

**" Analysen zur Funktion von Mehmet, einem  
neuen Interaktionspartner des  
Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$ , sowie  
Charakterisierung von Mehmet in *Drosophila  
melanogaster* "**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der  
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung  
des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

**Anja Septinus**

aus Würselen

Berichter:       Universitätsprofessor Dr. med. Reinhard Büttner  
                    Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Fritz M. Kreuzaler

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

## DANKESWORTE

Für seine akademische Prägnanz, das stetige Interesse an dieser Arbeit und für die absolute Unterstützung verdient Herr Prof. Dr. Reinhard Büttner ein großes Lob. Herr Prof. Dr. Reinhard Büttner ermöglichte mir, diese Dissertation zunächst am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Aachen und im weiteren Verlauf im Universitätsklinikum Bonn anfertigen zu können. Dafür gilt Ihm mein Dank, sowie für die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. Fritz Kreuzaler danke ich ganz herzlich für die spontane Verantwortung des Korreferates.

Großer Respekt und viele, viele Dankeschöns gebühren meiner Betreuerin Dr. Jutta Kirfel. Ich danke Ihr für Ihr Wissen, Ihre Geduld, Ihre Ideen, Ihre Witzigkeit und Ernsthaftigkeit und Ihre Zeit und Mühe, die sie in das Gelingen dieser Arbeit investiert hat. Sie hat mich in manch frustrierter Phase wieder aufgebaut. Herzlichen Dank dafür! .

Ein ganz lieber Dank gilt Sonja Matthiesen. Wir haben nicht nur Schreibtisch und Laborplatz, sondern auch Frust und Freude, Kummer, Sorge, Glück und Erfolg miteinander geteilt. Die Zeit mit Dr. Matthiesen war empfehlenswert, humorvoll und bedeutend – wo wir sind ist und bleibt vorne!

Anke Röper sei herzlich gedankt für ihre Tricks & Tips, die den Laboralltag erleichtern und für jegliche fachmännische Inspiration und Hilfe und für manch amüsantes, herzliches Frauengespräch.

Den Bonner-Laborkollegen: Jochen, Dawid, Richard, Susi, Mathilde, Renate, Andrea, Angela, Sandra, Theresa, Lucia, Frau Heim, Jörg & Necla bin ich für so manchen Gefallen, die Heiterkeit und schlichtweg für Ihr Dasein dankbar.

Inge und Ellen: Danke für zahlreiche Sequenzierungen !

Danken möchte ich auch der Aachener Bande der Büttner-Gruppe für etliche frische und fröhliche Momente und manche Rückenstärkung.

Herrn Dr. Reinhard Bauer und den Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Entwicklungsbiologie am Institut für Molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie der Universität Bonn danke ich für die Zusammenarbeit in puncto *Drosophila melanogaster*.

Für ihre Freundschaft und ihre stetige Unterstützung - auch im Labor - ein riesiges Dankeschön an Judiii.

Ein grosses Lob gewährt meinem Keks, dessen Ruhepol, Humor, Toleranz und Hilfsbereitschaft, mir immer wieder Aufwind und Kraft gegeben haben, wenn's Segel mal durchhingt- Você é o mais melhor

Meinen Eltern danke ich in ganz besonderer Weise - ohne sie hätte ich dieses Ziel nie erreichen können! Ich bin sehr glücklich solche Eltern zu haben!  
muito obrigado mama e papa!

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Einleitung                                                                      | 1  |
| I.1. Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren                                       | 1  |
| I.2. Konservierte AP-2 Transkriptionsfaktoren in der Maus und in <i>Drosophila</i> | 3  |
| I.3. Potentielle Regulation der AP-2 Aktivität                                     | 7  |
| I.4. Zielsetzung                                                                   | 12 |
| II Material und Methoden                                                           | 14 |
| II.1 Material                                                                      | 14 |
| II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien                                       | 14 |
| II.1.2 Enzyme und Reaktionskits                                                    | 19 |
| II.1.3 Antikörper und enzymkonjugierte anti-Antikörper                             | 20 |
| II.1.4 Längenstandards für Nukleinsäuren und Proteine                              | 21 |
| II.1.5 Bakterienstämme, Zelltypen, Mausstämmen und Genbibliotheken                 | 21 |
| II.1.6 Plasmid-Vektoren                                                            | 22 |
| II.1.7 Synthetische Oligonukleotide                                                | 24 |
| II.1.8 Medien, Puffer und Lösungen                                                 | 26 |
| II.1.9 Geräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör                                   | 27 |
| II.2 Molekularbiologische Methoden                                                 | 30 |
| II.2.1 Restriktion von DNS                                                         | 30 |
| II.2.2 Ligation von DNS-Fragmenten                                                 | 31 |
| II.2.3 5'-Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten                                    | 31 |
| II.2.4 PCI-Extraktion                                                              | 32 |
| II.2.5 DNS-Präzipitation                                                           | 32 |
| II.2.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNS                             | 33 |
| II.2.7 Agarosegelelektrophorese von DNS                                            | 33 |
| II.2.7.1 Analytische Agarosegelelektrophorese                                      | 33 |
| II.2.7.2 Präparative Agarosegelelektrophorese                                      | 35 |
| II.2.8 DNS-Isolierung aus Agarosegelen                                             | 35 |
| II.2.9 Polymerase-Kettenreaktion                                                   | 35 |
| II.2.9.1 Aufreinigung von PCR-Produkten                                            | 37 |
| II.2.9.2 Klonierung von PCR-Produkten                                              | 38 |
| II.2.10 Sequenzierung von DNS                                                      | 40 |
| II.2.11 Anzucht von Bakterien                                                      | 40 |
| II.2.11.1 Anzucht von <i>Escherichia coli</i>                                      | 40 |
| II.2.11.2 Herstellung von <i>E.coli</i> -Stammkulturen                             | 41 |
| II.2.12 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS                               | 41 |
| II.2.12.1 Herstellung hitzeschock-kompetenter <i>E.coli</i>                        | 41 |
| II.2.12.2 Hitzeschock-Transformation von <i>E.coli</i>                             | 42 |
| II.2.13 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien                                   | 42 |
| II.2.13.1 Analytische Präparation von Plasmid-DNS                                  | 43 |
| II.2.13.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNS                                   | 44 |
| II.2.14 <i>In Vitro</i> Translation                                                | 44 |
| II.2.15 Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungssonden                    | 45 |
| II.2.16 Isolierung von Gesamt RNS                                                  | 46 |
| II.2.16.1 RNS-Isolierung aus Gewebe nach TRIZOL®                                   | 46 |
| II.2.16.2 RNS-Isolierung aus <i>Drosophila</i> nach Qiagen                         | 47 |
| II.2.17 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNS                            | 47 |
| II.2.18 Agarosegelelektrophorese von RNS                                           | 48 |

|                                                                              |        |
|------------------------------------------------------------------------------|--------|
| II.2.18.1 Analytische Agarosegelelektrophorese                               | 48     |
| II.2.18.2 Präparative Agarosegelelektrophorese                               | 48     |
| II.2.19 Northern Blot-Analyse und Hybridisierung                             | 49     |
| II.2.19.1 Northern Blot                                                      | 49     |
| II.2.19.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden                    | 50     |
| II.2.20 Entfernung radioaktiver Hybridisierungsproben mit SDS                | 51     |
| II.2.21 cDNS Synthese durch reverse Transkriptase Reaktion                   | 51     |
| <br>II.3 Proteinchemische Methoden                                           | <br>52 |
| II.3.1 Gesamt-Proteinisolierung aus Zellen                                   | 52     |
| II.3.2 Fraktionierte Proteinisolierung aus Zellen                            | 53     |
| II.3.3 Protein-Fällung                                                       | 54     |
| II.3.4 Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen                          | 55     |
| II.3.4.1 Denaturierende SDS-PAA Gelelektrophorese                            | 55     |
| II.3.5 Western Blot-Analyse                                                  | 57     |
| II.3.5.1 Nachweis des Mehmet-Proteins                                        | 57     |
| II.3.5.2 Nachweis des AP-2 $\alpha$ Proteins                                 | 58     |
| II.3.5.3 Nachweis des $\beta$ -Aktin Proteins                                | 59     |
| II.3.5.4 Nachweis des VP16 Proteins                                          | 59     |
| II.3.6 Entfernung von gebundenen Antikörpern                                 | 60     |
| <br>II.4 Methoden im Umgang mit murinen und humanen Zellen                   | <br>60 |
| II.4.1 Zellkultur                                                            | 60     |
| II.4.1.1 Herstellung und Verwendung von kryokonservierten Zellen             | 62     |
| II.4.1.2 Zellzahlbestimmung                                                  | 62     |
| II.4.2 Transfektion                                                          | 62     |
| II.4.3 Immunfluoreszenzen von transfizierten Zellen                          | 64     |
| II.4.4 Zell-Proliferation und Apoptose                                       | 65     |
| II.4.4.1 WST-1 Experimente                                                   | 66     |
| II.4.4.2 LDH Experimente                                                     | 66     |
| II.4.5 FACS                                                                  | 67     |
| <br>III Ergebnisse                                                           | <br>68 |
| III.1 Strukturanalyse der Mehmet cDNS                                        | 70     |
| III.2 Expressionsmuster von Mehmet                                           | 73     |
| III.2.1 Northern Blot-Analyse                                                | 73     |
| III.2.2 RT-PCR                                                               | 75     |
| III.3 Bestätigung der Interaktion zwischen AP-2 $\alpha$ und Mehmet          | 75     |
| III.4 Bestätigung der Kolokalisation von AP-2 $\alpha$ und Mehmet            | 79     |
| III.4.1 Kolokalisation von Mehmet und AP2 $\alpha$ in transienter Expression | 80     |
| <br>III.5 Funktionsanalyse des Mehmet-Proteins                               | <br>82 |
| III.4.1 Induzierbare Expression von Mehmet in Fibroblasten                   | 83     |
| III.4.1.1 Herstellung stabiler MEF Klone                                     | 84     |
| III.4.1.2 Western Blot-Analyse – zellulärer Mehmet Spiegel                   | 87     |
| III.4.2 Zelluläre Lokalisation von Mehmet                                    | 89     |
| III.4.2.1 Immunfluoreszenzen der stabilen MEF Klone                          | 89     |
| III.4.3 Die Mehmet „knock-out“ Maus                                          | 91     |
| III.4.4 Untersuchungen des AP2 $\alpha$ -Spiegels                            | 93     |
| III.4.4.1 Western Blot-Analyse                                               | 95     |
| III.4.5 Proliferations- und Apoptosetests                                    | 97     |
| III.4.5.1 Proliferationstest : WST-1                                         | 98     |

|                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.4.5.2 Apoptosetest : LDH                                                                          | 100 |
| III.4.5.3 FACS-Analyse                                                                                | 102 |
| III.5 Struktur- und Funktionsanalyse des <i>Drosophila</i> Homologs                                   | 105 |
| III.5.1 Northern Blot-Analyse                                                                         | 106 |
| III.5.2 RT-PCR                                                                                        | 108 |
| III.6 Herstellung einer AP-2 $\alpha$ überexprimierenden Zelllinie                                    | 110 |
| III.6.1 Klonierungsstrategie der Konstrukte pUHD10-3_HA-AP-2 $\alpha$<br>und pCMXpl1_HA-AP-2 $\alpha$ | 110 |
| III.6.1.1 Konstruktion von pUHD10-3_HA-AP-2 $\alpha$                                                  | 111 |
| III.6.1.2 Konstruktion von pCMXpl1_HA-AP-2 $\alpha$                                                   | 112 |
| III.6.2 Analyse stabiler MEF Transformanten                                                           | 113 |
| IV. Diskussion                                                                                        | 115 |
| IV.1 Expressionsmuster, Interaktion & Kolokalisation von Mehmet und AP-2 $\alpha$                     | 115 |
| IV.2 Die Mehmet KO Maus                                                                               | 118 |
| IV.3 Mehmet bewirkt keine AP-2 $\alpha$ Degradation                                                   | 121 |
| IV.4 Proliferations- und Apoptoseverhalten                                                            | 123 |
| IV.5 <i>Drosophila</i> Mehmet                                                                         | 126 |
| IV.6 Zukunftsperspektiven                                                                             | 128 |
| V. Zusammenfassung                                                                                    | 131 |
| VI. Literatur                                                                                         | 134 |
| VII. Abkürzungen                                                                                      | 143 |
| VIII. Anhang                                                                                          | 148 |
| A. murine Mehmet cDNS-Sequenz des ORF für das Mehmet-Protein                                          | 148 |
| B. Aminosäuresequenz des murinen Mehmet-Protein                                                       | 153 |
| C. <i>Drosophila</i> Mehmet cDNS-Sequenz des <i>Drosophila</i> Gens CG11033                           | 155 |
| D. Aminosäuresequenz des <i>Drosophila</i> Mehmet (dMehmet)-Protein                                   | 160 |

## I. Einleitung

### I.1. Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren

AP-2 Transkriptionsfaktoren bilden eine Familie aus fünf evolutionär konservierten sequenzspezifischen DNS-Bindeproteinen. Die AP-2 Familie umfasst die verschiedenen Isoformen AP-2 $\alpha$  (WILLIAMS *et al.*, 1988), AP-2 $\beta$  (MOSER *et al.*, 1995), AP-2 $\gamma$  (BOSHER *et al.*, 1996), AP-2 $\delta$  (ZHAO *et al.*, 2001) und AP-2 $\epsilon$  (TUMMALA *et al.*, 2003), wobei jede von separaten Genen kodiert wird. Der Transkriptionsfaktor AP-2 $\alpha$  wurde als 52kDa grosses Kernprotein durch Affinitätschromatographie aus HeLa Zellen isoliert (WILLIAMS *et al.*, 1988). Das AP-2 $\alpha$  Protein besteht aus 437 Aminosäuren (AS) und ist in einer Vielzahl von Vertebraten aber auch in Invertebraten wie Maus, Huhn, *C.elegans*, *Xenopus* und *Drosophila* hochkonserviert (MOSER *et al.*, 1993; MONGE und MITCHELL, 1998; BAUER *et al.*, 1998). Struktur- und Funktionsanalysen führten zur Identifikation eines N-terminalen prolin- und glutaminreichen Motives und eines basischen und  $\alpha$ -helikalen Motives im C-Terminus. Durch das N-terminal gelegene prolin- und glutaminreiche Motiv wird eine transkriptionsaktivierende Funktion vermittelt. Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnte die zwischen den Aminosäuren 52 und 108 gelegene Aktivierungsdomäne auf einen Bereich von weniger als 36 Aminosäuren für die Transaktivierungseigenschaften von AP-2 nachgewiesen werden (WANKHADE *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu wird die sequenzspezifische DNS-Bindung durch ein, die gesamte zweite Hälfte des Proteins umfassendes, basisches und  $\alpha$ -helikales Motiv erzielt (WILLIAMS und TJIAN, 1991). Charakteristisches Merkmal des C-Terminus ist ein basischer Bereich (AS 215-279), dem sich zwei amphipathische Helices (AS 279-307 und AS 390-410) anschließen, die durch einen Abschnitt von 80 AS voneinander getrennt sind. In Anlehnung an die basischen Helix-Loop-Helix Proteine wird AP-2 $\alpha$  als ein basisches Helix-Span-Helix Protein bezeichnet. Dieses Motiv vermittelt neben der

sequenzspezifischen DNS-Bindung gleichzeitig die Dimerisierung, die die notwendige Voraussetzung für die DNS-Bindung darstellt (WILLIAMS und TJIAN, 1991) und hochkonserviert in allen AP-2 Isoformen ist.

