulturen und kann verschlossen (Parafilm) bei 4°C 1-2 Monate verwendet werden. Von dieser Platte kann nach dieser Zeit auch wieder ein neuer *Working Stock* angelegt werden, aber generell ist diese Methode nur für den kurzfristigen Einsatz gedacht.

Für eine langfristige Lagerung werden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wird eine einzelne Kolonie des *Working Stocks* in 500 µl YPD-Medium resuspendiert und anschließend mit 500 µl 50 %igen Glycerinlösung versetzt. Die Suspension wird 30 min auf Eis inkubiert und die Zellen dann bei -70°C aufbewahrt. Die Haltbarkeit beträgt etwa ein Jahr.

2.6.2.2 Kultivierung

S. cerevisiae wächst bei 30°C auf Vollmedium (zum Beispiel YPD) beziehungsweise auf entsprechenden SD-Mangelmedien. Die Generationszeit in der exponentiellen Wachstumsphase beträgt durchschnittlich 180 Minuten. Durch Messung der Trübung bei 600 nm können folgende Wachstumsphasen unterschieden und verschiedenen Zelldichten zugeordnet werden. Mit der Näherung $OD_{600} = 0,1 \cong 3 \times 10^6$ Zellen/ml lässt sich die Zellzahl abschätzen.

- Anlaufphase

- Exponentielle Phase

* <i>Early</i> log-Phase	$OD_{600} = 0,4$	$\Rightarrow \leq 1 \times 10^7$	Zellen/ml
* <i>Mid</i> log-Phase	$OD_{600} = 0,4-1,7$	$\Rightarrow 1-5 \times 10^7$	Zellen/ml
* <i>Late</i> log-Phase	$OD_{600} = 1,7-6,6$	$\Rightarrow 5 \times 10^7 - 2 \times 10^8$	Zellen /ml

- Stationäre Phase

- Absterbephase

2.6.2.3 Elektroporation

Die Elektroporation stellt bei Hefezellen eine sehr effiziente Methode zur Transformation mit Plasmid-DNA dar. Ein Spannungsimpuls öffnet Poren in der Plasmamembran, so daß DNA aus dem umgebenden Medium ins Zytoplasma gelangen kann. Die Transformationseffizienz liegt für ein Plasmid bei $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ cfu/ μ g DNA. Bei der Kotransformation von zwei Plasmiden ist die Zahl der resultierenden Transformanden gering.

Herstellung kompetenter Zellen

Ein 500 ml YPD-Hefekultur wird bei 30°C bis zu $OD_{600} = 1,3-1,5$ inkubiert und anschließend fünf Minuten bei 4000 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 ml eiskaltem sterilem ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Es schließen sich Waschschriffe mit 250 ml sterilem ddH₂O (4°C) und 20 ml einer 1 M Sorbitol-Lösung (4°C) an. Das Pellet wird in 0,5 ml 1 M Sorbitol-Lösung (4°C) resuspendiert, so daß sich ein Endvolumen von 1-1,5 ml mit einer Konzentration von etwa 1×10^{11} Zellen/ml ergibt.

Durchführung

Ein Gemisch aus 65 μ l frisch präparierter, kompetenter Zellen und maximal 4 μ l Plasmid-DNA (0,5-3,0 μ g/ μ l) wird fünf Minuten lang auf Eis inkubiert. Es wird in eine eisgekühlte Küvette überführt und für etwa 4 ms einem Spannungsimpuls von 750 V ausgesetzt. Anschließend werden die Zellen in 1 ml 1 M Sorbitol-Lösung aufgenommen und auf Agarplatten mit einem Sorbitolgehalt von 1 M ausplattiert.

2.6.2.4 Chemische Transformation in Gegenwart von Lithiumacetat

Bei der chemischen Transformation von Hefezellen liegt die Effizienz im Bereich von etwa 1×10^3 cfu/ μ g DNA. Auch lassen sich mit dieser Methode im Gegensatz zur Elektroporation zwei Plasmide gleichzeitig mit hoher Effizienz transformieren.

Herstellung kompetenter Zellen und Durchführung

Kulturvolumina und Reagenzienmengen variieren je nach Konzentration und Anzahl der verwendeten Plasmide (Anzahl in Klammern):

Konzentration (Anzahl)

gering (1) mittel (2) hoch (1-2)

small scale large scale library scale

- | | | | |
|---|--------|--------|--------|
| 1. YPD- bzw. SD-Medium wird mit einer Hefekolonie inokuliert und 18 Stunden lang bei 30°C bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = >1,5$ inkubiert (Stationäre Phase). | 50 ml | 50 ml | 150 ml |
| 2. Die Vorkultur wird überimpft ($OD_{600} = 0,2$). Die anschließende Inkubation erfolgt bei 30°C im Schüttelwasserbad bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,5$ (etwa 3 Stunden). | 300 ml | 300 ml | 1 l |
| 3. Die Kultur wird für 5 Minuten bei 1000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet in sterilem ddH ₂ O resuspendiert. | 25 ml | 25 ml | 500 ml |
| 4. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in frisch hergestellter 1x TE/LiAc-Lösung aufgenommen. | 1,5 ml | 1,5 ml | 8 ml |

Die kompetenten Zellen müssen innerhalb einer Stunde transformiert werden.

PEG/LiAc-Lösung wird frisch hergestellt. 10 ml 10 ml 100 ml

6. Der Transformationsansatz wird erstellt:

- | | | | |
|------------------------------------|--------|-------|--------|
| • Plasmid 1 (Köderkonstrukt) | 0,1 µg | 50 µg | 0,5 mg |
| • Plasmid 2 (Bibliothekskonstrukt) | | 30 µg | 0,3 mg |
| • <i>carrierDNA</i> | 0,1 mg | 2 mg | 20 mg |
| • Hefezellen | 0,1 ml | 1 ml | 8 ml |

7. PEG/LiAc-Lösung wird dazugegeben und der Ansatz intensiv durchmischt. 0,6 ml 6 ml 60 ml

8. Nach 30 minütiger Inkubation unter ständigem Schütteln erfolgt die vorsichtige Zugabe von DMSO. 70 µl 700 µl 7 ml

9. Nach einem 15minütigen Hitzeschock (42°C) wird der Ansatz 1-2 min auf Eis gekühlt und anschließend für 5 min bei 1000 g zentrifugiert.

10. Das Pellet wird in TE aufgenommen und auf entsprechende Selektionsmedien ausplattiert. 0,5 ml 10 ml 10 ml

2.6.2.5 β -Galaktosidase-Colony-Lift-Filter-Assay

Die auf His⁻-Mangelmedium gewachsenen Kolonien (His-produzierende Kotransformanten) mit einem Durchmesser größer als 1 mm werden auf frisches Selektionsmedium überimpft und 2 bis 4 Tage bei 30°C inkubiert. Es wird dann ein Papierfilter (Whatman #5, Ø 75 mm) auf die Kolonien gelegt, wodurch diese ganz oder teilweise von der Agarplatte abgehoben werden. Der Filter mit den Kolonien wird für zehn Sekunden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, wobei die Zellmembranen zerstört werden. Nach dem Auftauen wird der Filter mit den lysierten Zellen in eine Petrischale überführt, in welcher sich ein mit X-Gal/Z-Puffer-Lösung getränkter Nitrozellulosefilter befindet. Die Petrischale wird bei 30°C inkubiert, wobei sich bei β -Galaktosidase-produzierenden Kolonien nach 0,5 bis 8 Stunden eine Blaufärbung zeigt.

2.6.3 Arbeiten im Rahmen des *Phage-Display-Systems*

2.6.3.1 Vermehrung von M13KO7-Helferphagen

100 μ l TG1-Zellen werden in 20 ml LB Flüssigmedium gegeben und bei 37°C im Schüttelwasserbad bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 inkubiert. Nach Zugabe von 1×10^7 cfu (*Colony Forming Unit*) M13KO7-Helferphagensuspension wird für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert (20 min, 1000 g), in 100 ml LB^{Kan} resuspendiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die M13KO7-Phagen werden, im Gegensatz zu den rekombinanten Phagen, nach der Aufarbeitung in SM-Puffer aufgenommen. Die Aufarbeitung und Konzentrationsbestimmung erfolgt analog zu den rekombinanten Phagen.

2.6.3.2 Produktion rekombinanter Phagen

100 μ l kompetente TG1-Bakterienzellen werden mit 100 ng des rekombinanten Phagemid-Vektors chemisch transformiert. Nach dem Hitzeschock werden die Bakterien in 800 μ l LBG-Medium aufgenommen und bei 37°C 60 min inkubiert. Auf einer LB^{Amp}-Agarplatte werden 50 μ l der Bakteriensuspension ausgestrichen, um die Transformationseffizienz zu kontrollieren. Der Rest wird in 20 ml LBG^{Amp}-Medium überführt und bei 37°C im

Schüttelwasserbad bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,5$ inkubiert, was je nach Transformationseffizienz 4 bis 6 Stunden dauert. Bei Erreichen der erforderliche Zelldichte werden 3×10^{10} cfu M13KO7-Helferphagen zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen 10 min zentrifugiert (1000 g), das Pellet in 12 ml $LB^{Amp/Kan}$ -Medium resuspendiert und über Nacht bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

2.6.3.3 Isolierung rekombinanter Phagen und deren Konzentrationsbestimmung

Die Zellen der Übernachtskultur werden sedimentiert (20 min, 1000 g) und der Überstand, der die rekombinanten Phagen enthält, in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Die Bakteriophagen werden dann durch Zugabe von 1/5 des Suspensionsvolumens an PEG-NaCl und nachfolgender 4stündiger Inkubation bei 4°C gefällt. Anschließend werden die Phagen 2 Stunden sedimentiert (6200 g). Das Pellet wird in 10 ml 1 x PBS, 0,1 % (v/v) Triton X-100 resuspendiert und sterilfiltriert (Sterilfilter, Satorius, Porengröße 0,45 µm).

Während der Zentrifugation werden 20 ml LB-Medium mit 100 µl kompetenten TG1-Zellen angeimpft und bei 37°C im Schüttelwasserbad bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Um den Phagentiter zu bestimmen, wird folgende Verdünnungsreihe der Phagensuspension mit ddH₂O hergestellt: 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷.

Je 10 µl Phagenverdünnung werden zu je 1 ml der TG1-Kultur gegeben, 30 min bei 37°C inkubiert und anschließenden zentrifugiert (3000 rpm, 5 min, Eppendorf Centrifuge 5415). Der Überstand wird dekantiert, das Pellet im verbleibenden Restvolumen resuspendiert und auf LB^{Amp} -Agarplatten (bei Helferphagen auf LB^{Kan} -Platten) ausgestrichen. Aus der Anzahl der Klone auf den Agarplatten läßt sich dann über den Verdünnungsfaktor und das eingesetzte Volumen der Phagentiters in der Einheit cfu/ml bestimmen.

2.6.3.4 Beschichtung der Mikrotiterplatten

Für die Durchführung des *Pannings* (siehe 2.6.3.5) wird eine Mikrotiterplatte mit den zu untersuchenden Proteinen beschichtet (*Coating*). Die Proteinlösungen werden mit ddH₂O auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt und in jede der zu beschichtenden Vertiefungen (*Well*) der Mikrotiterplatte 200 µl der Proteinverdünnungen eingefüllt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C, bei der die Proteine an die Oberfläche binden, wird die Proteinlösung vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Die beschichteten Platten sind bei 4°C etwa 3

Wochen ohne Qualitätsverlust lagerbar. Es wurden nur frisch beschichtete Mikrotiterplatten verwendet.

2.6.3.5 *Panning*

Das *Panning* dient der Untersuchung der Wechselwirkung der rekombinanten Bakteriophagen mit den auf der Mikrotiterplatte immobilisierten Proteinen. Damit man unspezifische Wechselwirkungen ausschließen kann, wird für jeden rekombinierten Phagen ein Blindwert mit einem unbeschichteten *Well* gemacht. Zu Beginn des *Panning* werden in jedes *Well*, egal ob beschichtet oder Blindwert, 300 µl Blockpuffer gegeben und die Mikrotiterplatte 30 min bei RT inkubiert. Währenddessen werden die Phagentiter bestimmt und für das *Panning* mit ddH₂O eine Verdünnung mit einem Titer von 1×10^9 cfu/ml hergestellt.

Nach der Inkubation wird der Blockpuffer aus den *Wells* abgesaugt und 200 µl der verdünnten Phagensuspensionen zugegeben. Es folgt eine 4stündige Inkubation bei 4°C, anschließend wird die Suspension abpipettiert. Nun beginnt das Waschen der *Wells* mit 250 µl *Phage-Display*-Waschpuffer, wodurch unspezifisch gebundene Phagen entfernt werden. Es wird bis zu 30 mal mit Puffer gewaschen, wobei die Einwirkzeit 3 min beträgt. Jeder Pipettierschritt muß mit einer frischen Spitze erfolgen, da es sonst zu Kontaminationen mit Bakteriophagen aus anderen *Wells* kommen würde, die das Ergebnis verfälschen.

Vor Beginn des Waschens werden 20 ml LB-Medium mit 100 µl TG1-Bakterien angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Um die Effizienz des Waschens zu überprüfen wird jeder 5. bis 10. Waschschrift (*Wash*) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach Beendigung des Waschens werden 200 µl der zuvor angesetzten TG1-Kultur in jedes benutzte *Well* und 500 µl zu jedem aufgefangenen *Wash* gegeben. Beides wird 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Suspensionen in den Reaktionsgefäßen werden sedimentiert (3000 rpm, 5 min, Eppendorf Centrifuge 5415) und ein Großteil des Mediums dekantiert. Das Pellet wird im Restmedium resuspendiert und ebenso wie die Bakteriensuspension in den Mikrotiterplatten auf LB^{Amp}-Platten ausgestrichen. Die Anzahl der Klone auf den Platten der Waschschrift spiegelt die Wirksamkeit der Waschprozedur wieder. Ist es durch spezifische Wechselwirkungen rekombinante Phagen mit den proteinbeschichteten *Wells* zu einer Anreicherung gekommen, so läßt sich dieses an der erhöhten Kolonienanzahl auf den zugehörigen Agarplatten im Vergleich zu den Platten der unbeschichteten *Wells* erkennen. Der Faktor zwischen beschichtetem und unbeschichtetem *Well* stellt ein Maß für die Stärke

der Wechselwirkung dar, wobei es sich um relative Werte handelt. Man kann die Werte zweier *Pannings* also nicht direkt vergleichen; sondern muß immer den Bezug zum Blindwert beachten.

2.6.4 Arbeiten mit euykariontischen Zelllinien

Die Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen werden an der Sterilwerkbank Biobench der Firma Ceag Shirp durchgeführt. An sterilen Einmalverbrauchsgütern finden einzeln verpackte 10 und 25 ml Plastikpipetten, Zellkulturflaschen mit 80 cm² Grundfläche sowie 60 beziehungsweise 100 mm Petrischalen Verwendung. Die Zelllinien werden im Begasungsbrutschrank BB16 der Firma Heraeus bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Zellen werden in DMEM unter Zusatz von 10 % FCS, 5 ml L-Glutamin-Lösung und 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung kultiviert. Das in Gebrauch befindliche Medium sowie die Medienvorräte werden bei 4°C gelagert. Das Medium ist vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C zu temperieren.

2.6.4.1 Passagieren von Zellen

Es ist in der Zellkultur notwendig, die Zellen bei Erreichen eines gewissen Bedeckungsgrades zu teilen und ein Aliquot in eine neue Kulturschale auszusäen. Dieser als Passagieren bezeichnete Vorgang findet statt, bevor die Zellen vollständig konfluent gewachsen sind (bei 80-90 % Bedeckung). Sollten die Zellen dichter wachsen; kommt es zu einer sogenannten Kontaktinhibierung, die zum Absterben und Ablösen der Zellen führt. Durch Zellzählungen ließen sich bei etwa 80 bis 90 % Konfluenz Werte von $0,75 \times 10^7$ bis $1,25 \times 10^7$ Zellen/80 cm²-Flasche feststellen. Wurde die Konfluenz erreicht, lag die Zellzahl bei über $1,5 \times 10^7$ Zellen/Flasche und das zuvor beschriebene Phänomen der Zellablösung trat auf.

Das Passagieren beginnt mit dem Dekantieren des Mediums, Waschen mit 10 ml sterilem PBS, Dekantieren des PBS und anschließender Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung zu den Zellen. Nach 30 s bis 1 min werden die Zellen durch Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. *HEK-293* Zellen sind leicht ablösbar. Einwirkzeiten der Trypsin/EDTA-Lösung von einer Minute und mehr führen zu einer steigenden Zahl toter Zellen. *CV-1* Zellen und die davon abgeleiteten *COS-7* Zellen sind robuster und zeigen auch eine deutlich höhere Adhärenz, was eine längere Einwirkzeit der Trypsin/EDTA-Lösung

bedingt, damit auch sie sich durch Klopfen ablösen lassen. Nun werden 8 ml Medium zugegeben, der Boden der Kulturflasche mehrfach mit der Zellsuspension gespült und die Zellen durch mehrfaches Aufziehen in der Pipette resuspendiert und Zellklumpen aufgelöst. Eine Probe der Suspension wird entnommen und mit einer Neugebauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. 50 µl der Zellsuspension werden mit 50 µl einer 0,4 % Trypanblaulösung gemischt und einige Tropfen in die Zählkammer gegeben. Trypanblau ist ein Farbstoff der von lebenden Zellen nach dem Eindringen in die Zelle abgebaut oder ausgeschleust wird. Er wird verwendet, um lebende von toten Zellen, die im Lichtmikroskop blau erscheinen, zu unterscheiden. Bei der Zählung wird die Zellzahl in vier große Quadrate bestimmt und der Mittelwert gebildet. Ein großes Quadrat umschließt ein Volumen von 0,1 µl. Unter Berücksichtigung der Verdünnung ergibt sich die Zellzahl pro ml nach: $\text{Zählwert} \cdot 2 \cdot 10^4$. In der neuen Kulturflasche werden 1,5 bis 2×10^6 Zellen ausgesät, was meist 1,5 bis 2 ml Zellsuspension entspricht, der dann 20 ml Medium zugegeben werden. Die Zellen müssen alle 2 bis 3 Tage im Verhältnis 1:5 oder 1:6 passagiert werden. Für längere Kulturzeiten werden 0,5 bis 1×10^6 Zellen ausgesät, was eine Zeit zwischen zwei Passagen von vier bis fünf Tagen ermöglicht.

2.6.4.2 Lagerung von Zellen

1. Einfrieren

Eukaryontische Zellen können für längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Es ist sinnvoll, sich einen Vorrat an eingefrorenen Zellen anzulegen, da auch bei sorgfältigem Arbeiten eine Kontamination der Kultur mit Bakterien oder Pilzen nicht auszuschließen ist. Auch kann es nach häufigem Passagieren zu Änderungen im Wachstumsverhaltens, in der Morphologie oder in der Transfizierbarkeit der verwendeten Zellen kommen. Sollte es zu solchen Veränderungen kommen, hilft nur die Verwendung von Zellen mit einer geringeren Passagenzahl.

Um Zellen einzufrieren, werden vier 80 cm² große Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer Zellzahl von etwa 1×10^7 Zellen/Flasche kultiviert. Die Zellen werden wie beschrieben abgelöst, die 4×10 ml Zellsuspension in einem sterilen 50 ml Falcon-Gefäß vereinigt und bei 15 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das Medium wird dekantiert, die Zellen werden in 6 ml FCS/10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und die Suspension auf 6 Cryoröhrchen aufgeteilt. Alle Arbeitsschritte nach der Zentrifugation sind auf Eis durchzuführen und das FCS vorzukühlen, um die Aufnahme von DMSO in die Zellen zu

verringern. Die Cryoröhrchen werden in einer doppelwandigen Styroporbox im Tiefkühlschrank langsam auf -80°C gekühlt. Nach zwei bis drei Tagen können sie in flüssigen Stickstoff überführt werden, wobei ein Röhrchen direkt wieder aufgetaut wird, um sicherzustellen, daß die Zellen den Einfriervorgang überlebt haben und nicht kontaminiert wurden.

2. Auftauen

Nach der Entnahme des Cryoröhrchens aus dem Stickstoff werden die Zellen schnell in der Hand oder im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wird die Zellsuspension in einem sterilen Falcon-Gefäß mit 20 ml Medium versetzt, gut durchmischt, dann für 30 min bei 15 g und 4°C zentrifugiert, das Medium dekantiert und durch neues ersetzt. Diese Vorgehensweise soll möglichst viel DMSO aus der Suspension entfernen. Die Zellsuspension wird in eine Kulturflasche überführt und wie oben beschrieben inkubiert.

2.6.4.3 Transfektion

Das Einbringen von Plasmid-DNA in einen eukaryontischen Organismus wird als Transfektion bezeichnet. Es gibt verschiedene Methoden, um dieses Ziel zu erreichen. Die klassische Kalziumphosphat-Methode ist für unsere Zwecke nicht effizient genug (Scholz, 1999), daher wird eine Methode, die mit einem Lipid-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen arbeitet, verwendet.

Ziel der Transfektionen ist es, eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, daß heißt einen hohen Anteil an transfizierten Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation. Die Kenntnis der Transfektionseffizienz ist wichtig für die Bewertung von Reporter-*Assays*. Hierbei werden einzelne Transfektionen miteinander verglichen und eine Normierung durchgeführt. Es gibt zwei allgemein verwendete Methoden um eine Quantifizierung zu verwirklichen:

- Verwendung eines konstitutiv exprimierten Proteins, das durch Aktivitätstests quantifiziert und in Relation zur Transfektionseffizienz gesetzt werden kann.
- Verwendung eines konstitutiv exprimierten Indikatorproteins, das zum Beispiel eine Verfärbung (*Blue/White-Screening*) der transfizierten Zellen hervorruft, so daß transfizierte und nicht transfizierte Zellen ausgezählt werden können.

Beide Verfahren wurden angewendet. Die Transfektionen von GFP-Proteinen werden über das Verhältnis von fluoreszierenden zu nicht fluoreszierenden Zellen quantifiziert, während beim Reportergen-Assay das β -Galaktosidase-Assay (siehe 2.6.4.6) durchgeführt wird.

2.6.4.4 Transfektion mit *Effectene*

Effectene ist ein Lipid-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen, das für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen verwendet wird. Die DNA wird bei dieser Transfektionsmethode durch die Wechselwirkung des negativen Phosphatrückgrats mit positiven Molekülen, sogenannten *Enhancern*, kondensiert. Die kondensierte DNA wird anschließend mit einem *Monolayer* kationischer, nichtliposomaler Lipide umschlossen und der so gebildete Komplex durch Endozytose von den Zellen aufgenommen.

Im dem Transfektions-Kit sind enthalten:

- Puffer EC (Verdünnungspuffer)
- *Enhancer* (DNA-Kondensierendes Reagenz)
1 mg/ml, 4°C Lagertemperatur
- *Effectene* (Transfektionsreagenz)
1 mg/ml, 4°C Lagertemperatur

Einen Tag vor der Transfektion werden 5×10^5 Zellen in 60 mm Petrischalen ausgesät, so daß die Konfluenz am Tag der Transfektion zwischen 60 und 80 % liegt. Am Transfektionstag werden 2 μ g DNA in 150 μ l EC in einem 5 ml Röhrchen vorgelegt und 8 μ l des *Enhancers* zugegeben und gut vermischt. Nach etwa 5 min werden 20 μ l des *Effectene*-Reagenz zugesetzt, auf dem Schüttler 10 s durchmischt und dann 10 min bei RT inkubiert.

Währenddessen wird von den Petrischalen das Medium abgesaugt, einmal mit sterilem PBS gewaschen und 4 ml frisches Medium zugegeben. Die Transfektionslösung wird mit 1 ml Medium verdünnt und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Da die Cytotoxizität gering ist, ist ein Mediumwechsel nicht zwingend erforderlich, er wird nach etwa 16-20 h, wie im *Effectene*-Handbuch vorgeschlagen, dennoch durchgeführt. Bei den Mengenangaben für *Enhancer* und *Effectene* handelt es sich um die von Scholz (1999) optimierten Ansätze.

Bei Transfektionen von Reportergenkonstrukten und den zugehörigen Expressionsvektoren wird die Gesamt-DNA-Menge von 2 μ g beibehalten und die Plasmide im gleichen Gewichtsverhältnis eingesetzt.

2.6.4.5 Ernten von Zellen

Zum Ernten der Zellen wird das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 500 μ l Extraktionspuffer 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden dann mit einem Schaber abgekratzt und das Zelllysate in Eppendorfgefäße überführt. Die Zelltrümmer werden 2 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert, das Lysat in neue Gefäße überführt und für die Messungen verwendet oder bei -80 °C aufbewahrt.

2.6.4.6 β -Galaktosidase-Assay

Im β -Galaktosidase-Assay wird o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG) durch die in den Zellen exprimierte und sich im Zelllysate befindende β -Galaktosidase hydrolysiert. Es entsteht der gelbe Farbstoff o-Nitrophenyl, dessen Konzentration kolorimetrisch bestimmt wird.

Diese Reaktion mit β -Galaktosidase dient der Normierung der Signalstärken auf die Transfektionseffizienz beim Reporter-Gen-Assay. Bei dieser Normierung wird angenommen, daß die Transfektionseffizienz des β -Galaktosidase-Plasmids proportional zur Transfektionseffizienz der anderen Konstrukte ist. Durch Quantifizierung der β -Galaktosidase-Aktivität und damit der exprimierten β -Galaktosidase erhält man die Basis für die Berechnung der normierten Reporter-Genaktivität.

Für den Assay werden 360 μ l Z-Puffer, 40 μ l Zelllysate und 100 μ l ONPG-Lösung bei 37°C in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen inkubiert, bis eine deutliche Gelbfärbung zu erkennen ist. Durch Zugabe von 250 μ l Na₂CO₃-Lösung wird die Reaktion beendet, wobei darauf zu achten ist, daß die Zugabe der Carbonat-Lösung in der gleichen Reihenfolge erfolgte wie die ONPG-Zugabe, damit alle Proben die gleiche Reaktionszeit aufweisen. In einer Mikrotiterplatte werden 100 μ l von jedem Ansatz gegen Z-Puffer im *ELISA-Reader* EL309 gemessen. Der β Galaktosidase-Assay ist als Doppelbestimmung durchzuführen. Die Inkubationszeiten bis zur sichtbaren Gelbfärbung variieren je nach Transfektionseffizienz von wenigen Sekunden bis zu mehreren Minuten.

2.6.4.7 Luziferase-Assay

Der Luziferase-Assay beruht auf der von der *Firefly*-Luziferase, einer Monooxygenase, katalysierten Reaktion, in der Luziferin unter ATP-Verbrauch zu einem reaktiven Zwischenprodukt oxidiert wird. Dieses relaxiert durch Emission von Licht bei 508 nm in seinen Grundzustand Oxyluziferin. Die entstehende Chemolumineszenz wird in Lumineszenzmessgeräten, sogenannten Lumaten, gemessen und ist proportional zu der im Zellysate enthaltenen Luziferasemenge. Diese ist abhängig von der Aktivierung des Luziferasegens und den regulatorischen Prozessen am vorgeschalteten Promotor.

Für die Messung der Lumineszenz wird ein Röhrenlumaten der Firma Beckman verwendet. 300 µl Meßpuffer werden in 5 ml Sarstedt-Röhren vorgelegt und direkt vor der Messung mit 50 µl Lysat versetzt. Das Röhren wird in den Lumaten gestellt, der selbständig 100 µl Luziferinlösung injiziert und für 10 s die Lumineszenz detektiert. Es hat sich aufgrund der Schwankungen zwischen zwei Messungen als sinnvoll erwiesen, eine Doppelbestimmung zu machen. Die Messung wird mittels der β -Galaktosidase-Messwerte normiert.

2.6.4.8 Fluoreszenzmikroskopie GFP-exprimierender Zellen

Die Fluoreszenzmikroskopie dient der Lokalisation exprimierter GFP-Fusionsproteine. Das inverse bi-okkulare Mikroskop CK40 der Firma Olympus mit Fluoreszenzaufsatz regt bei 488 nm die Fluoreszenz an, welche als grüne Lichtemission (Emissionsmaximum bei 507 nm) im Blaukanal betrachtet werden kann. Durch die zusätzliche Verwendung von Durchlicht lassen sich auch die Zellumrisse sichtbar machen. Die fluoreszierenden Zellen wurden mittels Farb- oder Schwarzweiß-Fotografie dokumentiert.

2.6.4.9 Immunfluoreszenzmikroskopie adhärenter Zellen

Ebenso wie die Fluoreszenzmikroskopie dient die Immunfluoreszenzmikroskopie der Lokalisation von Zellbestandteilen. In diesem Fall wird die Fluoreszenz aber nicht durch ein exprimiertes Protein hervorgerufen, sondern durch einen Antikörper, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Man kann somit durch spezielle Antikörper gegen

verschiedene Zellorganellen feststellen, in welchem Zellkompartiment sich ein exprimiertes GFP-Fusionsprotein befindet.

2.6.4.9.1 Vorbereitungen und Optimierung der Zelldichte

Es ist für die Immunofluoreszenzmikroskopie notwendig, die Zellen auf einem Deckglas zu kultivieren, um sie dann auf Objektträger aufbringen zu können, welche sich besser lagern und betrachten lassen als Zellen in einer Kulturschale.

Man benutzt für die Kultivierung in einer 6-Well-Platte quadratische Deckgläschen der Dimension 20 x 20 mm. Diese werden zuerst mit 2 ml 70 % Ethanol und anschließend mit 2 ml ddH₂O gespült, auf den Lüftungslöchern der Sterilwerkbank auf Zellstofftüchern einzeln getrocknet und in einer Glaspetrischale zwischen zwei Filterpapierlagen so plaziert, daß sie nicht aneinander haften können. Nun werden sie autoklaviert und können in der Zellkultur verwendet werden.

Weiterhin ist es notwendig, daß die Zellen eine geringe Dichte aufweisen, da sonst die Morphologie der Zellen durch Kontakt zu anderen Zellen verändert wird. Es hat sich bei der Untersuchung von transfizierten COS-7-Zellen, mit denen alle Untersuchungen gemacht wurden, als zweckmäßig erwiesen, die Zellen in einer 60 mm Petrischale zu transfizieren, sie einen Tag wachsen zu lassen und sie dann in 6-Well-Platten mit Deckgläschen zu passagieren. Hierbei zeigte sich, daß Transfektanten leicht unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten besitzen, so daß man verschiedene Zellmengen eines Transfektanten in die Wells überführen sollte, um sich am darauffolgenden Tag das Well mit der optimalen Zelldichte auswählen zu können. Üblicherweise werden zwischen 1 und 4 x 10⁵ Zellen transferiert.

2.6.4.9.2 Fixierung und Permeabilisierung der Zellen

Bei diesem Vorgang muß ein Kompromiß zwischen zwei sich widersprechenden Zielen gefunden werden. Einerseits sollen die Zellen *in situ* sofort und irreversibel fixiert werden. Andererseits soll die Antigenität der zu untersuchenden Moleküle erhalten bleiben, und sie sollen für den Antikörper zugänglich sein. Die irreversible Fixierung erfordert eine starke Quervernetzung der subzellulären Strukturen, die Antigenität gar keine. Für die vorliegenden Antikörper erwies sich eine Standardfixierung/Permeabilisierung als guter Kompromiß.

Für die Fixierung werden die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen und danach mit 1 ml 3 % PFA (frisch oder zum ersten Mal aufgetaut) für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wird dreimal mit 2 ml PBS gewaschen und verbliebenes PFA durch 10minütige Inkubation mit 2 ml Neutralisationslösung inaktiviert. Nun wird noch dreimal mit 2 ml PBS gewaschen. Die Zellen können in diesem Stadium 1 bis 2 Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Permeabilisierung werden die Zellen 5 min mit 0,1 % Triton X-100/PBS behandelt. Bei großen Probenzahlen kann es daher nötig werden, die Permeabilisierung in zwei oder drei Durchgängen durchzuführen. Die Deckgläser werden dreimal mit 2 ml PBS gewaschen und es wird sofort mit der Immunmarkierung begonnen.

2.6.4.9.3 Immunmarkierung

Zunächst werden die unspezifischen Proteinbindungsstellen durch 30minütiges Inkubieren mit 0,5 ml Blockpuffer bei RT blockiert. Währenddessen wird der erste Antikörper in Blockpuffer verdünnt, wobei man etwa 20 µl mehr ansetzt als benötigt werden. Kurz vor Gebrauch wird die Antikörperverdünnung 3 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert.

Für die Inkubation mit dem Antikörper wird ein Einmalpapierhandtuch angefeuchtet und auf den Tisch gelegt. Darauf wird ein Stück Parafilm gelegt, ohne die nach oben weisende Fläche mit den Fingern zu berühren und ohne das sich unter dem Film Luftblasen bilden. Auf den Parafilm werden pro Deckgläschen 30 µl Antikörperlösung pipettiert. Das Deckgläschen wird aus dem Blockpuffer genommen, kurz mit PBS gespült und die Rückseite mit einem Filterpapier getrocknet. Von der Seite, an der die Zellen haften, wird das überschüssige PBS vorsichtig an einer Ecke mit Filterpapier abgesaugt und das Deckglas mit den Zellen nach unten in die Antikörperlösung gelegt. Während der nun folgenden 30minütigen Inkubation wird der zweite Antikörper wie beim ersten beschrieben vorbereitet.

Das Deckgläschen wird von der ersten Antikörperlösung genommen und dreimal 5 min mit 2 ml PBS gewaschen. Dann wird es vorsichtig getrocknet und in den zweiten Antikörpertropfen gelegt, für 30 min inkubiert und wie zuvor mit PBS gewaschen.