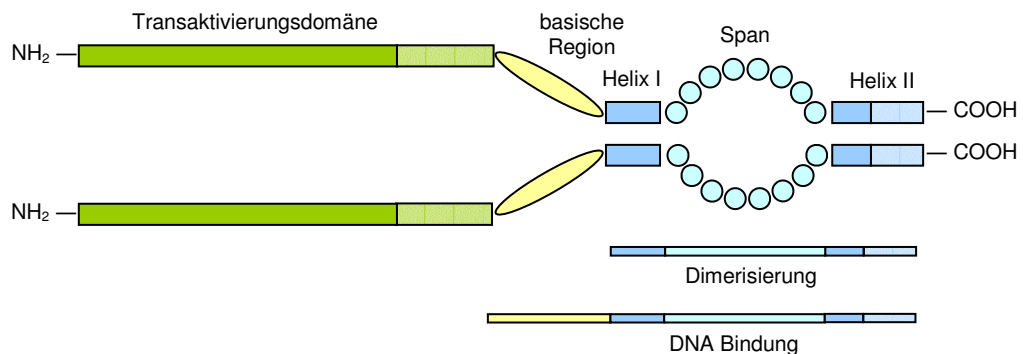


**Abb.1: struktureller Domänenaufbau eines dimeren AP-2 Proteinkomplexes**

Die transkriptionsaktivierende Funktion wird durch ein N-terminal gelegenes prolin- und glutaminreiches Motiv vermittelt (AS 1-165). Der C-Terminus (AS 166-437) umfasst die DNS-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne, wobei die AS 203-279 wichtig sind für sequenzspezifische DNS-Bindung und AS 280-437 die Homo- und Heterodimerisierung vermitteln. Ein Kernlokalisationssignal wurde in der Region AS 220-272 identifiziert (WERNER, 1995). Die Aminosäurenummern entsprechen ihrer Lage im humanen AP-2 $\alpha$  Protein.

Über die basische Domäne (Helix-Span-Helix Motiv) bindet AP-2 $\alpha$  nach Homo- oder Heterodimerisierung an die palindromische Konsensus-Sequenz 5'-GCCN<sub>3</sub>GGC-3' in zahlreichen Promotor und Enhancer Regionen verschiedener viraler und zellulärer Gene (MITCHELL *et al.*, 1987; IMAGAWA *et al.*, 1987; WILLIAMS *et al.*, 1988). *In vitro* Analysen ergaben, dass einige AP-2 $\alpha$  Bindungsstellen, wie das SV40 Enhancer Element 5'-CCCCAGGC-3', deutlich von dem 5'-GCCN<sub>3</sub>GGC-3' Sequenzmotiv abweichen und somit vermuten lassen, dass AP-2 $\alpha$  an GC-reiche Sequenzen mit unterschiedlicher Affinität bindet (MOHIBULLAH *et al.*, 1999).

Alle Faktoren dieser Transkriptionsfamilie haben gezeigt, dass sie eine Vielzahl von Genen mit unterschiedlicher biologischer Funktion, wie z.B.: Wachstum und Differenzierung, regulieren. Dabei werden einige durch AP-2 aktiviert, wie das Proto-Onkogen ERbB2 (BOSHER *et al.*, 1995), der Östrogenrezeptor (McPHERSON *et al.*, 1997), E-cadherin (HENNING *et al.*, 1996) und der Zellzyklus Inhibitor p21cip (ZENG *et al.*, 1997). Demgegenüber stehen einige durch AP-2 negativ regulierte Gene, wie c/EBP- $\alpha$  (JIANG *et al.*, 1998) und c-myc (GAUBATZ *et al.*, 1995). Die Regulation der AP-2 Expression steht selbst unter der Kontrolle verschiedener Signalwege. Aktivatoren der Proteinkinase C, wie Phorbol ester, sowie Induktoren von cAMP führen zu einer Steigerung der AP-2 Aktivität (LUSCHER *et al.*, 1989). Weiterhin führen verschiedene Mechanismen der posttranslationalen AP-2 Regulation, wie z.B. eine Phosphorylierung oder Interaktion mit anderen Proteinen, zu einer Aktivierung von AP-2 (GARCIA *et al.*, 1999).

## **I.2. Konservierte AP-2 Transkriptionsfaktoren in der Maus und in *Drosophila melanogaster***

AP-2 Transkriptionsfaktoren wurden ursprünglich als ein positiver Regulator der frühen Transkription des SV40 Virus isoliert (MITCHELL *et al.*, 1987). Im Laufe der Zeit wurden homologe AP-2 Gene aus verschiedenen Organismen wie Maus, Huhn, *Xenopus* und *Drosophila* kloniert (MOSER *et al.*, 1993; SHEN *et al.*, 1997; WINNING *et al.*, 1991; BAUER *et al.*, 1998), die alle einen hohen Grad an Übereinstimmung in Ihrer Proteinstruktur zeigen. Mittlerweile wurden fünf AP-2 Gene in der Maus identifiziert (AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , AP-2 $\delta$  und AP-2 $\epsilon$ ). AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zeigen während der Maus-Embryogenese ein überlappendes Expressionsmuster in den Neuralleistenzellen, die aus dem Neuralrohr auswandern und einen grossen Teil des peripheren Nervensystems, spezifische Knochen und Bindegewebe des Kopfes bilden. Darüberhinaus findet man ein spezifisches Expressionsmuster in der Haut, im Urogenitaltrakt und im zentralen Nervensystem.

Durch gezielte Genzerstörung mit Hilfe der „knock-out“ Technologie wurden die Funktionen der AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$  Proteinen in der Maus untersucht. Die Relevanz der AP-2 Gene zeigt sich durch die embryonale Letalität von AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$  defizienten Mäusen. AP-2 $\alpha$  defiziente Mäuse weisen erste Missbildungen an Tag 9,5 der Embryonalentwicklung auf und zeigen einen komplexen Phänotypen, der vor allem durch schwere cranofaciale Defekte und Defekte an den Gliedmassen geprägt ist (SCHORLE *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1996). Dabei schliessen sich sowohl die Bauchdecke, als auch das Neuralrohr im Kopfbereich nicht, was mit einer erhöhten Apoptoserate in den Regionen des Mittel- und Nachhirn einhergeht. Gesichtsmesenchym und craniale Ganglien, die von cranialen Neuralleistenzellen gebildet werden, weisen schwere Missbildungen auf. Die Neuralleistenzellen wandern zwar ins Gesichtsmesenchym ein, sind dort allerdings nicht in der Lage, differenzierte Strukturen auszubilden. Ebenso werden zwar craniale Ganglien angelegt, die Anzahl der Zellen in diesen ist jedoch deutlich reduziert. Spinalganglien, Epidermis und Niere zeigen keine auffälligen Veränderungen. AP-2 $\alpha$  ist überwiegend essentiell für die craniofaciale und kardiovaskuläre Morphogenese und die Entwicklung der Gliedmassen, der Augen, des Skeletts und der Körperhöhle (BREWER *et al.*, 2002; NOTTOLI *et al.*, 1998). AP-2 $\alpha$  defiziente Maus-Mutanten sterben bei der Geburt aufgrund der beschriebenen Missbildungen und besitzen neben den skelettalen Veränderungen im Kopfbereich auch Defekte im axialen Skelett. Neuste Beobachtungen von BREWER und WILLIAMS (2004, in press) zeigen, dass bei AP-2 $\alpha$  defizienten Mausembryonen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ein überdurchschnittlich grosser Nabelring nachzuweisen ist. Durch diesen vergrösserten Nabelring treten sowohl die Leber, als auch der Darm durch den Ring hinaus. Dieser Defekt ist durch zwei Fehlfunktionen im Entwicklungsprozess begründet: erstens durch die Migration von einer oder mehreren primären mesodermalen Körperfalten und zweitens durch die unzulängliche Zelldeposition an der Körperwand-Plakode. Der homozygote Verlust des AP-2 $\beta$  Gens (MOSER *et al.*, 1997) führt ebenfalls zum Tod am ersten Tag nach der Geburt. Im Gegensatz zu AP-2 $\alpha$

defizienten Mäusen sind die meisten Organe und Gewebe histologisch normal. Einzig die Niere zeigt ab Tag 18,5 der Maus-Embryogenese zystenartige Erweiterungen der Nierentubuli, (auch polyzystische Nieren genannt) begleitet von erhöhter Apoptose im Sammelrohr und distalen tubulären Epithel, die letztlich zum Tod der Mäuse führt.

An Tag 3,5 der Maus-Embryogenese wird eine AP-2 $\gamma$  Expression im Trophoblasten und deren Derivate gefunden (SHI und KELLEMS, 1998). Die AP-2 $\gamma$  Expression im Embryo beginnt an Tag 7,5 und ist nachweisbar im Neuralrohr, den Neuralleisten- und Epithialzellen (CHAZAUD *et al.*, 1996). Durch gezielte Genzerstörung von AP-2 $\gamma$  zeigte sich, dass AP-2 $\gamma$  essentiell für die Proliferation von extraembryonalem Gewebe ist (WERLING und SCHORLE, 2002). Heterozygote Tiere waren entwicklungsfähig, fertil, wiesen dabei zum Zeitpunkt der Geburt eine geringere Körpergrösse auf. Homozygoter Verlust von AP-2 $\gamma$  führte neben einer Wachstumsretardierung, zum Tod zwischen Tag 7 und 9 der Embryonalentwicklung (WERLING und SCHORLE, 2002). Der Tod der Mäuse scheint ein sekundärer Effekt zu sein, bedingt durch die unvollständige Versorgung des Embryos, da die trophoektodermalen Zellen, die eine starke AP-2 $\gamma$  Expression aufzeigen, nicht mehr fähig sind zu proliferieren. Untersuchungen zeigten, dass AP-2 $\gamma$  in der frühen embryonalen Entwicklung wichtig ist, weil es die Proliferation und Differenzierung der extraembryonalen Zellen des Trophoektoderms reguliert (AUMAN *et al.*, 2002).

Die Inaktivierung der AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$  Gene zeigt somit die essentielle Bedeutung dieser Gene für die Entwicklung und Differenzierung des Organismus und seiner Gewebe.

Obwohl bereits umfangreiche Studien zur Funktion und Regulation von AP-2 durchgeführt wurden, sind die Signaltransduktionswege in denen die Mitglieder der AP-2 Familie involviert sind nicht gut verstanden. Zudem wird die Analyse in Vertebraten durch das Problem der Redundanz erschwert (MACONOCHIE *et al.*, 1999).

In *Drosophila* hingegen existiert nur ein homologes AP-2 Gen (BAUER *et al.*, 1998), dem eine essentielle Rolle bei der Extremitäten-Entwicklung nachgewiesen werden konnte. *Drosophila* AP-2 produziert zwei mRNAs, die verschiedene erste Exone besitzen und die sich in ihrem 5'-Bereich unterscheiden (MONGE *et al.*, 1998). Alternative erste Exone wurden auch für das Maus AP-2 Gen gezeigt (MEIER *et al.*, 1998). *Drosophila* AP-2 Proteine weisen einen hohen Grad an Homologie zu AP-2 Proteinen aus anderen Organismen auf (BAUER *et al.*, 1998). Dabei ist die DNS-Bindungsdomäne, die am höchsten konservierte Domäne des Proteins, mit einer bis zu 92% Übereinstimmung zwischen Vertebraten und *Drosophila*. *Drosophila* AP-2 bindet auch an dieselbe DNS Sequenz wie die AP-2 Proteine der Vertebraten. Während der Embryogenese findet man ein Expressionsmuster von *Drosophila* AP-2 in den maxillaren Segmenten, dem Protocerebrum, im ventralen Nervenstrang und im Gehirn (MONGE *et al.*, 1998; BAUER *et al.*, 1998). In den Larvalstadien wird *Drosophila* AP-2 in den optischen Loben, der Bein-, Antennen- und Labialscheibe exprimiert (KERBER *et al.*, 2001). Vergleicht man das Expressionsmuster von AP-2 in *Drosophila* und Vertebraten, so zeigt sich, dass sowohl in Vertebraten, als auch in *Drosophila* AP-2 im Nervensystem, im Kopf und in den Gliedmaßen exprimiert wird. Interessante Parallelen lassen sich auch beim Vergleich der mutanten Phänotypen von *Drosophila* AP-2 und Maus AP-2 $\alpha$  feststellen. Diese Gemeinsamkeiten erstrecken sich auf die Cranofacialdefekte bishin zu den Defekten bei Wachstum von Gliedmaßen in Maus und *Drosophila* AP-2 Mutanten (KERBER *et al.*, 2001; MONGE *et al.*, 2001). Die Gemeinsamkeiten des Vertebraten AP-2 und AP-2 in *Drosophila* lassen auf eine konservierte Rolle von AP-2 Proteinen schließen. Bleibt die Frage, ob und wie AP-2 seine Aufgabe in Zusammenarbeit mit potentiellen Interaktionspartnern vermittelt.

### I.3. Potentielle Regulation der AP-2 Aktivität

Neben der Regulation der AP-2 Aktivität durch die Interaktion mit anderen Proteinen, wird die AP-2 Expression auch auf transkriptioneller Ebene beeinflusst.

Das Protoonkogen c-myc ist ein zellulärer Schalter, der zum einen die Proliferation von Zellen stimulieren und zum anderen Apoptose induzieren kann (EVAN und LITTLEWOD, 1993). Das myc-Protein zählt zu der Familie der Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper (HLH/LZ) Proteine und bindet spezifisch an die Konsensus-Sequenz 5'-CAC(G/A)TG-3' eines sogenannten E-Box Element verschiedener Gene (BLACKWELL *et al.*, 1990). Die Funktion von c-myc lässt sich als zentraler Regulator der Zellproliferation beschreiben, die u.a. unter der negativen Kontrolle von AP-2 steht. So inhibiert AP-2 die Aktivität von c-myc durch zwei Mechanismen: erstens überlappt die AP-2 Bindungsstelle mit der E-Box Sequenz und dadurch konkurriert AP-2 um die Bindungsstelle mit dem Heterodimer myc/max bzw. dem Homodimer max/max. Aufgrund sterischer Behinderung ist es nur einem Komplex möglich an die DNS zu binden.

Zweitens kommt es durch die Interaktion zwischen der C-terminalen DNS-Bindungsdomäne von AP-2 und der HLH/LZ Domäne von c-myc zu einer verhinderten DNS-Bindung des myc/max Komplexes und somit zu einer Inhibition der c-myc regulierten Genexpression (GAUBATZ *et al.*, 1995). Der Transkriptionsfaktor AP-2 agiert als negativer Regulator der Aktivierung von c-myc.

Ein weiteres Beispiel in der die Ausbildung von Komplexen mit AP-2 zu einer negativen Regulation der AP-2 vermittelten Genexpression führen kann, stellt das Retinoblastom (Rb) Tumor Suppressor Protein dar. Die Regulation von Rb ist ein zentraler Bestandteil des G1/S Kontrollpunktes während des Zellzyklus (WEINBERG, 1995). Durch eine physikalische und funktionelle Interaktion zwischen AP-2 und der C-terminale Domäne von Rb kommt es zu einer Repression der Expression (WU und LEE, 1998). Darüber hinaus aktiviert AP-2 die Transkription des Zellzyklus-Inhibitors p21.

Dabei wird durch eine AP-2 induzierte Aktivierung der p21 Expression durch ein AP-2 sensibles Element im p21 Promotor die Repression des Zellwachstums vermittelt. So zeigten Transfektionsexperimente mit AP-2 Expressionsplasmiden erhöhte p21 Proteinspiegel, die mit einer Hemmung der eigentlichen DNS-Synthese einhergehen.

Zusammenfassend zeigen diese Beobachtungen, dass AP-2 den Zellzyklus-Ablauf nicht nur durch die negative Regulation der c-myc Funktion und die Wechselwirkung zum Retinoblastom Tumor Suppressor Protein reguliert, sondern auch die Transkription des Zellzyklus-Inhibitors p21 aktiviert.

Wie bereits beschrieben agiert der Transkriptionsfaktor AP-2 sowohl als transkriptioneller Aktivator, als auch als Repressor. AP-2 Transkriptionsfaktoren stellen somit eine regulatorische Schlüsselfunktion, sowohl in der Tumorgenese verschiedene Krebszelltypen, der Kontrolle und Regulation bestimmter Zellzyklus- und Apoptose-Effektoren, als auch in der embryonalen Zelldifferenzierung der Vertebraten dar. Murine Defektmutanten zeigen schwerwiegende Entwicklungsstörungen, die mit einer erhöhten Apoptoserate in AP-2 exprimierenden Geweben einhergehen. Eine Regulation der AP-2 Genexpression und Stabilität der Proteinstruktur ist essentiell für eine kontrollierte Entwicklung der Zellen. Bei der Analyse transkriptioneller und post-translationaler Mechanismen der AP-2 Expression wurde ein Protein identifiziert, dass die transkriptionelle Expression von AP-2 reprimiert.