2.6.4.9.4 Einbettung

Als Einbettungsmedium dient Mowiol, welchem nach dem Auftauen noch 25 mg/ml 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)oktan (DABCO) als Ausbleichschutz zugesetzt werden.

Die Objektträger werden entsprechend den Experimenten beschriftet und pro Deckglas ein Mowiol/DABCO-Tropfen, etwa 30 μ l, aufgetragen. Die Deckgläschen werden aus dem PBS des letzten Waschschriffs genommen und kurz mit ddH₂O gespült um restliches PBS zu entfernen. Dieser Schritt dient dazu, die Salze zu entfernen, die sonst beim Trocknen auskristallisieren würden und so das Präparat und die Optik des Mikroskops beschädigen würden. Das gespülte Deckglas läßt man nun vorsichtig von der Seite auf den Mowiol-Tropfen gleiten. Es dauert mindestens eine Stunde, bis das Mowiol geliert und man sich das Präparat anschauen kann, sicherer ist es, das Einbettungsmedium über Nacht fest werden zu lassen. Die Präparate werden bei 4°C gelagert.

2.6.4.10 Frackelton-Extraktion

Die Frackelton-Extraktion dient der Gewinnung von Zellextrakten transfizierter Zellen um damit *Shift*-Experimente durchzuführen.

Pro Schale mit transfizierten Zellen werden 2 Eppendorfgefäße auf Eis vorgekühlt. Die Petrischalen werden unter der Sterilwerkbank auf Eis gestellt und das Medium abgesaugt. Es werden 200 μ l eiskalter Frackelton-Puffer zu jeder Schale gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden abgeschabt, in die vorbereiteten Eppendorfgefäße überführt, 45 s stark geschüttelt und 20 min zentrifugiert (4°C, 13000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415). Der Überstand wird in neue, vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

2.6.4.11 Modifizierte Frackelton-Extraktion

Da es bei der oben beschriebenen Methode nicht möglich ist, die Extrakte zweier Schalen miteinander zu vergleichen, wurde die bestehende Vorschrift modifiziert. Zum einen wird jede Schale zusätzlich mit einem β -Gal-Vektor transfiziert und dann über das β -Galaktosidase-Assay die Transfektionseffizienz, zum anderen wird die Zelldichte durch Auszählen bestimmt.

Damit diese beiden Untersuchungen durchgeführt werden können, ist das Protokoll der Extraktion wie folgt geändert worden:

Alle Arbeiten sind auf Eis unter einer Sterilwerkbank auszuführen. Von den Petrischalen mit transfizierten Zellen wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 300 µl Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche gelöst. Anschließend werden sie mit einem Zellkulturschaber zusammengesoben und in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführt. Es wird 1 ml Medium zugegeben und die Zellen werden 20 min bei 1000 g sedimentiert. Dieser Waschschrift wird wiederholt und die Zellen am Schluß in 1 ml Medium resuspendiert. Durch die Waschschrift wird das Trypsin weitgehend entfernt.

Von dem Milliliter werden 50 µl abgenommen mit 50 µl 0,4 % Trypanblau versetzt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Weitere 350 µl werden 3 min bei 6000 rpm (4°C, Eppendorf Centrifuge 5415) zentrifugiert, das Pellet in 350 µl Extraktionspuffer resuspendiert, 10 min bei RT inkubiert und der β -Galaktosidase-Assay nach der Vorschrift weitergeführt.

Die restlichen 650 µl werden 3 min bei 6000 rpm (4°C, Eppendorf Centrifuge 5415) zentrifugiert und das Pellet in 200 µl Frackelton-Puffer resuspendiert. Man inkubiert 5 min auf Eis und durchmischt die Suspension 1 min auf einem mechanischen Schüttler. Es schließt sich eine 20minütige Zentrifugation bei 4°C an, nach welcher der Überstand in, auf -80°C temperierte, Eppendorfgefäße in einem Aluminiumblock pipettiert und bei dieser Temperatur gelagert wird.

Durch die Bestimmung der Zellzahl und der Transfektionseffizienz ist es möglich einen Koeffizienten auszurechnen, mit dem sich vergleichbare Proteinnengen für zum Beispiel *Shift*-Ansätze bestimmen lassen.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Plasmidpräparation

a.) aus *Escherichia coli*

Für Plasmidpräparationen aus *E.coli* wurden Materialien und Vorschrift der Firma Qiagen verwendet.

Es handelt sich dabei um die Kombinationen der alkalischen Extraktionsmethode (Birnboim, 1979) mit anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung der DNA, wodurch die Abtrennung von chromosomaler DNA, RNA und Proteinen vereinfacht wird. In Abhängigkeit

vom Kulturvolumen werden verschiedene, jedoch nur leicht unterschiedliche Protokolle verwendet:

- Minipräparation

Eine 12 bis 16 Stunden bei 37°C inkubierte Suspensionskultur (4 ml) von *E.coli* wird zentrifugiert (3500 g) und das Pellet in Puffer P1 (enthält RNase) resuspendiert (Puffervolumina siehe Tabelle: 5). Anschließend erfolgt der Zellaufschluß durch Zugabe und fünfminütige Inkubation mit Puffer P2 (alkalischer Aufschluß). Nach Zugabe von Puffer N3 (Neutralisation und Fällung) und nachfolgender Inkubation auf Eis (5 min) werden Proteine und chromosomale DNA durch zehnmünütige Zentrifugation (13000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415) abgetrennt. Das klare Lysat enthält die Plasmid-DNA. Diese wird an eine QIAprep-spin-Säule gebunden, durch Waschen mit Puffer PE gereinigt und durch Zugabe von Puffer EB eluiert.

- Midi- und Maxipräparation

Das Kulturvolumen bei Midipräparationen beträgt 100 ml, bei Maxipräparationen 250 beziehungsweise 500 ml. Resuspension und Aufschluß der Zellen erfolgt analog zur Minipräparation. Die Neutralisation und Präzipitation geschieht durch Zugabe von Puffer P3 und anschließender 15-20minütiger Inkubation auf Eis. Es folgt eine 30minütige Zentrifugation (6300 g, 4°C). Zur Isolierung der Plasmid-DNA werden Qiagen tip-100-beziehungsweise tip-500-Säulen benutzt. Diese werden zuvor mit Puffer QBT äquilibriert und binden die Plasmid-DNA des klaren Lysats. Nach Waschen mit Puffer QC wird die DNA mit Puffer QF eluiert, mit Isopropanol gefällt und für 30 Minuten bei 6300 g sedimentiert. Das Pellet wird nochmals mit 70 % Ethanol gewaschen und in EB-Puffer aufgenommen.

Tabelle 5: Mengenangaben für eingesetzte Puffer in Mini-, Midi- und Maxipräparationen

	Mini-Präp.	Midi-Präp.	Maxi-Präp.
Puffer P1 [ml]	0,25	4	10
Puffer P2 [ml]	0,25	4	10
Puffer N3 [ml]	0,35	-	-
Puffer P3 [ml]	-	4	10
Puffer QBT [ml]	-	4	10
Puffer QC [ml]	-	2 x 10	2 x 30
Puffer PE [ml]	2 x 0,75	-	-
Puffer QF [ml]	-	5	15
Isopropanol [ml]	-	3,5	10,5
Ethanol 70 % [ml]	-	2	5
Puffer EB [µl]	50	150	250

b.) aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolierung von Plasmiden aus Hefezellen wurde nach der Methode von Ling *et al.* (Ling, 1985) mit Vorschrift und Materialien der Firma Clontech durchgeführt.

Eine zu präparierende Hefekolonie wird auf ein entsprechendes SD-Festmedium ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Man entnimmt etwa 1 cm² des Zellrasens und resuspendiert in 50 µl TE-Puffer. Bei einem anderen Protokoll wird die Kolonie in 500 µl SD-Flüssigmedium 18-20 Stunden inkubiert und anschließend abzentrifugiert.

Der Zellaufschluß erfolgt enzymatisch durch Inkubation der Suspension mit 50 U Lytikase für 60 min bei 37°C. Der enzymatischen Lyse folgt eine Behandlung mit 10 µl einer 20 %igen SDS-Lösung und einminütiges Schütteln, gefolgt vom Einfrieren der Suspension. Nach dem Auftauen wird die Suspension auf eine CHROMA SPIN-1000-Säule aufgetragen, die mit DEPC-H₂O äquilibriert wurde und bei 700 g fünf min zentrifugiert. Proteine, RNA und ein Teil der genomischen Hefe-DNA werden dabei von der Plasmid-DNA abgetrennt. Im Eluat befindet sich ein Gemisch aus Plasmid- und restlicher genomischer DNA.

Zur Isolierung reiner Plasmid-DNA ist es notwendig, *E.coli*-Bakterien (TG1, HB101) mit einem Aliquot des Eluats zu transformieren. Der Transformationsansatz wird in Selektionsmedien über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend nach der Methode der

Minipräparation (siehe 2.7.1 a.) weiterverarbeitet. Aufgrund der geringen Kopienzahl pro Hefezelle und der daraus zu erwartenden geringen Plasmid-Konzentration im Eluat ist die Elektroporation der chemischen Transformation vorzuziehen.

2.7.2 Präparation genomischer DNA

Eine 20 ml Übernachtkultur von nicht transformierten LK111(λ) wird 10 min bei 4000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 10 ml DNAzol[®] resuspendiert und gut durchmischt. Es folgt eine 10 minütige Zentrifugation bei 6000 g. Der klare Überstand wird in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt und mit 10 ml Ethanol (96 %) versetzt. Anschließend wird 15 min bei 6000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit einem Gemisch aus 700 μ l DNAzol und 300 μ l Ethanol (96 %) und danach mit 1 ml Ethanol (70 %) vorsichtig gewaschen. Am Schluß wird die genomische DNA in 500 μ l TE aufgenommen.

2.7.2.1 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Das zu isolierende DNA-Fragment wird unter UV-Licht aus einem EtBr-gefärbten Agarosegel (siehe 2.7.6.1) ausgeschnitten und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Pro 100 mg Gel werden 300 μ l Puffer QG zugegeben und das Gemisch bis zur vollständigen Auflösung des Gels bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 μ l Isopropanol/100 mg Gel wird der Ansatz auf eine QIAquick-spin-Säule überführt, eine Minute zentrifugiert (13000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5415) und auf der Säule mit 750 μ l PE gewaschen. Die DNA wird mit 50 μ l EB-Puffer eluiert.

2.7.3 DNA-Modifikationen

2.7.3.1 Restriktionsspaltung von DNA

Es finden folgende Restriktionsenzyme mit den angegebenen Erkennungssequenzen Verwendung.

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz mit markierter Spaltstelle
<i>AccI</i>	GT↓PuPyAC
<i>AvaI</i>	C↓PyCGPuG
<i>BamHI</i>	G↓GATCC
<i>BglII</i>	A↓GATCT
<i>BlpI</i>	GC↓TNAGC
<i>BsuRI</i>	GG↓CC
<i>EagI</i>	C↓GGCCG
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC
<i>EcoRV</i>	GAT↓ATC
<i>HaeII</i>	PuGCGC↓Py
<i>HaeIII</i>	GG↓CC
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT
<i>NcoI</i>	C↓CATGG
<i>NlaIII</i>	CATG↓
<i>NotI</i>	GC↓GGCCGC
<i>PaeI</i>	GCATG↓C
<i>PflMI</i>	CCANNNN↓NTGG
<i>PshAI</i>	GACNN↓NNGTC
<i>PvuII</i>	CAG↓CTG
<i>SmaI</i>	CCC↓GGG
<i>SphI</i>	GCATG↓C
<i>TaqI</i>	T↓CGA
<i>Tsp509I</i>	↓AATT
<i>XbaI</i>	T↓CTAGA
<i>XhoI</i>	C↓TCGAG
<i>XmaI</i>	C↓CCGGG
<i>XmnI</i>	GAANN↓NNTTC

Für eine Restriktionsspaltung werden, je nachdem ob es sich um einen analytischen oder präparativen Ansatz handelt, 1 bis 10 µg DNA, 10 x Puffer (Ansatzgröße: 10 bis 50 µl) und 10 bis 50 U Enzym eingesetzt. Der Spaltansatz wird 1 bis 4 Stunden bei der vom Hersteller

angegebenen Temperatur inkubiert, anschließend mit 5 bis 25 µl Stoppuffer versetzt und auf einem Agarose- beziehungsweise Acrylamidgel analysiert.

2.7.3.2 Ligation linearer DNA

Ein linearisiertes Plasmid, etwa 100 bis 200 ng, und ein zu ligierendes DNA-Fragment werden im molaren Verhältnis Rahmen:Insert \cong 1:3 gemischt, mit 10 x Ligasepuffer und 5 bis 10 U Ligase versetzt. Der Ansatz wird vier Stunden bei Raumtemperatur oder alternativ 16 Stunden bei 10°C inkubiert. Die Gesamtmenge des Ligationsansatzes wird direkt zur Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt. Wird eine Elektroporation durchgeführt, verwendet man nur ein Aliquot, da sonst die Salzkonzentration in der Elektroporationsküvette zu groß würde.

2.7.3.3 Dephosphorylierung von DNA

Für die zuvor beschriebene Ligation ist es nötig, daß zumindest auf einer der beiden zu verknüpfenden Seiten des DNA-Stranges eine Phosphatgruppe vorhanden ist. Um die Religation eines Rahmens zu verhindern, ist es sinnvoll, die Phosphatgruppen zu entfernen, da sie vom *Insert* bereitgestellt werden. Diese Spaltungsreaktion wird von der Alkalischen Phosphatase (CIAP) durchgeführt, welche in den gängigen Restriktionsendonukleasepuffern arbeitet, so daß man sie direkt im Anschluß an eine Restriktionsspaltung der Reaktionsmischung zusetzen kann. Man verwendet 1 U CIAP/20 pmol DNA und inkubiert 30 min bei 37°C. Anschließend wird die Phosphatase durch 20minütiges Erhitzen auf 85°C inaktiviert und die DNA über ein Agarosegel aufgearbeitet (siehe 2.7.6.1).

2.7.3.4 Auffüllen von Überhängen nach der Restriktionsspaltung

In einigen Fällen ist es notwendig, die bei der Restriktionsspaltung generierten Überhänge (*Sticky Ends*) aufzufüllen, so daß stumpfe Enden (*Blunt Ends*) entstehen. Dazu wird das, nach der Spaltung über ein Agarosegel aufgereinigte, lineare Plasmid mit einer Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP (dNTP's) versetzt und mit Klenow-Polymerase 30 min bei

37°C inkubiert. Das Enzym wird anschließend durch 10minütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert. Die DNA kann direkt weiter eingesetzt werden.

Ein typischer Reaktionsansatz besteht aus etwa 2 bis 5 µg lineariertem Plasmid (50 µl, nach der Gelextraktion), 1 µl dNTP's (2 mM), 16 U Klenow-Polymerase, 7 µl 10 x Klenow-Puffer und wird mit ddH₂O auf 70 µl aufgefüllt.

2.7.4 PCR

Für die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*) wurde der Thermocycler Primus 25 der Firma MWG-Biotech eingesetzt. Folgende Polymerasen wurden verwendet:

- *Pyrococcus furiosus* DNA-Polymerase (*Pfu*, Stratagene)
- *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase (*Taq*, MBI-Fermentas)
- Expand[®] *high fidelity* PCR-System (Boehringer Mannheim), Thermostabile DNA-Polymerase-Mischung

Die PCR wurde zum *Screening* von Klonen nach einer Liaktion, zum Amplifizieren von *Inserts* oder zum Einfügen neuer Schnittstellen benutzt. Die typische Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6: Mengenangaben für PCR-Ansätze

	<i>Analytische PCR</i>	<i>Präparative PCR</i>
10 x Puffer	2,5 µl	12,5 µl
dNTPs [2 mM]	2,5 µl	12,5 µl
3' <i>Primer</i> [10 µM]	2,5 µl	12,5 µl
5' <i>Primer</i> [10 µM]	2,5 µl	12,5 µl
DNA-Polymerase [U]	0,5	5
ddH ₂ O	<i>ad</i> 25 µl	<i>ad</i> 125 µl

Als *Template* dient für die analytische PCR eine Bakterienkolonie oder eine Probe der zu untersuchenden Plasmidlösung. Für eine präparative PCR werden dem Ansatz 0,5 bis 1 µg DNA zugesetzt.

Tabelle 7 zeigt einen typischen PCR-Zyklus.

Tabelle 7: Exemplarischer PCR-Zyklus

	1	2	3	4	5	6
T [°C]	94	94	50-70	72	72	4
Zeit [s]	300	60	60	60	180	∞

1: Einleitender Denaturierungsschritt

2: Denaturierung

3: Annealing } 15 bis 25 Wiederholungen

4: Elongation

5: Abschließender Elongationsschritt

6: Endtemperatur

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgt nach einem Protokoll der Firma Qiagen über QIAquick-spin-Säule gemäß den Herstellerangaben.

Verwendete *PCR*-Primer

Die verwendeten *PCR-Primer* wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen beziehungsweise von Dr. Heiner Wolfes mit einer vollautomatischen Syntheseapparatur (Beckman) nach der Cyanoethylphosphoamidit-Methode synthetisiert. Die Primersequenzen sind im Anhang oder an entsprechender Stelle bei der Durchführung angegeben.

2.7.5 Sequenzierung von DNA

Das im folgenden beschriebene Sequenzierverfahren basiert auf der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger, 1977).

1. Denaturierung und Fällung von DNA

1-2 µg DNA in 32 µl ddH₂O werden mit 8 µl 2 M NaOH versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wird mit 7 µl 3 M NaAc (pH 5,2) und 4 µl ddH₂O neutralisiert und die DNA durch Zugabe von 120 µl eiskaltem 100 % Ethanol und anschließender Inkubation bei -70°C eine Stunde gefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm (4°C, Eppendorf Centrifuge 5415) wird das Sediment in 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das bei 37°C getrocknete Pellet wird in 10 µl ddH₂O aufgenommen (*Template*).

2. Annealing

Ansatz:

10 µl	<i>Template</i>
2 µl	<i>Annealing-Puffer</i>
je 2 µl	<i>Primer</i> (10 pmol)

Der Ansatz wird fünf Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend weitere zehn Minuten bei 37°C inkubiert.

Die verwendeten Sequenzier*primer* sind im Anhang aufgeführt.

3. Markierungsreaktion

Ansatz:

14 µl	<i>Annealingansatz</i>
3 µl	<i>Labelling-Mix</i> (je 2 mM dGTP, dCTP und dTTP in ddH ₂ O)
1 µl	[α - ³⁵ S] dATP (10 µCi/µl)
2 µl	T7 DNA-Polymerase (1,5 U/µl)

Das Gemisch wird anzentrifugiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

4. Terminationsreaktion

Vier 1,5 ml-Reaktionssgefäße mit je 2,5 µl eines Didesoxynukleotids (A-, T-, G- beziehungsweise *C-Read Short-Mix*) werden für eine Minute bei 37°C vorgewärmt. Nach Zugabe von je 4,5 µl des Markierungsansatzes folgt eine fünfminütige Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 µl Sequenzierauftragspuffer gestoppt und die Proben bis zur Gelelektrophorese bei 4°C aufbewahrt (Gel siehe 2.7.6.5).

2.7.6 Gel-Elektrophoresen

2.7.6.1 Agarosegel-Elektrophorese

Agarosegele eignen sich zur präparativen und analytischen Auftrennung von DNA einer Größe > 250 bp. Bei Standardgelen, die zur Qualitätskontrolle von Plasmidpräparationen oder Restriktionsspaltungen dienen, wird 1 g Agarose in 100 ml 1 x TPE-Puffer durch Aufkochen

gelöst und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Plexiglaskämme formen die Probestaschen aus. Nach dem Erstarren wird das Gel mit TPE-Puffer bedeckt. Der Gellauf erfolgt über 1 bis 2 Stunden bei 60 bis 70 mA unter Wasserkühlung. Nach Färbung mit Ethidiumbromid (20 µl auf 50 ml Wasser, 10 min) und anschließender Entfärbung in Wasser (20 min) wird das Gel unter UV-Licht (312 nm) betrachtet und mit einem Videosystem (E.S.A.Y, Firma Herolab) dokumentiert.

2.7.6.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAAGE)

Für die Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten (50 bis 1000 bp) eignet sich die Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAAGE). Es werden Minigel (9 x 7 x 0,1 cm) benutzt. Für ein 10 %iges Acrylamidgel benötigt man:

5 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
1 ml	10x TPE-Puffer
4 ml	ddH ₂ O

Die Polymerisation wird durch Zugabe von 20 µl TEMED und 20 µl 40 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) ausgelöst. Die Lösung wird dann zügig zwischen die Glasplatten gegossen, welche die Kammer bilden, und der Kamm eingesetzt. Nach etwa 30 Minuten ist die Polymerisation abgeschlossen und das Gel kann in die Elektrophoreseapparatur gespannt werden. Als Laufpuffer wird TPE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wird bei 30 mA durchgeführt und dauert etwa eine Stunde. Anschließend wird das Gel 5 min in ETBr gefärbt und 10 min in Wasser entfärbt, bevor es auf den UV-Tisch (312 nm) betrachtet und mittels eines Videosystems dokumentiert wird.

2.7.6.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAAGE)

Die SDS-PAAGE (Laemmli, 1970) wird sowohl für die Überprüfung der Induktion bei Expressionsexperimenten als auch zur Reinheitsbestimmung bei der Proteinaufreinigung eingesetzt. Das Gel besteht aus zwei Teilgelen, dem Trenngel und dem, auf dem Trenngel aufpolymerisierten, Sammelgel. Die Zusammensetzung der Teilgele ist wie folgt:

- Trenngel (17,5 %ig)

5,8 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
2,8 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
1 ml	1 % SDS
0,4 ml	ddH ₂ O

Zum Start der Polymerisationsreaktion werden zugesetzt:

25 µl	TEMED
25 µl	APS (40 %)

- Sammelgel (6 %ig)

300 µl	30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
190 µl	1 M Tris/HCl, pH 6,8
150 µl	1 % SDS
910 µl	ddH ₂ O

Zum Start der Polymerisationsreaktion werden zugesetzt:

4 µl	TEMED
4 µl	APS (40 %)

Es wird eine Minigelkammer benutzt. Die Proben werden vor dem Auftragen 5 min auf 95°C erhitzt. Der Gellauf erfolgt über etwa 1,5 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA. Das Gel wird durch Aufkochen mit Coomassie-Färbelösung angefärbt, in 7 %iger Essigsäure entfärbt und mit einem Videosystem dokumentiert.

2.7.6.4 Shadow Cast-Gel-Elektrophorese

Die *Shadow Cast*-Gel-Elektrophorese dient der Reinigung der nach der Cyanoethylphosphoamidit-Methode synthetisierten Oligonukleotide. Man verwendet ein 20 x 20 x 0,1 cm großes, denaturierendes, 15 %iges Polyacrylamidgel folgender Zusammensetzung:

30 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
3 ml	TTE 20 x
25,2 g	Harnstoff
5 ml	ddH ₂ O

Zum Start der Polymerisationsreaktion werden zugesetzt:

120 μ l TEMED

120 μ l APS 40 %

Als Laufpuffer wird 1 x TTE verwendet. Das Gel benötigt einen Vorlauf von 30 min bei 500 V, wobei die Taschen mit etwas Azorubinauftragspuffer (AAP) befüllt werden, um den Lauf kontrollieren zu können. Anschließend werden die Taschen mit TTE gespült, um aus dem Gel diffundierten Harnstoff zu entfernen. Die Proben werden in einer SpeedVac lyophilisiert und in einem geeigneten Volumen ddH₂O, abhängig von der Taschengröße, aufgenommen. Die Lösung wird dann mit AAP versetzt und auf das Gel aufgetragen. Nun wird die Elektrophorese bei 500 V durchgeführt, bis der Azorubinfarbstoff die Gelunterkante erreicht hat.

Nach der Elektrophorese wird das Gel auf eine Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt und von oben mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt. An den Stellen, an denen sich DNA befindet wird das UV-Licht absorbiert und es entsteht eine dunkle Stelle (Schatten, *Shadow Cast*). Das gewünschte Fragment wird mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und über Nacht mit 2 ml TE unter Schütteln aus dem Gelstück eluiert. Die Lösung wird auf 1 ml eingengt und über NAP-10 Säulen (Firma Pharmacia) entsalzt.

2.7.6.5 Sequenziergel

Die elektrophoretische Auftrennung der radioaktiv markierten DNA-Fragmente der Sequenzierreaktion (siehe 2.7.5) erfolgt in einem 6 %igen, denaturierenden Polyacrylamidgel mit konischen *Spacern* (0,2 bis 0,6 mm Dicke).

Die mit Ethanol gereinigten Glasplatten werden mit Haftsilan (40 μ l Silan A-174 = τ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan, BDH) und 200 μ l 10 %ige (v/v) Essigsäure in 10 ml Ethanol) beziehungsweise *Repellsilan* (5 ml 10 %iges Dichlordimethylsilan in Toluol) beschichtet und die Platten nach etwa 10 min Trocknungszeit gründlich poliert. Für 50 ml 6 %ige Acrylamid-Lösung werden benötigt:

25 g Harnstoff

10 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

2,5 ml 20x TTE

mit ddH₂O auffüllen

Die Lösung wird unter leichter Erwärmung gerührt, bis der Harnstoff gelöst ist. Durch Zugabe von 27 μl TEMED und 270 μl APS 40 % (w/v) wird die Polymerisation gestartet und das Gel für eine Stunde auspolymerisiert.

Das Gel wird in eine temperierbare Elektrophoresekammer ($T \approx 55^\circ\text{C}$) eingebaut. Beide Pufferbehälter werden mit 1 x TTE-Puffer gefüllt. Die Auftragstaschen werden von Luftblasen befreit, mit etwa 2 μl SAP gefüllt. Ein Vorlauf wird für 30 bis 60 min bei 1500 V durchgeführt.

Anschließend werden 2 μl der vorbereiteten Proben (2 min auf 95°C erhitzen) in die Taschen pipettiert und die DNA-Fragmente bei 1500 V etwa 2 bis 3 h getrennt, bis das Bromphenolblau des Auftragspuffers das Gelende erreicht hat.

Zur Entfernung des Harnstoffs wird das Gel für 1 bis 2 h in 10 %ige (w/v) Essigsäure gelegt und anschließend bei 65°C getrocknet. Die radioaktiv markierten Banden werden durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Firma Kodak; Kodak Bio Max) sichtbar gemacht.

2.7.6.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der EMSA wird in 0,5x TTE durchgeführt. Als Substrat dient der mittels PCR amplifizierte mim-1-Promotor, wobei die *Primer* 3'-markiert wurden. Alternativ wird ein 5'-markiertes Oligodesoxynukleotid-Paar benutzt. Man verwendet ein 6 %iges Acrylamidgel mit dem Abmessungen 20 x 20 x 0,1 cm. Die Komplexe werden 30 min bei 4°C in *Shift*-Puffer vorinkubiert (Schweers, 1993). Alle Oligodesoxynukleotide werden durch Gelfiltration mit MicroSpinTM-Säulen (Firma Pharmacia) nach Angaben des Herstellers (Pharmacia 1993) gereinigt. Die Reinigung des PCR-Produktes erfolgt mit dem Qiagen QIAquick PCR Purification Kit. Der Gellauf erfolgt 90 min bei 170 V.

Markierungsansatz für 5'-Phosphorylierungen:

je 15 μl	Oligonukleotid (100 μM)
8 μl	5 x Kinasepuffer
1 μl	200 mM DTT
4 μl	[γ - ^{32}P] dATP (Firma Amersham, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
1 μl	T4-Polynukleotidkinase (5 U/ μl , MBI-Fermentas)

Markierungsansatz für 3'-Phosphorylierungen:

15 µl	Oligonukleotid (100 µM)
6 µl	5x Terminale Transferase-Reaktionspuffer
1 µl	[α - ³² P] ddATP (Firma Amersham, 10 µCi/µl)
7,5 µl	ddH ₂ O
0,5 µl	Terminale Transferase (10 U/µl, Stratagene)

Die Inkubationsdauer beträgt jeweils 60 min bei 37°C. Anschließend erfolgt fünfminütiges Erhitzen auf 95°C, um die Enzyme zu deaktivieren. Das Oligonukleotidpaar wird langsam abgekühlt, damit ein *Annealing* stattfinden kann. Das als *Primer* verwendete Oligonukleotid wird mittels Qiagen QIAquick Nucleotide Removal Kit gereinigt und für die PCR eingesetzt.

2.7.7 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

1. Zellaufschluß und Bindung an GSH-Sepharose

Einer Zellsuspension in 50 ml PBS (Aliquot aus einem Fermenter) werden 1 % Triton X-100 und 400 µl PMSF (100 mM) zugegeben. Die Zellen werden durch Ultraschallbehandlung im Eisbad (Branson Sonifier 250, Stufe 6, 3 x 30 Sekunden) aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (1 Stunde, 6000 g, 4°C). Das im Zelllysate befindliche GST-Fusionsprotein wird an GSH-Sepharose gebunden. Hierzu wird das Lysat mit 1 ml GSH-Sepharose zwei Stunden lang in einem 50 ml Falcon-Gefäß bei Raumtemperatur geschüttelt. Nun wird das Säulenmaterial mit dem gebundenen GST-Fusionsprotein sedimentiert, zwei mal mit PBS-Puffer gewaschen und in 5 ml PBS aufgenommen.

Für die anschließende Proteinisolierung stehen zwei Methoden zur Verfügung:

2a. Spaltung mit Thrombin

Die Suspension von Säulenmaterial mit daran gebundenem GST-Fusionsprotein in PBS wird nach Äquilibrierung mit TBS-Puffer in Gegenwart von 2 mM CaCl₂ mit 5 U Thrombin für 4 bis 22 Stunden bei 4°C gespalten. Anschließend wird das Säulenmaterial durch Zentrifugation abgetrennt. Das Protein befindet sich im Überstand. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch durch die Aufnahme von Spektren im Wellenlängenbereich zwischen 240 nm und 320 nm.

2b. Elution mit Glutathion

Das beladene Säulenmaterial wird auf eine Säule mit einer Keramikfritte aufgebracht und durch mehrfaches Eluieren mit 1 ml 1 x PBS/50 mM Glutathion das Protein von seiner GST-Bindungsstelle verdrängt und somit vom Säulenmaterial abgelöst. Die Konzentrationsbestimmung gestaltet sich aufgrund des im Eluat enthaltenen Glutathions etwas aufwendiger. Man vergleicht hierzu eine Probe des Eluat auf einem Laemmligel mit anderen Proteinbanden verschiedener, bekannter Konzentration und kann so über einen Intensitätsvergleich die Konzentration der Probe abschätzen. Eine weitere Möglichkeit ist über eine Auswertungssoftware (E.A.S.Y) die Intensität der Banden bei bekannter Konzentration zu bestimmen und mittels Linearer Regression die Intensität der Probenbande in Korrelation zur Konzentration zu setzen.

2.7.8 Aufreinigung von (His)₆-tag-Proteinen

2.7.8.1 Affinitätschromatographie

Der Aufschluß der Zelle erfolgt analog zu den GST-Fusionsproteinen (siehe 2.7.7) mit Ultraschall. Zur Aufreinigung eines Aliquots (50 ml) aus einem Fermenter wird eine Säule mit 1 ml Ni²⁺-NTA-Agarose gepackt und mit 15 ml PDL (10 mM Imidazol) äquilibriert. Der Überstand nach der Zentrifugation wird zum Aufbringen auf die Säule drei mal über das Säulenmaterial gegeben. Anschließend wäscht man zuerst mit 50 ml PDL (10 mM Imidazol), danach mit 5 ml PDL (30 mM Imidazol) und eluiert das Protein anschließend zweifach mit 1 ml PDL mit einer steigenden Imidazolkonzentration beginnend bei 75 mM und 200 mM als Maximalkonzentration. Durchlauf, die beiden Waschfraktionen, das Säulenmaterial und die eluierten Proteinfractionen werden auf einem Laemmligel analysiert (siehe 2.7.6.3). Hierzu ist es bei geringer Proteinkonzentration nötig, die in den Lösungen enthaltenen Proteine zu konzentrieren, da das Probenvolumen 20 µl nicht übersteigen darf (Größe der Probetaschen). Man versetzt ein Aliquot der Proteinlösung auf Eis mit 1/10 des Volumens an 100 %iger Trichloressigsäure (TCA), wodurch die Proteine ausgefällt werden. Sie werden dann bei 4°C und 14000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415) für 15 min sedimentiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Pellet mit 20 µl LAP aufgenommen. Sollte der Farbstoff des Puffers einen Farbumschlag zeigen wird mit 0,5 µl 2 M Tris (nicht eingestellt) neutralisiert.

2.7.8.2 Ionenaustauscherchromatographie

Das Protein sollte nach dem ersten Aufarbeitungsschritt (siehe 2.7.8.1) in etwa 80 %iger Reinheit vorliegen. Bei dem Protein Rcd1+ wird nach der Affinitätssäule eine Säule mit Phosphozellulose (P-Cell, Whatman) verwendet, an der DNA-bindende Proteine gebunden werden. So kann das Protein zu 90 bis 98 % rein dargestellt werden (Coomassie-Färbung).

Die Protein enthaltenden Fraktionen werden mit 20 ml äquilibrierter (PDL, 100mM NaCl) P-Cell-Suspension versetzt und 1,5 Stunden bei 4°C geschüttelt. Die Suspension wird in eine Säule gegeben und mit 50 ml PDL (100 mM NaCl) gewaschen. Anschließend wird ein linearer Salzgradient verwendet, mit je 75 ml PDL und PDL (2 M NaCl) und mit einem Fraktionssammler etwa 5 ml große Aliquots aufgefangen. Von diesen wird ein Teil durch TCA gefällt und zusammen mit dem Durchlauf, dem *Wasch* und dem Säulenmaterial auf einem Laemmligel (siehe 2.7.6.3) analysiert. Bei einer großen Fraktionsanzahl ist es vorteilhaft, erst durch UV-Spektroskopie die proteinhaltigen Proben zu identifizieren (Absorption bei 280 nm), und sich für die weitere Untersuchung auf diese Proben zu beschränken.

2.7.9 DNA-Zellulose-Bindungs-Assay

DNA-Zellulose-Chromatografie ist ein etabliertes Verfahren, die Bindungsfähigkeit eines Proteins an DNA zu untersuchen. Dazu wird 1 ml DNA-Zellulose-Suspension mit etwa 8 bis 10 ml Proteinlösung ($c \approx 150$ ng/ml) 30 min bei RT in einem 15 ml Falcon-Gefäß geschüttelt. Anschließend wird die Suspension in eine Säule mit Keramikfritte überführt, wobei der Durchlauf noch ein zweites mal über die Säule gegeben wird. Nun wird mit einem Stufengradienten mit steigender Salzkonzentration in 1 ml Schritten eluiert. Zur Herstellung des Stufengradienten werden die Puffer Z1 und Z2 verwendet, wobei Z1 kein KCl enthält und Z2 2 M KCl. Die Elution wird mit reinem Z1 begonnen und der Anteil von Z2 pro Stufe um 100 μ l erhöht, so daß auf der elften Stufe eine Salzkonzentration von 2 M erreicht wird. Von Durchlauf und Eluaten wird jeweils ein Aliquot genommen und durch TCA-Fällung (siehe 2.7.8.1) die Proben konzentriert. Sie werden zusammen mit dem Säulenmaterial auf ein Laemmligel (siehe 2.7.6.3) aufgetragen. Findet eine Bindung des Proteins an DNA statt, so sollte sich auch in Proben mit hoher Salzkonzentration (etwa 1 M) noch eine Bande auf dem Laemmligel zeigen.

3 Durchführung und Ergebnisse

3.1 Etablierung eines modifizierten *Phage-Display*-Systems

Das *Phage-Display* soll im Rahmen dieser Arbeit angewendet werden, um intermolekulare Interaktionen des Proto-Onkogenproduktes c-Myb mit möglichen Wechselwirkungspartnern zu untersuchen, daß heißt es soll nach neuen Interagenten gesucht, beziehungsweise die Interaktion mit im *Yeast-Two-Hybrid*-System gefundenen Kandidaten verifiziert werden. Ausgehend von der Arbeit und den Ergebnissen von Kiewitz (Kiewitz, 1997a) wurden Überlegungen angestellt, wie das bestehende System verbessert werden könnte. Kiewitz hatte den pCANTAB5E-Vektor dahingehend modifiziert, daß in die *Linkersequenz* ein neuer *Polylinker* mit den Erkennungssequenzen von drei *Blunt*-schneidenden Restriktionsendonukleasen klonierte (siehe Anhang) wurde. Da Ligationen von *Blunt-End*-Fragmenten weniger effizient sind als die mit *Sticky-End*-Fragmenten, lag es nahe, Erkennungssequenzen für *Sticky-End*-erzeugende Restriktionsendonukleasen einzuführen. Außerdem ist es sinnvoll, die Transformationsbedingungen und Methoden zu verbessern. In den folgenden Abschnitten wird der schematische Ablauf eines *Phage-Displays* und die Klonierung der Phagemid-Vektoren für die Produktion der benötigten rekombinanten Bakteriophagen beschrieben.

3.1.1 Schematischer Ablauf eines *Phage-Displays*

Der Ablauf eines *Phage-Displays* läßt sich in drei Bereiche gliedern. In der Vorbereitungsphase werden die Phagemid-Vektoren und die Expressionsvektoren für das zu untersuchende Protein kloniert. In diese Vorbereitungsphase gehört auch die Anzucht von Wildtypphagen, die Proteinexpression und -aufreinigung, sowie die Beschichtung einer Mikrotiterplatte mit dem zu untersuchenden Protein. Als nächstes schließt sich die Phase des eigentlichen *Phage-Displays* an, in der Bakterien mit den Phagemid-Vektoren transformiert und mit Wildtypphagen infiziert werden. Die dabei entstehenden rekombinanten Phagen werden aufgereinigt und im *Panning* in Kontakt mit dem zu untersuchenden Protein gebracht. Nach dem *Panning*, bei dem die Phagen mit einer erhöhten Affinität zu dem vorgelegten Protein angereichert werden, wird aus den durch das *Panning* erhaltenen Bakterienkolonien der Phagemid-Vektor isoliert und ein neuer Zyklus mit der Transformation des Vektors

begonnen (siehe Abbildung 27). Man führt drei bis vier solcher Anreicherungszyklen aus, je nach Stärke der Anreicherung.

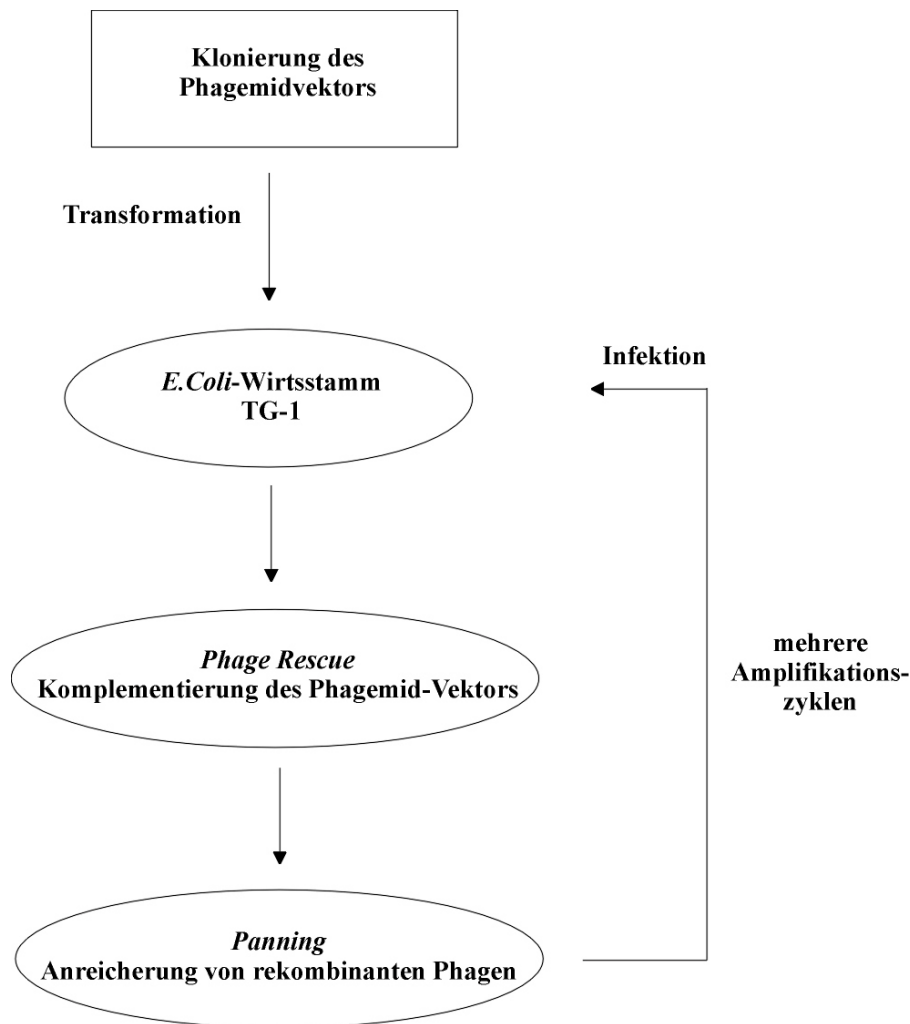


Abbildung 27: Schema eines Amplifikationszyklus'

In der dritten Phase werden die nach dem letzten Anreicherungszyklus gewonnenen Phagemid-Vektoren sequenziert und die Ergebnisse mittels einer Datenbanksuche auf signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten Genen untersucht. Dieses Vorgehen ist bei der Untersuchung von DNA-Bibliotheken erforderlich und entfällt, wenn intramolekulare Wechselwirkungen oder Kontakte bei zwei bekannten Proteinen untersucht werden. Bei den beiden zuletzt genannten Anwendungen endet das *Phage-Display* nach der Auszählung der Kolonien. Es ist auch nicht notwendig, mehrere Zyklen zu durchlaufen, da nur ein Phagemid-Vektor verwendet wird (kein Pool, wie beim *Screening* einer Bibliothek).

3.1.2 Klonierung der Phagemid-Vektoren

Um die angesprochenen Modifikationen in pCANTAB5E durchzuführen, wurde als Basis das von Kiewitz modifizierte Konstrukt gewählt. Dabei war es von Vorteil, daß die von ihm eingeführte *SmaI*-Schnittstelle (*Blunt-End*) die gleiche Erkennungssequenz besitzt wie *XmaI*, das allerdings ein *Sticky-End* erzeugt. Man hatte also die Möglichkeit, über *XmaI* und *NotI* einen neuen *Polylinker* gerichtet in den Vektor einzuführen. Bei dem Design der Nukleotidsequenz spielte vor allem die angestrebte Verwendung von cDNA-Bibliotheken eine Rolle. So sollten zu Testzwecken eine Bibliothek aus genomischer *E.coli*-DNA verwendet werden, die sich am einfachsten durch eine Restriktionsspaltung mit einem Enzym, dessen Erkennungssequenz aus vier Basen besteht, herstellen läßt. Man erhält dabei Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 296 bp, was der statistischen Häufigkeit für das Auftreten eines bestimmten Basenquadrupels entspricht. Daher wurden Paare von Enzymen verwendet, die einem kompatiblen Überhang erzeugen und von denen das eine Basenquartett und das andere ein Basensextett erkennt. Die folgenden drei Paare wurden genutzt:

- *EcoRI* / *Tsp509I*
- *SphI* / *NlaIII*
- *AccI* / *TaqI*

Zur Verwendung des Paares *EcoRI* / *Tsp509I* mußte zunächst die *EcoRI*-Schnittstelle auf pCANTAB5E entfernt werden. Dazu wurde das Plasmid mit *EcoRI* geöffnet (siehe 2.7.3.1), die Überhänge mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt (siehe 2.7.3.4) und das Plasmid religiert (siehe 2.7.3.2). Dieser Vektor trägt den Namen pCANTAB Δ *EcoRI*.

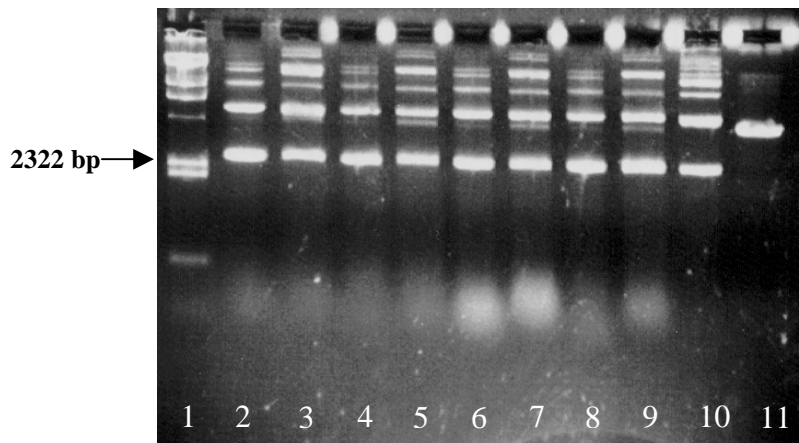


Abbildung 28: Kontrollspaltung von pCANTAB Δ EcoRI mit EcoRI,
 1: λ DNA/HindIII-Marker; 2 bis 9: verschiedene Klone von pCANTAB Δ EcoRI, gerade
 Zahl: nativ, ungerade Zahl: geschnitten, mit dem Klon in Bahn 2 wurden die Arbeiten
 fortgesetzt; 10, 11: pCANTAB nativ, geschnitten

Entsprechend den Enzympaaren wurden die Oligonukleotide entworfen. Die drei Basensextetts der Erkennungssequenzen wurden aneinandergereiht und die Überhänge so konzipiert, daß sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende jeweils um eine Base variiert wurde, so daß alle Leseraster realisierbar sind. Es waren demnach neun Oligonukleotidpaare, die nach der Cyanoethylphosphoamidit-Methode synthetisiert wurden. Die Bezeichnungen spiegeln die Varianz am 5'- beziehungsweise 3'-Ende wieder. Die Sequenzen sind nachfolgend aufgeführt:

pAS 1/1

```
CCGG GAATTCGCATGCGTCGAC GC
      CTTAAGCGTACGCAGCTG CGCCGG
```

pAS 2/1

```
CCGGG GAATTCGCATGCGTCGAC GC
      C CTTAAGCGTACGCAGCTG CGCCGG
```

pAS 3/1

```
CCGGGC GAATTCGCATGCGTCGAC GC
      CG CTTAAGCGTACGCAGCTG CGCCGG
```

pAS 1/2

CCGG GAATTCGCATGCGTCGAC GGC
 CTTAAGCGTACGCAGCTGC CGCCGG

pAS 1/3

CCGG GAATTCGCATGCGTCGAC GCGC
 CTTAAGCGTACGCAGCTG CGCGCCGG

pAS 2/2

CCGGG GAATTCGCATGCGTCGAC GGC
 C CTTAAGCGTACGCAGCTG CGCCGG

pAS 2/3

CCGGG GAATTCGCATGCGTCGAC GCGC
 C CTTAAGCGTACGCAGCTG CGCGCCGG

pAS 3/2

CCGGGC GAATTCGCATGCGTCGAC GGC
 CG CTTAAGCGTACGCAGCTG CGCCGG

pAS 3/3

CCGGGC GAATTCGCATGCGTCGAC GCGC
 CG CTTAAGCGTACGCAGCTG CGCGCCGG

Nach der Synthese wurden die Oligonukleotide mittels der *Shadow Cast*-Technik gereinigt (siehe 2.7.6.4), die erhaltene Lösung über NAP-10-Säulen entsalzt und die entsprechende Paare hybridisiert. Der Vektor pCANTAB Δ EcoRI wurde mit *Xma*I und *Not*I verdaut (siehe 2.7.3.1), dephosphoryliert (siehe 2.7.3.3) und nach der Aufreinigung mit den verschiedenen doppelsträngigen Oligonukleotide ligiert (siehe 2.7.3.2). Das *Screening* erfolgte über Restriktionsspaltungen von DNA-Minipräparationen (siehe 2.7.1) entsprechend den eingefügten Restriktionsschnittstellen. Die Richtigkeit der Übergänge wurde durch Sequenzierung überprüft und bestätigt. Die Vektoren werden nach den eingefügten Oligonukleotidpaaren benannt.

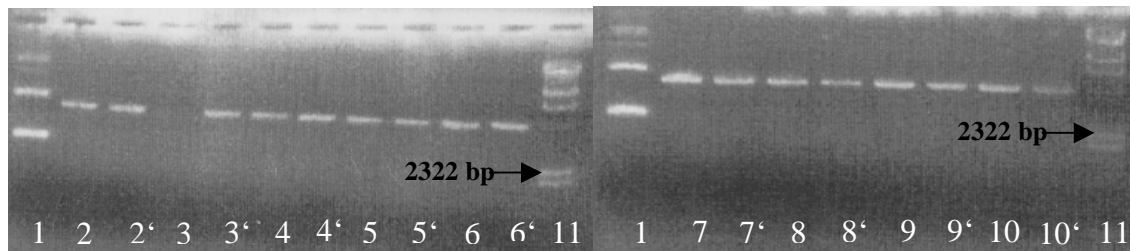


Abbildung 28: Kontrollspaltung der Vektoren pAS 1/1 bis pAS 3/3 mit *AccI* und *SphI*
 1: pAS 1/1 nativ; 2 bis 10': pAS 1/1 bis pAS 3/3 mit *AccI* und *SphI* (') geschnitten;
 11: λ DNA/*HindIII*-Marker

3.1.3 Effizienzbestimmung des neuen Systems

Um die Effizienz zu bestimmen, wurden Versuche mit einer genomischen *E.coli*-DNA-Bibliothek durchgeführt. Dazu wurde die DNA mit einem der drei Enzyme *Tsp509I*, *NlaIII* oder *TaqI* gespalten und die so erhaltenen Fragmente mit einem entsprechend präparierten Rahmen ligiert, wobei die meisten Versuche mit der Kombination *SphI* / *NlaIII* durchgeführt wurden, da die beiden anderen Paare nur bedingt verwendbar waren.

Die Enzyme *Tsp509I* und *TaqI* ließen sich nicht von den DNA-Fragmenten trennen. Die nicht abgetrennten und noch aktiven Enzyme waren auch unter den Pufferbedingungen der Ligation in der Lage, zu spalten. Die Ligations- und nachfolgende Transformationsausbeute waren infolgedessen sehr gering. Es wurden verschiedene Methoden getestet (zum Beispiel Aufreinigung über ein Agarosegel, Phenolfällung des Proteins, Abtrennung des Proteins über eine Ultrafiltrationssäule), aber mit keiner ließen sich die Enzyme entfernen. Da es sich um Proteine aus dem Stamm *Thermus aquaticus* handelt, war auch eine Hitzeinaktivierung nicht möglich.

Es stand somit nur ein System zur Verfügung, mit dem die sondierenden Untersuchungen gemacht werden konnte. Dieses System wurde dann hinsichtlich Ligationsausbeute und Transformationseffizienz optimiert. Zuerst wurde das Verhältnis von Rahmen zu *Insert* variiert, bis eine maximale Kolonienzahl auf der Selektionsplatte erreicht war, wobei das Optimum bei einem molaren Verhältnis von etwa 1 zu 25 lag. Eine Verwendung von DNA-Ligase verschiedener Hersteller brachte keinen signifikanten Unterschied. Anschließend wurde mit diesem Verhältnis weitergearbeitet und die Bedingungen der chemischen Transformation optimiert. Dabei wies sich die Verwendung eines Hitzeschocks von 90 Sekunden bei 42°C und anschließender einstündiger Inkubation in antibiotikafreiem

Medium als sehr effektiv. Die Steigerung entsprach einem Faktor von 10^2 bis 10^3 , was eine Gesamtkompetenz von etwa 10^4 bis 10^5 Kolonien pro μg DNA bedeutet.

Die Benutzung eines Elektroporators brachte hingegen keine weitere Verbesserung. Zwar ließen sich Zellen mit einer Kompetenz von bis zu 10^{10} Kolonien pro μg DNA (pUC8 als Testvektor) herstellen, allerdings erwies sich die Transformation eines Ligationsansatzes als problematisch. Die erreichten Koloniezahlen waren um den Faktor 10 schlechter als bei der chemischen Methode. Die Elektroporation scheint also ein Verfahren sein, mit dem man Zellen mit reinen Plasmidlösungen effizient transformieren kann. Will man hingegen einen Ligationsansatz verwenden, scheint man durch geringe Ligationsausbeuten und die Tatsache, daß man aufgrund der hohen Salzkonzentration im Ligationsansatz nur ein Aliquot transformieren kann, an die Grenzen dieses Verfahrens zu stoßen.

Tabelle 8: Koloniezahlen in Abhängigkeit von Rahmen/Insert-Verhältnis und der verwendeten Transformationsmethode

Verhältnis Rahmen/Insert	1:3	1:10	1:25	1:40	1:50
Transformation ohne Hitzeschock:					
Klonzahl	9	23	164	30	10
Transformation mit Hitzeschock:					
Klonzahl	/	/	bis etwa 30000	/	/
Elektroporation:					
Klonzahl	/	/	bis etwa 1500	/	/

Nachdem die Ligations- und Transformationsbedingungen optimiert wurden, konnte die eigentliche Leistungsfähigkeit des Systems untersucht werden. Im Anfangsstadium wurde nur mit dem Vektor pAS 1/1 gearbeitet, eine Ausweitung auf allen Vektoren erfolgte später. Als Zielprotein wurde RecA, welches bei Reparatur und Rekombination eine Rolle spielt, gewählt. Zu Beginn wurde eine Bibliothek aus genomischer DNA von *E.coli* durch Restriktionsspaltung mit *NlaIII* hergestellt und in den entsprechend präparierten Rahmen kloniert. Aus den erhaltenen, etwa 20000 unabhängigen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und Bakterien damit transformiert. Das *Phage-Display* wurde durchgeführt und nach vier Amplifikationszyklen mehrere Klone sequenziert. Neben etlichen ubiquitär vorkommenden Proteinen konnte eine *E.coli*-Helikase und eine Integrase als Wechselwirkungspartner identifiziert werden. Beide Proteine kooperieren mit RecA bei der DNA-Reparatur. Die Ausdehnung des Screenings auf alle Leseraster brachte keine weiteren Erkenntnisse.

Tabelle 9: Klonzahlen der vier Amplifikationszyklen

Amplifikationszyklus	Klonzahl recA	Klonzahl Blindwert	Faktor
1	1800	900	2:1
2	1400	112	12,5:1
3	307	64	4,7:1*
4	1424	315	4,5:1*
5	1700	46	37:1

* Die verwendeten Zellen zeigten bei Transformationen nur eine geringe Kompetenz, obwohl sie erst vier Monate alt waren. Ein Einfluß der Ursache des Kompetenzverlustes auf die Infizierbarkeit ist nicht auszuschließen. Die im fünften Zyklus verwendeten frischen Zellen zeigen wieder ein „normales“ Verhalten.

3.1.4 Untersuchung intra- und intermolekularer Wechselwirkungen

Nachdem die Erprobungsphase abgeschlossen war, wurden die, in unserer Arbeitsgruppe gefundenen möglichen intermolekularen Wechselwirkungspartner *rcd1+* und *fog* (Kersten, 1999; Siegert, 1998) die mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-System detektiert wurden, auf ihre *in vitro* Wechselwirkungen hin untersucht. Für die Untersuchungen wurde jeweils das entsprechende Teilstück von *c-myc* in den passenden pAS-Vektor kloniert (für *Rcd1+* ist es CK3, siehe Abbildung 33) und der Wechselwirkungspartner als *His₆-tag*-Fusionsprotein in der Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Wechselwirkung wurde für *Rcd1+* bestätigt (siehe Tabelle 10)

Tabelle 10: Klonzahlen des Panning von Rcd1+

Versuch	Klonzahl Rcd1+	Klonzahl Blindwert	Faktor
1	1700	87	19,5:1
2	500	25	20:1

Der zweite Faktor konnte noch nicht auf seine Wechselwirkung im *Phage-Display* geprüft werden, da es erst vor kurzem gelungen ist, das Gen in einen Expressionsvektor zu klonieren (Ackermann, 2000). Der Versuch, die cDNA-Bibliothek des *Two-Hybrid*-Systems in die pAS-Vektoren umzusetzen, scheiterte an der zu geringen Klonzahl von etwa 18000 Klonen. Um die Multiplizität der cDNA-Bibliothek vollständig zu erhalten, sind aber drei Millionen unabhängige Klone notwendig.

Unserer Arbeitsgruppe untersuchte mit dem modifizierten System die Wechselwirkungspartner B-Myb und CyclinD1. In Vorversuchen konnte Stöver (Stöver, 2000) eine intramolekulare Wechselwirkung von B-Myb detektieren. Außerdem deutete sich eine Wechselwirkung des C-terminalen Bereichs von B-Myb beim *Panning* mit dem gesamten CyclinD1 an.

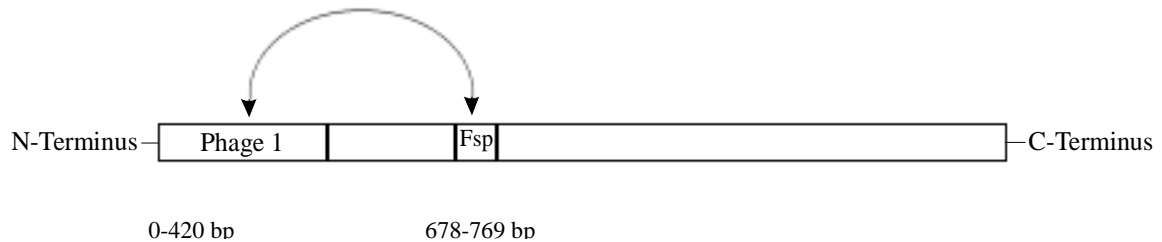


Abbildung 29: Ergebnis der *Phage-Display*-Untersuchung zur Detektion der intramolekularen Wechselwirkungen von B-Myb nach (Stöver, 2000)

Um diese Wechselwirkung zwischen B-Myb und CyclinD1 zu kartieren, wurden von mir aus B-myb durch PCR (*Primer* siehe Anhang) fünf etwa gleich große Teilstücke amplifiziert, die in die entsprechenden pAS-Vektoren kloniert wurden. Diese wurden zur Produktion rekombinanter Phagen eingesetzt, mit denen ein *Panning* gegen Fragmente von CyclinD1 durchgeführt wurde. Die CyclinD1-Fragmente wurden auch mittels PCR amplifiziert, in die entsprechenden pGEX-Vektoren kloniert (siehe Anhang) und exprimiert. Eine Übersicht der Fragmente ist in Abbildung 30 dargestellt.

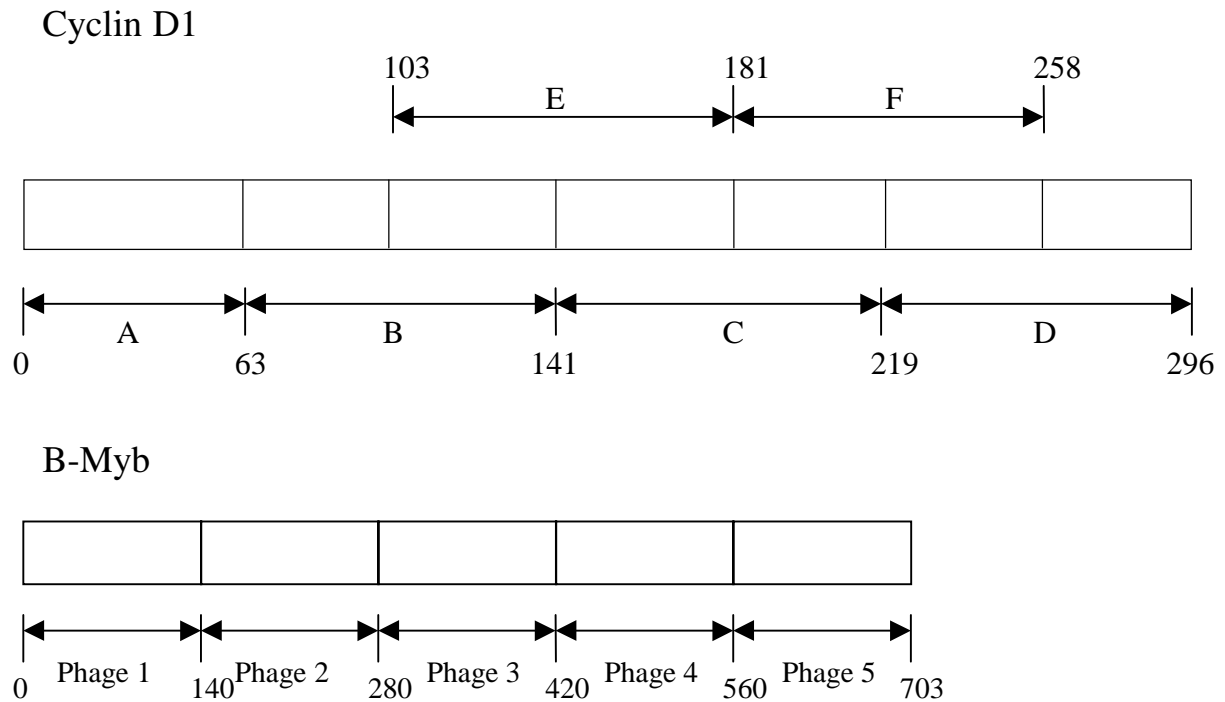


Abbildung 30: Fragmentierung von CyclinD1 und B-Myb; die Zahlen stellen die Aminosäureposition dar

Die B-myb-Phagemid-Vektoren wurden über die *EcoRI*-Schnittstelle in pAS 2/1 kloniert, mittels PCR auf ihre Richtigkeit überprüft und für die weiteren Arbeiten verwendet. Die CyclinD1 pGEX-Vektoren wurden mittels PCR auf korrekte Größe (etwa 240 bp) ihrer Inserts überprüft und die Induktion durch SDS-PAAGE nach Laemmli kontrolliert (siehe Abbildung 31).

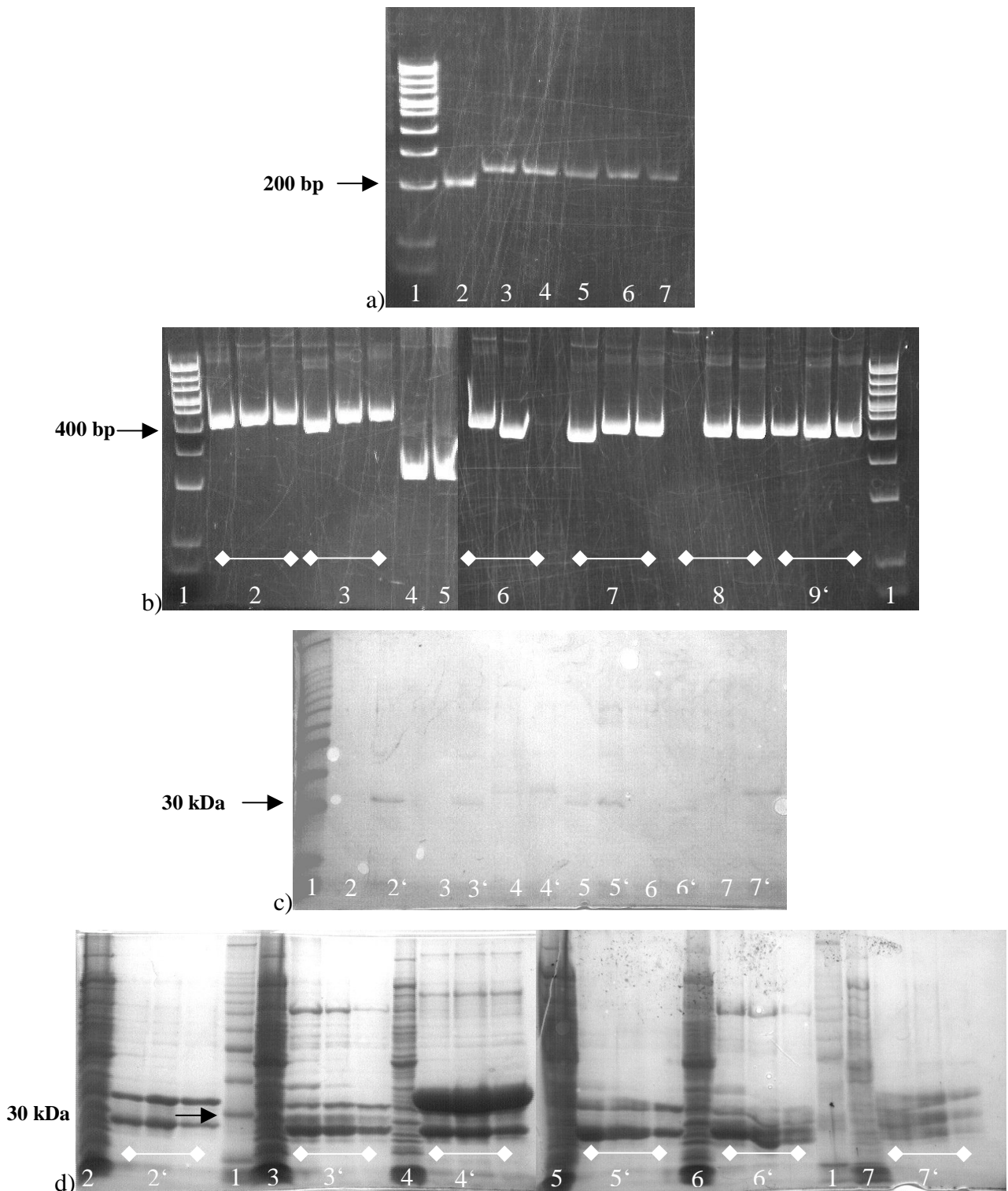


Abbildung 31: a) CyclinD1-Fragmente nach der PCR

1: 100 bp DNA-Leiter; 2 bis 7: Fragmente A bis F

b) Screening mehrerer Klone nach Insertgröße, je drei Klone pro Fragment

1: 100 bp DNA-Leiter; 2: Fragment E; 3: Fragment F; 6: Fragment D; 7: Fragment C;
8: Fragment B; 9: Fragment A; 4, 5: Kontrolle auf den leeren Rahmenplasmiden

c) Induktionstest

1: 10 kDa Protein Ladder; 2 bis 8': Fragmente A, B, C, D, E, F, jeweils vor und nach (') der Induktion

d) Gel der Elutionsfraktionen nach der Affinitätschromatographie

1: 10 kDa Protein Ladder; 2 bis 7': Fragmente A bis F, jeweils eine Bahn vor der Induktion und drei Bahnen der Elutionsfraktionen

Anschließend wurde ein *Panning* durchgeführt, bei dem alle Fragmente gegeneinander getestet wurden. Wie der Abbildung 32 zu entnehmen ist, konzentriert sich die Wechselwirkung auf den Bereich der Aminosäuren 103 bis 258 des CyclinD1. Die stärkste Interaktion ist dabei zwischen Fragment 5 (AS 181 bis 258) mit dem Phagen B5, dem C-Terminus von B-Myb, zu erkennen. Dort konnte eine Anreicherung um den Faktor 100 beobachtet werden. Die Ergebnisse aus den Vorversuchen konnten also bestätigt und präzisiert werden. Die Meßwerte sind in Tabelle 11 aufgeführt.