Als Zinkfingerprotein, mit drei Zinkfingern in der C-terminalen Region, gehört AP-2rep der Familie der Krüppel-ähnlichen Transkriptionsfaktoren an, die spezifisch an regulatorische Elemente innerhalb von Genpromotoren wie z.B.: von AP-2 $\alpha$  mit dem Konsensus-Motiv 5'-CAGTGGG-3' binden (ROTH *et al.*, 2000).

Bezüglich der Expression von AP-2rep und AP-2 $\alpha$  zeigen beide eine starke Expression in der Niere und im Gehirn. Ausserdem konnte vor allem in der Niere festgestellt werden, dass bei vermehrter AP-2rep Expression eine Abnahme von AP-2 $\alpha$  nachzuweisen war. Die Abnahme der Expression von

AP-2 $\alpha$  korreliert mit einem Anstieg der AP-2rep Synthese in diesem Gewebe, so dass auch eine negative transkriptionelle Regulation der AP-2 $\alpha$  Expression durch AP-2rep *in vivo* vermutet werden kann. Bei der Generierung von AP-2rep Maus-Mutanten zeigten homozygot defiziente Tiere keine äusserlich erkennbaren Veränderungen und die Mäuse waren fertil (MOSER *et al.*, unveröffentlicht).

Somit zeigt sich eine gegenseitige Regulation von AP-2 $\alpha$  und AP-2rep. Zudem spielt AP-2rep eine wichtige Rolle als Transkriptions-„Silencer“. Experimente von SCHUIERER *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die Repression der AP-2 $\alpha$  Transkription abhängig ist von dem N-terminalen PVDLS Motiv im AP-2rep-Protein. Dieses Motiv findet sich auch im C-Terminus des adenoviralen Onkoprotein E1A und interagiert mit dem AP-2rep Korepressor CtBP1. E1A aktiviert die Transkription des endogenen AP-2 $\alpha$  Gens, ein Effekt, der die De-Repression des AP-2 $\alpha$  Promotors bewirkt, bedingt durch die Interaktion zwischen E1A und CtBP1 (SCHUIERER *et al.*, 2001).

Ein weiterer Regulator der AP-2 $\alpha$  Aktivität wurde durch einen South-Western Screen mit einem autoregulatorischen Element A32, das eine kombinierte AP-2-BTE Bindungsstelle an Position -336 enthält, gefunden. Diese Bindungsstelle erlaubt sowohl eine positive, wie auch negative Regulation der Promotor Aktivität. Bei der identifizierten cDNS handelte es sich um den Transkriptionsfaktor BTEB-1. Expressionsanalysen von Ratten-Gewebe zeigten eine dominante BTEB-1 Expression in der Haut, der Niere, der Lunge, im Gehirn, im Skelett- und Herzmuskel, sowie ein geringeres Expressionsmuster in der Leber, im Darm und der Milz (IMATAKA *et al.*, 1994).

Transfektionsexperimente in Neuroblastom Zelllinien durch IMHOF *et al.* (1999) konnten den Transkriptionsfaktor BTEB-1 als einen starken Aktivator der AP-2 $\alpha$  Promotor Aktivität und seine Funktion als neuen Regulator der embryonalen Entwicklung neuraler Gewebe nachweisen.

Eine bekannte Form der post-translationalen Modifikation von AP-2, ist eine für AP-2 beschriebene Phosphorylierung bedingt durch Proteinkinase A. Desweiteren wurden auch Interaktionen des Koaktivators PC4 (KANNAN und TAINSKY, 1999) oder der Poly ADP Ribose Polymerase (KANNAN *et al.*, 1999) mit AP-2 beschrieben, die eine Koaktivierung des Transkriptionsfaktors beeinflussen. Aber auch Interaktionen mit anderen Kofaktoren könnten zu einer Regulation der AP-2 Aktivität führen. Bis heute konnten noch keine Daten über ein Korepressor-Protein oder einen Mechanismen der Hemmung der AP-2 Aktivität durch Protein-Protein-Wechselwirkungen oder Protein-Modifikationen gefunden werden.

Das erst kürzlich von ELORANTA und HURST (2002) beschriebene SUMO-konjugierte Enzym UBC9 vermittelt die Bindung von SUMO Peptiden. In Anlehnung an das kompakte Protein Ubiquitin können SUMO Peptide als Ubiquitin verwandte Modifikationen bezeichnet werden, mit Hilfe dessen, ähnlich wie der Prozess der Ubiquitylierung, eine Sumoylierung stattfindet. Im Gegensatz zur Ubiquitylierung, wobei die Zielproteine degradiert werden, zeichnet sich die Sumoylierung dadurch aus, dass die zelluläre Lokalisation von Proteinen moduliert oder ihrer Stabilität gesteigert werden kann (MÜLLER *et al.*, 2001). So reguliert die kovalente Modifikation von Proteinen durch SUMO verschiedene zelluläre Prozesse, wie den Nucleus-Transport oder den Zellzyklus. Sumoylierung von Transkriptionsfaktoren bewirkt unterschiedliche Effekte auf deren Aktivität. So zeigt die Konjugation von SUMO an den Tumor Suppressor p53 oder den Hitzeschock-Faktor HSF2 eine gesteigerte Transaktivierung. Sumoylierung von c-Jun oder dem Androgen Rezeptor vermindern hingegen die transkriptionelle Aktivität. Der Transkriptionsfaktor AP-2 zählt zu der letzt erwähnten Gruppe, wo Sumoylierung einen negativen Effekt auf die Aktivität hat. Die Modifikation des Transkriptionsfaktors AP-2 durch SUMO bewirkt eine Runterregulierung der transkriptionellen Aktivität.

Weitere Experimente zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von AP-2 wurden u.a. mit Hilfe eines Proteininteraktionsscreen mit der AP-2 $\alpha$  DNS-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne durchgeführt. Zunächst wurde ein Hefe „Two Hybrid Screen“ untersucht. Dazu wurde das System nach FIELDS und SONG (1989) verwendet, welches als DNS-Bindungs- bzw. Transaktivator-domäne die entsprechenden Domänen des Hefe GAL4 Transkriptionsfaktors nutzt. Die Verwendung von möglichen AP-2 $\alpha$  Domänen als Fusionsanteil war aus folgenden Gründen nicht möglich: Die AP-2 $\alpha$  Transaktivierungsdomäne (AS 1-165) ist in Hefe sehr stark aktiv und konnte deshalb als Fusionsanteil nicht verwendet werden. Zudem ist die AP-2 $\alpha$  DNS Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (AS 166-437) bei konstitutiv hoher Expression in Hefe stark toxisch.

Da eine Interaktion in diesem System nicht nachgewiesen werden konnte, wurde ein Far-Western Protein-Interaktionsscreen gewählt, wobei eine Reihe von Klonen isoliert wurden. Unter diesen Klonen befand sich auch ein bisher unbekanntes Protein, das strukturell aus drei Domänen aufgebaut ist, wobei die Homologie der zentralen Domäne zur Namensgebung Mehmet führte.



### Abb.2: schematische Struktur des Mehmet Proteins

Die Mehmet cDNS kodiert für ein Protein von 1306 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von etwa 144kDa.

Y: Yeast-Box; A: saure Domäne; MT/TRX: 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferase / *Drosophila* Trithorax Protein; PHD: Zinkfingermotiv; NLS: Kernlokalisierungssignal; pro: prolinreiche Region; F: F-Box Region, ein Rezeptor-Motiv für den Ubiquitin-Ligase-Komplex; L: Leucin-Repeats

Die Positionen 1, 520/522, 1018 und 1306 bezeichnen Aminosäure-Positionen.

Der N-Terminus (AS 1-520) enthält Homologiebereiche zu verschiedenen Hefe-Proteinen (Yeast-Box, Y-Box), der eine kurze saure Region folgt.

Die zentrale Region (AS 522-1018) interagiert mit AP-2 und besitzt Homologien zu 5' Cytosin-DNS Methyltransferasen und zum *Drosophila* Trithorax Protein. Aufgrund dieser Homologie wurde das Protein Mehmet genannt (Protein containing **MECP-1** homology region similar to DNS **Methyltransferase** and mammalian **trithorax** proteins). Im Anschluss daran zeigen sich drei Bereiche, die Homologie zum Zinkfingermotiv, Kernlokalisationssignal und prolinreichen Regionen aufweisen. Die C-terminale Region (AS 1018-1306) enthält zwei gekoppelte Homologiebereiche, bestehend aus F-Box- und Leucin-Repeat-Motiv, welches für eine Gruppe von Proteinen charakteristisch ist, die Komponenten des SCF(Skp1-Cullin-F-Box Protein)-Ubiquitin-Ligase-Komplexes darstellen (BAI *et al.*, 1996; SCHULMAN *et al.*, 2000) und als F-Box Proteine bezeichnet werden. Die F-Box Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der selektiven Degradation von kurzlebigen Proteinen, die meist durch das Ubiquitin-System vermittelt wird (HERSHKO, 1996; HERSHKO und CIECHANOVER, 1998). Als mögliches Substrat für die Ubiquitinylierung und Degradation könnte AP-2 $\alpha$  dienen.

Eine zweite Überlegung ergibt sich aus der im mittleren Drittel von Mehmet vorhandenen 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferase-Homologieregion (AS 574-623). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Region in der Lage ist, selbst DNS zu binden. Die Vorstellung einer Bindung von Mehmet an die DNS, führt auch zu der Möglichkeit, dass Mehmet an Mitosevorgängen beteiligt sein könnte.

#### I.4. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Struktur und Funktion von Mehmet, einem neuen Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$ , untersucht werden. Dem Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  wurde eine zentrale Funktion bei verschiedenen Differenzierungen während der Embryonalentwicklung nachgewiesen. Wie jedoch AP-2 $\alpha$  seine vielfältige Funktion erfüllt ist noch weitgehend unklar, so könnte eine Struktur- und Funktionsanalyse von

Mehmet eine Möglichkeiten zur Klärung der Funktionweise von AP-2 $\alpha$  eröffnen. Zunächst sollte die Grösse und Verteilung der Expression des Mehmet-Transkriptes untersucht werden.

Um eine Wechselwirkung beider Proteine weitgehend zu bestätigen, sollten zu Beginn Interaktionsexperimente und Lokalisationsversuche beider Partner durchgeführt werden. Zur Klärung der Funktion von Mehmet war zunächst ein transgenes Zellmodell zu entwickeln, das Mehmet induzierbar exprimieren sollte. Diese Induzierbarkeit hat den Vorteil, dass eine kontrollierte Steuerung der Proteinexpression unter Verwendung eines Antibiotikums, in unserem Fall Doxycyclin, möglich ist. Mit dieser Zelllinie sollten funktionelle Tests durchgeführt werden, um sowohl die regulierbare Proteinexpression, als auch die Lokalisation von Mehmet bei stabiler Transfektion aufzuklären.

Der C-Terminus (AS 1018-1306) von Mehmet enthält ein sogenanntes F-Box/Leucin-Repeat-Motiv, welches charakteristisch für Komponenten des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist. Die Ubiquitylierung von Zielproteinen führt zu einer raschen Proteasom vermittelten Degradation. Mit der Mehmet exprimierenden Zelllinie sollte geklärt werden, ob eine regulatorische Kommunikation zwischen AP-2 $\alpha$  und Mehmet möglich ist und AP-2 $\alpha$  ein potentielles Substrat darstellt.

Desweiteren sollten Arbeiten mit *Drosophila melanogaster* durchgeführt werden, da mit Hilfe von Datenbank-Analysen ein homologes Mehmet-Protein in *Drosophila* identifiziert wurde. Hier sollte zunächst der Nachweis des homologen Mehmet-Transkriptes in verschiedenen Entwicklungsstadien gefunden und zudem die Expression während der gesamten Entwicklung quantitativ untersucht werden.

## II Material und Methoden

### II.1 Material

#### II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

allgemeine Chemikalien und Fertiglösungen

|                                                               |                                              |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Agar                                                          | Merck (Darmstadt)                            |
| Agarose                                                       | MJResearch Biozym (Hessisch Oldendorf)       |
| Ammoniumazetat                                                | Roche (Mannheim)                             |
| Ammoniumpersulfat                                             |                                              |
| Ampizillin                                                    | Sigma-Aldrich (München)                      |
| Azeton                                                        | Roth (Karlsruhe)                             |
| 30% Acrylamidstammlösung + 0,8%                               | Roth (Karlsruhe)                             |
| Bisacrylamid (im Verhältnis 37,5:1)                           |                                              |
| Borsäure                                                      | Merck (Darmstadt)                            |
| Bromphenolblau                                                | Serva (Heidelberg)                           |
| $\beta$ -Mercaptoethanol                                      | Serva (Heidelberg)                           |
| 2x BES (N-N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethane-sulfonic acid) | Sigma-Aldrich (München)                      |
| Cäsiumchlorid                                                 | Merck (Darmstadt)                            |
| Chloroform                                                    | Merck (Darmstadt)                            |
| Coomassie Brilliant Blue G-250                                | Serva (Heidelberg)                           |
| Desoxyribonucleotidtriphosphate (dNTPs)                       | Invitrogen (Karlsruhe); Pharmacia (Freiburg) |
| Diamonobenzidin                                               | Merck (Darmstadt)                            |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC)                                    | Sigma-Aldrich (München)                      |
| Dimethylformamid                                              | Sigma-Aldrich (München)                      |

|                                                             |                          |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                     | Sigma-Aldrich (München)  |
| Dinatriumhydrogenphosphat<br>( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  | Merck (Darmstadt)        |
| Dithiothreitol (DTT)                                        | Sigma-Aldrich (München)  |
| Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Eisessig)           | Merck (Darmstadt)        |
| Ethanol ( $\text{EtOH}$ )                                   | Merck (Darmstadt)        |
| Ethidumbromid (Etbr)                                        | Sigma-Aldrich (München)  |
| Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)                        | Merck (Darmstadt)        |
| Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-<br>tetraessigsäure (EGTA) | Sigma-Aldrich (München)  |
| ExpressHyb <sup>TM</sup> Hybridization Solution             | BD Clontech (Heidelberg) |
| Ficoll Typ 400                                              | Sigma-Aldrich (München)  |
| Fluorescent Mounting Medium                                 | Dako (Hamburg)           |
| Formaldehyd                                                 | Merck (Darmstadt)        |
| Formamid                                                    | Sigma-Aldrich (München)  |
| Glukose                                                     | Merck (Darmstadt)        |
| Glycerol                                                    | Sigma-Aldrich (München)  |
| Hämatoxylin                                                 | Merck (Darmstadt)        |
| Hefe-Extrakt                                                | Merck (Darmstadt)        |
| 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-<br>ethansulfonsäure (HEPES) | Serva (Heidelberg)       |
| Isoamylalkohol                                              | Merck (Darmstadt)        |
| Isopropanol                                                 | Merck (Darmstadt)        |
| Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid<br>(IPTG)        | Sigma-Aldrich (München)  |
| Kaliumazetat (KAc)                                          | Merck (Darmstadt)        |
| Kaliumchlorid (KCl)                                         | Merck (Darmstadt)        |
| Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )       | Merck (Darmstadt)        |
| Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )                          | Merck (Darmstadt)        |
| Magermilchpulver                                            | Merck (Darmstadt)        |
| Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )                        | Merck (Darmstadt)        |
| Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )                         | Merck (Darmstadt)        |
| Maltose                                                     | Merck (Darmstadt)        |

|                                                         |                                      |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Methanol (MeOH)                                         | Merck (Darmstadt)                    |
| Morpholino-Propansulfonsäure (MOPS)                     | Sigma-Aldrich (München)              |
| Natriumazetat (NaAc / NaOAc)                            | Merck (Darmstadt)                    |
| Natriumchlorid (NaCl)                                   | Merck (Darmstadt)                    |
| Natriumcitrat                                           | Merck (Darmstadt)                    |
| Natriumdesoxycholat                                     | Merck (Darmstadt)                    |
| Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) | Merck (Darmstadt)                    |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                              | Merck (Darmstadt)                    |
| Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )            | Merck (Darmstadt)                    |
| Natriumhydrogenphosphat ( $\text{NaHPO}_4$ )            | Merck (Darmstadt)                    |
| Natriumhydroxid                                         | Merck (Darmstadt)                    |
| Natriumpyruvat                                          | Merck (Darmstadt)                    |
| Natronlauge (NaOH)                                      | Merck (Darmstadt)                    |
| Nonidet P-40 (NP-40, IGEPAL)                            | Sigma-Aldrich (München)              |
| NTB-2 nuclear track Fotoemulsion                        | Kodak (Rochester, USA)               |
| Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer                       | Invitrogen (Karlsruhe)               |
| Oligodesoxynukleotide                                   | Proligo (Paris, Frankreich)          |
| Paraformaldehyd (PFA)                                   | Merck (Darmstadt)                    |
| Phenol                                                  | Roth (Karlsruhe)                     |
| Phenol / Chloroform                                     | Roth (Karlsruhe)                     |
| Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)                      | Sigma-Aldrich (München)              |
| Rinderserumalbumin (BSA)                                | Sigma-Aldrich (München)              |
| Röntgenentwickler und Fixierlösung                      | Tetenal Photowerk GmbH (Norderstedt) |
| Salzsäure (HCl)                                         | Merck (Darmstadt)                    |
| Sarcosyl                                                | Sigma-Aldrich (München)              |
| 4x SDS-PAA-Gelelektrophorese-Probenpuffer               | Roth (Karlsruhe)                     |
| Tetramethylethylenediamine (TEMED)                      | BioRad                               |
| Tissue-Tek <sup>®</sup>                                 | Sekura (Zoetewoude, Niederlande)     |
| Triethanolamin                                          | Merck (Darmstadt)                    |

|                                                     |                        |
|-----------------------------------------------------|------------------------|
| Trinatriumcitrat                                    | Merck (Darmstadt)      |
| TritonX-100                                         | Serva (Heidelberg)     |
| TRIS base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan         | Merck (Darmstadt)      |
| TRIZOL <sup>®</sup> Reagent                         | Invitrogen (Karlsruhe) |
| Trypton/Pepton aus Casein                           | Merck (Darmstadt)      |
| Tween20                                             | Serva (Heidelberg)     |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | Merck (Darmstadt)      |
| X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid)     | Roth (Karlsruhe)       |
| Xylencyanol                                         | Roth (Karlsruhe)       |