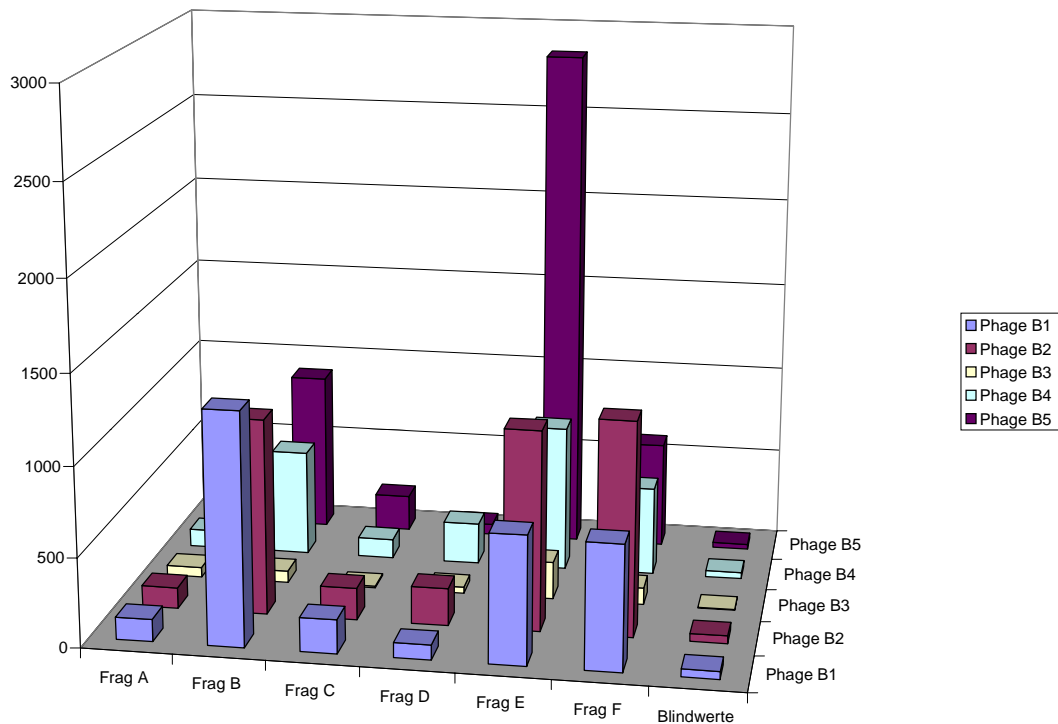


Abbildung 32: Ergebnis des *Pannings* CyclinD1 gegen B-Myb, die Zuordnung der einzelnen Teilstücke ist Abbildung 31 zu entnehmen

Tabelle 11: Meßwerte des *Pannings*

	Phage B1	Phage B2	Phage B3	Phage B4	Phage B5
Frag A	125	118	56	100	217
Frag B	1300	1100	65	600	900
Frag C	190	180	10	109	204
Frag D	85	211	35	234	61
Frag E	717	1120	211	825	2844
Frag F	700	1200	95	500	600
Blindwerte	44	44	3	36	29

3.1.5 Grenzen und Vorteile des Systems

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen sind mit Kenntnis der methodischen Beschränkungen des *Phage-Display*-Systems zu betrachten. Bei den auf dem Phagen-Kapsid exponierten Proteinfragmente handelt es sich nicht um Fusionsproteine, wie man sie in *in vivo*-Systemen vorfindet. Vielmehr sind es Proteine, die nur aufgrund der Wechselwirkung ihrer Aminosäuren untereinander eine Sekundärstruktur ausbilden. Sie unterliegen keinerlei posttranslationaler Modifikation wie zum Beispiel Phosphorylierung, Glykosylierung oder Faltung, die *in vivo* eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielen können. Die mit dem *Phage-Display*-System detektierten Interaktionen lassen sich daher nicht automatisch auf die Verhältnisse bei nativen Proteinen übertragen. Auch ist zu beachten, daß durch das *Phage-Display*-System nur starke Wechselwirkungen detektiert werden können. Eine weitere Einschränkung stellt die Tatsache dar, daß die Fragmentierung willkürlich vorgenommen wird. Es ist denkbar, daß bei dieser zufälligen Fragmentierung des Proteins Domänen auseinandergeschnitten werden, die *in vivo* aus mehreren schwach aber synergistisch interagierenden Regionen bestehen. Diese Art von Wechselwirkungen ist mit dem *Phage-Display*-System nur schwer nachweisbar, es sei denn, die funktionellen Domänen des zu untersuchenden Proteins sind bekannt, so daß man eine gezielte Fragmentierung vornehmen kann. Desweiteren schränkt die Transformationsbeziehungsweise Ligationsausbeute die Anwendung des Systems zum *Screening* auf die Untersuchung von Minibibliotheken ein. Eine komplette eukaryontische cDNA-Bibliothek ist mit diesem Verfahren nicht zu untersuchen.

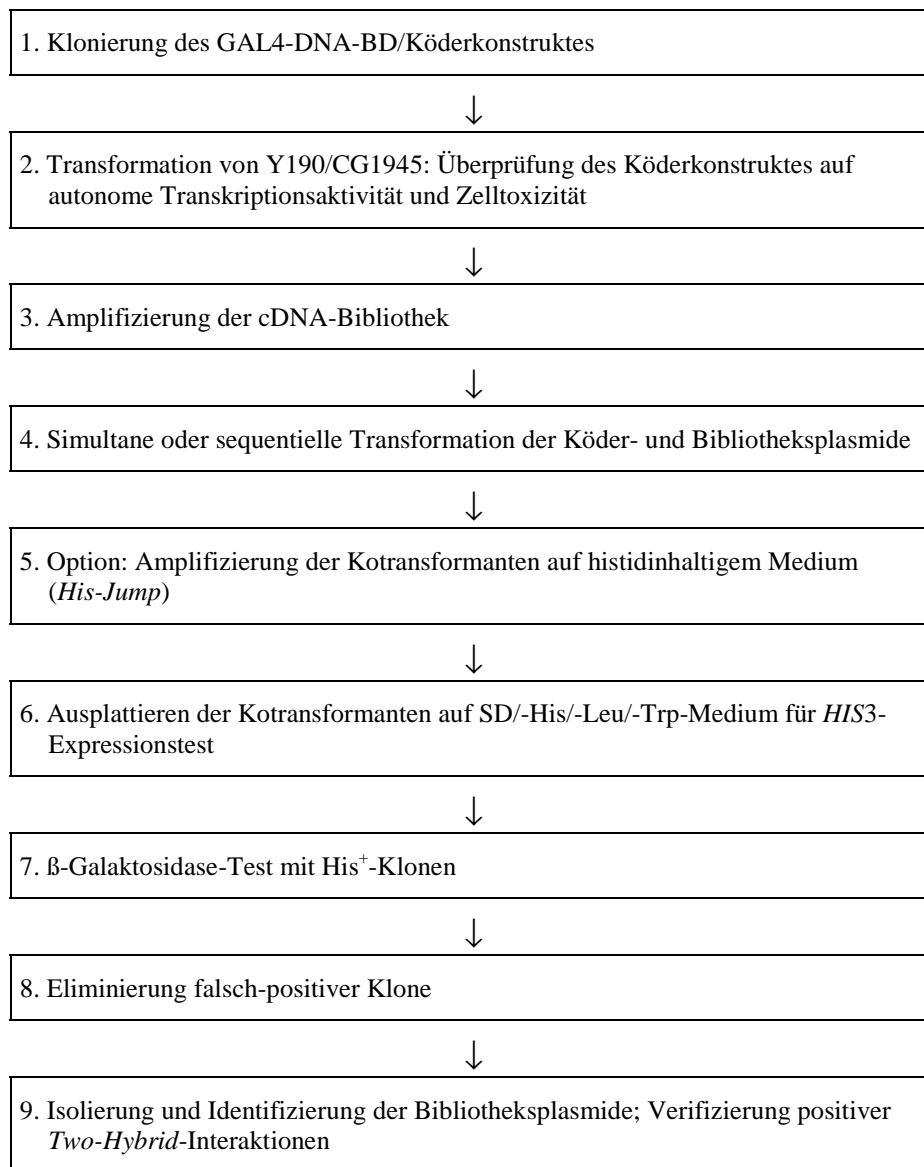
Trotz dieser Einschränkungen ist das *Phage-Display*-System aufgrund der Qualität der erzielbaren Ergebnisse seit Jahren ein erfolgreich eingesetztes System zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Vorteilhaft am *Phage-Display*-System ist dabei vor allem die einfache Handhabung und die schnelle Durchführbarkeit. Das System ist außerdem sehr robust gegenüber äußeren Einflüssen. Ein weiterer Vorteil ist die relativ gute Skalierbarkeit, die einen hohen Probendurchsatz auch ohne Automation erlaubt.

3.2 Screening einer cDNA-Bibliothek mittels *Two-Hybrid*-System

Ein weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion stellt das *Two-Hybrid*-System dar. Mit ihm ist es möglich, eukaryontische cDNA-Bibliotheken zu

untersuchen, allerdings ist die Methode zeitaufwendiger und empfindlicher gegen äußere Einflüsse. Dennoch stellt sie durch die Tatsache, daß die Proteine posttranslational prozessiert werden, daß heißt in ihren nativen Faltungsform vorliegen, ein wertvolles Werkzeug dar.

3.2.1 Fließschema eines *Two-Hybrid-Screening*



3.2.2 Klonierung des Köderplasmids

Für das *Two-Hybrid*-System waren bereits vier Köderkonstrukte kloniert. Die Position der einzelnen Fragmente von c-Myb, die Verwendung fanden, ist in der nachfolgenden Grafik zu sehen.

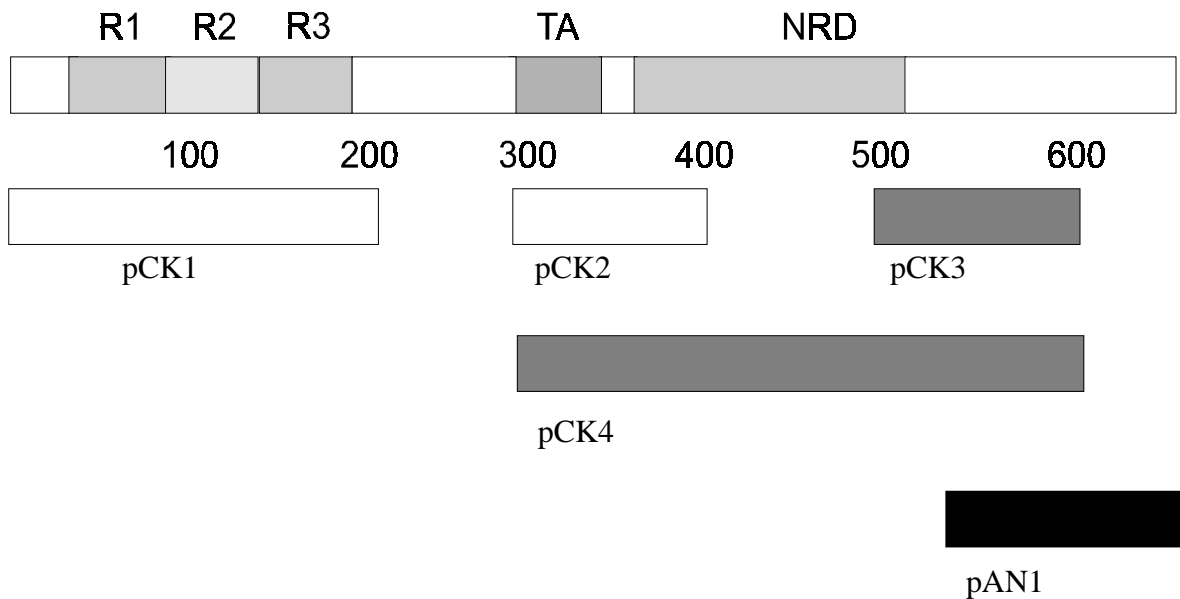


Abbildung 33: Regionen von c-Myb, die als Köder verwendet werden sollten

Von den vier Konstrukten pCK1 bis pCK4 konnte jedoch nur mit pCK2 und pCK3 ein *Screening* durchgeführt werden. Die anderen beiden zeigten schon bei alleiniger Transformation positive Interaktion beziehungsweise führten zum Absterben der Zellen.

Es wurde von mir ein weiteres Köderkonstrukt (pAN1) entworfen, das 30 Aminosäuren nach pCK3 beginnt und bis zum C-Terminus von c-Myb reicht. Dazu wurde das Plasmid pAS2-1 mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten, dephosphoryliert und über ein Agarosegel aufgearbeitet. Der die Aminosäuren 530 bis 636 kodierende Teil des c-myb-Gens wurde mittels präparativer PCR amplifiziert (*Primer* siehe Anhang) und das Fragment auf einem Acrylamidgel kontrolliert. Anschließend wurde das Fragment mit *EcoRI* und *BamHI* gespalten und mittels eines Agarosegels aufgereinigt. Rahmen und *Insert* wurden nun ligiert, transformiert und ein Teil der erhaltenen Klone mittels PCR untersucht, wobei ein *Primer* auf dem Gal4-Gen des Rahmens lag und der zweite auf dem *Insert*. Von den sechs Klonen zeigten vier das erwartete PCR-Produkt (siehe Abbildung 34).

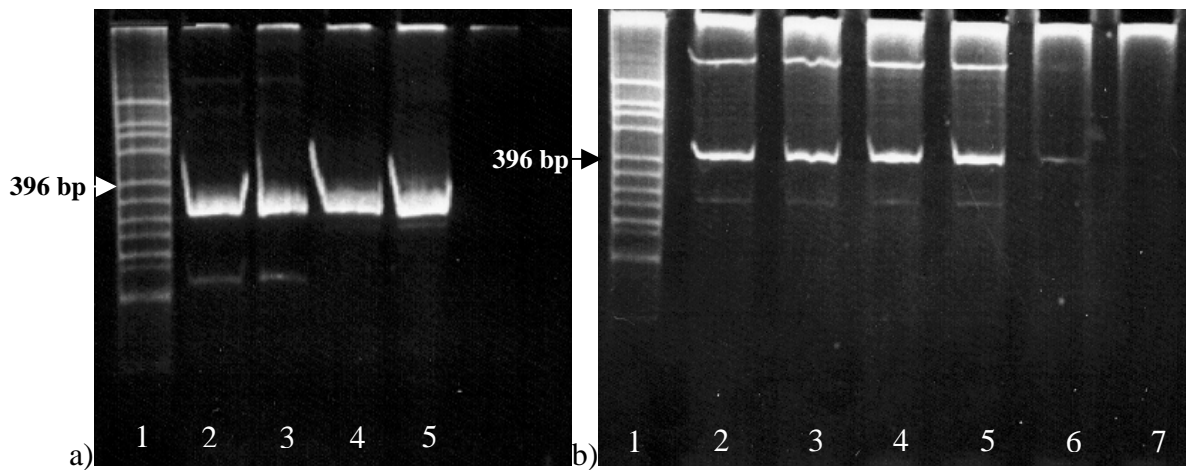


Abbildung 34: a) Acrylamidgel des PCR-Produktes (c-Myb AS 530 bis 636)
 1: pTR54/HinfI-Marker; 2, 3: vor der Reinigung; 4, 5: nach der Reinigung
 b) *Screening* des Köderkonstruktes, sechs Klone wurden überprüft
 1: pTR54/HinfI-Marker; 2 bis 7: PCR-Produkt der untersuchten Klone, 2 bis 5 zeigen
 das erwartete Ergebnis von 412 bp, die Arbeit wurde mit Klon in 4 weitergeführt

3.2.3 Transformation und Kultivierung von Hefezellen

Hefezellen des Y190-Stammes wurden mit dem Vektor pAN1 transformiert (*Small Scale*) und auf SD –T –Platten kultiviert. Der Y190-Stamm neigt aufgrund der unregulierten TC-TATA-Box zu einer unkontrollierten Expression von HIS 3. Diese Eigenschaft würde im weiteren Verlauf zu vielen falsch-positiven Klonen führen. Es ist daher notwendig, die Expression, die bei jedem Konstrukt unterschiedlich stark ausgeprägt ist, durch Zusatz von 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) zu unterdrücken. Die nötige Konzentration von 3-AT wurde experimentell ermittelt: Dazu wurden SD –T –H –Platten mit einer steigenden Konzentration an 3-AT von 5 bis 60 mM verwendet, auf denen die transformierten Hefen vier Tage inkubiert wurden. Die Konzentration, bei der noch ein geringes Wachstum festgestellt wurde, war optimal für die weiteren Arbeiten. pAN1 benötigt eine 3-AT-Konzentration von 15 mM.

Anschließend wurden die Hefen mit dem pAN1-Konstrukt mit der cDNA-Bibliothek transformiert (*Library Scale*) und auf SD –T –L –H –Platten inkubiert (optional können auch SD –T –L –Platten verwendet werden, *Histidin Jump Start*; siehe Abbildung 35). Nach acht Tagen wurden die 155 Kolonien, deren Durchmesser größer als zwei Millimeter war, auf frische Platten überimpft und nach weiteren sechs Tagen das β -Galaktosidase-*Colony-Lift-Filter-Assay* (siehe 2.6.2.5) durchgeführt.

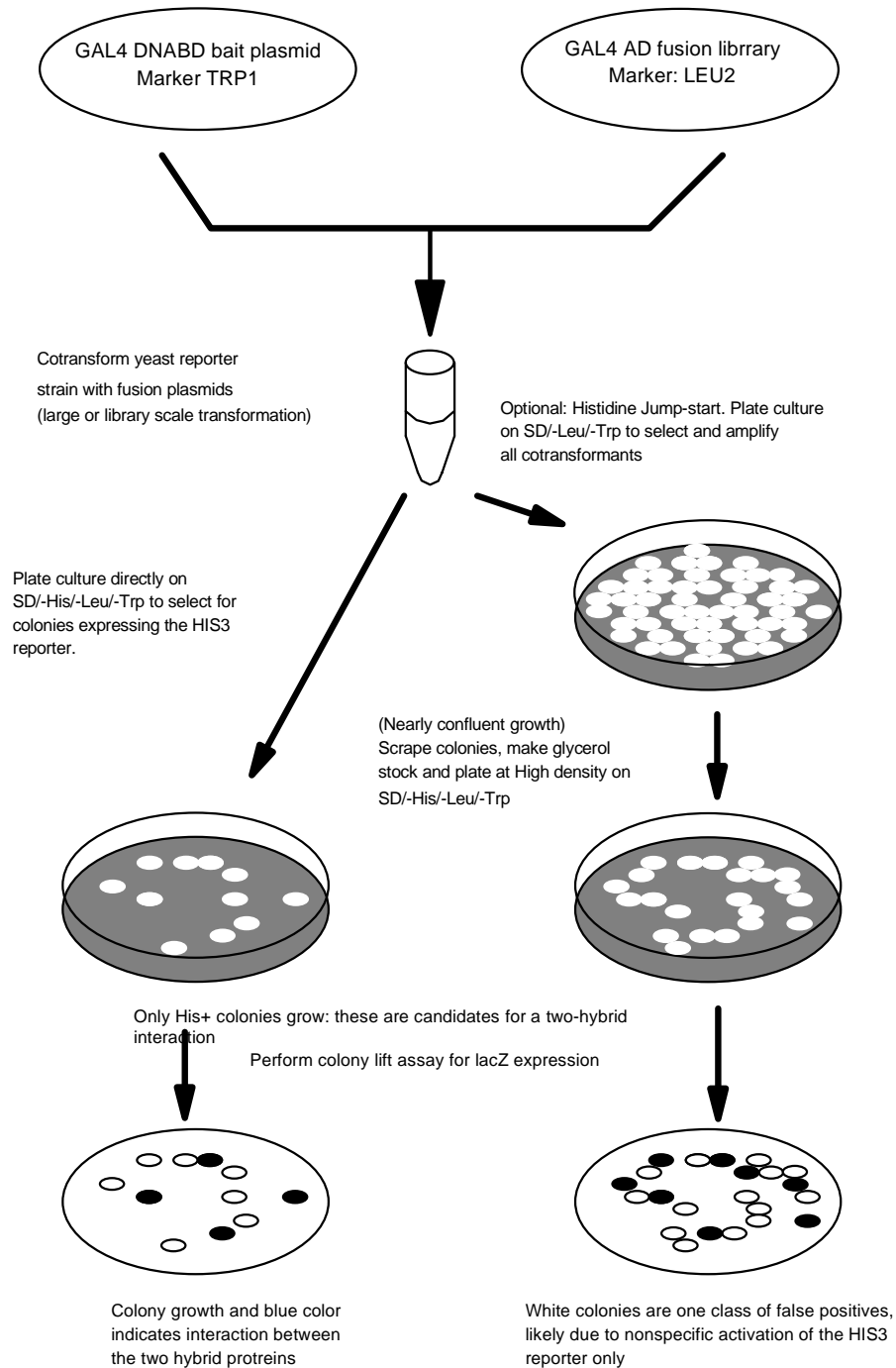


Abbildung 35: Alternative nach der Transformation; der Histidin Jump Start dient zum Nachweis schwacher Kontakte (Clontech, Handbuch, 1997)

Nur eine von 155 Kolonien zeigte nach vier Stunden eine Blaufärbung. Der Klon wurde in einer SD –T –L –H –Flüssigkultur inkubiert, das Plasmid isoliert, in *E.coli* amplifiziert und sequenziert. Die Sequenz zeigte in allen Leserastern Stop-Kodons, so daß eine weitere Untersuchung nicht sinnvoll erschien. Als einziges Ergebnis läßt sich festhalten, daß die Aminosäuren von 500 bis 530 vermutlich essentiell für die Protein-Protein-Interaktion sind.

Um diese Aussage präzisieren zu können, bedarf es noch weiterer Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich waren.

3.3 Untersuchung des Proteins *rcd1+*

Das Protein *Rcd1+* wurde 1998 von Siegert als potentieller Wechselwirkungspartner von *c-Myb* in einem *Two-Hybrid Screening* gefunden. Das *rcd1+*-Gen der Maus ist evolutionär konserviert und homolog zu Genen von *Saccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und anderen Spezies (siehe Anhang). Kürzlich konnte es aus menschlichen Fibroblasten isoliert werden (Okazaki *et al.*, 1998). Das *Rcd1+*-Protein umfaßt 299 Aminosäuren, von denen 20 % Leucin und Isoleucin sind und ist zu 99,7 % identisch mit dem humanen *Rcd1+*-Protein. Auf genetischer Ebenen besteht eine 65 %ige Homologie. In *Saccharomyces pombe* stimuliert *Rcd1+* den Transkriptionsfaktor *Ste11+* (siehe Abbildung 36), welcher an Meioseprozessen und der sexuellen Differenzierung des Spaltpilzes in Hungersituationen beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, daß *Rcd1+* besonders in Milz, Thymus und glattem Muskel exprimiert wird und in Mäuseembryonen ab dem 15. Gestationstag nachweisbar ist.

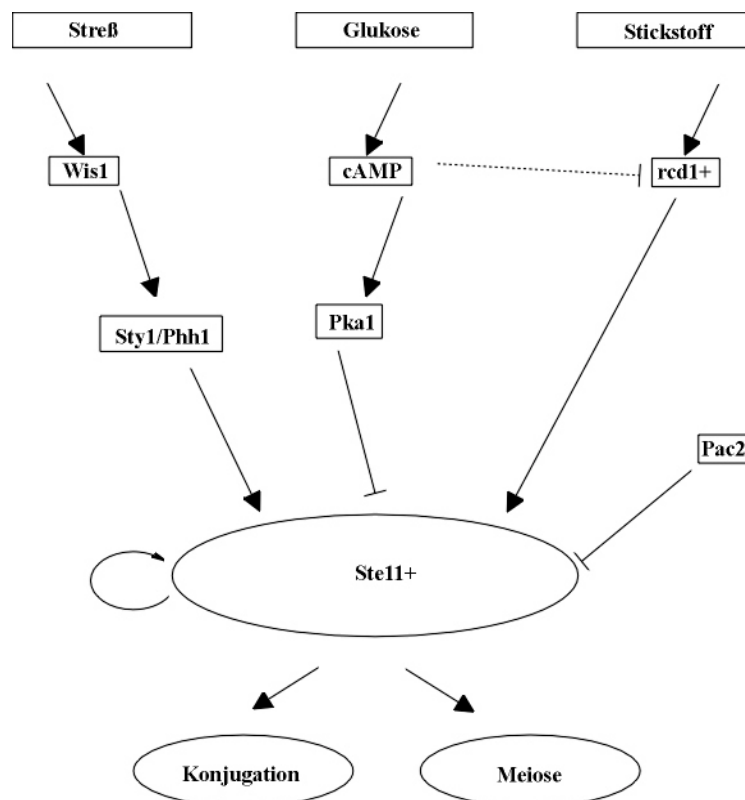


Abbildung 36: *Ste11+*-Signalweg mit möglicher Position für *Rcd1+*; modifiziert nach (Okazaki *et al.*, 1998)

3.3.1 Aufreinigung und Charakterisierung des His₆-Fusionsproteins von Rcd1+

Versuche Rcd1+ als GST-Fusionsprotein zu exprimieren, erwiesen sich als problematisch, da das Protein instabil war und so keine Untersuchungen vorgenommen werden konnten. Das Gen wurde daraufhin in den Vektor pQE30 kloniert und als His₆-Fusionsprotein exprimiert und mittels Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt (siehe 2.7.8.1). Die Reinheit betrug etwa 80 %.

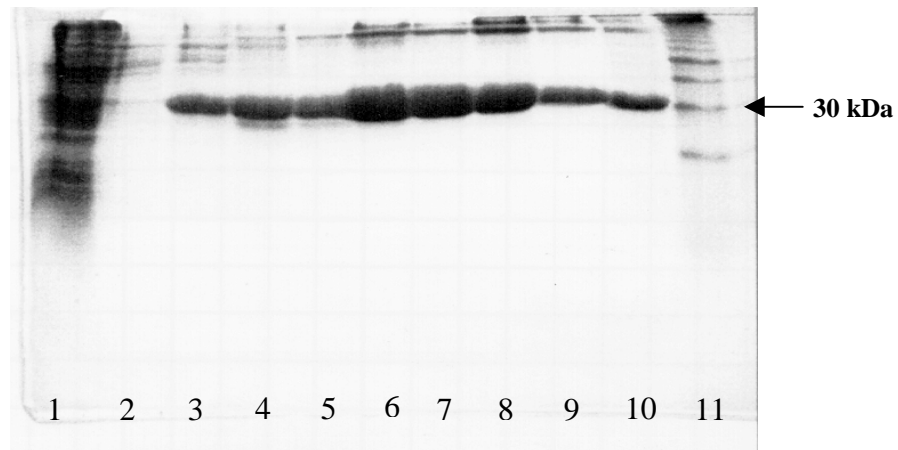


Abbildung 37: Laemmli gel der Fraktionen nach der Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule von Rcd1+
 1: Durchlauf; 2: Waschschrift, 10 mM Imidazol; 3: Waschschrift, 30 mM Imidazol
 4 bis 9: je zwei Elutionsschritte mit 75, 125 und 200 mM Imidazol; 10: Säulenmaterial
 11: 10 kDa Protein Ladder

Anschließend erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt mit Phosphozellulose (siehe 2.7.8.2). Die Reinheit konnte mit diesen Schritt auf 90 bis 98 % gesteigert werden.

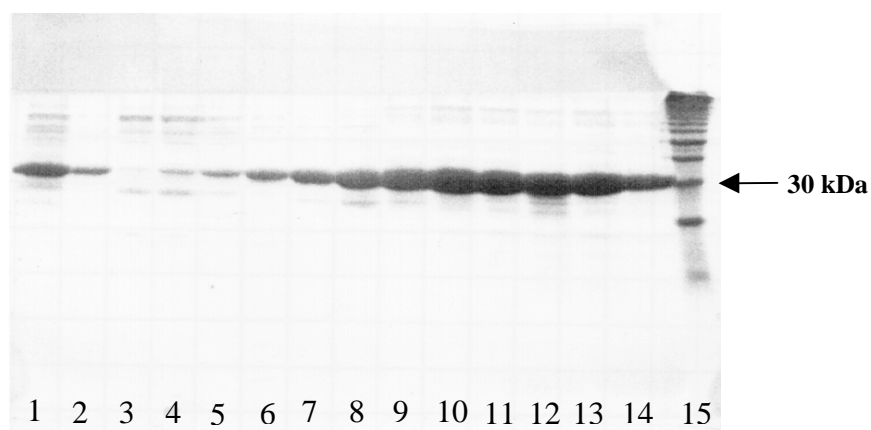


Abbildung 38: Laemmli gel nach dem zweitem Reinigungsschritt von Rcd1+ auf Phosphozellulose
 1: Durchlauf; 2: Waschschrift; 3 bis 14: Probe, die nach dem linearen Salzgradienten im UV-Spektrum einen Proteingehalt aufwiesen, die Salzkonzentration steigt von links nach rechts; 15: 10 kDa Protein Ladder

Da die Bindung des Proteins an P-Cell durch die Affinität zu Phosphatgruppen erfolgt, lag es nahe, ein DNA-Zellulose-Bindungs-Assay (siehe 2.7.9) durchzuführen. Das Ergebnis des Assays ist in Abbildung 39 wiedergegeben. Sie zeigt ein Laemmliigel der einzelnen Fraktionen der Elution mit von links nach rechts zunehmender Salzkonzentration.

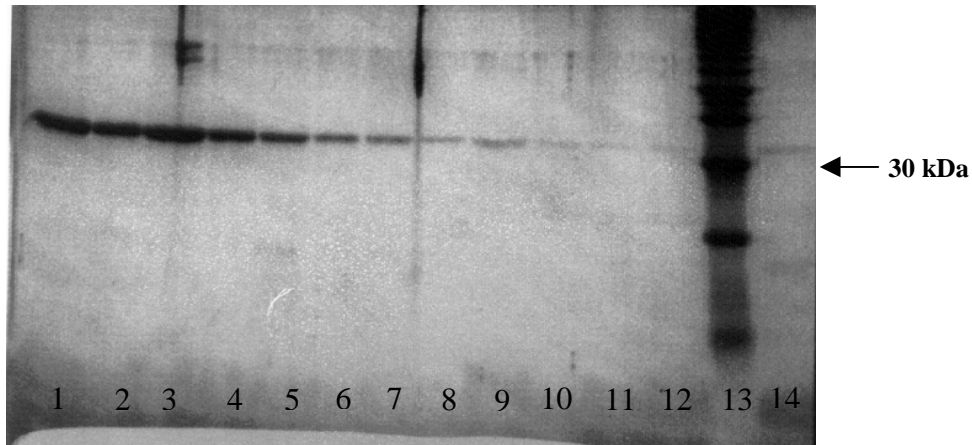


Abbildung 39: Laemmliigel des DNA-Zellulose-Bindungs-Assays von Rcd1+
 1: Durchlauf; 2 bis 12: Elutionsschritte, die Salzkonzentration liegt im ersten Schritt bei 0 mM und steigt je Schritt um 200 mM bis 2 M im letzten Schritt
 13: 10 kDa Protein Ladder; 14: Säulenmaterial

Auffallend ist hierbei die Tatsache, daß sich schon bei sehr geringer Salzkonzentration Protein vom Säulenmaterial löst, aber auch noch bei hohen Salzkonzentration von über 1 mol/l NaCl Protein an der Säule bindet. Möglicherweise liegen in der Lösung zwei verschiedene Spezies des Rcd1+-Proteins vor, von denen eine gut DNA bindet, die andere aber schon bei geringer Salzkonzentration ihre Bindungsfähigkeit verliert.

Durch Circular dichroismus-Spektroskopie konnte der α -Helix-Anteil zu 43 % bestimmt werden und eine Untersuchung in der analytischen Ultrazentrifuge zeigte, daß das Protein monomer vorliegt und ein Molekulargewicht von 33 kDa besitzt. Die Interaktion mit c-Myb wurde durch *Phage-Display* untersucht und bestätigt (siehe 3.1.4). Auch im *Pull Down Assay* ließ sich die Wechselwirkung detektieren (siehe Abbildung 40). Hierzu wurden Myb-GST-Fusionsproteine auf einer Glutathion-Sepharose-Säule immobilisiert und das Rcd1+-(His)₆-tag-Fusionsprotein über diese Säule gegeben. Die Proteinkomplexe werden mit Glutathion eluiert, auf einem Laemmliigel aufgetrennt und anschließend mittels Elektrobrot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Markierung erfolgte mit einem Antikörper gegen (His)₆.

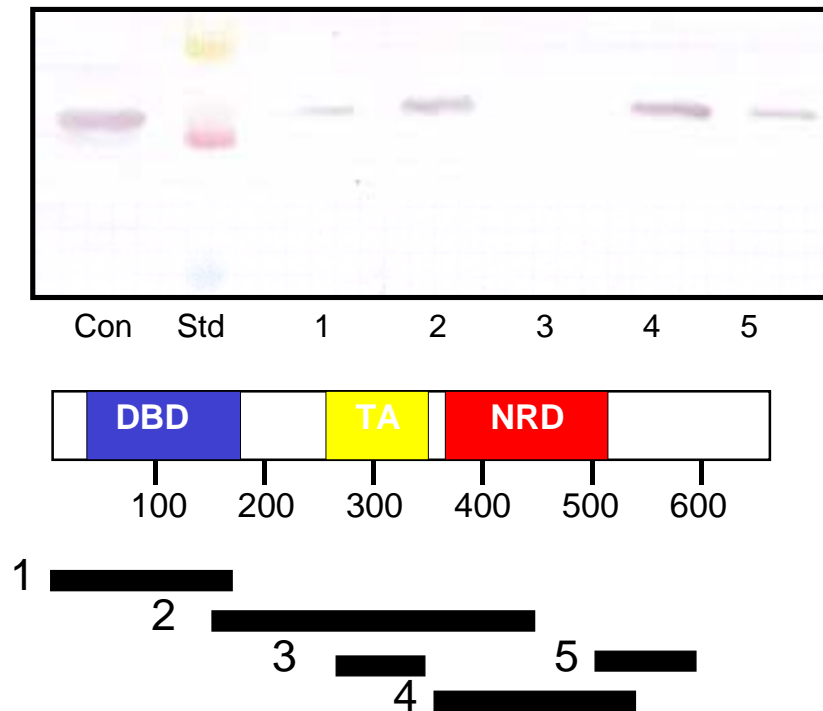


Abbildung 40: *Pull Down Assay*, die c-Myb-Fragmente 1 bis 5 wurden als GST-Fusionsproteine an eine Säule mit Glutathion-Sepharose gebunden, über die Rcd1⁺-(His)₆-tag-Fusionsprotein gegeben wird; Con: Kontrolle Rcd1⁺-(His)₆-tag-Fusionsprotein; als Antikörper wurde ein Antikörper gegen (His)₆ verwendet

Man konnte sowohl eine Wechselwirkung mit den N- als auch mit dem C-terminalen Ende von c-Myb detektieren. Einzig die transaktivierende Domäne scheint nicht an der Interaktion beteiligt zu sein.

Anschließend wurden EMSA-Experimente durchgeführt, in denen versucht wurde, Rcd1⁺ an einen DNA-c-Myb-Komplex zu binden und so über einen *Shift* des Komplexes einen weiteren Beweis für die Interaktion zu erhalten. Als DNA-*Template* diente der mit PCR amplifizierte mim-1-Promotor und ein 22 Basen langes Oligonukleotid, das von Sokolowski für die Bindungsstudien seiner Mutanten eingesetzt wurde (Sokolowski, 1998).

Bei den Transkriptionsfaktoren Fos und Myc konnte nachgewiesen werden, daß die Fähigkeit, DNA zu binden, durch reduzierende oder oxidierende Reagenzien reguliert werden kann (Xanthoudakis and Curran, 1996). Auch der ubiquitäre nukleäre Redox-Faktor Ref-1 stimuliert die DNA-Bindungsaktivität. Bei c-Myb konnte gezeigt werden, daß für die Bindung die Anwesenheit eines reduzierenden Agens, wie zum Beispiel DTT, essentiell ist (Moelling *et al.*, 1992). In Analogie zu diese Ergebnissen wurde vermutet, daß der Redox-Zustand des Proteins Rcd1⁺ das Bindungsverhalten an DNA beziehungsweise an c-Myb reguliert. Um

dies zu überprüfen, wurde ein EMSA unter Verwendung von Diazen-Dicarbonsäure-bis-(N,N-Dimethylamid) (Diamide) und DTT durchgeführt.

Die Proteine wurde jeweils eine halbe Stunde mit Diamide und / oder DTT bei 4°C inkubiert, bevor das DNA-Template zugesetzt wurde. Das Ergebnis ist dem dargestellten Autoradiogramm zu entnehmen (siehe Abbildung 41).

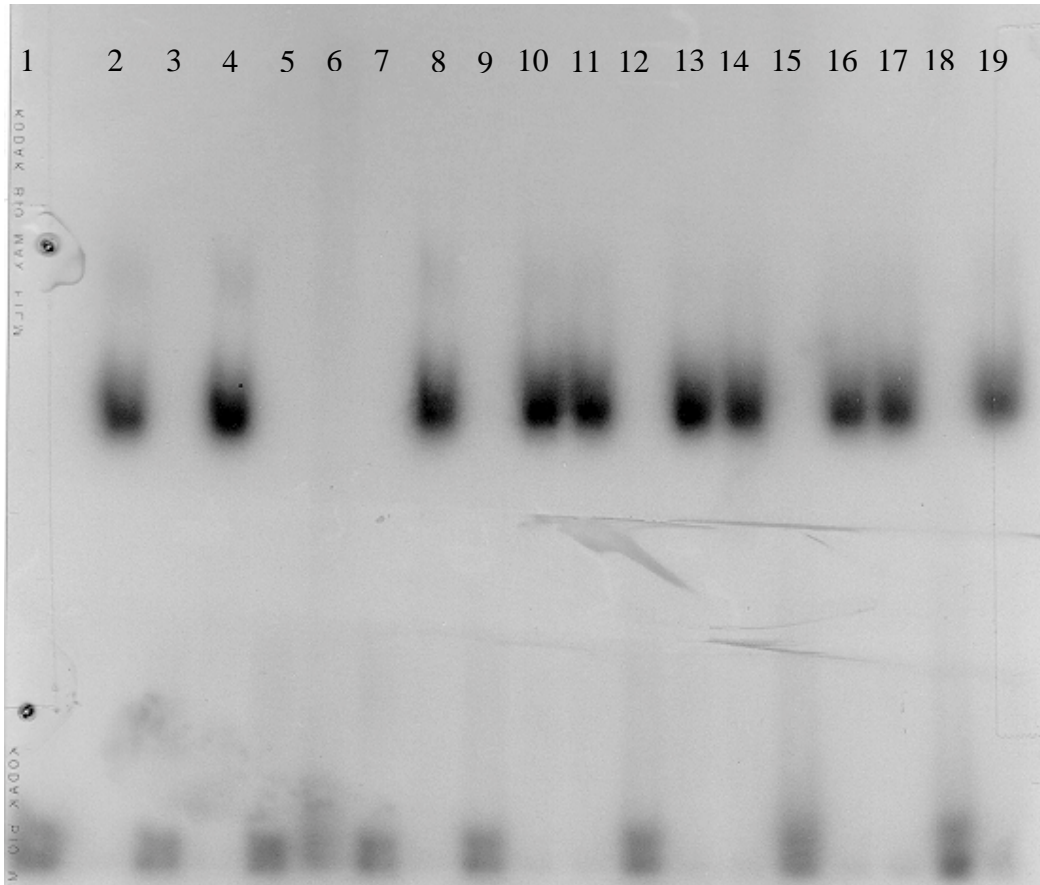


Abbildung 41: Autoradiogramm des Diamide-EMSA; Die Zuordnung der Bahnen ist der Tabelle zu entnehmen, die Zahlen geben das Verhältnis c-Myb/Rcd1+ an.

Nr.		Nr.	
1	/	11	c-Myb/Rcd1+/1:6
2	c-Myb	12	c-Myb/Rcd1+/Diamide/1:6
3	c-Myb/Diamide	13	c-Myb/Rcd1+/Diamide/DTT/1:6
4	c-Myb/Diamide/DTT	14	c-Myb/Rcd1+/1:9
5	Rcd1+	15	c-Myb/Rcd1+/Diamide/1:9
6	Rcd1+/Diamide	16	c-Myb/Rcd1+/Diamide/DTT/1:9
7	Rcd1+/Diamide/DTT	17	c-Myb/Rcd1+/1:12
8	c-Myb/Rcd1+/1:3	18	c-Myb/Rcd1+/Diamide/1:12
9	c-Myb/Rcd1+/Diamide/1:3	19	c-Myb/Rcd1+/Diamide/DTT/1:12
10	c-Myb/Rcd1+/Diamide/DTT/1:3		

Es zeigte sich, daß die DNA-Bindungsfähigkeit von c-Myb durch Zugabe von Diamide gehemmt und durch anschließende Behandlung mit DTT wieder regeneriert werden kann. Auf

Rcd1+ beziehungsweise auf das Gemisch c-Myb und Rcd1+ haben die beiden Reagenzien keinen Einfluß.

Um festzustellen, ob sich die Interaktion zwischen c-Myb und Rcd1+ auch *in vivo* nachweisen läßt, wurden mehrere Transfektionen (siehe 2.6.4.4) mit eukaryontischen Zellen durchgeführt. Begonnen wurden diese Untersuchungen von Scholz (Scholz, 1999), der das *rcd1+*-Gen in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA1.1Amp klonierte und erste Transfektionen in HEK-293-Zellen durchführte, wobei er die Interaktion bestätigen konnte (siehe Abbildung 42). Er erhielt, bei gleichzeitiger Anwesenheit von c-Myb, für Rcd1+ eine ähnliche Aktivierung der Reportergeraktivität wie für CEBP α und c-Myb (Oelgeschläger *et al.*, 1996b). Waren in den Zellen mit allen drei Faktoren anwesend, so schwächte sich das Signal ab, was auf eine Konkurrenz zwischen Rcd1+ und CEBP α schließen läßt.

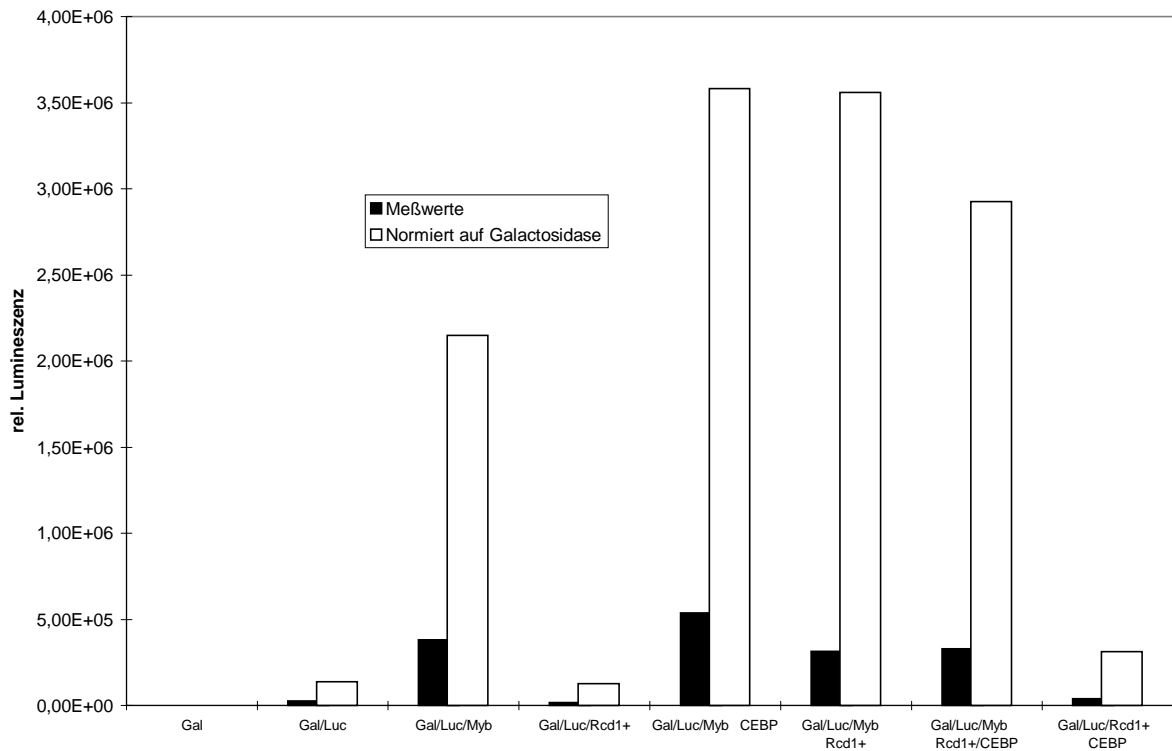


Abbildung 42: Aktivität des *mim-1* Promotors mit c-Myb, CEBP α und Rcd1+, HEK-293

Nach diesen einleitenden Untersuchungen wurde die Zelllinie gewechselt, da es Probleme bereitete, die empfindlichen HEK-293-Zellen bei den Waschschrinen, die zur Transfektion notwendig sind, nicht von der Oberfläche des Kulturgefäßes abzulösen. Es wurden nun CV-1-Zellen verwendet, die eine größere Adhärenz und eine höhere Toleranz gegenüber äußerem

Streß besitzen. Ein Nachteil der CV-1-Zellen ist ihre etwas geringere Expressionsrate, was zu einem insgesamt niedrigerem Signal in den Reporterassays führt. Die Experimente von Scholz wurden von mir mit der neuen Zelllinie wiederholt, allerdings ließen sich die Ergebnisse in CV-1 nicht reproduzieren. Da sich bei späteren Transfektionen von COS-7-Zellen ein ähnliches Bild wie bei den HEK-293-Zellen zeigte (siehe Abbildung 51), liegt die Vermutung nahe, daß neben den eingesetzten Plasmiden auch der Genotyp der verwendeten Zelllinie (E1A bei HEK-293; T-Antigen bei COS-7) für die Ergebnisse von Bedeutung ist. Es könnte sein, daß CV-1-Zellen in ihrem Zytoplasma einen Faktor besitzen, der die Interaktion zwischen Rcd1+ und c-Myb hemmt oder ihnen ein Faktor fehlt, der essentiell für die Wechselwirkung ist. Da sich die Interaktion aber sowohl im *Phage-Display*- als auch im *Two-Hybrid*-System und im *Pull Down Assay* nachweisen läßt, ist die Überlegung, daß ein in CV-1-Zellen enthaltener Faktor die Interaktion behindert, als wahrscheinlich zu betrachten.

Da es in den Datenbanken keine Anhaltspunkt für die Funktion des Proteins Rcd1+ gibt, wurden verschiedene Ansätze verfolgt um Hinweise auf die Aufgabe des Proteins zu finden. Da Rcd1+ die MAP-Kinase Ste11 stimuliert, bestand die Möglichkeit, daß auch Rcd1+ eine MAP-Kinase ist und sollte als solche die Fähigkeit besitzt, ATP zu binden. Um dieses zu überprüfen, wurde ein EMSA durchgeführt, bei dem Rcd1+ mit γ -³²P-ATP inkubiert wurde. Es zeigte sich, daß Rcd1+ kein ATP bindet. Desweiteren wurde untersucht, ob das Protein in der Lage ist, depurinierte *supercoiled* Plasmid-DNA zu relaxieren, also eine AP-Endonuklease-Aktivität besitzt. Auch in diesem Fall war das Ergebnis negativ.

Das *Mercury Pathway Profiling*-System (Firma Clontech) erlaubt die Untersuchung des Effekts von Stimuli auf verschiedene Signaltransduktionswege. Die Anwendung des System ist sehr einfach, und es ist schnell durchzuführen. Für das Experiment standen die folgenden Vektoren mit den zugehörigen Signalwegen zur Verfügung:

- pAP1-Luc Nachweis der Induktion des Aktivatorproteins 1 (AP1) und des streßaktivierten Proteinkinase/Jun N-terminale Kinase (SAPK/JNK) Signal-Transduktionsweges
- pCRE-Luc Nachweis der Aktivierung des cAMP-bindenden Proteins und des cAMP-vermittelten Signaltransduktionsweges
- pE2F-Luc Nachweis der Aktivierung des E2F-vermittelten Signaltransduktionsweges
- pISRE-Luc Nachweis der Aktivierung des durch Interferon (IFN) ausgelösten Signaltransduktionsweges

- pSRE-Luc Nachweis der Aktivierung des *Serum Response Element* (SRE) und des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP) Signaltransduktionsweges
- pTAL-Luc Kontrollvektor

Mit diesen Vektoren, pcDNA-rcd1+ und dem Vektor des β -Galaktosidase-Assays wurde die Transfektion durchgeführt. Das Ergebnis der Transfektion ist in Abbildung 43 dargestellt.

Die Transfektion von COS-7-Zellen wurde analog 2.6.4.4 ausgeführt, mit der Modifikation, daß serumfreies Medium verwendet wurde. Diese Änderung war notwendig, um Einflüsse durch Bestandteile des Serums auszuschließen. Im serumfreien Medium war das Zellwachstum erheblich verlangsamt, was auf das Fehlen der im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren zurückzuführen ist. Die Zellen wurden nach zwei Tagen geerntet und das β -Galaktosidase- und das Luziferase-Assay (siehe 2.6.4.6 und 2.6.4.7) durchgeführt.

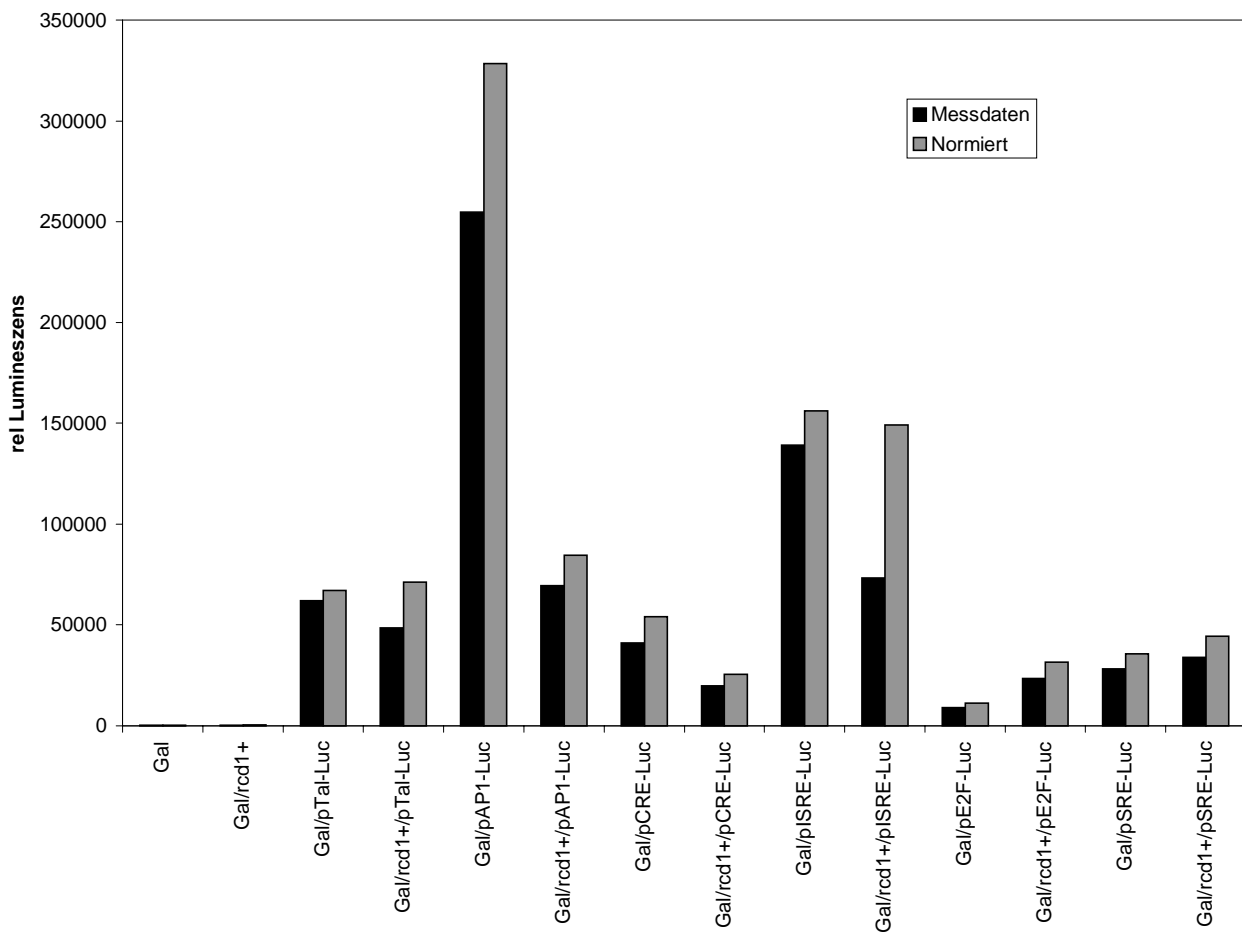


Abbildung 43: Reporterogenaktivität des *Mercury Pathway Profiling*-Systems

Dem Diagramm ist eindeutig zu entnehmen, daß Rcd1+ eine signifikante Veränderung des Signals bei pAP1-Luc hervorruft. Das Signal wird um den Faktor 4 verringert. Die Veränderung bei den anderen Vektoren sind minimal, sie liegen in der Größe des Kontrollvektorsignals. Welche Bedeutung dieses Ergebnis für die Funktionsbestimmung des rcd1+-Gens hat, läßt sich noch nicht sagen. Es läßt sich jedoch feststellen, daß Rcd1+ bei der Induktion des Aktivatorproteins 1 (AP1) (siehe Abbildung 44) oder der Induktion des streßaktivierten Proteinkinase/Jun N-terminale Kinase (SAPK/JNK) Signal-Transduktionsweges beteiligt ist.

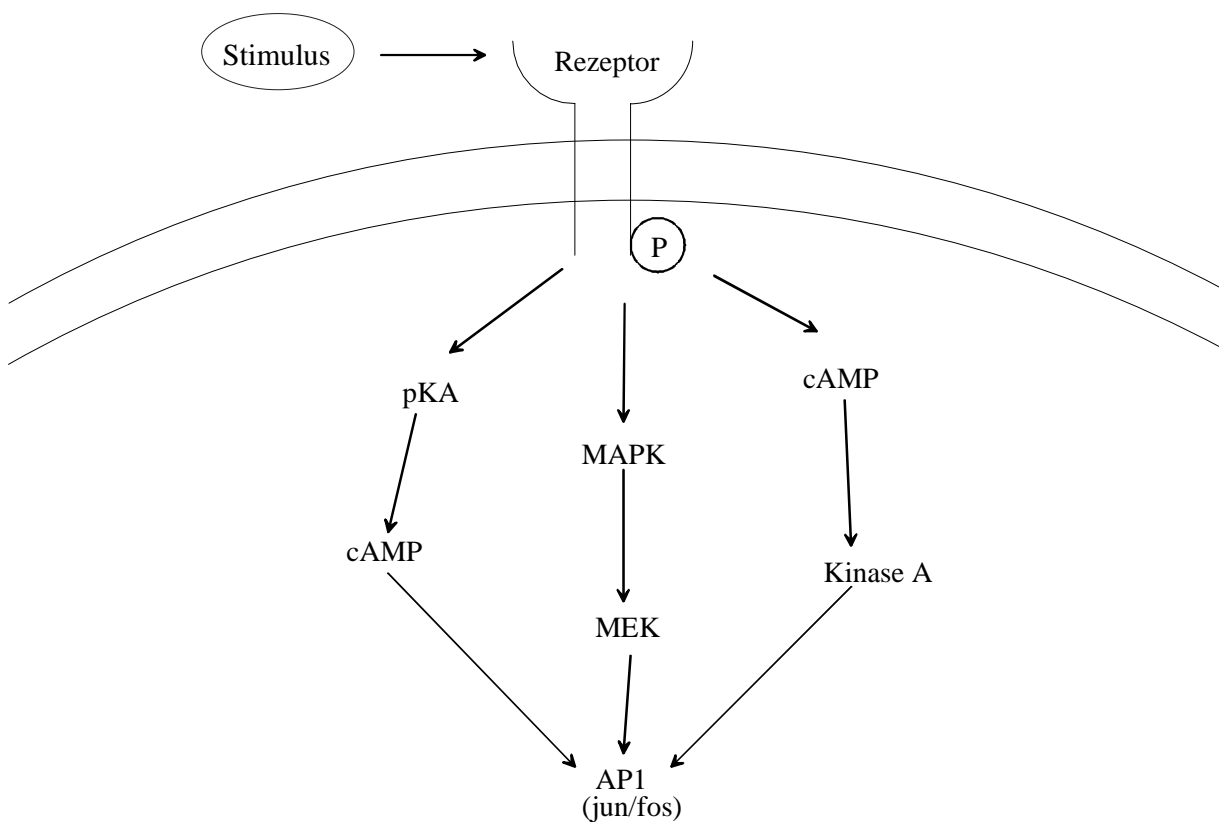


Abbildung 44: AP1-Signal-Transduktionweg

3.3.2 Lokalisation des Proteins Rcd1+ in eukaryontischen Zellen

Für die weitere Charakterisierung des Proteins ist es wichtig, die Position des Proteins in der Zelle zu kennen, da die Lokalisation Rückschlüsse auf die Funktion erlaubt. Um den Aufenthaltsort von Rcd1+ in der Zelle zu bestimmen, wurden COS-7 Zellen mit pEGFP-

rcd1+ transfiziert. Der Vektor stand zu Beginn der Arbeiten zur Verfügung. Essentiell für eine korrekte Lokalisation ist eine einwandfreie Zellmorphologie, daß heißt die Zellen sollten vereinzelt wachsen und keinen oder kaum Kontakt zu Nachbarzellen haben, da sonst die Zelle in ihrer Ausbreitung behindert würde. Eine hohe Zelldichte kann durch äußeren Streß die Ergebnisse verfälschen, da die Zelle den Stoffwechsel umstellt, das Wachstum verlangsamt und im Extremfall abstirbt. Um Verfälschungen durch zu dichtes Wachstum auszuschließen, wurde zu Beginn der Untersuchung die Zelldichte optimiert (siehe 2.6.4.9.1).

Für die Immunmarkierung wurden die Deckgläschen mit transfizierten Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgewählt, die eine optimale Dichte für die Immunfluoreszenz besitzen. Auch wurde die Transfektionseffizienz durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Transfektionsausbeute muß nicht besonders hoch sein, aber so, daß bei einer 400fachen Vergrößerung noch 4 bis 5 transfizierte Zellen im Blickfeld des Mikroskops liegen. Die Zellen auf diesen Deckgläschen werden fixiert, permeabilisiert und die Antikörpermarkierung mit dem primären und sekundären Antikörper durchgeführt (siehe 2.6.4.9.2 und 2.6.4.9.3). Anschließend werden die Zellen in Mowiol eingebettet, was die Diffusionsprozesse im Zellinneren weitgehend unterbindet (siehe 2.6.4.9.4). Es wurden die in 2.5 aufgeführten Antikörper verwendet. Die Ergebnisse der Immunmarkierung wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das EGFP-Rcd1+-Fusionsprotein wurde dabei durch Licht im blauen Bereich (460 bis 490 nm) angeregt, die Anregungswellenlänge für den an den sekundären Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoff liegt im grünen Spektralbereich (475 bis 545 nm). Zur Dokumentation wurden Schwarzweißphotographien des selben Bildausschnitts mit beiden Anregungswellenlängen angefertigt. Im Folgenden ist exemplarisch pro Antikörper ein Bildpaar dargestellt. Die Aufnahmen wurden bei 630facher Vergrößerung am Leitz-Fluoreszenzmikroskop im Institut für Physiologische Chemie gemacht.

Als erstes wurde der Antikörper MAb414 gegen den nukleären Kernporenkomplex verwendet (siehe Abbildung 45). Es ist deutlich zu erkennen, daß die Markierungen durch GFP-Rcd1+ und den Antikörper die selbe Position in der Zelle einnehmen. Es ist zwar auch noch GFP-Rcd1+ im Zytosol und in der Nähe der Plasmamembran zu erkennen, aber dieser Anteil ist klein. Das Auftreten im Zytosol ist auch nicht weiter ungewöhnlich, da Proteine ja im Zytosol prozessiert werden und von dort zu ihrem Bestimmungsort transloziert werden. Bei dem Antikörper CI-MPR, der spezifisch das späte Endosom/Lysosom markiert konnte keine Übereinstimmung mit GFP-Rcd1+ beobachtet werden (siehe Abbildung 46). Auch der Antikörper X22 (*Anti-Clatenin*), der spezifisch für Clatenin/Vesikel ist (siehe Abbildung

47), und der Anti-Calnetin-Antikörper, der das Endoplasmatische Retikulum markiert (siehe Abbildung 48), zeigen keine übereinstimmende Lokalisation mit GFP-Rcd1+. Die Markierung mit dem Antikörper EEA1 (*Early Endosom Associated Antigen 1*), der spezifisch das frühe Endosom erkennt war nicht erfolgreich. Die Markierung war sehr diffus und entsprach nicht dem erwarteten Bild (siehe Abbildung 49).

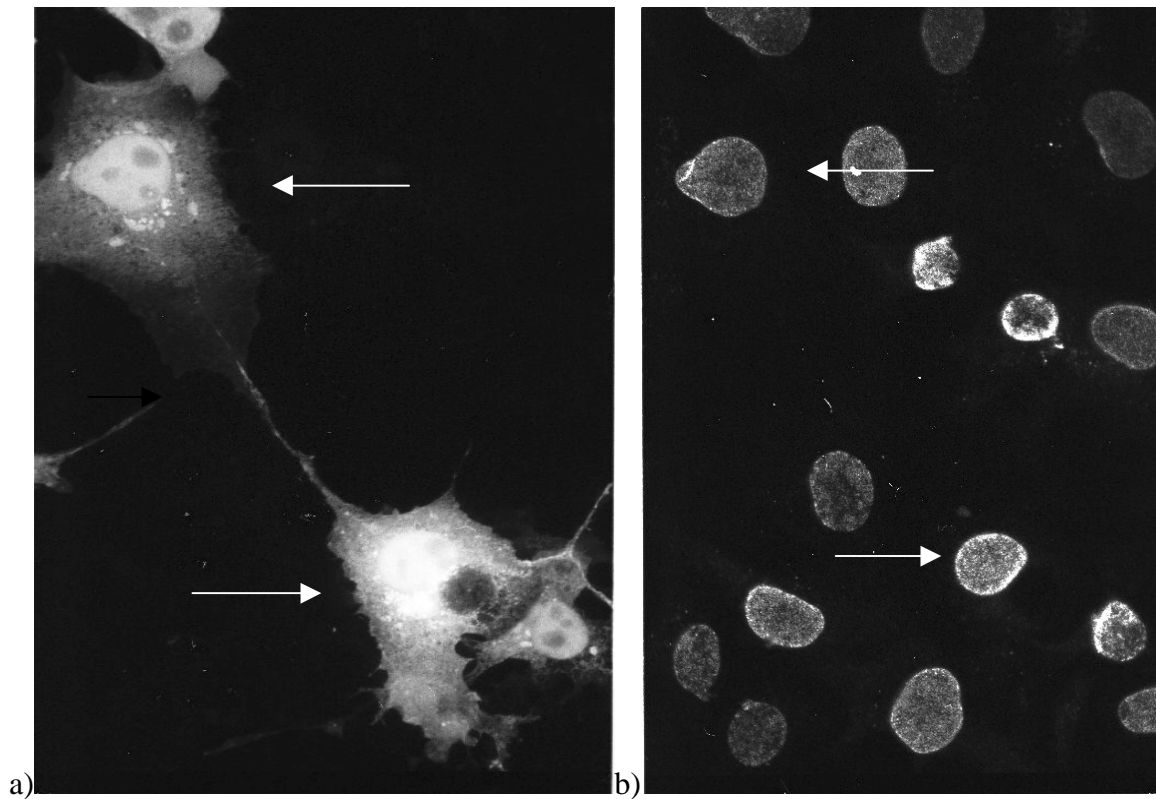


Abbildung 45: a) GFP-Rcd1+, b) Antikörper MAb414; die Pfeile markieren jeweils identische Positionen

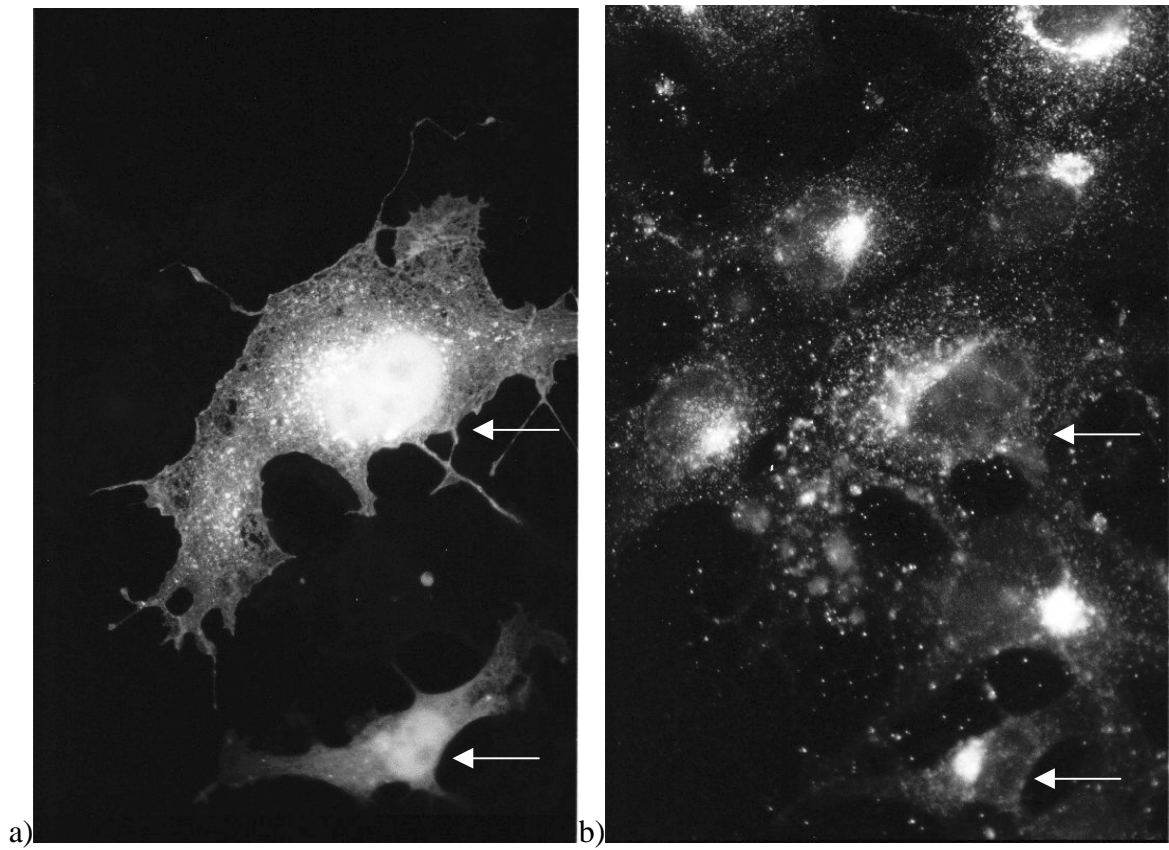


Abbildung 46: a) GFP-Rcd1+, b) Antikörper CI-MPR; die Pfeile markieren jeweils identische Positionen