#### Chemikalien für die Zellkultur

|                                                                                         |                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Camptothecin                                                                            | Sigma-Aldrich (München)                     |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)w/o NaPyruvat + 4500mg/l Glucose + Pyridoxin HCl | Gibco BRL (Karlsruhe)                       |
| Doxycyclin                                                                              | BD Clontech (Heidelberg)                    |
| foetal calf serum (fötales Kälberserum)                                                 | Gibco BRL (Karlsruhe)                       |
| Geneticin (G418)                                                                        | Gibco BRL (Karlsruhe)                       |
| Hygromycin                                                                              | BD Clontech (Heidelberg)                    |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (w/o Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )         | Gibco BRL (Karlsruhe); Biochrom AG (Berlin) |
| Penizillin / Streptomycin                                                               | Gibco BRL (Karlsruhe)                       |
| Puromycin                                                                               | Sigma-Aldrich (München)                     |
| Trypsin / EDTA (0,25% Trypsin/1mM EDTA)                                                 | Gibco BRL (Karlsruhe)                       |

## Radiochemikalien

|                                                                                          |                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-Desoxy-Cytidintriphosphat<br>(dCTP) (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l) | Amersham (Braunschweig) |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|

## Verbrauchsmaterialien

|                                                                  |                                              |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| BioMax light Röntgenfilme                                        | Eastman Kodak (Rochester, USA)               |
| Blaukappenröhrchen, 15 und 50ml                                  | Greiner Labortechnik (Solingen)              |
| chamber slides                                                   | Nunc (Wiesbaden)                             |
| Deckgläschen                                                     | Bender und Hobein (Karlsruhe)                |
| Einmal Stabpipetten (5,10 und 25ml)                              | Nerbe (Winsen/Luhe)                          |
| Einmal-Sterilfilter                                              | Millipore (Schwalbach)                       |
| Hybond-XL Nylonmembran                                           | Amersham (Braunschweig)                      |
| Kryoröhrchen                                                     |                                              |
| Nitrocellulosefilter 9 und 15cm                                  | Schleicher & Schuell (Dassel)                |
| Nylonmembran (PVDF-Membran)                                      | Millipore (Schwalbach)                       |
| Objektträger                                                     | Bender und Hobein (Karlsruhe)                |
| Parafilm „M“                                                     | American Nat. Can (Chicago, USA)             |
| PCR-Reaktionsgefäße 100 $\mu$ l                                  | MJResearch Biozym (Hessisch<br>Oldendorf)    |
| Petrischalen 9 und 15cm                                          | Greiner Labortechnik (Solingen)              |
| Polyallomer-Zentrifugenröhrchen                                  | Beckmann (München)                           |
| Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0ml                                    | Sarstedt (Nümbrecht); Eppendorf<br>(Hamburg) |
| Sepharyl <sup>®</sup> S-200 HR MicroSpin <sup>®</sup><br>Columns | Pharmacia (Freiburg)                         |
| Whatman 3MM Filterpapier                                         | Laborcenter (Nürnberg)                       |
| X-Omat AR5 Röntgenfilme                                          | Eastman Kodak (Rochester, USA)               |
| Zellkulturflaschen T-25 und T-75,                                | Greiner Labortechnik (Solingen)              |
| Zellkulturschalen 10cm                                           | Beyer GmbH (Düsseldorf)                      |
| 12-,24-,48- und 96-Loch-Platten                                  | Nunc (Wiesbaden)                             |

### II.1.2 Enzyme und Reaktionskits

Die im nachfolgenden aufgelisteten Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, mit den dazugehörigen Puffern und nach Herstellerangaben eingesetzt.

|                                                            |                                                                            |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| DNase I                                                    | Roche (Mannheim)                                                           |
| Complete / Complete mini (Protease-Inhibitoren-Cocktail)   | Roche (Mannheim)                                                           |
| Restriktionsendonukleasen                                  | Invitrogen (Karlsruhe); New England Biolabs (Schwalbach); Roche (Mannheim) |
| RNase A                                                    | Roche (Mannheim)                                                           |
| RNase H                                                    | Roche (Mannheim)                                                           |
| RNase out (RNase Inhibitor)                                | Roche (Mannheim)                                                           |
| Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP)                       | Invitrogen (Karlsruhe)                                                     |
| Superscript <sup>TM</sup> II RNaseH- Reverse Transcriptase | Invitrogen (Karlsruhe); Roche (Mannheim)                                   |
| T4 DNS Ligase                                              | Invitrogen (Karlsruhe); Roche (Mannheim)                                   |
| Taq DNS Polymerase                                         | Invitrogen (Karlsruhe); Roche (Mannheim)                                   |

Desweiteren wurden folgende Reaktionskits verwendet :

|                                                       |                          |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|
| Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I                | BD Clontech (Heidelberg) |
| BrdU Immunohistochemistry System                      | Oncogene (San Diego,USA) |
| Cell Proliferation Reagent WST-1                      | Roche (Mannheim)         |
| Cytotoxicity Detection Kit (LDH)                      | Roche (Mannheim)         |
| DOTAP Liposomales Transfektionsreagenz                | Roche (Mannheim)         |
| ECL <sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents | Amersham (Braunschweig)  |

|                                                                    |                          |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Human 12-Lane Multiple Tissue Northern (MTN) <sup>®</sup> Blot III | BD Clontech (Heidelberg) |
| Mouse MTN <sup>™</sup> Blot                                        | BD Clontech (Heidelberg) |
| Qiagen HiSpeed <sup>™</sup> Midi+Maxi Kit                          | Qiagen (Hilden)          |
| QIAquick Gel Extraction Kit                                        | Qiagen (Hilden)          |
| QIAquick PCR Purification Kit                                      | Qiagen (Hilden)          |
| Rediprime II Random Prime Labelling System                         | Amersham (Braunschweig)  |
| TnT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System              | Promega (Mannheim)       |
| TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit                                   | Invitrogen (Karlsruhe)   |

### II.1.3 Antikörper und enzymkonjugierte anti-Antikörper

Zur Detektion des Epitop-tagHA des Mehmet-Proteins im Western Blot und in der Immunfluoreszenz wurde der murine monoklonale Antikörper HA.11 verwendet (Babco, Richmond (USA)). Der HA.11 erkennt das Aminosäurepeptid YPYDVPDYA des Influenza-Hämagglutinin Epitops. Zum Nachweis des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  sowohl im Western Blot, als auch bei der Immunfluoreszenz wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-AP-2 Antikörper der Firma Geneka (Rixensart, Belgien) verwendet. Dieser Antikörper wurde gegen ein synthetisches Peptid hergestellt, das den Aminosäure-Resten AS 120-134 des menschlichen Ap-2 Proteins entspricht. Außerdem kam zur Detektion im Western Blot ein polyklonales Kaninchen anti-AP-2 $\alpha$  Serum der Firma Santa Cruz Biotechnology (California, USA) zum Einsatz, welches den Carboxyterminus von AP-2 $\alpha$  erkennt. Die Kontrollansätze zur Überprüfung der Ladungsverhältnisse anhand des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin bzw. der Existenz des „tetracycline-responsive transcriptional activator“ wurden im ersten Fall mit Hilfe des monoklonalen Maus anti- $\beta$ -Aktin Antikörper (Sigma, München) und im zweiten Fall über den

polyklonalen Kanninchen VP-16 Antikörper (BD Clontech, Heidelberg) detektiert. Weiterhin wurden folgende, mit „horse raddish peroxidase“ (HRP) konjugierte, polyklonale Seren eingesetzt:

Ziege anti-Maus (alle IgG Subklassen, sowie IgA+IgM) und Ziege anti-Kanninchen (Ig aller Klassen), beide von der Firma DAKO (Hamburg). Für die Immunfluoreszenz wurden zur Visualisierung der „Alexa Fluor 488“ Ziege anti-Maus (IgG H+L spezifisch) bzw. der „Alexa Fluor 594“ Ziege anti-Kanninchen (IgG H+L spezifisch) Antikörper eingesetzt. Die genannten Fluorochrom-konjugierten Seren wurden von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) bezogen.

#### **II.1.4 Längenstandards für Nukleinsäuren und Proteine**

|                                               |                        |
|-----------------------------------------------|------------------------|
| 100 base pair (bp) DNA ladder                 | Invitrogen (Karlsruhe) |
| 1 kb DNA ladder                               | Invitrogen (Karlsruhe) |
| 0.24-9.5 kb RNA ladder                        | Invitrogen (Karlsruhe) |
| SeeBlue® Plus2 pre-stained<br>proteinstandard | Invitrogen (Karlsruhe) |
| BenchMark™ prestained protein<br>ladder       | Invitrogen (Karlsruhe) |

#### **II.1.5 Bakterienstämme, Zelltypen, Mausstämme und Genbibliotheken**

In allen Klonierungsarbeiten wurden zur Transformation und Amplifikation rekombinanter DNS die *Escherichia coli*-Stämme DH5α (HANAHAH, 1985), SCS110 oder XL-1 Blue verwendet.

Zur Klonierung von PCR Produkten, wie auch als Empfänger rekombinanter DNS, unter Verwendung des pCR® II-TOPO® Vektor, im Rahmen der Blau-Weiß-Selektion, diente der *Escherichia coli*-Stamm TOP10.

## Bakterienstämme und Kennzeichnung Ihres Genotypen

| STAMM        | GENOTYP                                                                                                                                                                                                                |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DH5 $\alpha$ | F <sup>-</sup> , endA, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA, relA1, $\Delta$ (lacZYA-argF), $\Phi$ 80d lacZ $\Delta$ M15 (AUSUBEL <i>et al.</i> , 1994)                                                                  |
| SCS110       | F <sup>-</sup> , rpsL, thr, leu, endA, thi-1, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, $\Delta$ (lac-proAB), lacZ $\Delta$ M15 (Stratagene GmbH, Heidelberg)                                                |
| XL-1 Blue    | F <sup>'</sup> , supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac <sup>-</sup> [pro AB+ lac I <sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15: Tn10 (tet <sup>R</sup> )]                                                           |
| TOP10        | F <sup>-</sup> mcrA, $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC), $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ lacX74, recA1, deoR, araD139, $\Delta$ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (Str <sup>R</sup> ), endA1, nupG (Invitrogen, Karlsruhe) |

Zum Nachweis der *in vivo* Expression, sowie zur Lokalisationsbestimmung des Mehmet-Proteins mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurden HeLa Zellen eingesetzt.

Für die Organentnahmen zur RNS Isolierung aus verschiedenen Maus-Geweben wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57/B6 (Charles River, Sulzfeld) und 129SVJ (Charles River, Sulzfeld) benutzt. Bei der transienten und stabilen Expression verschiedener Genkonstrukte wurden Tet-Off Zelllinien des Zelltypes embryonaler Fibroblasten der Maus (MEF/3T3 Tet-Off<sup>TM</sup>) (BD Clontech, Heidelberg) verwendet.

### II.1.6 Plasmid-Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Plasmid-Vektoren verwendet:

pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup> [3,973kB; AmpR, KmR]

Der pCR<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> Vektor wurde linearisiert mit 3'-Thymidin Überhängen und einer Topoisomerase I-Aktivität, die die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem Insert-Fragment mit 3'-Adenin

Überhängen und der Vektor-DNS vermittelt, von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Im lacZ $\alpha$ -Gens verfügt er über eine multiple cloning site (MCS), in die der Einbau des Inserts erfolgen kann und somit eine Blau-Weiss-Selektion der rekombinanten Klone ermöglicht wird.

#### pCMXpl2.3HA.10His [4,5kB; Amp<sup>R</sup>]

Hierbei handelt es sich um einen auf dem Cytomegalo-Virus (CMV) basierenden Expressions-Vektor, der drei HA-tags, zur möglichen Detektion, und zehn Histidin-Resten, zur putativen Aufreinigung, aufweist. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Roland Schüle (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Zentrale Klinische Forschung) zur Verfügung gestellt.

#### pSV2-Puro [5,729kB; Amp<sup>R</sup>, Puro<sup>R</sup>]

Das Plasmid ist ein Derivat des Selektions-Vektors pSV2neo, der anstelle einer Neomycin-Resistenz eine Puromycin-Resistenz aufweist. Das Puromycin Resistenzgen wird als dominanter Selektionsmarker zur Generierung von stabil transformierten Säugetierzellen verwendet. Dieser Vektor wurde freundlicherweise von PD Dr. Barbara Schnierle (Georg Speyer Haus, Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

#### pTK-Hyg [5,1kB; Amp<sup>R</sup>, Hyg<sup>R</sup>]

Dieser Selektions-Vektor enthält eine Hygromycin-Resistenz (Basen: 2577-1540), die in erster Linie bei der Selektion von doppelt-stabilen Transformanten im Tet-Off<sup>TM</sup> Gene Expression System verwendet wird. Durch das Fehlen des Enhancer Elementes, verhindert der pTK-Hyg die ungewollte Aktivierung des pTRE Plasmides nach der Kointegration ins Zell-Genom. Dieser Vektor wurde von der Firma BD Clontech (Heidelberg) bezogen.

#### pTRE-Tet-Off [3,1kB; Amp<sup>R</sup>]

Bei diesem Vektorplasmid handelt es sich um eine modifizierte Form des pUHD10-3-Vektors (RESNITZKI *et al.*, 1994), das bei der Expression von Zielgenen im Tet-Off<sup>TM</sup> Gene Expression System der Firma BD Clontech

(Heidelberg) eingesetzt werden kann. Der Vektor enthält ein „tetracyclin responsive element“ (TRE), das aus sieben Kopien der 42 Basenpaar (bp) langen Tet Operator (tetO) Sequenz besteht. Die Operatorsequenz liegt 5'-stromaufwärts eines minimalen CMV-Promotors ( $P_{\text{minCMV}}$ ). Das Zielgen wird unter der Kontrolle des TRE exprimiert.

pUHD10-3 [3,146kB; Amp<sup>R</sup>]

Das Plamid pUHD10-3 besteht aus 4 Segmenten : der Replikationsregion des *E.coli* Plamids ColE1, dem  $\beta$ -Lactamase-Resistenzgen mit dem Promotor Pbla/p3 des Transposons Tn2661, dessen *HincII*- und *PstI*-Restriktionsschnittstellen eliminiert wurden, der regulatorischen Region mit dem Minimal-Promotor hCMV (GOSSEN und BUJARD, 1992), der MCS mit den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *SacII*, *EcoRI* und *XbaI*, sowie 3'-stromabwärts der MCS die Polyadenylierungssequenz des SV40.