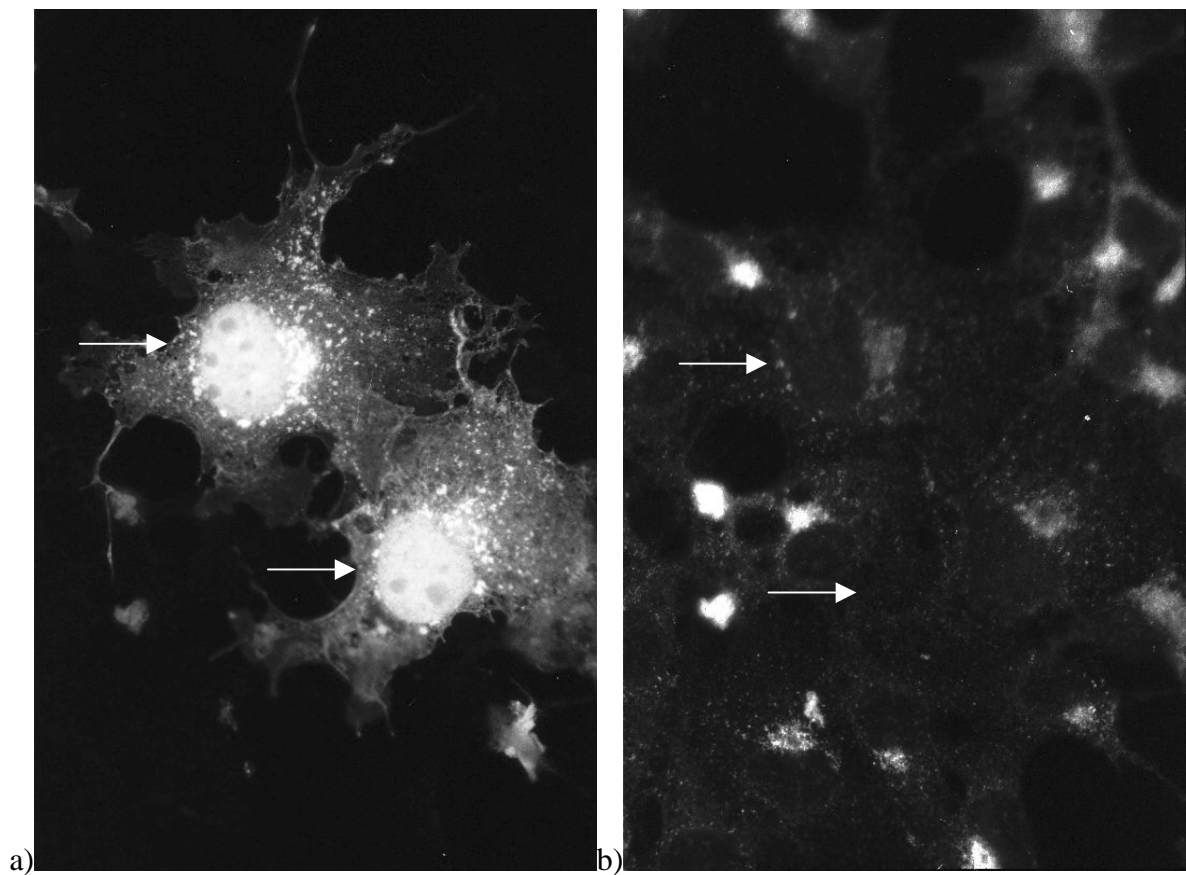


Abbildung 47: a) GFP-Rcd1+, b) Antikörper X22; die Pfeile markieren jeweils identische Positionen

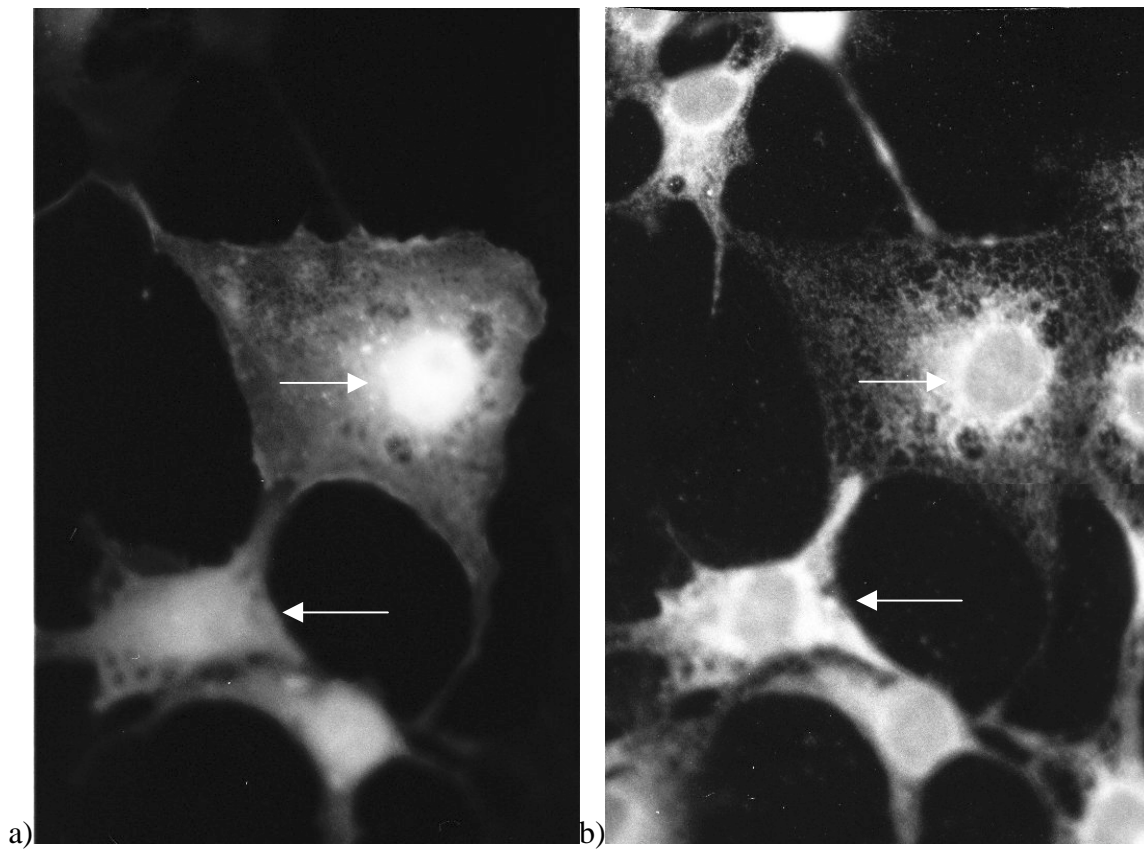


Abbildung 48: a) GFP-Rcd1+, b) Calnetin-Antikörper; die Pfeile markieren jeweils identische Positionen

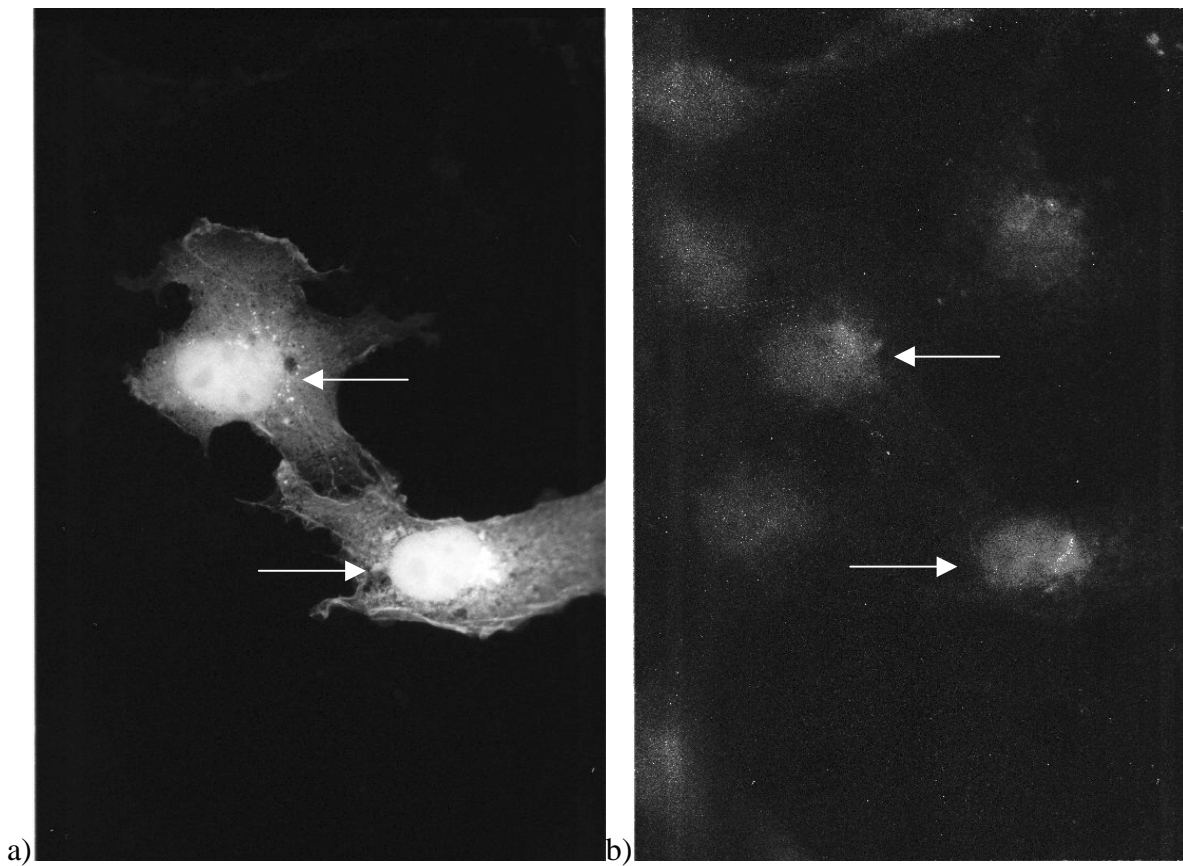


Abbildung 49: a) GFP-Rcd1+, b) Antikörper EEA1; die Pfeile markieren jeweils identische Positionen

Es läßt sich eindeutig feststellen, daß GFP-Rcd1+ im Nukleus der Zelle lokalisiert ist. Diese Beobachtung unterstützt die These, daß Rcd1+ bei der Transkription eine Rolle spielt. Außerdem ist eine geringe Affinität zur Plasmamembran festzustellen.

3.3.3 Versuche zur Bestimmung der wechselwirkenden Region

Um die Funktion von Rcd1+ zu verstehen, ist es notwendig die Wechselwirkungsregion zu bestimmen. Eine Möglichkeit, die interagierende Region einzugrenzen, ist es, Deletionsmutanten von Rcd1+ zu generieren und die Veränderung des Reportersignals *in vivo* zu beobachten. Für die Erzeugung von Deletionsmutanten wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Mittels PCR (*Primer* siehe Anhang) wurden sowohl Fragmente von rcd1+ als auch das gesamte Gen amplifiziert, mit *EcoRI* und *XhoI* gespalten und in den entsprechend präparierten Rahmen von pcDNA1.1Amp ligiert. Das Ergebnis wurde durch Restriktionsspaltung verifiziert.

Über Restriktionsspaltung von pcDNA-rcd1+ mit den Enzympaaren *NotI/BglII*, *NotI/BpII* und *SmaI/SphI* wurden Fragmente des rcd1+-Gens aus dem Plasmid herausgeschnitten. Anschließend wurde mit einem ausgleichenden Oligonukleotidpaar (*NotI/BglII*, *NotI/BpII*, N-terminale Deletion) ligiert oder überhängende Enden mit Klenow-Polymerase (*SmaI/SphI*, C-terminale Deletion) aufgefüllt und ligiert. Die Verwendung eines Oligonukleotidpaares bei der N-terminalen Deletion war notwendig, um eine Verschiebung des Leserasters zu verhindern. Die Deletionen wurden durch Restriktionsspaltung überprüft. Eine Übersicht über die generierten Mutanten bietet Abbildung 50.

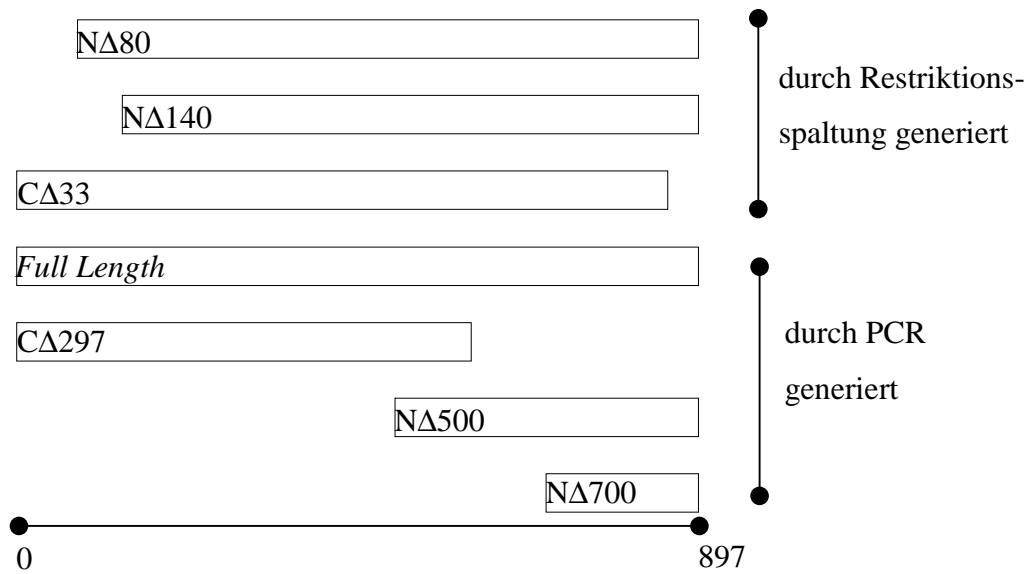


Abbildung 50: Fragmente von *rcd1+*, die Zahlenangaben bezeichnen Basenpaare

Die Deletionsmutanten wurden anschließend zusammen mit dem Ausgangskonstrukt und den Reportergenvektoren in COS-7-Zellen transfiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 51 dargestellt. Man kann erkennen, daß der N-terminale Bereich bis etwa 140 bp eine negativ regulierende Wirkung besitzt. Wird er entfernt, steigt das Signal auf den doppelten bis vierfachen Wert an. Deletionen am C-Terminus oder größere Deletionen am N-Terminus scheinen keinen Einfluß auf die Signalstärke zu haben.

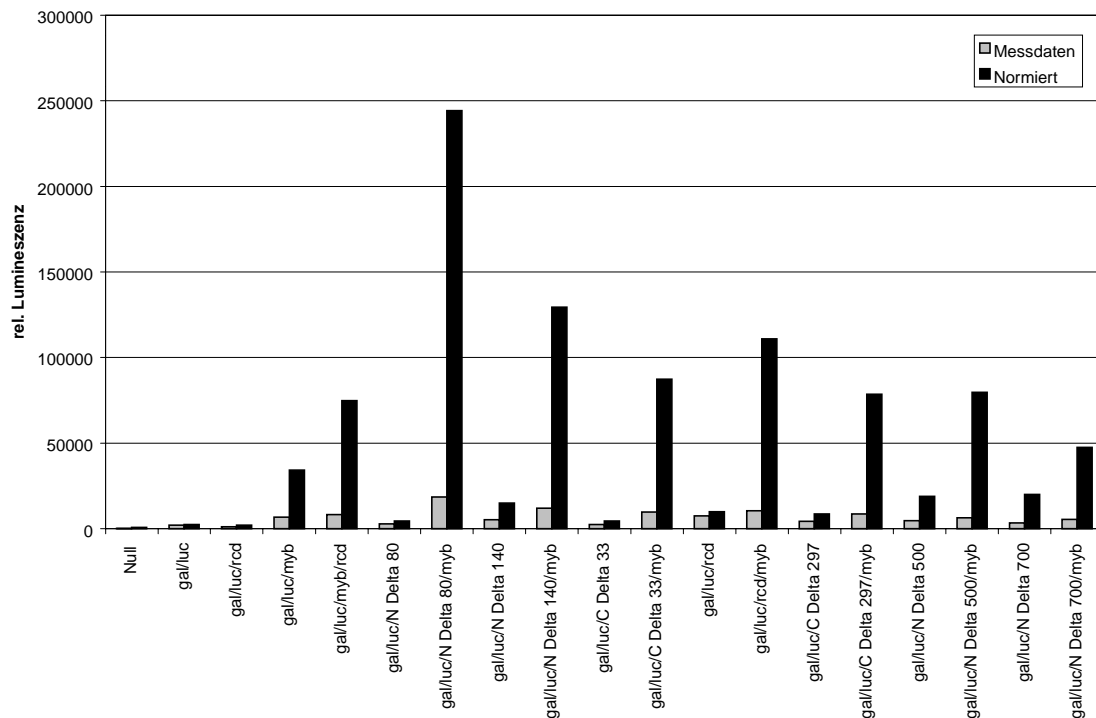


Abbildung 51: Ergebnis der Transfektion mit den Rcd1+-Deletionsmutanten

3.4 Auswirkung von Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne des Proteins c-Myb bei *in vivo* Experimenten

Neben den Untersuchungen zu Rcd1+ war auch das Verhalten von c-Myb in der Zellkultur von Interesse, insbesondere, wie sich die von Sokolowski (Sokolowski, 1998) eingeführten Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne auf die Signalstärke im Reporter-Gen-Assay auswirken. Sokolowski hatte die von der japanischen Arbeitsgruppe um Kazuhiro Ogata (Ogata *et al.*, 1994) durch NMR-Strukturanalyse ermittelten acht spezifische Bindungen von Aminosäuren an die DNA (siehe Abbildung 5, Einleitung) durch gezielte Mutation der Aminosäuren verändert und die Bindungsfähigkeit der Mutanten durch EMSA untersucht (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Assoziations- und Dissoziationskonstanten der 13 untersuchten Mutanten und des Wildtyp c-Mybs (Sokolowski, 1998)

Mutante	K128A	K128E	E132A	E132N	N136A	N136D	N179A
K_{ass}	$3,2 \times 10^7$	$3,4 \times 10^5$	nd	$< 10^5$	nd	$6,0 \times 10^6$	$< 10^5$
K_{diss}	$3,1 \times 10^{-8}$	$2,9 \times 10^{-6}$	nd	$> 10^{-5}$	nd	$1,7 \times 10^{-7}$	$> 10^{-5}$

Mutante	N179D	N183A	N183D	N186A	S187A	S187N	Wildtyp
K_{ass}	nd	$<10^5$	nd	$3,4 \times 10^8$	$6,7 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$
K_{diss}	nd	$>10^{-5}$	nd	$2,9 \times 10^{-9}$	$1,5 \times 10^{-8}$	$3,6 \times 10^{-9}$	$3,2 \times 10^{-9}$

Speziell die Frage, ob die im EMSA als bindungsaktiv zu bewertenden Mutanten in der Zellkultur auch ohne Einfluß sind, ist von Interesse. Es ist hierbei zu berücksichtigen, daß die Bindungsstudien nur mit einem Konstrukt, das die *Repeats* R1, R2 und R3 repräsentiert, durchgeführt wurden, da die Expression von *Full Length-c-Myb* in bakteriellen Systemen nicht möglich war. Bei den *in vivo* Experimenten wurde das gesamte Protein benutzt. Dazu wurde das Gen mittels PCR aus dem Vektor pEQ176p2Myb amplifiziert und über die *EagI*- und *EcoRI*-Schnittstelle in den Vektor pcDNA1.1/Amp kloniert. Dann wurde die DNA-Bindungsdomäne durch Restriktionsspaltung aus dem Vektor entfernt und durch die mutierten, mit PCR amplifizierten DNA-Bindungsdomänen aus den von Sokolowski hergestellten Konstrukten ersetzt. Anschließend wurde eine Transfektion von COS-7-Zellen mit den Mutanten und dem Wildtyp-Konstrukt durchgeführt.

Das Ergebnis der Transfektion ist in Abbildung 52 dargestellt. Sie zeigt die normierten Durchschnittswerte der Messungen aus drei Transfektionen.

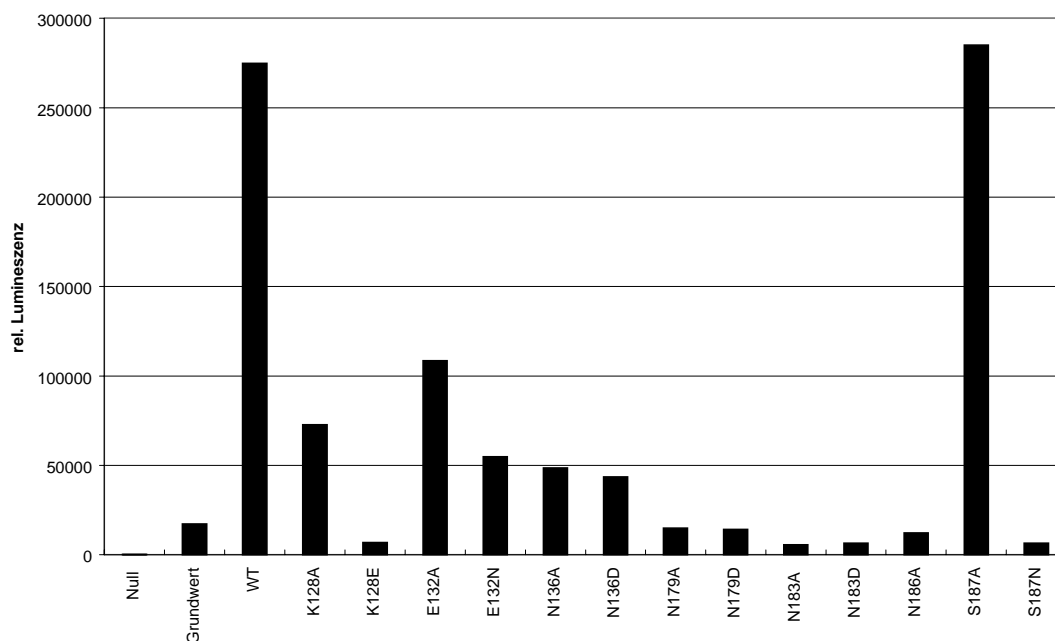
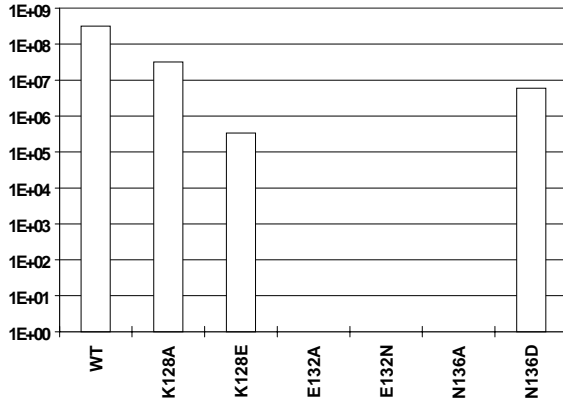


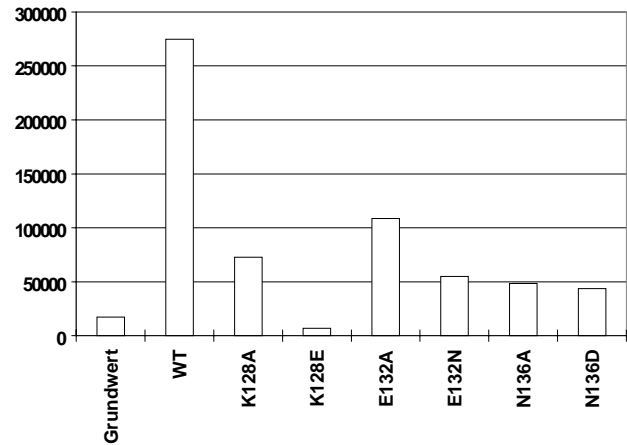
Abbildung 52: Mittelwerte aus drei Transfektionen

In Abbildung 53 sind die Ergebnisse der Transfektionen nach *Repeat 2* und *Repeat 3* getrennt und den Bindungsaktivitäten gegenübergestellt.

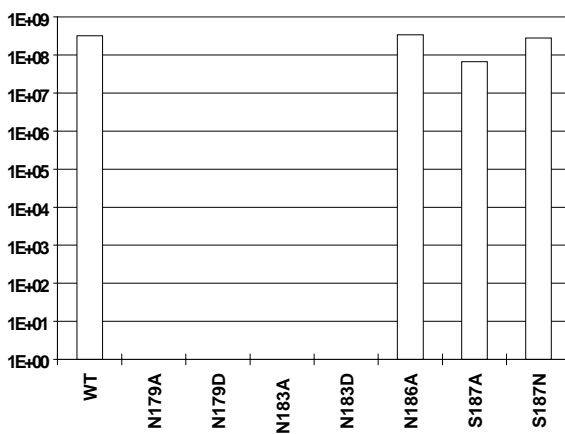
DNA-Bindung *Repeat 2*



Transaktivierung *Repeat 2*



DNA-Bindung *Repeat 3*



Transaktivierung *Repeat 3*

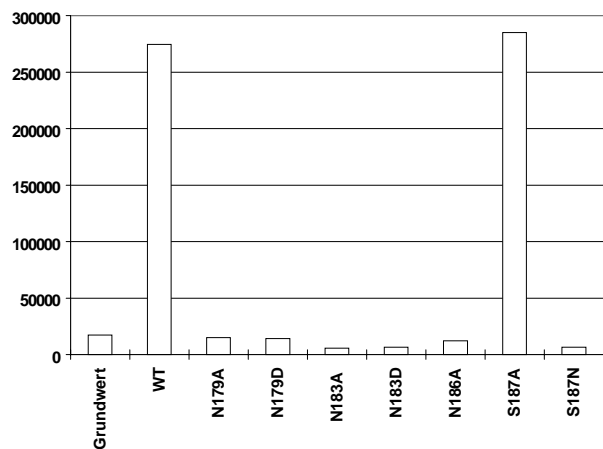


Abbildung 53: Gegenüberstellung von DNA-Bindungsfähigkeit und Transaktivierung

Interessant an den Ergebnissen ist die Tatsache, daß einige Mutanten (E132A, E132N, N136A), die in der Bindungsstudie inaktiv sind, transaktivierende Eigenschaften besitzen und einige Mutanten (K128E, N186A, S187N), die DNA binden, dennoch keine Transaktivierung hervorrufen.

Um EMSA-Experimente mit dem gesamten Protein durchzuführen, wurde durch Frackelton-Extraktion (siehe 2.6.4.10) Zellextrakte hergestellt und mit ihnen ein *Shift*-Experiment durchgeführt. Da man bei der ursprünglichen Methode jedoch nicht weiß, wie viele Zellen für den Extrakt verwendet wurden und wie hoch die Transfektionseffizienz war, daß heißt wie hoch die Proteinkonzentration in den Zellen ist, wurde die Extraktionsmethode modifiziert (siehe 2.4.6.11). Bei der Transfektion wurde zusätzlich zu dem Plasmid pEG176P2Myb noch der β -Galaktosidase-Vektor pEQ176 verwendet, um die Transfektionseffizienz bestimmen zu können. Außerdem wurde die Zellzahl bestimmt. Über die Signalstärke im Reporter-Gen-Assay und die Zellmenge wurde für jeden Zellextrakt ein Faktor ermittelt, mit dem die einzusetzende Menge so berechnet werden konnte, daß der Proteingehalt bei den verschiedenen Versuchen gleich war. Dennoch konnte selbst beim Wildtyp kein *Shift* beobachtet werden. Offenbar war die Proteinkonzentration der Extrakte zu gering.

4 Diskussion

4.1 Das modifizierte *Phage-Display-System*

Ausgehend von einem bestehenden *Phage-Display-System* (Kiewitz, 1997a) wurde das System so verändert, daß eine Klonierung mit überhängenden Enden ermöglicht wurde. Diese Modifikation stellt eine entscheidende Verbesserung gegenüber dem bisher verwendeten System dar, bei dem stumpfe Enden verwendet wurden. Die Verwendung von überhangerzeugenden Restriktionsendonukleasen vereinfacht den gerichteten Einbau von Fragmenten, stellt allerdings auch höhere Anforderungen an die Klonierungsstrategie. Die Ligationsausbeute konnte erhöht werden ebenso die Transformationseffizienz, so daß es möglich wurde, kleine DNA-Bibliotheken zu untersuchen. Eine Bibliothek von 20000 Klonen aus genomischer *E.coli*-DNA, die etwa 4000 Gene des Bakteriums repräsentiert, konnte in den Phagemid-Vektor kloniert werden. RecA als Köderprotein lieferte mehrere mögliche Wechselwirkungspartner darunter eine Helikase und eine Integrase, die mit RecA bei der DNA-Reparatur kooperieren könnten.

Die Untersuchung von cDNA-Bibliotheken eukaryontischer Organismen ist mit dem modifizierten System trotz der Verbesserungen immer noch nicht möglich, da die Ausbeute von unabhängigen Klonen zu gering ist. Um die Multiplizität einer cDNA-Bibliothek zu erhalten, ist es notwendig, eine Zahl von 3×10^6 unabhängiger Klone zu erzeugen. Die erzielte Klonzahl lag um den Faktor 10^2 unter dieser Vorgabe. Eine weitere Steigerung der Ligations- und Transformationsausbeute war nicht möglich.

Für die Untersuchung intra- und intermolekularer Wechselwirkungen ist das entwickelte System jedoch gut geeignet, da es durch die eingefügten Restriktionsendonuklease-schnittstellen flexibel ist. Ein Ergebnis ist die Bestätigung der intermolekulare Wechselwirkung zwischen c-Myb und Rcd1+.

Desweiteren wurde die Wechselwirkung zwischen B-Myb und CyclinD1 untersucht. B-Myb ist ein Mitglied der Myb-Familie. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der während des Zellzyklus durch CyclinA-Cdk2 vermittelte Phosphorylierung am C-Terminus reguliert wird. Er stellt somit eine Art Sensor dar, welcher die Aktivität des Transkriptionsfaktors zum erforderlichen Zeitpunkt des Zellzyklus initiiert (Zieblold, 1997). Der Takt der aufeinanderfolgenden Vorgänge des Zellzyklus wird durch mehrere Regulatorproteine

gesteuert. Für die Steuerung des Zellzyklus durch Proteinkinasen ist es notwendig, daß sie an ein Cyclin gekoppelt werden. Diese speziellen Kinasen werden deshalb auch als cyclinabhängige Kinasen (*Cyclin Dependend Kinases*, Cdks) bezeichnet. Cycline stellen eine weitere Klasse von Regulatorproteinen dar und erhalten ihren Namen aufgrund der Eigenschaft, daß sie während des Zellzyklus einem periodischen Auf- und Abbau unterliegen. Die verschiedenen Cdks liegen während des gesamten Zellzyklus in konstanter Konzentration in der Zelle vor. Ihre Aktivität bei der Phosphorylierung von Zielproteinen wird durch die Konzentrationsschwankungen eines spezifischen Cyclins reguliert. Dieser aktive Komplex aus Cdk und Cyclin wird als MPF (*Maturation Promoting Factor*) bezeichnet. Die wechselnde Aktivität verschiedener MPFs bestimmt den zeitlichen Ablauf der verschiedenen Stadien des Zellzyklus. Ein Komplex aus dem CyclinD1 und Cdk4 ist zum Beispiel notwendig, damit die Zelle den Restriktionspunkt überschreiten und von der G 1-Phase in die S-Phase übergehen kann (Zieblold, 1997). B-Myb vermittelt wirksam die Aktivierung des *Heat Shock Promotors* (HSP70), wobei nachgewiesen werden konnte, daß diese Transaktivierung unter Einbeziehung des *Heat Shock Elementes* (HSE) vermittelt und durch Interaktion mit CyclinD1 verstärkt wird (Kamano, 1997). Bei den beschriebenen MPFs hatten Cycline die Aufgabe, Cdks für regulierende Aufgaben im Rahmen des Zellzyklus zu aktivieren. Bei der Verstärkung der transaktivierenden Eigenschaften von B-Myb wirkt das CyclinD1 jedoch als Aktivator für ein anderes Zielmolekül. Bei der Untersuchung der Wechselwirkung dieser beiden Proteine zeigte sich, daß sich die Interaktion hauptsächlich mit dem Mittelteil (AS 103 bis 258) von CyclinD1 stattfindet, wobei der Einfluß des vom Phagen präsentierten B-Myb-Fragments relativ gering ist.