### II.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide („Primer“) wurden von Proligo (Paris, Frankreich) synthetisiert. Die Primer wurden im folgenden zur DNS-Sequenzierung, zur Amplifikation und Identifizierung der Aktin bzw Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Domänen, sowie für die Herstellung von cDNS-Konstrukten verwendet.

Der Verwendungszweck und die Spezifitäten der Primer werden im Ergebnisteil dieser Arbeit detailliert beschrieben.

## Standard Sequenzierprimer

T7 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3'

## Vektor spezifische Sequenzierprimer

|               |                                         |
|---------------|-----------------------------------------|
| CMX5          | 5'-CCC ACT GCT TAA CTG GC-3'            |
| CMX3          | 5'-CCA ATT ATG TCA CAC CA-3'            |
| pTRE5         | 5'-GGA GAC GCC ATC CAC GCT-3'           |
| pTRE3         | 5'-CAT CAA TGT ATC TTA TCA-3'           |
| pUHD10.3-for  | 5'-CGC TGT TTT GAC CTC CAT AGA AGA C-3' |
| pUHD10.3-back | 5'-GTG GTT TGT CCA AAC TCA TCA ATG-3'   |
| pUAST5        | 5'-GAA ATC TGC CAA GAA GT-3'            |
| pUAST3        | 5'-CCT CTA GAG GTA CC-3'                |

## Mehmet spezifische Sequenzierprimer

|             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| Mehmetfor1  | 5'-GGA GAT GAG GCA GCT GCT GCG T-3' |
| Mehmetfor2  | 5'-GGG GAC TTC GTG CAT GCT ATG G-3' |
| Mehmetfor3  | 5'-GGG ATC AAG ATG CCA GAC CCT G-3' |
| Mehmetfor4  | 5'-GCC AAG CGG AGA AGT GAG TGT G-3' |
| Mehmetfor5  | 5'-CCC GGG AGA GTG ATC AGT CAC G-3' |
| Mehmetback1 | 5'-CTT GTC CTG GAA CTA ACT TAG-3'   |
| Mehmetback1 | 5'-CTT GTC CTG GAA CTA ACT TAG-3'   |
| MehR1       | 5'-GGG ACG CTT GAC CAG ATG CTC C-3' |
| MehR2       | 5'-GCC CTT CAC GCT CAT CAG ACA G-3' |
| MehR3       | 5'-GCC AAG TTG TGC AGG GTT GGA G-3' |

## AP-2α spezifische Sequenzierprimer

|       |                                          |
|-------|------------------------------------------|
| AP2-1 | 5'-GAT CCT TAC TCC CAC GTC AAC GAC-3'    |
| AP2-2 | 5'-GAT CAA ACT GTA ATT AAG AAA GGC C-3'  |
| AP2-3 | 5'-CTG GAC AAA ATA GGA TTA AAT CTG CC-3' |
| AP2-4 | 5'-GCT TGA CCC ACT TCA ACC TCA TCT C-3'  |
| AP2-5 | 5'-GAG GAG AAG CAC AGA AAG TGA GGC-3'    |

## Aktin- und GAPDH spezifische Primer

|           |                                      |
|-----------|--------------------------------------|
| actin5C5' | 5'-AGC CAG CAG TCG TCT AAT CCA G-3'  |
| actin5C3' | 5'-CAG CAA CTT TCT TCG TCA CAC AT-3' |

GAPDHfor 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'

GAPDHback 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

Primer zum Nachweis des dMehmet-Konstruktes in *Drosophila*

dMehmet5 5'-TAG AAG GCA GCG ATG TCC ACC GCC G-3'

dMehmet-reverse 5'-ATC TCG CGC ACC ATT CCC GCC TGC G-3'

Primer zur Herstellung des HA-AP-2 $\alpha$ -Konstruktes

AP2-Eco-HAfor 5'-GAC TGA ATT CCC ACC ATG TAC CCA TAC  
GAT GTT CCT GAC TAT GCG CTT TGG AAA  
TTG ACG GAT AA-3'

AP2-Ecoback 5'-GAC TGA ATT CTC ACT TTC TGT GCT  
TCT CC-3'

### II.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

Die Herstellung von Standard-Medien, -Puffern und -Lösungen erfolgte nach SAMBROOK *et al.* (1989), AUSUBEL *et al.* (1994) und COLIGAN *et al.* (1994). Die Zusammensetzungen spezieller Medien, Puffer und Lösungen sind jeweils im Anschluß der entsprechenden Methode aufgelistet. Alle Lösungen wurden mit ultrafiltriertem bidestilliertem (bidest.) Wasser und Chemikalien des Reinheitsgrades p.a. angesetzt und durch Autoklavieren (25min/121°C/1bar) sterilisiert.

Thermolabile Lösungskomponenten wurden sterilfiltriert (Ausschlußgröße 0,2 $\mu$ m) und nach dem Abkühlen auf 50°C steril zugesetzt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit 1M HCl oder 1M NaOH.

### **II.1.9 Geräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör**

DNS Sequenzierungsapparatur und Zubehör

Betriebssystem, OS/2 Warp4, DNS-Sequenzierungssoftware

Computer, Hewlett Packard (Meriden, Connecticut, USA)

Sequence Analysis 3.4.5 / Data Collection 2.1 Software

Sequencer ABI prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Einschweissgerät

Folio (Severin, Sundern)

Eismaschine

Firma Ziegra (Isernhagen)

Fotodokumentation und Zubehör

Duoscan Scanner (Agfa, Leverkusen)

Entwickler X-omat 100 1 (Eastman Kodak, Rochester (USA))

Expositionskassetten und Verstärkerfolie (Rego, Augsburg)

Geldokumentationsanlage UV System (254nm) + Kamera Classic Uno (Intas, Göttingen)

Olympus Camedia, Digital Camera C1400L (Olympus, Hamburg)

Gefrier-und Kühlschränke

Firma AEG (Nürnberg)

Firma Bosch (Stuttgart)

Firma Hereaus (Hanau)

Firma Liebherr (Biberach an der Riß)

Gelelektrophorese Apparaturen und Zubehör

Fastblot B33 / B34-Kammer für Proteine (Biometra, Göttingen)

Gelgiesstation Dual Gel Caster SE245 mighty small II (Hoefer, San Francisco (USA))

Minigel System SE250/SE260 mighty small II (Hoefer, San Francisco (USA))

PerfectBlue Minigelsystem und Zubehör (Peqlab, Erlangen)

Spannungsgerät E143 (Consort, Turnhout (Belgien))

## Heizgeräte

Heizblock TR-L288 (Liebisch, Bielefeld)

Mikrowelle NN-5256 (Panasonic, Hamburg)

Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)

## Homogenisatoren

Ultraturrax Micra D-8 (Art-Labortechnik, Müllheim)

Ultraturrax T8 (IKA-Labortechnik, Staufen)

## Inkubator-Schüttler

Inkubator (Hereaus, Hanau)

Innova 4000 (New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen (Schweiz))

Mini Hybridisierungsofen (Appligene, Heidelberg)

Windsor Inkubator (Sandrest Ltd, Eastbourne (England))

## Magnetrührgerät

MR 3001 (Heidolph, Schwabach)

## Mikroplatten-Lesegerät

ELx800 universal Reader (Bio-Tek Instruments, Vermont (USA))

## Mikroskope

DM LB2 mit JVC digital camera KYF70B (Leica, Bensheim)

Labovert (Leitz, Solms)

## PCR-Thermozykler

DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim)

Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJResearch Biozym, Hessisch Oldendorf)

## pH-Meter

pH-Meter pH522 (Uni Equip Laborgerätebau und -vertriebs GmbH, Martinsried)

## Photometer

Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)

## Präzisionspipetten

Mikropipetten P20, P100, P200, P1000 (Gilson, Den Haag (Niederlande))

Research Einkanal-Pipetten 10 (Eppendorf, Hamburg)

## Schüttler

Rocky 1000 (Fröbel Labortechnik, Lindau)

Taumler Polymax 1040 (Heidolph, Schwabach)

## Sterilbank

Sterilbank BSB 4 A (Gelaire Flow Laboratories, Opera (Italien))

## Sterilisator

Autoklav 3870 (Tuttnauer, Breda (Niederlande))

## Szintillationszähler

Szintillationszähler LS5000 TD (Beckmann, München)

## UV-Transilluminator

UV-Crosslinker CL-1 (Herolab, Wiesloch)

UV-Kästen KW 254nm und KW 366nm (Intas, Göttingen)

## Vortexgerät

Schnellmixer Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia (USA))

## Waagen

Feinwaage BP211S (Sartorius, Göttingen)

Waage BP 3100P (Sartorius, Göttingen)

## Wasserbäder

Wasserbad GFL 1083 (ZILAB, Adligenswil (Schweiz))

Wasserbad TWB5 (Julabo, Seelbach)

## Wasseraufbereitungsanlage

Reinstwassersystem Typ HP6 UV/UF (TKA-Lab, Niederelbert)

## Zentrifugen

Biofuge fresco und Biofuge 13 (Heraeus, Hanau)

Eppendorfszentrifuge 5415D und 5417R (Eppendorf, Hamburg)

Galaxy Mini (Merck, Darmstadt)

Minifuge RF (Heraeus, Hanau)

## II.2 Molekularbiologische Methoden

### II.2.1 Restriktion von DNS

Die Spaltung von DNS mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde nach Vorschrift des jeweiligen Enzymherstellers unter Verwendung der dazugehörigen Puffer und Berücksichtigung der entsprechenden Temperatur- und Zeitoptima durchgeführt.

Bei der analytischen Restriktion von Plasmid-DNS wurde in der Regel in einem Volumen von 10 bis 20 µl mit 0,5 bis 1 µg DNS, 10 Einheiten des entsprechenden Restriktionsenzym und 1 bis 2 µl des empfohlenen 10x Reaktionspuffers gearbeitet.

Für die Restriktion unter präparativen Aspekten wurden die Mengen der Plasmid-DNS (1 bis 5 µg), des Restriktionsenzym, des 10x Reaktionspuffers und das Gesamtvolumen auf bis zu 100 µl erhöht. Beim Gebrauch von zwei unterschiedlichen Enzymen wurde bei gegebener Kompatibilität der einzelnen Puffer- bzw. Temperaturoptima die Restriktion in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer angesetzt. Im Falle einer Puffer- oder Temperatur-Inkompatibilität erfolgte ein sequentieller Verdau. Dabei wurde das Enzym nach der ersten Restriktion, wie vom Hersteller angegeben, inaktiviert, die DNS mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, in einem Verhältnis von 25:24:1 (v/v/v)) extrahiert (II.2.4), anschließend mit Ethanol (EtOH) präzipitiert (II.2.5) und mit dem zweiten Enzym restringiert. Lagen mehrere identische Enzymschnittstellen vor, wurde eine partielle Restriktion nach Optimierung der Inkubationszeiten durchgeführt. In allen Restriktionsansätzen wurde beachtet, daß der Anteil der Enzymmenge 1/10 des gesamten Reaktionsvolumens nicht überschreitet.

### II.2.2 Ligation von DNS Fragmenten

Restringierte DNS-Fragmente (II.2.1) können durch Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen benachbarten 3' Hydroxy- und 5' Phosphatenden mit Hilfe der T4 DNS Ligase (New England Biolabs, Schwalmbach) miteinander verknüpft werden. Man unterscheidet dabei zwischen der Verknüpfung glatter Enden („blunt end“ Ligation) und überhängender, komplementärer Enden („sticky end“ Ligation). Im ersten Fall wurde das Insert in zehnfachem, im zweiten Fall in dreifachem molaren Überschuß zum kompatiblen Vektor zugegeben.

Der Ansatz zur Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20µl mit einer Enzymeinheit T4 DNS Ligase und dem vom Hersteller empfohlenen Ligationspuffer angesetzt und über Nacht (ü.N.) bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die Hälfte des Ligationsansatzes für eine Hitzeschock-Transformation (II.2.12) eingesetzt.

### II.2.3 5'-Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten

Die im Rahmen einer Ligation eingesetzten Vektoren, die lediglich mit einem Enzym restringiert wurden, wurden an ihrem 5'-Ende mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um die Religation der Fragmente zu unterbinden. Dabei wurde der Restriktionsansatz 15min bei 65°C inaktiviert und durch Zugabe von einer Einheit Shrimps alkalischer Phosphatase (SAP) und dem entsprechenden Dephosphorylierungspuffer die Hydrolyse der Phosphatgruppen gestartet. Nach 10- bis 30-minütiger Inkubation bei 37°C, wurde der Ansatz erneut für 15min bei 65°C inaktiviert und schließlich für die Ligationsreaktion (II.2.2) eingesetzt.

### II.2.4 PCI-Extraktion

Zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen und anderen Verunreinigungen aus Lösungen von Nukleinsäuren wurden diese einer PCI-Extraktion unterzogen. Dabei wurde die PCI-Lösung in einem Verhältnis von 25:24:1 (v/v/v) entsprechend vorgenannter Reihenfolge angesetzt. Die zu reinigende DNS-Probe wurde mit einem Volumen PCI versetzt, durch mehrfaches Vortexen ausreichend gemischt und zur vollständigen Trennung der beiden Phasen zentrifugiert (5min/13.000UpM/Raumtemperatur (RT)). Die obere wässrige, nukleinsäurehaltige Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zur Beseitigung phenolischer Restkomponenten mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (C:I, in einem Verhältnis von 24:1 (v/v)) extrahiert. Danach wurde die Lösung, wie oben beschrieben, wiederholt zentrifugiert, erneut die obere Phase entnommen und die DNS präzipitiert (II.2.5).

### II.2.5 DNS-Präzipitation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNS-Fällungen zur Reinigung, Umpufferung und Konzentrierung durchgeführt. Dabei wurden die DNS-haltigen Lösungen entweder einer Ethanol- oder Isopropanolfällung unterzogen. Im ersten Fall wurde der DNS-Probe der 2,0fache Volumenanteil 96% (v/v) EtOH und der 0,1fache Volumenanteil 3M Natriumacetat (pH 5,2) zugesetzt. Im Falle einer Isopropanolfällung wurde die Fällung durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol durchgeführt. Beide Ansätze wurden gründlich gemischt, mindestens 30min bei -80°C bei der Ethanol-Fällung und 10min bei RT bei Verwendung von Isopropanol gelagert und durch Zentrifugation (20min/13.000UpM/4°C) die präzipitierte DNS sedimentiert. Das entstandene DNS-Pellet wurde mit 70% (v/v) EtOH gewaschen, zentrifugiert (5min/13.000UpM/RT) und nach vollständiger Trocknung bei RT in einer angemessenen Menge sterilem bidestilliertem (bidest.) Wasser

resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNS-Lösung bei -20°C gelagert.

## **II.2.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNS**

Die Konzentration von DNS-Lösungen kann mittels zweier Methoden bestimmt werden, zum einen durch analytische Agarosegelelektrophoresen (II.2.7.1) und zum anderen mit Hilfe photometrischer Messungen. Die Ermittlung der DNS-Konzentration im Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel (II.2.7) wurde nach Elektrophorese durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der zu untersuchenden Bande mit den Banden einer Marker-DNS bekannter Konzentration bei 254nm durchgeführt (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Konzentrationsbestimmung durch UV-Licht im Spektralphotometer bedient sich der Strahlenabsorption der Nukleinsäure aufgrund der mesomeren Strukturen der Purin- und Pyrimidinbasen. Mit einer entsprechenden Verdünnung wurde die Extinktion der zu untersuchenden Probe bei 260nm gegen ihr Lösungsmittel gemessen (SAMBROOK *et al.*, 1989). Darüber hinaus wurde die photometrische Messung ebenfalls zur Überprüfung des Reinheitsgrades der jeweiligen Probe verwendet. Dieser läßt sich durch die Bildung des Quotienten aus der Extinktion bei 260nm und 280nm ermitteln (MÜLLER *et al.*, 1993). Liegt dieser Wert zwischen 1,8 und 1,9 kann davon ausgegangen werden, daß kaum Verunreinigungen vorliegen.

## **II.2.7 Agarosegelelektrophorese von DNS**

### **II.2.7.1 Analytische Agarosegelelektrophorese**

Mit Hilfe der horizontalen Agarosegelelektrophorese ist es möglich, Größe, Reinheit und Konzentration von DNS-Fragmenten zu bestimmen. Dies spielt unter anderem bei der Ermittlung von Fragment- und Vektorgrößen aus

DNS-Restriktionen (II.2.1) und PCR-Produkten (II.2.9) sowie bei der quantitativen und qualitativen Überprüfung (II.2.6) von Plasmid-Präparationen eine bedeutende Rolle.

Zur Auftrennung der DNS-Fragmente wurden abhängig von der Grösse der Nukleinsäuren 0,8 bis 2,0% (w/v) Agarosegele verwendet. Die Durchführung der Elektrophorese wie auch die Herstellung der Gele erfolgte nach SAMBROOK *et al.* (1989) in einem 1x TAE- bzw. 1x TBE-Puffersystem. Als Detektionsfarbstoff wurden 0,5µg/ml Ethidiumbromid (Etbr), welches zwischen den aromatischen Ringsystemen der Nukleotide interkaliert, bei der Herstellung der Agarosegele und des Laufpuffers hinzugefügt. Die Fragmentgrößen wurden mit Hilfe eines parallel aufgetrennten DNS-Größenstandards abgeschätzt. Zum Beschweren wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10x Ladepuffer versetzt und bei konstanter Spannung von 7-10V/cm elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Nukleinsäuren die Gelmatrix zur Anode durchwandern.

Die Visualisierung und Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei einer Wellenlänge von 254nm unter Verwendung des digitalen Photodokumentationssystems von Intas (Göttingen).

| <u>50x TAE-Puffer</u> |        | <u>5x TBE-Puffer</u> |       |
|-----------------------|--------|----------------------|-------|
| 0,5M EDTA (pH 8,0)    | 100ml  | Borsäure             | 27,5g |
| Eisessig              | 57,1ml | 0,5M EDTA (pH 8,0)   | 20ml  |
| TRIS Base             | 242g   | TRIS Base            | 54g   |

| <u>10x Ladepuffer</u> |             |
|-----------------------|-------------|
| Bromphenolblau        | 0,25% (w/v) |
| Ficoll Typ 400        | 15%         |
| Xylencyanol           | 0,25% (w/v) |

### II.2.7.2 Präparative Agarosegelelektrophorese

Zur Isolierung von DNS-Fragmenten nach einer Restriktion (II.2.1) wurde die präparative Agarosegelelektrophorese angewendet. Der Versuchsaufbau und -ablauf entsprach dabei dem der analytischen Agarosegelelektrophorese (II.2.7.1). Nach Beenden der elektrophoretischen Auftrennung wurden die gewünschten DNS-Fragmente mit einem sterilen Skalpell auf dem UV-Transilluminator bei einer 70% UV-Belichtung (366nm) aus dem Agarosegel präpariert und bis zur DNS-Isolierung (II.2.8) bei -20°C aufbewahrt.

### II.2.8 DNS-Isolierung aus Agarosegelen

DNS-Fragmente wurden mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) nach präparativer Agarosegelelektrophorese (II.2.7.2) aus der Gelmatrix isoliert. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die DNS in 30 bzw. 50µl sterilem bidest. Wasser gelöst wurde. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNS erfolgte durch Auftrennung eines Zehntel des Eluates in der analytischen Agarosegelelektrophorese (II.2.7.1).

### II.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) stellt eines der wichtigsten Verfahren der enzymatischen *in vitro*-Amplifikation von definierten DNS-Fragmenten dar (SAIKI *et al.*, 1985). Die mehrfache Wiederholung der aus drei Teilschritten (Denaturierung, Primeranlagerung, DNS-Synthese) bestehenden PCR-Reaktion läßt eine spezifische, hohe Anreicherung von DNS- und cDNS (copy DNS)-Bereichen, indem deren flankierende Enden Basenpaarungen mit Oligonukleotid-Primern eingehen, zu. Die Synthesereaktion wird von einer hitzeresistenten Polymerase (Taq-Polymerase) aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*

durchgeführt, die den Hochtemperaturschritt der DNS-Denaturierung übersteht. Zu Beginn der Amplifikationsreaktion wird die doppelsträngige DNS in Einzelstränge denaturiert. Durch Temperaturabsenkung werden Basenpaarungen erneut ausgebildet und die DNS wird renaturiert. Primer hybridisieren an die jeweiligen komplementären Regionen auf der DNS und dienen der DNS-Polymerase als Startpunkt zur DNS-Neusynthese. Der neusynthetisierte DNS-Strang liefert in einem folgenden Zyklus nach Denaturierung wieder eine Vorlage für die nächste Syntheserunde. Durch die Wiederholung dieses Zyklus ergibt sich eine exponentielle Anreicherung der zwischen Primern gelegenen Matrix-DNS (MULLIS *et al.*, 1986). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden zur Amplifikation der  $\beta$ -Aktin - bzw. GAPDH-Domänen und zum Einbau eines HA Epitop-tags in die AP-2 $\alpha$ - und Mehmet-DNS-Sequenz verwendet. Desweiteren wurden mit der PCR-Methode Transkripte von Mehmet und dMehmet identifiziert. Dabei wurden alle PCR-Reaktionen im 50 $\mu$ l Maßstab in silikonisierten 100 $\mu$ l „PCR-strip“-Reaktionsgefäßen wie folgt angesetzt:

#### PCR-Reaktionsansatz

|                               |               |
|-------------------------------|---------------|
| Ausgangs-DNS                  | 0,5-50ng      |
| 5'-Primer                     | 10pmol        |
| 3'-Primer                     | 10pmol        |
| dNTP-Mix (1,25 mM/dNTP)       | 0,2 mM        |
| 10x Taq DNS-Polymerase-Puffer | 1x            |
| MgCl <sub>2</sub>             | 1,5 mM        |
| Taq DNS-Polymerase            | 2,5U          |
| steriles bidest. Wasser       | ad 50 $\mu$ l |

Die Amplifikation der DNS-Fragmente im Thermozykler wurde entsprechend folgendem Protokoll durchgeführt:

| PCR-Zyklusprotokoll |                   |          |            |
|---------------------|-------------------|----------|------------|
| Denaturierung       | 95°C              | 5min     | 1x         |
| Denaturierung       | 95°C              | 15s-1min | } 30 - 40x |
| Primer-Anlagerung   | (T <sub>p</sub> ) | 15s-1min |            |
| Primer-Verlängerung | 72°C              | 30s-3min |            |
| Auffüll-Reaktion    | 72°C              | 5-15min  | 1x         |

Die Temperatur zur Primer-Anlagerung (T<sub>p</sub>) wurde für den jeweiligen Primer nach folgender empirischen Formel (WU *et al.*, 1991) berechnet:

$$T_p = 22 + 1,46 \times [2x (G + C) + A + T]$$

Die in dieser Formel aufgeführten Basen stellen den Gehalt der Basen im entsprechenden Primer-Anlagerungsbereich dar. Die Dauer der einzelnen Teilschritte richtete sich nach den Eigenschaften der zu amplifizierenden DNS-Fragmente bzw. der verwendeten Primer.

Ein Aliquot der PCR-Reaktionsansätze wurde abschließend auf einem analytischen Agarosegel (II.2.7.1) aufgetrennt und analysiert und die unverwendeten PCR-Produkte bis zu weiteren Verwendung bei 4-8°C gelagert.

### II.2.9.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach erfolgter Amplifikation wurde der PCR Ansatz mit Hilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) von Salzen, sowie von nicht eingebauten Nukleotiden und Oligonukleotiden befreit. Dazu wurde die

Aufreinigung entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die quantitative und qualitative Kontrolle der Ausbeute erfolgte anhand einer analytischen Agarosegelelektrophorese (II.2.7.1).

### II.2.9.2 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte konnten mit Hilfe des „TOPO-TA-Cloning®Kits“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) mittels einer „one-step“ Klonierungsstrategie (TOPO® Cloning) direkt in den Vektor pCR®II-TOPO® subkloniert werden. Das Verfahren basiert auf der Tatsache, dass Taq-Polymerasen eine Matrizen-unabhängige terminale Transferasesaktivität besitzen, wodurch ein singuläres Deoxyadenosin (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts angefügt wird. Der pCR®II-TOPO® Vektor liegt linearisiert mit einfachen 3'-Thymidin (T) Überhängen an den Plasmidenden vor und trägt das Enzym Topoisomerase I in kovalenter Bindung, das zur Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem doppelsträngigen PCR-Fragment und der Vektor-DNS führt.

Die zu klonierenden PCR-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, gereinigt und die Klonierungsreaktion entsprechend folgendem Protokoll angesetzt:

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| PCR Produkt             | 0,5-4µl |
| Salzlösung              | 1µl     |
| steriles bidest. Wasser | ad 5µl  |
| pCR®II-TOPO® Vektor     | 1µl     |

Anschließend wurden die Komponenten vorsichtig gemischt und für 30s bis zu 30min bei RT inkubiert. Die beigegefügt TOP10 kompetenten Zellen wurden mit 1/3 Volumen des Klonierungsansatzes vorsichtig gemischt und

für 5 bis 30min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein 30-sekundiger Hitzeschock in einem 42°C warmen Wasserbad. Nach erneuter Lagerung auf Eis wurden 250µl SOC-Medium hinzugefügt und die Zellen 60min bei 37°C und 250UpM regeneriert. Im folgenden wurden unterschiedliche Mengen der Suspension auf mit dem unphysiologischen Substrat X-Gal (40µl einer 40mg/ml Stammlösung) vorbehandelte LB-Ampizillin (50µg/ml) Agarplatten gebracht und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die Inkubation ermöglichte eine optische Unterscheidung der Bakterienklone, die sogenannte Blau-Weiß-Selektion. Diese Selektion beruht auf der enzymatischen Umsetzung des X-Gal Substrates in Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol durch die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Galaktosidase (LacZGen). Religierte Vektormoleküle tragen ein intaktes LacZ-Gen und die gebildete  $\beta$ -Galactosidase hydrolysiert das zugefügte Substrat. Als Reaktionsprodukt entsteht der oben erwähnte Indigofarbstoff, der zur *in vivo*-Blaufärbung der Bakterienzellen führt. Beim Einbau des PCR-Produkts wird das LacZ-Gen des Vektors inaktiviert und kann somit keine funktionsfähige  $\beta$ -Galactosidase mehr exprimieren, so dass die positiven Klone weiß bleiben. Diese Klone wurden dann zur weiteren Analyse ausgewählt.

#### SOC Medium

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Glukose           | 20mM  |
| Hefe-Extrakt      | 0,5%  |
| KCl               | 2,5mM |
| MgCl <sub>2</sub> | 10mM  |
| MgSO <sub>4</sub> | 10mM  |
| NaCl              | 10mM  |
| Trypton/Pepton    | 2%    |

### II.2.10 Sequenzierung von DNS

Durch Sequenzierung kann unter anderem die Sequenz neu eingebrachter DNS-Abschnitte oder PCR-amplifizierter Bereiche in einem bestimmten Genbereich ermittelt werden. Zur Sequenzerfassung von DNS wurde nach dem Prinzip des "Cycle-Sequencing" gearbeitet, das auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode von SANGER *et al.* (1977) beruht, wobei die PCR-Amplifikations-Methode (SAIKI *et al.*, 1985) verwendet wurde. Die Technik wurde unter Verwendung des „PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Sequencing Kits“ der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. Zur Analyse der Reaktionsprodukte in einer Kapillarelektrophorese stand ein automatischer DNS-Sequencer ABI Prisme 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) zur Verfügung.

Zur Aufzeichnung und Auswertung der Sequenzdaten wurde das systemeigene Computerprogramm mit Hilfe der entsprechenden Software Sequence Analysis 3.4.5 / Data Collection 2.1 (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet.

### II.2.11 Anzucht von Bakterien

#### II.2.11.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E.coli*-Bakterien der Stämme DH5 $\alpha$ , SCS110 und XL-1 Blue erfolgte unter Schütteln (250UpM) in LB-Flüssigmedium ü.N. bei 37°C. Rekombinante *E.coli*-Bakterien wurden in LB-Flüssigmedium angezogen, dem das entsprechende Selektionsantibiotikum zugefügt wurde. Zur Selektion positiver Klone nach Transformation (II.2.12), sowie zur vorübergehenden Lagerung rekombinanter Klone wurden LB-Agarplatten (LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar) mit passendem Selektionsantibiotikum verwendet. Dazu wurde die Kultur plattiert, ü.N. bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

LB (Luria Bertani)-Medium (pH 7,5)

|                |            |
|----------------|------------|
| Hefeextrakt    | 0,5% (w/v) |
| NaCl           | 1% (w/v)   |
| Trypton/Pepton | 1% (w/v)   |

**Selektionsantibiotika**

|                              |         |    |          |         |                          |
|------------------------------|---------|----|----------|---------|--------------------------|
| Ampizillin-Stammlösung:      | 50mg/ml | in | sterilem | bidest. | Wasser                   |
|                              |         |    |          |         | Endkonzentration 50µg/ml |
| Kanamycin-Stammlösung:       | 10mg/ml | in | sterilem | bidest. | Wasser                   |
|                              |         |    |          |         | Endkonzentration 50µg/ml |
| Chloramphenicol-Stammlösung: | 34mg/ml | in | 100%     |         | Ethanol                  |
|                              |         |    |          |         | Endkonzentration 34µg/ml |

**II.2.11.2 Herstellung von *E.coli*-Stammkulturen**

Die Herstellung von *E.coli*-Stammkulturen erfolgte durch sorgfältiges Mischen von 700µl einer gut angewachsenen ü.N.-Flüssigkultur mit 700µl einer sterilen 70% (v/v) Glycerinlösung. Die Stammkulturen wurden anschließend in 1,5ml Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

**II.2.12 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNS****II.2.12.1 Herstellung hitzeschock-kompetenter *E.coli***

Zellen, die in der Lage sind, Fremd-DNS aufzunehmen, bezeichnet man als kompetente Zellen. Bei *E.coli*-Zellen kann dieser zeitlich begrenzte Zustand durch die Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> induziert werden (MANDEL und HIGA, 1970; DAGERT und EHRLICH, 1979). Zur Präparation hitzeschock-kompetenter Zellen wurden 100ml LB-Flüssigmedium mit 1,0% (v/v) einer ü.N.-Vorkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (250UpM) bis zu einer

Extinktion bei der Wellenlänge 600nm ( $E_{600nm}$ ) von 0,2 inkubiert. In diesem Stadium befindet sich ein Großteil der Zellen in der frühen exponentiellen Wachstumphase, in der die Kompetenz gut induziert werden kann. Anschließend wurden die Zellen auf 4°C abgekühlt, zentrifugiert (5min/2500Upm/4°C), das Bakterienpellet in 1/2 Volumen eiskaltem 50mM  $CaCl_2$  der Ausgangssuspension vorsichtig resuspendiert und dann 20min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5min/2500Upm/4°C) wurde das Bakterienpellet in 1/10 Volumen eiskaltem 50mM  $CaCl_2$  mit 15% Glycerin der Anfangssuspension gelöst. Jeweils 100µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

#### **II.2.12.2 Hitzeschock-Transformation von *E.coli***

Zur Transformation von *E.coli* wurden  $CaCl_2$ -kompetente Zellen verwendet (II.2.12.1), wobei ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1/2 Volumen des unverdünnten Ligationsansatzes (II.2.2) bzw. 10ng Plasmid-DNS vermischt wurde. Der Ansatz wurde 20min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 2-minütiger Hitzeschock in einem 42°C warmen Wasserbad. Nach erneuter Lagerung auf Eis für 5min wurden 800µl LB-Medium hinzugefügt und die Zellen 45 bis 60min bei 37°C und 250UpM regeneriert. Im folgenden wurden unterschiedliche Mengen der Suspension auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum plattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert. Rekombinante Klone wurde schließlich durch Mini-Plasmidpräparationen (II.2.13) und Kontrollrestriktionen (II.2.1) analysiert.