Abschließend läßt sich sagen, daß das modifizierte *Phage-Display*-System fast alle gestellten Anforderungen erfüllt. Es eignet sich gut zur Untersuchung intra- beziehungsweise intermolekularer Wechselwirkungen zwischen bekannten Proteinen von denen gezielt Fragmente generiert und exprimiert beziehungsweise auf dem Phagen-Kapsid präsentiert werden können. Auch die Untersuchung kleinerer DNA-Bibliotheken ist nicht problematisch. Allerdings konnte das Ziel, eine eukaryontische cDNA-Bibliothek auf Wechselwirkungspartner eines bekannten Proteins zu untersuchen, nicht erreicht werden. Bei der Anwendung des Systems sind die erwähnten Einschränkungen (siehe 3.1.5) zu beachten.

4.2 *Two-Hybrid-Screening*

Für die Untersuchung mit dem *Yeast-Two-Hybrid-System* wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte System (Kersten, 1999; Siegert, 1998) verwendet. Es sollte untersucht werden, ob eine weitere Verschiebung des Köderproteins in Richtung C-Terminus von c-Myb zur Entdeckung neuer Wechselwirkungspartner führt. Dazu wurde das Köderplasmid pAN1 (siehe Abbildung 33) kloniert und das *Screening* nach dem erprobten Protokoll durchgeführt. Dabei wurde ein möglicher positiver Klon gefunden und sequenziert. Dieser zeigte jedoch Stops in allen Leserastern, so daß weitere Untersuchungen mit dem Köderplasmid pAN1 wenig sinnvoll erscheinen. Als Ergebnis dieses *Screenings* bleibt festzuhalten, daß die Region von Aminosäure 500 bis 530 essentiell für eine Wechselwirkung ist. Dort findet sich auch das EVES-Motiv, das mit der DNA-BD interagieren kann (Dash *et al.*, 1996). Abschließend läßt sich sagen, daß das *Yeast-Two-Hybrid-System* eine elegante Methode ist, um intermolekulare Interaktionen zu untersuchen. Dabei ist von Vorteil, daß man nicht, wie beim *Phage-Display* auf ein etwa 300 Aminosäuren langes Fragment beschränkt ist. Außerdem wird beim *Yeast-Two-Hybrid-System* das Protein posttranslational prozessiert und liegt somit in der natürlichen Faltungsform vor. Ferner ist die Untersuchung von cDNA-Bibliotheken möglich. Von Vorteil ist weiterhin, daß cDNA-Bibliotheken kommerziell vertrieben werden und in einem Vektor vorliegen, der direkt im System verwendet werden kann.

4.3 Das Protein Rcd1+

Das *rcd1+*-(*Required For Cell Differentiation*)-Gen der Maus wurde mit dem Köder pCK3 (Myb-Protein AS 500 bis 600) gefunden. Die Funktion von Rcd1+ in Wirbeltieren ist unbekannt. Es wird durch Erythropoietin (EPO) induziert. Beim Menschen scheint Rcd1+ spezifisch in den blutbildenden Organen exprimiert zu werden. Wie schon erwähnt (siehe 3.3) ist es im Spaltpilz *Saccharomyces pombe* bei der sexuellen Entwicklung der Sporulation beteiligt (Maekawa, 1994; Okazaki *et al.*, 1998). Der sexuellen Differenzierungsprozess der Hefe wird von dem Faktor *ste11* gesteuert, der von der cAMP-Proteinkinase A1 (PKA) Kaskade und Streßsignalen reguliert wird. *Ste11* interagiert mit dem Hefehomologon von CREB, das als PCR bezeichnet wird. Die beschriebenen Parallelen zwischen Maus und Hefe sind in Abbildung 54 dargestellt. Rcd1+ aktiviert *ste11*, das Hefeanalogon der humanen MAP-Kinase MeKK3, welches ein *High-Mobility Group* (HMG) Motiv enthält. HMG-Proteine haben eine durchschnittliche Größe von 100 bis 200 Aminosäuren und sind Bestandteil des Chromatins. Sie können doppelsträngige DNA in der kleinen Furche binden.

Weiterhin gibt es Hinweise auf eine strukturelle Verwandtschaft zwischen der DNA-Bindungsdomäne von Myb und HMG-Proteinen. Der Faktor TCF-1 ist ebenfalls ein HMG-Protein (Verbeek, 1995). Er steuert die Differenzierung von Thymozyten.

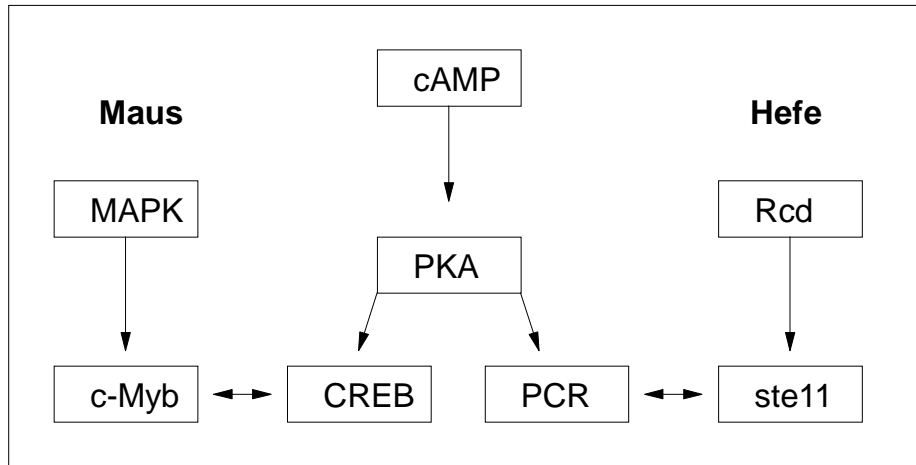


Abbildung 54: Rcd1+ und c-Myb als Teile von Signaltransduktionskaskaden

Die Differenzierungsprozesse in eukaryontischen Zellen werden von mehreren Protein-Protein-Interaktionen, wie dem von cAMP regulierten Netzwerk oder dem MAP-Kinase *Pathway* reguliert. Eine Konservierung dieser Differenzierungssysteme in allen eukaryontischen Zellen ist wahrscheinlich. Auch in *S.pombe* wurden hochkonservierte Homologa der genannten Proteine gefunden. Man kann nun, aufgrund der evolutionären Konservierung des Gens, annehmen, daß von *rcd1+* ein Kofaktor kodiert wird, der unter anderem bei den Differenzierungsprozessen, die von Myb bewirkt werden, eine wichtige Aufgabe erfüllt.

Durch einen *Dot Blot* wurde gezeigt, daß die Expression des Protein in der Maus bevorzugt in Milz, Thymus und glatter Muskulatur stattfindet (Kersten, 1999). Das Protein Rcd1+ umfaßt 299 Aminosäuren und konnte von mir in *E.coli* als (His)₆-tag-Fusionsprotein in etwa 80 %iger Reinheit isoliert werden (siehe Abbildung 37). Ein weiterer Reinigungsschritt über eine Phosphozellulosesäule erhöhte den Reinheitsgrad auf über 90 % (siehe Abbildung 38). Eine schwache Bindung an DNA-Zellulose konnte ebenfalls nachgewiesen werden (siehe Abbildung 38). Das *Pull Down Assay* des (His)₆-tag-Proteins zeigt mit Ausnahmen der transaktivierenden Domäne mit allen anderen Konstrukten Interaktion (siehe Abbildung 40). Die Lokalisation von Rcd1+ konnte durch Transfektion eines *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) –Fusionsproteins und anschließend Immunfluoreszenzmikroskopie auf den Kern eukaryontischer Zellen begrenzt werden (siehe Abbildungen 45 bis 49). Signale von

Rcd1+-EGFP aus dem Zytosol sind auf die dort stattfindende Synthese des Proteins zurückzuführen.

Die Kotransfektion von c-Myb und Rcd1+ löst im Reporter-Gen-Assay (siehe 2.6.4.7) die gleiche Verstärkung aus wie die Kotransfektion von c-Myb und C/EBP. Wird zusätzlich zu c-Myb und C/EBP noch Rcd1+ transfiziert kommt es zu einer Verringerung des (Scholz, 1999). Diese Beobachtungen legen nahe, daß Rcd1+ ein positiver Kofaktor der Myb-induzierten Transaktivierung sein könnte. Bei Anwesenheit von C/EBP kommt es durch Rcd1+ zur Repression des von c-Myb und C/EBP synergistisch induzierten Signals.

Es ist offensichtlich, daß c-Myb und Rcd1+ Gemeinsamkeiten besitzen. So werden beide in blutbildenden Organen exprimiert und sind in vielen Spezies hochkonserviert. c-Myb ist ein Transkriptionsfaktor. Allerdings fand sich in der Proteinsequenz von Rcd1+ kein Motiv, das eine Zuordnung in eine Proteinfamilie zuläßt.

Daher wurde systematisch versucht, weitere Eigenschaften des Proteins zu ermitteln. Zunächst wurde mit dem *Mercury Pathway*-System der Firma Clontech nach Signaltransduktionswegen gesucht, in die Rcd1+ regulatorisch eingreift.

Man konnte in den letzten Jahren eine große Anzahl von Genen identifizieren, durch welche Mitose oder Differenzierung eukaryontischer Zellen kontrolliert werden. Faktoren, welche die Mitose stimulieren, werden in einem Netzwerk untereinander verknüpfter Signaltransduktionswege (z.B. PKA-Pathway, Jak/Stat-Pathway, MAP-Kinasekaskade, etc.) von der äußeren Membran bis in den Kern der Zelle weitergeleitet (siehe Abbildung 55).

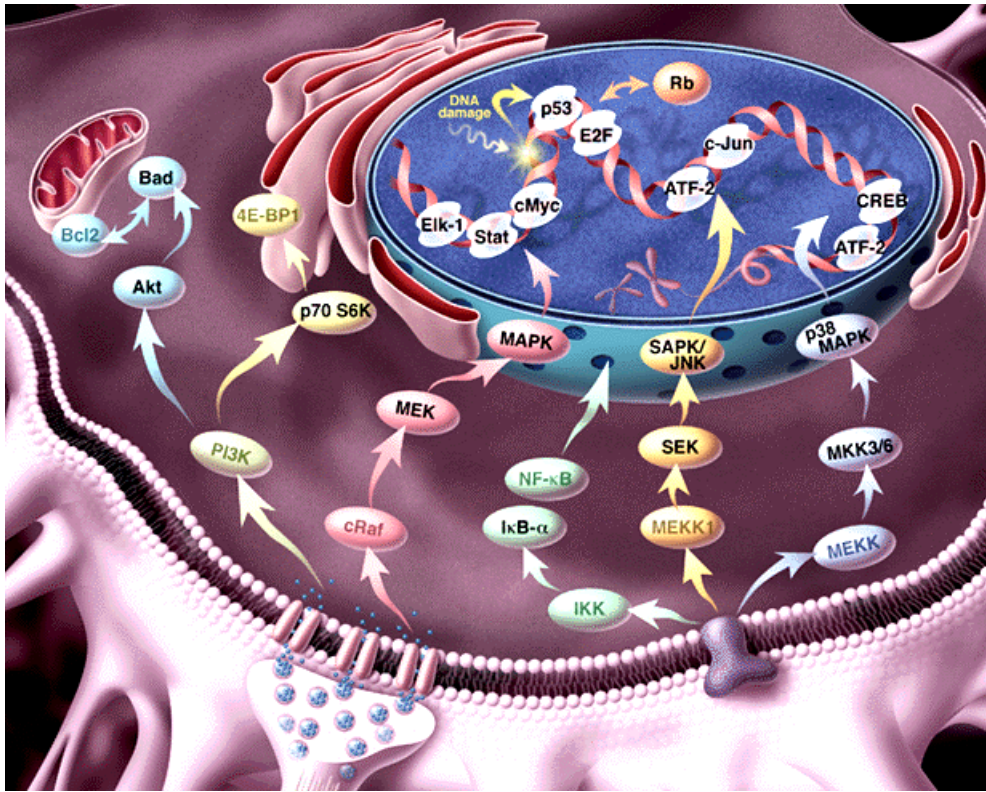


Abbildung 55: Beispielhafte Darstellung einiger Signaltransduktionskaskaden

Das *Pathway Profiling* ermöglicht es, die Rolle eines Gens unbekannter Funktion in wichtigen Signaltransduktionskaskaden zu untersuchen. Es werden dafür mehrere Vektoren mit unterschiedlichen cis-agierende Elementen (zum Beispiel E2F, CRE oder AP1) solcher Signaltransduktionswege kombiniert mit einem Reporter gen (zum Beispiel Luziferase oder SEAP, *Secreted Alkaline Phosphatase*) benötigt. Werden diese Vektoren in Zellen transfiziert, so werden durch endogene Faktoren Reporter gensignale induziert. Wird nun eine Kotransfektion mit dem zu untersuchenden Gen durchgeführt, so wird das Signal positiv oder negativ verändert. Das erwähnte System der Firma Clontech enthält solche *Pathway Profiling* Vektoren. Eine Untersuchung von Rcd1+ mit diesem System zeigte eine Reduzierung des AP1-Signals auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes (siehe Abbildung 43).

Weitere wichtige Erkenntnisse über die Funktion von Rcd1+ lassen sich gewinnen, wenn man eine Kartierung der Wechselwirkungsdomäne vornimmt. Dazu wurden C- und N-terminale Deletionsmutanten von Rcd1+ hergestellt (siehe 3.3.3). Diese wurden mit c-myb und einem Reporter genkonstrukt (pMim1-Luc) transfiziert. Es zeigte sich, daß N-terminale Deletionen bis zur Aminosäure 140 eine Verstärkung bewirken, während Deletionen am C-Terminus das Signal weitgehend unverändert lassen.

Interessant ist die anfangs erwähnte Tatsache, daß die Expression von Rcd1+ durch die Zugabe von EPO zum Kulturmedium stimuliert wird (Gregory *et al.*, 2000). EPO induziert die Differenzierung von Vorläuferzellen in erythroide Zellen. Myb ist in analoger Weise an der Differenzierung von Vorläuferzellen zu myeloiden Zellen beteiligt. Wegen der nukleären Lokalisation von Rcd1+ ist es denkbar, daß das Protein an der Transkription beteiligt ist. Eine weitere mögliche Funktion wäre, daß Rcd1+ ein Faktor ist, der bei Kondensation und Dekondensation des Chromatins eine Rolle spielt. Erst im letzten Jahr wurde das von Histoneacetylasen und Histondeacetylasen ausgelöste *Chromatin Remodelling* als ein wichtiger Faktor der Transkriptionsregulierung erkannt (Reviews: Gregory, 1998; Muchardt, 1999; Wolffe, 1999).

4.4 Bindungs- und Transaktivierungsverhalten von c-Myb-Mutanten

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) von Myb Proteinen hochkonserviert und findet sich in vielen Spezies. Sie besteht aus zwei bis drei Wiederholungen (*Repeats*) von etwa 50 Aminosäuren, wobei in jedem *Repeat* drei Tryptophane im Abstand von 18 Aminosäuren angeordnet sind.

Im *Phage-Display*-System (Kiewitz, 1997a) und im *Yeast-Two-Hybrid*-System (Kersten, 1999; Siegert, 1998) konnte gezeigt werden, daß die N-terminale DNA-BD mit dem C-Terminus des Proteins interagiert. Diese intramolekulare Wechselwirkung kann vermutlich durch Bindung von transkriptionellen Kofaktoren aufgehoben werden. Dabei wird auch die Konformation der DNA-BD beeinflusst. Desweiteren zeigte die DNA-BD im Transkriptionskomplex die Fähigkeit Kofaktoren zu binden. Ein Modell ist in Abbildung 5 dargestellt (Ness, 1996).

Das in der Einleitung dargestellte Modell von Ogata geht von acht *Direct Readout* Kontakten der Aminosäuren K128, E132, N136 (*Repeat* 2) und N179, K182, N183, N186, S187 (*Repeat* 3) aus. Durch zielgerichtete Mutagenese in der DNA-Bindungsdomäne wurden zu jeder Position zwei Mutanten generiert (Sokolowski, 1998). Sie wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt. Durch CD-Spektroskopie konnte für alle Mutanten und den Wildtyp ein α -Helixgehalt von etwa 48 % ermittelt werden, so daß man von einer identischen Konformation ausgehen kann. Durch EMSA wurden die Dissoziationskonstanten (siehe Tabelle 13) der Komplexe bestimmt. Als *Template* diente das

doppelsträngige Oligodesoxynukleotid TTACCTAACTGACACACAT, das von Ogata zur Ermittlung der NMR-Struktur benutzt wurde.

Tabelle 13: Bindungskonstanten der untersuchten Mutanten (Sokolowski, 1998)

Position		179			182	183			186	187	Bindungs- konstante
Mutante	Asp	Asn	Ala	Ile	Lys	Asn	His	Trp	Asn	Ser	
N179A		Ala									$< 10^5$
N179D		Asp									nd
K182A					Ala						$< 10^5$
K182E					Glu						nd
N183A						Ala					$< 10^5$
N183D						Asp					nd
N186A									Ala		3.4×10^8
N186D									Asp		$< 10^5$
S187A										Ala	6.7×10^8
S187N										Asn	2.8×10^9
Wildtyp											3.2×10^9
Position		128				132				136	
Mutante	Gly	Lys	Gln	Cys	Arg	Glu	Arg	Trp	His	Asn	
K128A		Ala									3×10^8
K128E		Glu									3×10^7
E132A						Ala					nd
E132N						Asn					$< 10^5$
N136A										Ala	nd
N136D										Asp	6×10^7

Die Transaktivierung durch die einzelnen Mutanten wurde *in vivo* in einem Reporter-Gen-Assay bestimmt (siehe 2.6.4.7). Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 dargestellt. In Abbildung 53 sind diese Werte den Bindungskonstanten gegenübergestellt, wobei *Repeat 2* und *3* getrennt betrachtet werden. Im Folgenden werden die Auswirkungen der einzelnen Mutationen sowohl auf die Bindung als auch auf die Transaktivierung getrennt nach *Repeat 2* und *3* diskutiert.

Substitutionen in *Repeat 3*

Die Aminosäuren N179, K182 und N183 sind essentiell für die Bindung an die spezifische DNA-Sequenz. Mutationen an diesen Positionen führen zu einem Verlust der DNA-Bindung sowie der Transaktivierung. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Bindungskonstanten der Mutanten N186A, S187A und S187N kaum vom Wildtyp. Man kann daher annehmen, daß für den Erkennungsprozess diese Positionen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Interessanterweise zeigt von diesen drei Mutanten, die eine hohe Affinität zu DNA haben, nur S187A eine Transaktivierung, die der des Wildtyps entspricht.

Es stellt sich die Frage, warum von drei Mutanten mit nahezu identischen DNA-Bindungskonstanten nur eine transaktivierende Eigenschaften besitzt. Die Bindungskonstante des Proteins wurde *in vitro* unter den Bedingungen des EMSA bestimmt. Die transaktivierenden Fähigkeiten des Proteins werden demgegenüber *in vivo* im Reportergen-Assay bestimmt, wo neben der DNA-Bindung auch Konformationsänderung und Interaktion mit anderen Kofaktoren eine Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, daß durch die Bindung an eine spezifische DNA-Sequenz der α -Helix-Anteil in der DNA-BD um 10 % steigt (Ebner *et al.*, 1994a). Es besteht die Möglichkeit, daß die Mutanten nicht in der Lage sind, trotz ihrer Fähigkeit DNA zu binden, diese Konformationsänderung zu vollziehen. Da der Austausch von Serin durch das fast gleich große Alanin in S187A zu keiner Änderung der Eigenschaften führt, ist zu vermuten, daß der Hydroxygruppe des Serins keine wichtige Funktion im Erkennungsprozess zukommt. Im Gegensatz hierzu wird bei N186A eine große Aminosäureseitenkette durch eine kleine und bei S187N eine kleine Aminosäureseitenkette durch eine große substituiert, was offensichtlich zu einer Konstellation in *Repeat 3* führt, die die DNA-BD hindert, die für die Bindung von Kofaktoren notwendige Konformationsänderungen zu durchlaufen.

Substitutionen in *Repeat 2*

Durch die Substitution von Lysin 128 in den Mutanten K128A und K128E kommt es zu einer Verringerung der Bindungsstärke von einer beziehungsweise drei Größenordnungen im Vergleich zum Wildtyp, die sich auch in den Signalverhältnissen im Reportergen-Assay zeigt. Während das Signal bei K128A schwach aber meßbar ist, liegt das Signal der K128E Mutante im Grundrauschen. Ein eher ungewöhnliches Verhalten zeigen die Mutanten E132A, E132N und N136A. Sie sind bindungsaktiv liefern aber dennoch reproduzierbar ein schwaches, deutlich über dem Grundrauschen liegendes Signal. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der Tatsache, daß DNA-Bindung die Voraussetzung für eine transaktivierende Funktion

eines Proteins ist. Offenbar verhindern die eingeführten Mutationen die Bindung der DNA-BD an spezifische DNA. Allerdings wurde beobachtet, daß DNA-Bindungsfähigkeit keine Voraussetzung der Transaktivierung sein muß. So zeigte ein Konstrukt von v-myb ohne DNA-BD ein Signal im Reporter-Gen-Assay (Klempnauer *et al.*, 1989). Der Mechanismus, der hinter dieser Transaktivierung steht ist unbekannt. Es ist möglich, daß in der Zelle Kofaktoren die Bindungsfähigkeit des Proteins verbessern. Ferner könnte es unter den *in vivo* Bedingungen im *Full-Length* Protein möglich sein, daß durch intramolekulare Wechselwirkungen mit anderen Domänen die schwache DNA-Bindung einiger Mutanten partiell kompensiert werden kann und man daher eine schwache Transaktivierung registriert. Gestützt wird diese Überlegung durch die Flexibilität des zweiten *Repeat*, die von McIntosh beobachtet wurde. Die Mutante N136D zeigt trotz der hohen Bindungsaktivität nur eine geringe transaktivierende Eigenschaft, die auf dem Niveau der Mutanten E132A, E132N und N136A liegt. Die Ursache hierfür kann in der Sokolowski (Sokolowski, 1998) beschriebenen Positionierung von N179 durch N136 liegen, die bei Substitution durch Alanin in N136A nicht mehr möglich ist.

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsch

Das Thema der vorliegenden Dissertation war die Optimierung des im Labor etablierten *Phage-Display*-Systems und die Untersuchung der Interaktion von c-Myb mit möglichen Kofaktoren.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein bestehendes *Phage-Display*-System modifiziert, um durch *Screening* einer cDNA-Bibliothek der Maus neue Interagenten von c-Myb zu finden. Die durchgeführten Modifikationen ermöglichen zwar die Untersuchung kleinerer Bibliotheken, allerdings reichte die erreichbare Zahl unabhängiger Klone nicht aus, die Multiplizität einer umfassenden cDNA-Bibliothek zu erhalten. Ferner wurde für ein bestehendes *Yeast-Two-Hybrid*-System ein neues Köderkonstrukt hergestellt und auf mögliche Wechselwirkungen untersucht. Es zeigte sich im Vergleich zu einem früher verwendeten Köder, daß die Aminosäuren 500 bis 530 des Myb-Proteins essentiell sind. Sie enthalten das EVES-Motiv, das mit der DNA-BD interagieren kann (Dash *et al.*, 1996).

Bei der Untersuchung der transaktivierenden Eigenschaften von c-Myb-Mutanten konnte gezeigt werden, daß Mutanten, welche die Bindungsaktivität des Wildtyp-Proteins besitzen, keine transaktivierenden Eigenschaften haben, während Mutanten, deren Bindungsfähigkeit im EMSA nicht nachzuweisen war, ein meßbares Signal im Reporter-*Assay* liefern.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Protein Rcd1+ biochemisch und biophysikalischen charakterisiert. Ein *Pathway Profiling* detektierte eine Involvierung von Rcd1+ in die AP1-Signaltransduktionskaskade. Ferner wurden Deletionsmutanten des Proteins generiert und im Reporter-*Assay* untersucht.

Schlüsselwörter: c-Myb, Rcd1+, Protein-Protein-Interaktion

5.2 English

The topic of this thesis was the optimization of the phage display system previously established in the laboratory and the examination of interactions of c-Myb with possible cofactors.

In the first part of the thesis, an existing phage display system was modified in order to detect new c-Myb interacting proteins by screening a murine cDNA library. Although the improvements of the system allowed for the screening of small libraries, the number of independent clones obtained was not sufficient to cover the multiplicity of a whole c-DNA library. Furthermore, a new plasmid was constructed for an established yeast-two-hybrid system and used as bait in the screening of an embryonic cDNA library. Although the outcome of the screen was negative, it could be concluded that amino acids 500 to 530 of the Myb protein are essential for an interaction. This domain comprises the EVES motif which can interact with the DNA binding domain (Dash *et al.*, 1996).

An investigation of the transactivating activities of c-Myb mutants revealed no stringent relationship between the abilities to bind DNA and to transactivate: mutants with wildtype binding constants were lacking transactivating activity, whereas mutants devoid of DNA binding activity in the EMSA essay showed a detectable signal in the reporter gene assay.

In the second part of the thesis, the Rcd1+ protein was characterized by biochemical and biophysical means. A pathway profiling system was used to demonstrate that Rcd1+ is regulated by the AP1 signal transduction pathway. Furthermore, deletion mutants of the Rcd1+ protein were generated and examined in reporter gene assays.

Keywords: c-Myb, Rcd1+, protein-protein-interaction

6 Literaturverzeichnis

- Ackermann, K. (2000) persönliche Mitteilung.
- Akimaru, H., Chen, Y., Dai, P., Hou, D.X., Nonaka, M., Smolik, S.M., Armstrong, S., Goodman, R.H. and Ishii, S. (1997) Drosophila CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *Nature*, **386**, 735-8.
- Arias, J., Alberts, A.S., Brindle, P., Claret, F.X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J. and Montminy, M. (1994) Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature*, **370**, 226-9.
- Aziz, N., Miglarese, M.R., Hendrickson, R.C., Shabanowitz, J., Sturgill, T.W., Hunt, D.F. and Bender, T.P. (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., Wu, J., Dubendorff, J.W., Lipsick, J.S., Sturgill, T.W. and Bender, T.P. (1993) c-Myb and v-Myb are differentially phosphorylated by p42mapk in vitro. *Oncogene*, **8**, 2259-2265.
- Biolabs, N.E. (1996) The NEB Transcript, **6**.
- Birnboim, H.C.a.D., J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513.
- Bortner, D. and Ostrowski, M. (1991) Analysis of the v- myb structural components important for transactivation of gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1533-1539.
- Brent, R.a.P., M. (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, **43**, 729-736.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. and de Lange, T. (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.*, **17**, 231-5.
- Burk, O., Worpenberg, S., Haenig, B. and Klempnauer, K.H. (1997) tom-1, a novel v-Myb target gene expressed in AMV- and E26-transformed myelomonocytic cells. *EMBO J.*, **16**, 1371-1380.
- Caracciolo, D., Venturelli, D., Valtieri, M., Peschle, C., Gewirtz, A.M. and Calabretta, B. (1990) Stage-related proliferative activity determines c-myb functional requirements during normal human hematopoiesis. *J. Clin. Invest.*, **85**, 55-61.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P.S., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R. and Goodman, R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, **365**, 855-858.

- Clarke, M.F., Kukowska-Latallo, J.F., Westin, E., Smith, M. and Prochownik, E.V. (1988) Constitutive expression of a c-myc cDNA blocks Friend murine erythroleukemia cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 884-892.
- Clontech. (1998) Living Colors Manual.
- Cooper, J.P., Nimmo, E. R., Allshire, R. C., and Cech, T. R. (1997) Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature*, **385**, 744-747.
- Dasgupta, P. and Reddy, P. (1989) Identification of alternatively spliced transcripts for human c-myc: molecular cloning and sequence analysis of human c-myc exon 9A sequences. *Oncogene*, **4**, 1419-1423.
- Dash, A.B., Orrico, F.C. and Ness, S.A. (1996) The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes Dev.*, **10**, 1858-1869.
- Dubendorff, J.W., Whittaker, L.J., Eltman, J.T. and Lipsick, J.S. (1992) Carboxy-terminal elements of c-Myb negatively regulate transcriptional activation in cis and in trans. *Genes Dev.*, **6**, 2524-2535.
- Dulbecco, R. and Freeman, G. (1959) *Virology*, **8**, 396.
- Durfee, T., *et.al.* (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.*, **7**, 555-569.
- Ebner, A., Adermann, K. and Wolfes, H. (1994a) Does a synthetic peptide containing the leucine-zipper domain of c-myc form an alpha-helical structure in solution? *FEBS Lett.*, **337**, 265-268.
- Ebner, A., Schweers, O., Thole, H., Fagin, U., Urbanke, C., Maass, G. and Wolfes, H. (1994b) Biophysical characterization of the c-Myb DNA-binding domain. *Biochemistry*, **33**, 14586-14593.
- Eckner, R., Ewen, M.E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J.A., Bentley-Lawrence, J. and Livingston, D. (1994) Molecular cloning and functional analysis of adenovirus E1A associated 300kDa Protein (p300) reveals a protein with the properties of a transcriptional adapter. *Genes Dev.*, **8**, 869-884.
- Evans, J.L., Moore, T.L., Kuehl, W.M., Bender, T. and Ting, J.P. (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., Smid, A., Rudloff, U., Lottspeich, F. and Grummt, I. (1995) Different domains of the murine RNA polymerase I-specific termination factor mTTF-I serve distinct functions in transcription termination. *EMBO J*, **14**, 1248-56.
- Favier, D. and Gonda, T.J. (1994) Detection of proteins that bind to the leucine zipper motif of c-Myb. *Oncogene*, **9**, 305-311.

- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-767.
- Fields, S. and Song, O.K. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Frampton, J., Gibson, T., Ness, S., G, D.d. and Graf, T. (1991) Proposed structure for the DNA- binding domain of the Myb oncoprotein based on model building and mutational analysis. *Protein Engineering*, **4**, 891-901.
- Fu, S.L. and Lipsick, J.S. (1996) FAETL motif required for leukemic transformation by v-Myb. *J. Virol.*, **70**, 5600-5610.
- Gabrielsen, O.S., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1991) Specific DNA binding by c-Myb: evidence for a double helix-turn-helix- related motif. *Science*, **253**, 1140-1143.
- Gerondakis, S. and Bishop, J.M. (1986) Structure of the protein encoded by the chicken proto-oncogene c-myb. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3677-3684.
- Golay, J., Capucci, A., Arsur, M., Castellano, M., Rizzo, V. and Introna, M. (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., Cusmano, G. and Introna, M. (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., Favier, D., Ferrao, P., Macmillan, E.M., Simpson, R. and Tavner, F. (1996) The c-myb negative regulatory domain. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **211**, 99-109.
- Gonda, T.J., Gough, N.M., Dunn, A.R. and de Blaquiére, J. (1985) Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb proto-oncogene. *EMBO J.*, **4**, 2003-2008.
- Gonda, T.J. and Metcalf, D. (1984) Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukaemia. *Nature*, **310**, 249-251.
- Gonzales, G.A.u.M.M.R. (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation at serine 133. *Cell*, **59**, 675-680.
- Gozes, I., Nakai, H., Byers, M., Avidor, R., Weinstein, Y., Shani, Y. and Shows, T.B. (1987) Sequential expression in the nervous system of c-myb and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **13**, 305-313.
- Gregory, P.a.H., W. (1998) Life with nucleosomes: Chromatin remodelling in gene regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 339-345.
- Gregory, R.C., Lord, K.A., Paneck, L.B., Gaines, P., Dillon, S.B. and Wojchowski, D.M. (2000) Substraction cloning and initial characterisation of novel EPO immediate response genes. *Cytokine*, **2**, 845-857.

- Guehmann, S., Vorbrueggen, G., Kalkbrenner, F. and Moelling, K. (1992) Reduction of a conserved Cys is essential for Myb DNA-binding. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2279-2286.
- Hall, W.J., Bean, C.W. and Pollard, M. (1941) A viral disease in chicken. *Am. J. Vet. Res.*, **2**, 272-279.
- Harper, J.W., *et.al.* (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- Howe, K.M., Reakes, C.F. and Watson, R.J. (1990) Characterization of the sequence-specific interaction of mouse c-myb protein with DNA. *EMBO J.*, **9**, 161-169.
- Howe, K.M. and Watson, R.J. (1991) Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by c-myb protein. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3913-3919.
- Hu, Y.L., Ramsay, R.G., Kanei-Ishii, C., Ishii, S. and Gonda, T.J. (1991) Transformation by carboxyl-deleted Myb reflects increased transactivating capacity and disruption of a negative regulatory domain. *Oncogene*, **6**, 1549-1553.
- Ibelgaufts, H. (1990) *Gentechnologie von A bis Z*. VCH Verlagsgesellschaft.
- Ivanov, X., Mladenov, Z., Nedyalkov, S. and Todorov, T. G. (1962) *Bull. Inst. Pathol. Comp. Animaux*, **9**, 5-36.
- Jamin, N., Gabrielsen, O.S., Gilles, N., Lirsac, P.N. and Toma, F. (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.
- Ju, Q., Morrow, B. and Warner, J. (1990) REB1, a Yeast DNA- Binding Protein with Many Targets, Is Essential for Cell Growth and Bears Some Resemblance to the Oncogene myb. *Molec. Cell. Biol.*, **10**, 5226-5234.
- Kalkbrenner, F., Guehmann, S. and Moelling, K. (1990) Analysis of transcriptional activation by human c- myb and v- myb genes. *Oncogene*, **5**, 0-0.
- Kamano, H., and Klempnauer, K.-H. (1997) B-Myb and cyclin D1 mediate heat shock element dependent activation of the human HSP70 promoter. *Oncogene*, **14**, 1223-1229.
- Kanei-Ishii, C., MacMillan, E.M., Nomura, T., Sarai, A., Ramsay, R.G., Aimoto, S., Ishii, S. and Gonda, T.J. (1992) Transactivation and transformation by Myb are negatively regulated by a leucine-zipper structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 3088-3092.
- Kersten, C. (1999) Etablierung eines Yeast Two-Hybrid-Systems zur Detektion von Wechselwirkungspartnern des Proto-Onkogenproduktes c-Myb. *Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover*.
- Kiewitz, A. (1997a) Etablierung eines Phage-Display-Systems zur Detektion von Wechselwirkungspartnern des Proto-Onkogenproduktes c-Myb. *Dissertation, Universität Hannover*.

- Kiewitz, A. and Wolfes., H. (1997b) Mapping of Protein-Protein interactions between c-myb and its coactivator CBP by a new phage display technique. *FEBS Letters*, **415**, 258-262.
- Klempnauer, K.H., Arnold, H. and Biedenkapp, H. (1989) Activation of transcription by v-myb: evidence for two different mechanisms. *Genes Dev*, **3**, 1582-9.
- Ku, D.H., Wen, S.C., Engelhard, A., Nicolaides, N.C., Lipson, K.E., Marino, T.A. and Calabretta, B. (1993) c-myb transactivates cdc2 expression via Myb binding sites in the 5'-flanking region of the human cdc2 gene. *J. Biol. Chem.*, **268**, 2255-2259.
- Kwok, R.P.S., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., HP, B.c., Brennan, R.G., Roberts, S.G.E., Green, M.R. and Goodman, R.H. (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*, **370**, 223-226.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-682.
- Lane, T., Ibanez, C., Garcia, A., Graf, T. and Lipsick, J. (1990) Transformation by v- myb correlates with trans- activation of gene expression. *Molec. Cell. Biol.*, **10**, 2591-2598.
- Leech, M.J., Kammerer, W., Cove, D.J., Martin, C., and Wang, T.L. (1993) Expression of myb-related genes in the moss, *Physcomitrella patens*. *Plant J.*, **3**, 51-61.
- Ling, M., Merante, F. and Robinson, B. H. (1985) A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.*, **23**, 4924-4925.
- Lüscher, B., Christenson, E., Litchfield, D.W., Krebs, E.G. and Eisenman, R.N. (1990) Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature*, **344**, 517-522.
- Lüscher, B. and Eisenman, R.N. (1992) Mitosis-specific phosphorylation of the nuclear oncoproteins Myc and Myb. *J. Cell Biol.*, **118**, 775-784.
- Maekawa, H., Nakagawa, T., Uno, Y., Kitamura, K. and Shimoda, C. (1994) The ste13+ gene encoding a putative RNA helicase is essential for nitrogen starvation-induced G1 arrest and initiation of sexual development in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.*, **244**, 456-464.
- Majello, B., Kenyon, L.C. and Dalla-Favera, R. (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.
- Makowski, L. (1993) Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene*, **128**, 5-11.
- Marocco, A., Wissenbach, M., Becker, D., Paz-Ares, J., Saedler, H., Salamini, F. and Rohde, W. (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., Stafford, J., Brents, L., Bender, T.P. and Kuehl, W.M. (1990) Differentiation of mouse erythroleukemia cells is blocked by late up- regulation of a c-myb transgene. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 705-710.
- McIntosh, P.B., Frenkiel, T.A., Wollborn, U., McCormick, J.E., Klempnauer, K.H., Feeney, J. and Carr, M.D. (1998) Solution structure of the B-Myb DNA-binding domain: A possible role for conformational instability of the protein in DNA-binding and control of gene expression. *Biochemistry*, **37**, 9619-9629.
- Mink, S., Haenig, B., and Klempnauer, K.H., (1997) Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6609-6617.
- Moelling, K., Guehmann, S., Vorbrueggen, G. and Kalkbrenner, F. (1992) Reduction if a coserved Cys is essential for Myb DNA-binding. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2279-2286.
- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Jr. and Potter, S.S. (1991) A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*, **65**, 677-689.
- Muchardt, C.a.Y., M. (1999) ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job. *J.Mol. Biol.*, **293**, 187-198.
- Myrset, A.H., Bostad, A., Jamin, N., Lirsac, P.N., Toma, F. and Gabrielsen, O.S. (1993) DNA and redox state induced conformational changes in the DNA-binding domain of the Myb oncoprotein. *EMBO J*, **12**, 4625-4633.
- Ness, S., Marknell, A. and Graf, T. (1989) The v- myb oncogene product binds to and activates the promyelocyte- specific mim- 1 gene. *Cell*, **59**, 1115-1125.
- Ness, S.A. (1996) The Myb oncoprotein: regulating a regulator. *Biochim. Biophys. Acta*, **1288**, 123-39.
- Ness, S.A., Kowenz-Leutz, E., Casini, T., Graf, T. and Leutz, A. (1993) Myb and NF-M: Combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes Dev*, **7**, 749-759.
- Nicolaides, N.C., Gualdi, R., Casadevall, C., Manzella, L. and Calabretta, B. (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., Takahashi, M., Matsui, M., Ishii, S., Date, T., Sasamoto, S. and Ishizaki, R. (1988) Isolation of human cDNA clones of myb- related genes A- myb and B- myb. *Nucleic Acids Res*, **16**, 11075-11081.
- Oelgeschläger, M., Janknecht, R., Krieg, J., Schreek, S. and Lüscher, B. (1996a) 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.

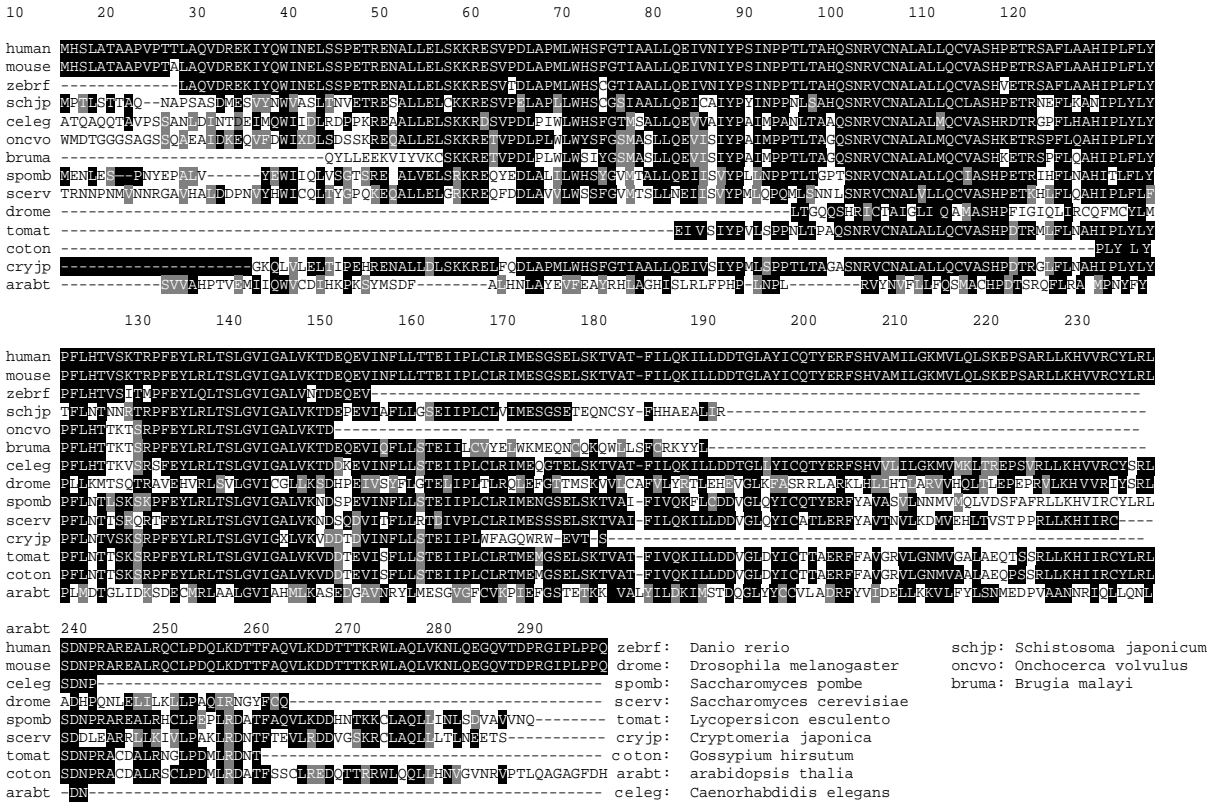
- Oelgeschläger, M., Krieg, J., Lüscher-Firzlaff, J.M. and Lüscher, B. (1995) Casein kinase II phosphorylation site mutations in c-Myb affect DNA binding and transcriptional cooperativity with NF-M. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 5966-5974.
- Oelgeschläger, M., Nuchprayoon, I., Lüscher, B. and Friedman, A.D. (1996b) C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4717-4725.
- Ogata, K., Kanei-Ishii, C., Sasaki, M., Hatanaka, H., Nagadoi, A., Enari, M., Nakamura, H., Nishimura, Y., Ishii, S. and Sarai, A. (1996) The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 178-187.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Hojo, H., Yoshimura, S., Zhang, R., Aimoto, S., Ametani, Y., Hirata, Z. and Sarai, A. (1995) Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-binding domain from c-Myb. *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 309-320.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawa, A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y. (1994) Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, **79**, 639-648.
- Ohi, R., McCollum, D., Hirani, B., Den Haese, G.J., Zhang, X., Burke, J.D., Turner, K. and Gould, K.L. (1994) The *Schizosaccharomyces pombe* cdc5+ gene encodes an essential protein with homology to c-Myb. *EMBO J.*, **13**, 471-483.
- Okazaki, N., Okazaki, K., Watanabe, Y., Kato-Hayashi, M., Yamamoto, M. and Okayama, H. (1998) Novel factor highly conserved among eukaryotes controls sexual development in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 887-95.
- Oppenheimer, D.G., Herman, P.L., Sivakumaran, S., Esch, J., and Marks, M.D. (1991) A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. *Cell*, **67**, 483-493.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P. and Saedler, H. (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.
- Pines, J. and Hunter, T. (1990) Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*, **346**, 760-3.
- Ptashne, M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, **335**, 683-689.
- Ramsay, R.G., Ishii, S. and Gonda, T.J. (1991) Increase in specific DNA binding by carboxyl truncation suggests a mechanism for activation of Myb. *Oncogene*, **6**, 1875-1879.
- Ramsay, R.G., Morrice, N., Van Eeden, P., Kanagasundaram, V., Nomura, T., De Blaquiére, J., Ishii, S. and Wettenhall, R. (1995) Regulation of c-Myb through protein phosphorylation and leucine zipper interactions. *Oncogene*, **11**, 2113-2120.

- Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T. und Stehelin, D. (1979) Three types of viral oncogenes of cellular origin specific for hematopoietic cell transformation. *Nature*, **281**, 452-455.
- Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T.J. and Ishii, S. (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.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463.
- Scholz, M. (1999) Aufbau eines Zellkulturlabors und Etablierung eines Reporterassays zur funktionellen Untersuchung des Transkriptionsfaktors c-Myb und seiner Wechselwirkungs-partner. *Diplomarbeit Universität Hannover*.
- Schuur, E.R., Dasgupta, P., Reddy, E.P., Rabinovich, J.M. and Baluda, M.A. (1993) Alternative splicing of the chicken c-myb exon 9A. *Oncogene*, **8**, 1839-1847.
- Schweers, O. (1993) Die DNA-bindende Domäne des c-Myb und B-Myb: Studien zur biophysikalischen Charakterisierung. *Diplomarbeit, Universität Hannover*.
- Shapiro, L.H. (1995) Myb and Ets proteins cooperate to transactivate an early myeloid gene. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8763-8771.
- Siegert, M. (1998) Untersuchung von Protein/Protein-Wechselwirkungen des Protoonkogens c-myb. *Diplomarbeit, Universität Hannover*.
- Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**, 1315-1317.
- Sokolowski, R. (1998) Expression und Charakterisierung des c-Myb Protoonkogenproduktes. *Dissertation, Universität Hannover*.
- Stöver, M. (2000) Untersuchung des Proto-Onkogenproduktes B-Myb mit dem Phage-Display-System. *Hausarbeit im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien*.
- Sugano, S., Andronis, C., Green, R. M., Wang, Z. Y. and Tobin, E. M. (1998) Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the Arabidopsis circadian clock-associated 1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 11020-5.
- Swope, D.L., Mueller, C.L., and Chrivia, J.C. (1996) CREB-binding protein activate transcription through multiple domains. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28138-28145.
- Tice- Baldin, K., Fink, G. and Arndt, K. (1989) BAS1 has a myb motif and activates HIS4 transcription only in combination with BAS2. *Science*, **246**, 931-935.
- Tong, X., Drapkin, R., Yalamanchili, R., Mosialos, G. and Kieff, E. (1995) The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4733-4735.

- Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., MacDonald, H. and Clevers, H. (1995) An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature*, **374**, 70-74.
- Vorbrueggen, G., Kalkbrenner, F., Guehmann, S. and Moelling, K. (1994) The carboxyterminus of human c-myb protein stimulates activated transcription in trans. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2466-2475.
- Welter, C., Henn, W., Theisinger, B., Fischer, H., Zang, K.D. and Blin, N. (1990) The cellular myb oncogene is amplified, rearranged and activated in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.*, **52**, 57-62.
- Westin, E., Gallo, R., Arya, S., Eva, A., Souza, L., Baluda, M., Aaronson, S. and Wong-Staal, F. (1982) Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **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. and Bishop, J.M. (1989) Transcriptional activation by the v-myb oncogene and its cellular progenitor, c-myb. *Cell*, **58**, 85-93.
- Wolffe, A.a.H., J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 711-720.
- Xanthoudakis, S. and Curran, T. (1996) Redox regulation of AP-1: a link between transcription factor signaling and DNA repair. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **387**, 69-75.
- Zargarian, L., L.T.V., Jamin, N., Chaffotte, A., Gabrielsen, O.S., Toma, F., Alpert, B. (1999) Myb-DNA recognition: role of tryptophan residues and structural changes of the minimal DNA binding domain of c-Myb. *Biochemistry*, **386**, 1921-1999.
- Zieblold, U., Bartsch, O., Marais, R., Ferrari, S., and Klempnauer, K.H. (1997) Phosphorylation and activation of B-Myb by cyclin A-Cdk2. *Curr. Biol.*, **7**, 253-260.
- Zobel, A., Kalkbrenner, F., Guehmann, S., Nawrath, M., Vorbrueggen, G. and Moelling, K. (1991) Interaction of the v- and c-Myb proteins with regulatory sequences of the human c-myc gene. *Oncogene*, **6**, 1397-1407.

7 Anhang

Übersicht über die Sequenz von Rcd1+ in verschiedenen Spezies



Sequenz des c-myb-Gens aus der Maus

ATGGCCCGGAGACCCCGACACAGCATCTACAGTAGCGATGAAGATGATGAAGACATTGAGATGTGTGACCATGAC
TACGATGGGCTGCTGCCCAAATCTGGAAAGCGTCACTTGGGGAAAAGTAGGTGGACAAGGGAAGAGGATGAGAAG
CTGAAGAAGCTGGTGGAAACAGAACGGAACAGACGACTGGAAAGTCATTGCCAATTATCTGCCCAACCGGACAGAT
GTGCAGTGCCAACACCGGTGGCAGAAAGTGTGAACCTGAACCTCATCAAAGTCCCTGGACCAAAGAAGAAGAT
CAGAGAGTCATAGAGCTTGTCCAGAAATATGGTCCGAAGCGTTGGTCTGTTATTGCCAAGCACTTAAAAGGGAGA
ATTGGAAAGCAGTGTCTGGGAGAGGTGGCACAACCAATTTGAATCCAGAAGTTAAGAAAACCTCCTGGACAGAAGAG
GAGGACAGAATCATTACCAGGCACACAAGCGTCTGGGGAACAGATGGGCAGAGATCGCAAAGCTGCTGCCCGGA
CGGACTGATAATGCTATCAAGAACCACCTGGAATTCACCATGCGTCGCAAGGTGGAACAGGAAGGCTACCTGCAG
GAGCCTTCCAAAGCCAGCCAGACGCCAGTGGCCACGAGCTTCCAGAAGAACAATCATTTGATGGGGTTTGGGCAT
GCCTCACCTCCATCTCAGCTCTCTCCAAGTGGCCAGTCTCCGTCAACAGCGAATATCCCTATTACCACATCGCC
GAAGCACAAAACATCTCCAGTACGTTCCCTATCCTGTGCGATTGCATGCTAATATAGTCAACGTCCCTCAGCCG
GCTGCGGCAGCCATCCAGAGACACTATAACGACGAAGACCTTGAGAAGGAAAAGCGAATAAAGGAGCTGGAGTTG
CTCCTGATGTCAACAGAGAACGAGCTGAAGGACAGCAGGCATTACCAACAGAACACACACTGCAGCTACCCC
GGTGGCAGCAGCCTCCATTTGTTGGACACAGACAGCTCATGGGGATAGTGCACCTGTTTCTGTTTGGGAGAA
CACCATGCCACCCCATCTCTGCCTGCAGATCCCGGCTCCCTACCTGAAGAAAGTGCCTCACCAGCAAGGTGCATG
ATCGTCCACCAGGCACCAATTTGACAATGTTAAGAACCCTTTAGAATTTGCAGAAACACTCCAGTTTATAGAT
TCTTTCTTGAACACTTCCAGCAACCATGAAAGCTCGGGCTTAGATGCACCTACCTTACCCTCCACTCCTCTCATT
GGTCACAAACTGACACCATGTGAGACCAGACTGTGAAAACCCAGAAGGAAAATTCATCTTTAGAACTCCAGCT
ATCAAAGGTCAATCTCGAAAGCTCTCCTCGAACTCCACACCAATCAAACATGCCCTTGCAGCTCAAGAAATT
AAATACGGTCCCCGTAAGATGCTACCTCAGACCCCTCCCATGCAGTGGAGGACCTACAAGATGTGATTAAGCAG
GAATCGGATGAATCTGGAATTTGGCTGAGTTTCAAGAGAGTGGACCACCGTTACTGAAAAAATCAAGCAGGAG

GTGGAGTCGCCAACTGAGAAATCGGGAAACTTCTTCTGCTCAAACCACTGGGCAGAGAACAGCCTGAGCACCCAG
 CTGTTCTCGCAGGCGTCTCCTGTGGCAGATGCCCCAAATATTCTTACAAGCTCTGTTTTAATGACACCTGTATCA
 GAAGATGAAGACAATGTCCTCAAAGCCTTTACCGTACCTAAGAACAGGCCCTGGTGGGTCCCTTGCAGCCATGC
 AGTGGTGCCTGGGAGCCAGCATCCTGTGGGAAGACAGAGGACCAGATGACGGCCTCCGGTCCGGCTCGGAAATAC
 GTGAACGCGTCTCAGCTCGAACTCTGGTCATGTGA

Sequenz des *rcd1*+ -Gens aus der Maus

ATGCACAGCCTGGCAACGGCAGCGCCTGTGCCTACTGCACTAGCCCAAGTGGACAGAGAGAAGATCTATCAGTGG
 ATCAATGAACTGTCCAGTCTCTGAGACAAGGGAAAATGCTTTGTTGGAGCTGAGCAAGAAGAGAGAGTCTGTCCCT
 GACCTTGACCCCATGCTATGGCATTTCATTTGGTACTATTGCAGCACCTGTTACAGGAAATTTGAAATATTTATCCA
 TCTATCAACCCCCAACCTTGACAGCACACCAGTCTAACAGAGTTTGCATGCTTTAGCATTGCTGCAGTGTGTG
 GCCTCACACCCGGAGACCAGGTTCAGCTTTTCTGGCAGCACACATCCCACCTTTTTTGTACCCCTTTTTTGCACACA
 GTCAGCAAAACTCGTCCCTTTGAATATCTTCGGCTCACCAGCCTTGGAGTTATTGGGGCCTTGGTTAAAACAGAT
 GAGCAAGAAGTAATCAACTTTTTTATTGACCACAGAGATCATCCCTCTGTGTCTGCGCATCATGGAGTCTGGAAGT
 GAACTCTCTAAAACGGTTGCCACATTCATACTCCAGAAGATCCTCTTGGATGACACTGGTTTAGCTTATATATGT
 CAGACATATGAGCGTTTTTCCCATGTTGCCATGATCTTGGGTAAAATGGTCTGCAGCTATCCAAAGAACCCTCA
 GCCCGTCTGCTGAAGCACGTAGTAAGATGTTACCTTCGACTCTCAGATAATCCCAGGGCACGTGAAGCACTCAGA
 CAGTGCCTCCCTGACCAGCTGAAGGACACAACCTTTGCCAGGTGCTAAAAGACGACACCACCACGAAACGCTGG
 CTTGCACAACTGGTGAAGAACCTGCAAGAGGGCCAGGTACCGATCCCCGGGGGATTTCCCTGCCCCCTCAGTGA

Sequenz des *B-myb*-Gens

Kodierende Sequenz: 143-2257

1	cagacctgca	gacacgctga	cgcctgagag	caccgcctgg	ggcccggagc	ggctcgagca
61	gcctgagtcc	tgaccccgcc	ccggctcccg	ctccgggctc	ggccggcggg	cgtaaggggtg
121	cggcgggggtc	cgggcccggg	ggatgtctcg	gcggacgcgc	tgcgaggatc	tggatgagtt
181	acactaccag	gacgtggact	cagacctcct	ggagcagaga	gacaacagat	gtaaggttaa
241	atggaccac	gaggaggacg	agcagttgag	ggcctgggtg	aggcagtttg	gacagcaaga
301	ctggaagtcc	ttggccagtc	actttcctaa	ccgcacagac	cagcaatgcc	agtaccgggtg
361	gctgaggggtt	ttgaatcccg	accttgtaa	gggacctgg	accaaagagg	aagatcaaaa
421	ggtcattgag	ttggtcaaga	agtatggcac	caaacagtgg	acgctgatag	ccaagcacct
481	gaagggcccg	ctggggaagc	agtgccgtga	gcgctggcac	aaccacctca	accccgaggt
541	gaagaagtca	tgctggaccg	aggaggaaga	caggataatc	tgtgaggccc	ataaagtcct
601	gggtaaccgc	tgggctgaga	tcgccaagat	gctaccaggg	aggacggaca	atgctgtgaa
661	gaatcactgg	aactccacta	tcaaaaggaa	agtgcacacg	ggaggtttcc	cagccgagtc
721	cagggactgc	aagcctgtct	acttgctcct	ggagctggag	gacaaggaac	agcaccaggg
781	tgtccagccg	gtggacggcc	agggaaagtct	cgtgagcagc	tggccgctgg	tgccctctat
841	tgtgaaggag	gagagcagcg	aggaggagat	tgccatagct	gctacttctg	ctaaagaact
901	cggacatgag	cctgtccctg	ctgatctggg	agaagtgcgc	acccagagc	cccagaatc
961	tctcaagcgt	gaataaccag	agttctcctc	cccggaaacg	agcctgcct	acaagtgggt
1021	ggtagaggcg	gcaaacctcc	tcatcccggc	tgtgggggtcc	agcctctctg	aagctctgga
1081	cttgattgag	tcggaccctg	atgcttgggtg	cgacctgagt	aaatttgacc	ttcctgaaga
1141	accctctacg	gagggcagtg	tcgtcagcag	cccagtgacg	cccagacgt	cgcagcagca
1201	gcaggaggag	gcaactgcagt	catcccagca	ggctgccacg	ccggggccca	gtgtgactga
1261	gtaccgcctt	gatggccaca	ctatctcaga	cctgagccgg	agcagtcggg	gggagctgat
1321	ccccatttct	cctagcactg	agtttggggg	ctcaggcatt	ggcacacctc	cctcagtgct
1381	caagcgacag	aagaaacggc	gtgtggccct	gtcgcctgtc	acagagaaca	gtgccagcct
1441	gtccttctctg	gactcttgta	acagcctcac	cccgaagagc	acgctgtca	aaacctccc
1501	cttctctcct	tcccagtttc	tgaacttctg	gaacaaacag	gataccctgg	agctggagag
1561	cccctcactg	acatccactc	cagtgtgtag	ccaaaagggtg	gtcgtcacca	cgcccctgca
1621	cagggataag	acacccctgc	accagaagta	tccatcatca	gaagtactcc	cagatcagaa
1681	gtactccatg	gacaacactc	cccacacgcc	aaccccgttc	aagaatgccc	tggagaagta
1741	cggaccgctg	aagccccctgc	cgcagactcc	gcacctggag	gaggacttga	aggaggtgct
1801	ccgttctgag	gctggcatgg	agctcatcat	tgaggatgac	atgaggccccg	agaagcagaa
1861	gagaaagcct	gggctgcggc	gaagccctat	caagaaggtc	cgcaagtctc	tggctctcga

```

1921 cattatggat gaagatggga agctgatgtc ctctaccatg cccaaacccc tgtccttgcc
1981 aaccagtgtc acaccagct cctgtggctt cacctcgcca ggtagcaaag agggtaacag
2041 cctgctcaac cagggtttcc tacaggccaa acccgagaag gtggtggccg cccagaagac
2101 tcggagccac attccaaccc ctgcccctat gacctatgcc tgggaagacgg tggcctgtgg
2161 gggcaccaaa gaccagctct tcatgcagga gaaagcccgg cagctcctga gccgcctgaa
2221 gtccagccac acatctcgga ccctcattct gtccctgaggg acttgaatgg caagagccgg
2281 ctctcatggt tacaggggta ggggtgsggg taagggttaa gtcacattaa gtgaccagct
2341 tcaggatgtc ttctgcccag ccctccaact acttaggtgg cagaagtcac gtggaatac
2401 ccctccctg agtctagctt tgggaagttc ctggtgctaa tagaacaagg tccactcctg
2461 ggctgctg tccctacc aatgctagaa ggaaccctat cagggtctcc caggctctca
2521 tccagtctgg cctcatctca gactcctgct taggatgggg gtgtggctag ggggtgcct
2581 ttctctgct cctgttggtta cactgtcccc acaataaaat gccattctcc cc

```

Sequenz des CyclinD1-Gens

Kodierende Sequenz: 188-1075

```

cacggactac aggggagttt tgttgaagtt gcaaagtcct gcagcctcca gagggctgtc
ggcgcagtag cagagagcta cagacttcgc gcgctccgga gaccggcagt acagcgcgag      120
gcagcgcgag tcagcagcag ccaccggagc ccaaccgaga ccacagcct cccagacgg      180
ccgcgccatg gaacaccagc tcctgtgctg cgaagtggag accatccgcc gcgcgtacct      240
tgacaccaat ctctcaacg accgggtgct gcgagccatg ctcaagacgg aggagacctg      300
tgcgccctcc gtatcttact tcaagtgcgt gcagaaggag attgtgcat ccatgcggaa      360
aatcgtggcc acctggatgc tggaggtctg tgaggagcag aagtgcgaag aggaggtctt      420
cccgtggcc atgaactacc tggaccgctt cctgtccctg gagcccctga agaagagccg      480
cctgcagctg ctgggggcca cctgcatggt cgtggcctct aagatgaagg agaccattcc      540
cttgactgcc gagaagttgt gcactctacac tgacaactct atccggcccg aggagctgct      600
gcaaatggaa ctgcttctgg tgaacaagct caagtggaac ctggccgcca tgactcccca      660
cgatttcatc gaacacttcc tctccaaaat gccagagcgg gatgagaaca agcagacat      720
ccgcaagcat gcacagacct ttgtggccct ctgtgccaca gatgtgaagt tcatttccaa      780
cccaccctcc atggtagctg ctgggagcgt ggtggctgag atgcaaggcc tgaacctggg      840
cagccccaac aacttctct cctgctaccg cacaacgcac tttctttcca gagtcatcaa      900
gtgtgaccgg gactgctcc gtgcctgcca ggaacagatt gaagcccttc tggagtcaag      960
cctgcgccag gccagcaga acgtcgacc caaggccact gaggaggagg gggagtggg      1020
ggaagaggct ggtctggcct gcacgccac cgacgtgcga gatgtggaca tctga      1075

```

Polylinker

```

5'      cgcccgggagtcgacagaaaggccttgc      3'
3'      tcggcgggcccctcagctgtctttccggaacgccgg      5'

```

Sequenzierprimer für pCantab/pAS X/X

```

Forward acgccaagctttggagcc
Reverse gtaaatgaattttctgtatga

```

Gal4 Sequenzierprimer

```

Forward taccactacaatggatg

```

Primer für die Generierung des *c-myb*-Fragments von AS 530 bis 636

Forward cgcggatccacatgaccagagttcgagc

Reverse ccggaattcactgagaaatcgggaaac

Primer für die Generierung des *c-myb*-Fragments von AS 500 bis 600

Forward ccggaattcgaatcggatgaatctgga

Reverse cgcggaattcgcacatggctgcaaggac

Primer für die Generierung der Rcd1+-Fragmente

Fragment	Primer	Primersequenz
Full Length	5'	5'-CTA CTC GAG ATG CAC AGC CTG GCA ACG-3'
Full Length	3'	5'-ATC GAA TTC TCA CTG AGG GGG CAG GGG-3'
CΔ297	5'	5'-CTA CTC GAG ATG CAC AGC CTG GCA ACG-3'
CΔ297	3'	5'-ATC GAA TTC ACA TAT ATA AGC TAA ACC-3'
NΔ500	5'	5'-CTA CTC GAG ATC CCT CTG TGT CTG CGC-3'
NΔ500	3'	5'-ATC GAA TTC TCA CTG AGG GGG CAG GGG-3'
NΔ700	5'	5'-CTA CTC GAG GTA AGA TGT TAC CTT CGA-3'
NΔ700	3'	5'-ATC GAA TTC TCA CTG AGG GGG CAG GGG-3'

Primer für die Generierung der B-myb-Fragmente

Fragment	Primer	Primersequenz
Phage 1	5'	5'-GCG GAA TTC ATG TCT CGG CGG ACG CGC-3'
Phage 1	3'	5'-GCG GAA TTC CTC CTC GGT CCA GCA TGA-3'
Phage 2	5'	5'-GCG GAA TTC GAG GAG GAA GAC AGG ATA-3'
Phage 2	3'	5'-GCG GAA TTC CTC CTG GTA TTC ACG CTT-3'
Phage 3	5'	5'-GCG GAA TTC TTC TCC TCC CCG GAA ACG-3'
Phage 3	3'	5'-GCG GAA TTC CCG TTT CTT CTG TCG CTT-3'
Phage 4	5'	5'-GCG GAA TTC CGT GTG GCC CTG TCG CCT-3'
Phage 4	3'	5'-GCG GAA TTC CAT GCC AGC CTC AGA ACG-3'
Phage 5	5'	5'-GCG GAA TTC GAG CTC ATC ATT GAG GAT-3'
Phage 5	3'	5'-GCG GAA TTC GGA CAG AAT GAG GGT CCG-3'

Primer für die Generierung der CyclinD1-Fragmente

(gesamtes CyclinD1: A5' und D3')

Fragment	Primer	Primersequenz
A	5'	5'-GCG GAA TTC CAT GGA ACA CCA GCT CCT GTG C-3'
A	3'	5'-GCG GCG GCC GCC CAGGTG GCC ACG ATT TTC C-3'
B	5'	5'-GCG GAA TTC ATG CTG GAG GTC TGT GAG-3'
B	3'	5'-GCG GCG GCC GCT CCA TTT GCA GCA GCT CC-3'
C	5'	5'-GCG GAA TTC ACT GCT TCT GGT GAA CAA-3'
C	3'	5'-GCG GCG GCC GCT GCC CAG GTT CAG GCC TT-3'
D	5'	5'-GCG GAA TTC GCC CCA ACA ACT TCC TCT-3'
D	3'	5'-GCG GCG GCC GCT CAG ATG TCC ACA TCT CG-3'
E	5'	5'-GCG GAA TTC GGG GGC CAC CTG CAT GTT-3'
E	3'	5'-GCG GCG GCC GCT TGC GGA TGG TCT GCT TG-3'
F	5'	5'-GCG GAA TTC GCA TGC ACA GAC CTT TGT-3'
F	3'	5'-GCG GCG GCC GCT GAC TCC AGA AGG GCT TC-3'

Lebenslauf

André Schürmann

Heidjerhof 7

30625 Hannover

Persönliche Angaben

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum: 26.07.1969

Geburtsort: Neubeckum

Ausbildung

7/76 - 6/80 Roncalli-Grundschule, Neubeckum

7/80 - 5/89 Albertus-Magnus-Gymnasium, Beckum

10/90 - 5/97 Universität Dortmund, Fachbereich Chemie

15.10.1993 Vordiplom

16.05.1997 Diplom

Diplomarbeit:

Untersuchungen zur Generierung von 2-Hydroxy-2H-isoindolen
und zum Nachweis durch [4+2]-Cycloaddition

Seit 10/97 Anfertigung der Dissertation am Institut für Biophysikalische Chemie der
Medizinischen Hochschule Hannover

Wehrdienst

6/89 - 8/90 Artilleriekommando 1, Münster, Geschäftszimmer Materialbewirtschaftung

Erklärung:

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Hannover im November 2000

André Schürmann