#### **II.2.13 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien**

Plasmide wurden zumeist aus *E.coli*-Kulturen isoliert, die unter dem Selektionsdruck des plasmidkodierten Antibiotikums, wie unter II.2.11.1 beschrieben, gewachsen sind. Für die Plasmidpräparation aus *E.coli* wurden

zwei Methoden angewandt. Zur Schnellpräparation kleinerer Mengen Plasmid-DNS erfolgte die Isolation nach der „Mini-Screen“-Vorschrift (modifizierte Methode nach BIRNBOIM und DOLY, 1979). Zur präparativen Isolation hochreiner Plasmid-DNS wurde das „HiSpeed Plasmid Midi- bzw. Maxi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) benutzt. Beide Verfahren beruhen auf der alkalischen Zellwand-Lyse bei gleichzeitiger Denaturierung der genomischen und der Plasmid-DNS. Durch die nachfolgende Absenkung des pH-Werts werden genomische DNS und bakterielle Proteine ausgefällt, während die Plasmid-DNS in Lösung bleibt und renaturiert wird.

#### **II.2.13.1 Analytische Präparation von Plasmid-DNS**

Die Isolierung von geringen Mengen von Plasmid-DNS erfolgte basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse in Gegenwart eines Detergenz. Die gewonnene Plasmid-DNS diente Testrestriktionen (II.2.1) und anschließenden analytischen Agarosegelelektrophoresen (II.2.7.1) zur Identifizierung rekombinanter Bakterienklone. Hierzu wurden 1,5ml einer ü.N.-Kultur sedimentiert (1min/8000Upm/RT) und das Bakterienpellet in 300µl eiskalter Solution I durch gründliches Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 300µl Solution II wurde die Suspension vorsichtig gemischt und anschließend mit weiteren 300µl Solution III versetzt, wobei die Bakterienproteine und chromosomale DNS als weißer Niederschlag gefällt wurden.

Nach Zentrifugation (10min/13.000Upm/RT) wurde der Überstand einer Isopropanol-Fällung unterzogen (II.2.5).

Die gefällte Plasmid-DNS wurde sedimentiert (10min/13.000Upm/4°C), mit 70% EtOH gewaschen, wie oben beschrieben, wiederholt zentrifugiert und nach sorgfältiger Trocknung bei RT in 30µl sterilem bidest. Wasser mit RNase A (1mg/ml) gelöst.

| <u>Solution I</u>                           |             | <u>Solution II</u>                                                  |          |
|---------------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------------------|----------|
| EDTA                                        | 10mM        | NaOH                                                                | 0,2M     |
| Glukose*                                    | 20mM        | SDS                                                                 | 1% (w/v) |
| Tris/HCl (pH 8,0)                           | 25mM        |                                                                     |          |
| *nach dem Autoklavieren<br>steril zugesetzt |             | nach der Herstellung werden<br>beide Lösungen 1:1 (v/v)<br>gemischt |          |
| <u>Solution III</u>                         |             |                                                                     |          |
| Eisessig                                    | 11,5% (w/v) |                                                                     |          |
| Kaliumazetat                                | 2,94M       |                                                                     |          |

### II.2.13.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNS

Zur Präparation größerer Mengen von Plasmid-DNS wurde sowohl das „HiSpeed Plasmid Midi Kit“ als auch das „HiSpeed Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Der Versuchsablauf wurde gemäß den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt. Quantität und Qualität der isolierten und anschließend restringierten (II.2.1) DNS wurden mit Hilfe analytischer Agarosegelelektrophoresen (II.2.7.1) oder durch Messung im Spektralphotometer (II.2.6) ermittelt.

### II.2.14 *In Vitro* Translation

Die gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation ist definiert als Übertragung eines DNS-Moleküls in mRNS Moleküle und die folgende Übersetzung der mRNS Moleküle in Polypeptide innerhalb eines zellfreien Systems. Dabei vereinfacht das TNT<sup>®</sup> Quick coupled transcription / translation System der Firma Promega (Mannheim) den Prozess, indem es

RNS Polymerase, Nukleotide, Salze und „recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor“ mit einem Reticulozyten Lysat kombiniert, und so im zellfreiem System Proteine hergestellt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das „TNT® Quick coupled transcription / translation system“ mit dem T7 RNS Polymerase Promoter verwendet und entsprechend nach Herstellerangaben durchgeführt. Die gewonnenen Proteine wurden für die Western Blot-Analyse (II.3.5) bei -20°C aufbewahrt.

### **II.2.15 Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungssonden**

Das Prinzip der Markierung doppelsträngiger DNS nach FEINBERG und VOGELSTEIN (1983) basiert auf Neusynthese der komplementären Stränge eines DNS-Templates. Die Synthese wird von zufälligen Hexamer-Oligonukleotiden als Primer gestartet und findet in Gegenwart eines radioaktiv markierten Nukleotids statt. Diese Reaktion wurde mit Hilfe des „Rediprime II Random Prime Labelling Systems“ der Firma Amersham (Braunschweig) durchgeführt. Dabei wurden 2,5 bis 25ng DNS in 45µl TE-Puffer gelöst, 5min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die Probe wurde mit einem Reaktionsmix aus entsprechendem Reaktionspuffer, sowie den darin enthaltenen Hexanukleotiden als unspezifischen Primermolekülen (0,2µg/µl), den Desoxynukleotiden dATP, dGTP und dTTP mit einer Endkonzentration von je 50 µM und der Klenow-Polymerase gemischt. Zur Radioaktivmarkierung wurden 3-5 µl  $\alpha(^{32}\text{P})\text{dCTP}$  eingesetzt und die Reaktion 10min bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung der markierten Fragmente erfolgte über eine Gelfiltrationssäule (S-200 HR MicroSpin® column) nach Herstellerangaben (Pharmacia, Freiburg). Die freie Radioaktivität wurde dabei zurückgehalten, während sich die markierte DNS im Durchlauf befand. Die spezifische Aktivität des Eluates wurde in einem Flüssig-Szintillationszähler kontrolliert und  $1\text{-}2 \times 10^6$  cpm/ml Hybridisierungspuffer dem zu hybridisierenden Blot (II.2.19.2) zugesetzt.

## II.2.16 Isolierung von Gesamt-RNS

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit gegenüber alkalischer Hydrolyse muss mit RNS deutlich vorsichtiger umgegangen werden als mit DNS. Sämtliche Versuche wurden mit Handschuhen und größter Sorgfalt durchgeführt, und es wurden ausschließlich sterilisierte Glaswaren und autoklavierte Lösungen verwendet. Wässrige Lösungen wurden vor dem Autoklavieren mit dem RNase-Inhibitor DEPC (Diethylpyrocarbonat) vorbehandelt.

DEPC-H<sub>2</sub>O: 0,1 % DEPC in bidest. Wasser

ü.N. inkubiert, anschließend autoklaviert

Die Isolierung von Gesamt-RNS erfolgte zum einen aus verschiedenen Maus-Geweben und Zelllinien nach dem TRIZOL<sup>®</sup>-Protokoll (Gibco BRL, Karlsruhe) und zum anderen aus unterschiedlichem *Drosophila* Material mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen (Hilden).

### II.2.16.1 RNS-Isolierung aus Gewebe nach TRIZOL<sup>®</sup>

Diese Technik basiert auf der Isolation von RNS nach CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987) unter Verwendung des TRIZOL<sup>®</sup> Reagenz. Dabei handelt es sich um eine monophasische Lösung aus Phenol und Isothiocyanat, einem stark denaturierenden Salz, wodurch bei gleichzeitiger Disruption von Zellen und Auflösung der Zellkomponenten die RNS stabilisiert wird. Die Organe wurden aus den Versuchstieren präpariert, zerteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit Hilfe eines Ultraturrax Micra D-8 (Art-Labortechnik, Müllheim) wurden die Gewebe zerkleinert, nach Zugabe von 1ml TRIZOL<sup>®</sup>-Lösung pro 50mg Material homogenisiert und für 5min bei RT inkubiert. Nach Zusatz von 0,2ml Chloroform pro ml TRIZOL<sup>®</sup> wurde die Probe kräftig geschüttelt und für weitere 2-3min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Emulsion zur Trennung der Phasen zentrifugiert (15min/12.000UpM/4°C) und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Fällung der RNS wurden 0,5ml Isopropanol pro ml TRIZOL<sup>®</sup> zugegeben, der Ansatz für 10min bei RT inkubiert und schließlich die RNS pelletiert (10min/12.000UpM/4°C). Das Pellet wurde mit 1ml 75% (v/v) EtOH gewaschen, sorgfältig gemischt und anschließend zentrifugiert (5min/7500UpM/4°C). Abschließend wurde das RNS-Pellet an der Luft getrocknet und in 30-70µl DEPC-behandeltem sterilem bidest. Wasser resuspendiert. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die isolierte RNS bei -80°C gelagert.

Bei der Verwendung von Zellen wurde 1ml TRIZOL<sup>®</sup>-Lösung pro 10cm<sup>2</sup> Kulturfläche eingesetzt und der Versuchsablauf analog der RNS-Isolierung aus Gewebe durchgeführt.

#### **II.2.16.2 RNS-Isolierung aus *Drosophila* nach Qiagen**

Das Ausgangsmaterial waren *Drosophila melanogaster*-Embryonen, -Larven, -Puppen und -Fliegen, die aus der Laborhaltung der Abteilung für Molekulare Entwicklungsbiologie am Institut für Molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie der Universität Bonn von Dr. R. Bauer freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Bei der RNS-Präparation wurde das „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) verwendet und nach den Angabe des Herstellers gearbeitet. Die gewonnene RNS wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

#### **II.2.17 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNS**

Um eine Aussage über die Reinheit und Ausbeute der RNS-Präparationen zu erhalten, wurde die RNS-Probe mit einer entsprechenden Verdünnung mittels UV-Licht im Spektralphotometer gegen ihr Lösungsmittel gemessen. Die photometrische Messung zur Bestimmung der RNS-Konzentration erfolgte durch Messen der Extinktion der zu untersuchenden Probe bei 260nm (SAMBROOK *et al.*, 1989). Darüber hinaus wurde die photometrische

Messung ebenfalls zur Überprüfung des Reinheitsgrades der jeweiligen Probe verwendet. Dieser läßt sich durch die Bildung des Quotienten aus der Extinktion bei 260nm und 280nm ermitteln (MÜLLER *et al.*, 1993). Liegt dieser Wert bei 2,0 kann von einer sauberen RNS-Präparation ausgegangen werden.

## **II.2.18 Agarosegelelektrophorese von RNS**

### **II.2.18.1 Analytische Agarosegelelektrophorese**

Die Ermittlung der RNS-Quantität und -Qualität im Agarosegel erfolgte analog der analytische Agarosegelelektrophorese von DNS (II.2.7.1). Zur Auftrennung der RNS-Fragmente wurden 1,0% (w/v) Agarosegele in einem TAE-Puffersystem verwendet.

### **II.2.18.2 Präparative Agarosegelelektrophorese**

Zum anschließenden Transfer von RNS-Fragmenten aus dem Gel auf eine Nylonmembran (II.2.19) wurde die präparative Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen angewendet. Hierbei wurden 1,0% (w/v) Agarose/Formaldehydgele in einem 1x MOPS-Puffersystem verwendet. Die RNS wurde mit 1/5 Volumen Ethidiumbromid-haltigem Auftragspuffer (Probenpuffer) vermischt, 10min bei 70°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf ein horizontales Gel mit 6% Formaldehyd aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 3-4 V/cm in 1x MOPS-Puffersystem durchgeführt. Unter UV-Beleuchtung konnten die Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden und das Gel wurde mit einem Lineal fotografiert. Nach Beenden der elektrophoretischen Auftrennung wurden die RNS-Fragmente mit Hilfe eines "Kapillar"-Blots auf eine Membran transferiert (II.2.19).

| <u>10x MOPS (pH 7,0)</u>           |      | <u>5x Probenpuffer</u>   |       |
|------------------------------------|------|--------------------------|-------|
| EDTA                               | 10mM | Bromphenol-Blau          | 8µl   |
| MOPS                               | 0,4M | 0,1M EDTA (pH 7,5)       | 1,5µl |
| Natriumacetat                      | 0,1M | Ethidiumbromid [10mg/ml] | 3,5µl |
|                                    |      | Formaldehyd (37%)        | 45µl  |
| verdünnt mit DEPC H <sub>2</sub> O |      | Formamid                 | 45µl  |
|                                    |      | 10x MOPS                 | 5µl   |

## II.2.19 Northern Blot-Analyse und Hybridisierung

### II.2.19.1 Northern Blot

Northern Blots dienen dem Nachweis einzelner RNSs mittels spezifischer Sonden. Dazu wird die RNS in einem Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der Sonde hybridisiert.

Die zu analysierende RNS (5 bis 30µg Gesamt RNS) wurde zunächst in einem 1,0% (w/v) denaturierenden Agarosegel (II.2.18.2) aufgetrennt und mit Hilfe eines alkalischen „downward“-Kapillarsystem (CHOMCZYNSKI, 1992) auf eine Hybond-XL-Nylonmembran (Amersham, Mannheim) transferiert. Dabei wurde der Aufbau zum Transfer analog der Abbildung (Abb.) 3 durchgeführt.

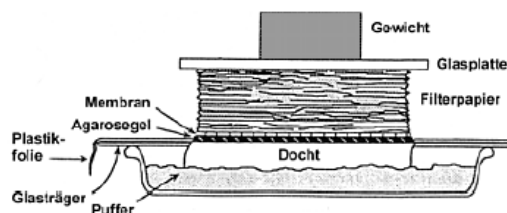


**Abb.3: Schematischer Aufbau der Transferanordnung für einen Northern Blot durch Kapillartransfer**

Nach ü.N.-Transfer in 10x SSC bei RT wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen und an der Luft getrocknet. Mit Hilfe des UV-Crosslinker CL-1 (Herolab, Wiesloch) wurde die RNS durch UV-Crosslinking (140mJoule) irreversibel an die Matrix gebunden.

20x SSC (pH 7,0)

|                   |      |
|-------------------|------|
| NaCl              | 3M   |
| tri-Natriumcitrat | 0,3M |

zur Einstellung des pH-Wertes  
wurde Eisessig verwendet

#### **II.2.19.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden**

Sowohl eigens hergestellte, als auch käuflich erworbene Northern Blots der Firma Clontech (Heidelberg) wurden unter Verwendung der „ExpressHyp™ Hybridization Solution“ der Firma Clontech (Heidelberg) hybridisiert. Pro Membran wurden 5ml vorgewärmte Hybridisierungs-Lösung zugesetzt. Die Prähybridisierung erfolgte 30-60min bei 68°C. Vor Zugabe der radioaktiv-markierten ds-DNS-Hybridisierungssonde (II.2.15) wurde diese zuvor zur Denaturierung 5min bei 95°C erhitzt. Zur Hybridisierung wurde die Prähybridisierungs- durch die Hybridisierungs-Lösung einschließlich der spezifisch, markierten DNS-Sonde ausgetauscht, wobei pro Membran ebenfalls 5ml Lösung verwendet wurden. Zum Entfernen nicht-hybridisierter Proben wurde die Membran mehrfach in Waschpuffer I geschwenkt und dann 2x 20min bei RT unter mehrmaligem Wechsel der Lösung gewaschen. Anschließend wurde mit höherer Stringenz 2x 40min bei 50°C mit Waschpuffer II gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt. Die anschließende Dokumentation erfolgte durch Autoradiographie. Bei der Detektion erfolgte die Belichtung in Abhängigkeit

von der Signalstärke mit einem Kodak X-Omat AR5 Film in einer Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie für 10min bis mehrere Tage bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Abschließend wurden die Röntgenfilme mit Hilfe des Kodak-Entwickler-Fixierer-System X-omat 100 1 entwickelt.

| <u>Waschpuffer I</u> |       | <u>Waschpuffer II</u> |      |
|----------------------|-------|-----------------------|------|
| SDS                  | 0,05% | SDS                   | 0,1% |
| SSC                  | 2x    | SSC                   | 0,1x |

### **II.2.20 Entfernung radioaktiver Hybridisierungsproben mit SDS**

Zum „Strippen“ von Nylonmembranen wurde die Membran in 2x SSC äquilibriert, dann 10min in  $90-100^{\circ}\text{C}$  heissem 0,5% (w/v) SDS geschwenkt und weitere 10min in der sich abkühlenden Lösung belassen. Anschließend wurde die Membran luftgetrocknet, eingeschweisst und bis auf weiteres bei  $4-8^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Kontrolle wurde ü.N. ein Röntgenfilm exponiert.

### **II.2.21 cDNS Synthese durch reverse Transkriptase Reaktion**

Zum Nachweis geringer Transkriptmengen wurde die Methode der reversen Transkription von mRNA mit anschließender spezifischer PCR-Amplifikation der hergestellten cDNS (copy DNS) angewandt (FOLEY *et al.*, 1993). Dabei wurde die „Super Script<sup>TM</sup> II RNase H- Reverse Transcriptase“ aus M-MLV („moloney murine leukemia virus“) der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Hierbei wurde eine RNS-Menge von 1ng bis 5µg mit 1µl Oligo (dT)<sub>12-18</sub> [500µg/ml] und 1µl 10 mM dNTP Lösung in einem Gesamtvolumen von 12µl 5min bei  $65^{\circ}\text{C}$  erhitzt und danach direkt auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 2µl 0,1 M DTT Lösung, 40 Einheiten des „RNaseOUT recombinant ribonuclease Inhibitors“ und dem empfohlenen cDNS-

Synthesepuffers wurden die Komponenten vorsichtig gemischt und 2min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden 200 Einheiten der „Super Script™II RNase H-Reverse Transcriptase“ dazugegeben und weitere 50min bei 42°C inkubiert. Durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C wurde die Transkriptase inaktiviert und um die verbleibenden RNS-Moleküle zu entfernen, wurden 2 Einheiten RNase H hinzugefügt und der gesamte Ansatz 20min bei 37°C inkubiert. Die anschließende PCR-Reaktion wurde mit 2µl der hergestellten cDNS und wie unter II.2.9 beschrieben durchgeführt.

## **II.3 Proteinchemische Methoden**

### **II.3.1 Gesamt-Proteinisolierung aus Zellen**

Um die Expression der verschiedenen Proteine in der PAGE (II.3.4) und im Western Blot (II.3.5) überprüfen zu können, mußten diese zuerst aus den transient oder stabil transfizierten Zellen isoliert werden. Dazu wurden die Zellen im 80% konfluenten Zustand unter Zugabe von 1x „phosphate-buffered saline“ (Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS) mit einem Zellschaber aus einer T-75 Gewebekulturflasche abgelöst. Nach vollständiger Ablösung des Zellmaterials wurden diese Extrakte sedimentiert (3min/3000Upm/4°C), der Überstand verworfen, das Zellpellet in einem angemessenen Volumen eines Proteaseinhibitionsbuffer RIPA resuspendiert und auf Eis gegeben. Die Zellsuspension wurde unter kräftigem Schütteln (14.000Upm) 30min bei 4°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (15min/13.000Upm/4°C) der aufgebrochenen Zellen und Aliquotierung der Überstände konnten die Proteinextrakte bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

| <u>1x PBS (pH 7,4)</u>           |       | <u>Proteaseinhibitionsbuffer RIPA</u> |       |
|----------------------------------|-------|---------------------------------------|-------|
| KCl                              | 2,7mM | NaCl                                  | 150mM |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2mM   | Na-Desoxycholat                       | 0,5%  |
| NaCl                             | 137mM | NP-40                                 | 1%    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 8mM   | SDS                                   | 0,1%  |
|                                  |       | Tris/HCl (pH 7,5)                     | 50mM  |

nach der Herstellung wurde 1Tbl  
Complete dazugegeben

### II.3.2 Fraktionierte Proteinisolierung aus Zellen

Während das Ziel der Gesamt-Proteinextraktion es ist, alle vorhandenen Proteine quantitativ zu extrahieren, werden bei der fraktionierten Extraktion die Proteine aus den Zellkompartimenten Kern und Cytoplasma extrahiert. Dabei werden zwei verschiedene Homogenisationspuffer verwendet, die sich in der Salzkonzentration unterscheiden. Die 80% konfluent gewachsenen Zellen wurden durch Abschaben mit 2x 1ml eiskaltem TBS-Puffer aus einer T-75 Gewebekulturflasche gelöst, zentrifugiert (30s/7000Upm/4°C) und das Pellet in 800µl Homogenisierungspuffer I resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 15min bei 4°C inkubiert und nach Zugabe von 60µl 10% NonidetP40-Lösung zentrifugiert (5min/13.000Upm/4°C). Der Überstand wurde aliquotiert und stellte den cytoplasmatischen Proteinextrakt dar. Das Pellet wurde mit 100µl Homogenisierungspuffer II resuspendiert und nach erneuter 15-minütiger Inkubation bei 4°C wurde die Suspension, wie oben beschrieben, sedimentiert (5min/13.000Upm/4°C). Dieser Überstand kennzeichnet den Kernextrakt. Beide Überstände wurden bis zur Verwendung bei -70°C gelagert werden.

| <u>TBS-Puffer (pH 7,4)</u> |       |
|----------------------------|-------|
| KCl                        | 5mM   |
| NaCl                       | 130mM |
| Tris/HCl                   | 25mM  |

| <u>Homogenisierungspuffer I</u> |       | <u>Homogenisierungspuffer II</u> |       |
|---------------------------------|-------|----------------------------------|-------|
| DTT                             | 1mM   | DTT                              | 1mM   |
| EDTA (pH 7,5)                   | 0,1mM | EDTA (pH 7,5)                    | 1mM   |
| EGTA (pH 7,5)                   | 0,1mM | EGTA (pH 7,5)                    | 1mM   |
| HEPES (pH 7,9)                  | 10mM  | HEPES (pH 7,9)                   | 20mM  |
| KCl                             | 10mM  | NaCl                             | 400mM |
| PMSF                            | 1mM   | PMSF                             | 1mM   |

### II.3.3 Protein-Fällung

Die Fällung von Proteinen wurde zur Konzentrierung der Proteine eingesetzt. Dabei wurden sowohl die native Fällung mit Methanol/Chloroform, als auch die denaturierende Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Soll die biologische Aktivität des Proteins erhalten bleiben, so verwendet man die Fällung mit organischen Lösungsmitteln. Dabei werden vier Volumen Methanol, ein Volumen Chloroform und drei Volumen bidestilliertes Wasser nacheinander und unter kräftigem Mischen zu einem Volumen Proteinlösung zugegeben. Nach Zentrifugation (1min/13.000Upm/4°C) wird die obere Schicht vorsichtig abgenommen und drei Volumen Methanol auf das gefällte Protein gegeben, erneut gevortext und wie oben beschrieben zentrifugiert. Methanolreste werden vom Proteinpellet entfernt, das Pellet getrocknet, in der entsprechenden Menge 4x SDS-PAA-Gelelektrophorese-Probenpuffer (Roth, Karlsruhe) resuspendiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Bei der Säurefällung wurde ein Volumen 20% TCA mit einem Volumen Proteinlösung 30min auf Eis gemischt und danach abzentrifugiert (15min/13.000Upm/4°C). Die Trichloressigsäurereste im Pellet wurden durch mehrmaliges Waschen mit eiskaltem 80% Aceton (5min/13.000Upm/4°C) entfernt. Das Proteinpellet wurde getrocknet, in der entsprechenden Menge 4x SDS-PAA-Gelelektrophorese-Probenpuffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### **II.3.4 Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese von Proteinen**

#### **II.3.4.1 Denaturierende SDS-PAA Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAA-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) durchgeführt. Die Proteine wurden zunächst mit einem 0,25fachem Volumenanteil eines 4x SDS-PAA-Gelelektrophorese-Probenpuffer versetzt, 5min bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Unter Verwendung der „SE250/SE260 mighty small II“-Gelapparatur (Hoefer, San Francisco (USA)) wurden die Proteinextrakte je nach Größe des zu erwartenden Proteins in einem 6 bis 10% SDS-PAA-Gel pherographiert. Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden entweder auf eine Nylonmembran (PVDF-Membran) transferiert und in immunologischen Nachweisreaktionen spezifisch detektiert oder durch die unspezifische Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (WILSON, 1983) nach Herstellerangaben (Serva, Heidelberg) visualisiert. Nach unspezifischer Anfärbung konnte die Membran mit Hilfe der Entfärbelösung entfärbt werden und zur Immundetektion verwendet werden.

| <u>Elektrophoresepuffer</u> |            | <u>Sammelgel</u>        |        |
|-----------------------------|------------|-------------------------|--------|
| Glyzin                      | 960mM      | steriles bidest. Wasser | 3,4ml  |
| SDS                         | 0,5% (w/v) | 30% Acrylamidlösung +   |        |
| TRIS base                   | 125mM      | 0,8% Bisacrylamid       | 0,83ml |
|                             |            | 1M Tris (pH 6,8)        | 0,63ml |
|                             |            | 10% SDS                 | 50µl   |
|                             |            | 10% APS                 | 50µl   |
|                             |            | TEMED                   | 5µl    |

| <u>Trenngel (6%)</u>    |       | <u>Trenngel (10%)</u>   |       |
|-------------------------|-------|-------------------------|-------|
| steriles bidest. Wasser | 5,3ml | steriles bidest. Wasser | 4,0ml |
| 30% Acrylamidlösung +   |       | 30% Acrylamidlösung +   |       |
| 0,8% Bisacrylamid       | 2,0ml | 0,8% Bisacrylamid       | 3,3ml |
| 1M Tris (pH 8,8)        | 2,5ml | 1M Tris (pH 8,8)        | 2,5ml |
| 10% SDS                 | 100µl | 10% SDS                 | 100µl |
| 10% APS                 | 100µl | 10% APS                 | 100µl |
| TEMED                   | 8µl   | TEMED                   | 4µl   |

| <u>Färbelösung</u>           |       | <u>Entfärbelösung</u> |       |
|------------------------------|-------|-----------------------|-------|
| bidest. Wasser               | 45ml  | bidest. Wasser        | 225ml |
| Coomassie BrilliantBlue R250 | 0,25g | Eisessig              | 50ml  |
| Eisessig                     | 10ml  | Methanol              | 225ml |
| Methanol                     | 45ml  |                       |       |

Lösung durch Whatman No.1 Filter  
filtriert

### II.3.5 Western Blot-Analyse

Nach der Auftrennung der Proteine in der denaturierenden SDS-PAA-Gelelektrophorese (II.3.4.1) wurden die Proteinbanden im „Semidryblot“ Verfahren auf eine Nylonmembran (PVDF-Membran) übertragen (Fastblot B33 / B34-Kammer; Biometra, Göttingen). Die Detektion der rekombinanten Proteine verlief über den Einsatz verschiedener primärer und sekundärer Enzym-konjugierter Detektionsantikörper. Der Nachweis der konjugierten „horse raddish peroxidase“ (HRP) erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenz-Substratlösungen (Amersham, Mannheim), wobei infolge der variablen Signalstärken unterschiedliche Inkubationszeiten verwendet wurden. Bei allen Ansätzen wurde zur Blockierung der freien Bindungsstellen die Membran mit 5% (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS-Puffer + 0,1% Tween20 eine Stunde (h) bei RT inkubiert. Desweiteren wurde jeweils vor und nach Zugabe der Antikörperlösungen die Membran 3x 5min mit 1x PBS-Puffer + 0,1% Tween20 bei RT gewaschen.

#### II.3.5.1 Nachweis des Mehmet-Proteins

Die Immunfärbung des Mehmet-Proteins begann mit der wie oben beschriebenen Blockierungsreaktion und verlief anschließend nach folgendem Schema:

##### Detektion I

Mit Hilfe eines monoklonalen HA.11-Maus Serum (Babco, Richmond (USA)), welches in Blockierungslösung 1:1000 verdünnt wurde, wurden die aufgetrennten und auf eine Membran übertragenen Mehmet-Proteinbanden über den Epitop-tagHA ü.N. bei 4°C gebunden.

##### Detektion II

Gebundene Maus-anti-HA.11 Antikörper wurden durch Zugabe eines 1:1000 in Blockierungslösung verdünnten Peroxidase (HRP)-markiertem Ziege-anti-Maus-Serums (DAKO, Hamburg) 60min bei RT detektiert.

### Substratreaktion

Die beiden Substratlösungen DetectionSolution I und DetectionSolution II (Amersham, Mannheim) wurden 1:1 gemischt und 1min bei RT auf der Membran inkubiert. Die Belichtung erfolgte in Abhängigkeit der Signalstärke mit einem Kodak X-Omat AR5 Film bei RT in einer Expositionskassette. Abschließend wurden die Röntgenfilme mit Hilfe des Kodak-Entwickler-Fixierer-System X-omat 100 1 entwickelt.

### II.3.5.2 Nachweis des AP-2 $\alpha$ Proteins

Zur Detektion des AP-2 $\alpha$  Proteins wurden zwei unterschiedliche primäre Antikörper eingesetzt. Die Blockierung der Membran erfolgte analog der Immunfärbung des Mehmet-Proteins.

#### Detektion I

Die Bindung des primären Antikörpers über die Peptidsequenz GLDPRRDYRRHEDLL (AS120-134 von hAP-2 Protein) erfolgte anhand eines polyklonalen AP-2-Kaninchen Serums (Geneka, Rixensart (Belgien)), das 1:1000 in Blockierungslösung verdünnt und 120min bei 37°C inkubiert wurde. Unter Einsatz eines polyklonalen anti-AP-2 $\alpha$  Antikörper aus Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology, California (USA)) wurde der Carboxyterminus im AP-2 $\alpha$  Protein gebunden. Dieser Antikörper wurde 1:200 in Blockierungslösung verdünnt und 60min bei RT inkubiert.

#### Detektion II

Gebundene Kaninchen-anti-AP-2- oder Kaninchen-anti- AP-2 $\alpha$  Antikörper wurden durch Zugabe eines Peroxidase (HRP)-markiertem Ziege-anti-Kaninchen-Serum (DAKO, Hamburg), welches 1:1000 in Blockierungslösung verdünnt und 60min bei RT inkubiert wurde, detektiert.

### Substratreaktion

Die Substratreaktion erfolgte entsprechend der Reaktion wie unter II.3.5.1 beschrieben.

### II.3.5.3 Nachweis des $\beta$ -Aktin Proteins

Die Kontrolle eines sogenannten Haushalts-Gens wurde verwendet, um die Ladeverhältnisse der einzelnen Proteine-Extrakte in der SDS-PAGE aufzuzeigen

#### Detektion I

Mit Hilfe eines monoklonalen anti  $\beta$ -Aktin-Maus Serums (Sigma, München) wurden die Proteinbanden von  $\beta$ -Aktin über ein N-terminales Peptid gebunden. Das Serum wurde 1:1000 in Blockierungslösung eingesetzt und 1h bei RT inkubiert.

#### Detektion II + Substratreaktion

Sowohl der Nachweis des primären Antikörpers, als auch die Substratreaktion erfolgten entsprechend der Vorgehensweise wie unter II.3.5.1 und II.3.5.2 aufgeführt.

### II.3.5.4 Nachweis des VP16 Proteins

Um das Vorhandensein des „tetracycline-responsive transcriptional activator“, einem Fusionsprotein aus VP-16 und dem Tetracycline abhängigem Transaktivator (tTA), im Tet-Off™ Zellsystem zu überprüfen, wurde die Immundetektion wie folgt durchgeführt:

#### Detektion I

Die Bindung des primären Antikörpers an die Sequenz des „tetracycline-responsive transcriptional activator“ erfolgte anhand eines polyklonalen VP16-Kanninchen Serums (BD Clontech, Heidelberg), das 1:200 in Blockierungslösung verdünnt und 120min bei 37°C inkubiert wurde.

#### Detektion II + Substratreaktion

Der Nachweis des polyklonalen VP16-Kanninchen Serums und die Detektion des sekundären Antikörpers wurden wie der Nachweis des AP-2 $\alpha$  Proteins durchgeführt.

### II.3.6 Entfernung von gebundenen Antikörpern

Um eine Membran von primären und sekundären gebundenen Antikörpern zu befreien, wurde die Membran in Stripping-Puffer für 30min bei 60°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2x 10min in 1x PBS-Puffer + 0,1% Tween20 bei RT gewaschen und entweder bis auf Weiteres bei 4-8°C gelagert oder die Immunfärbung wie unter II.3.5.1-4 beschrieben gestartet.

| <u>Stripping-Puffer</u> |        |
|-------------------------|--------|
| 2-Mercaptoethanol       | 100mM  |
| SDS                     | 2%     |
| Tris/HCl (pH 6,7)       | 62,5mM |

## II.4 Methoden im Umgang mit murinen und humanen Zellen

Alle Arbeitsschritte mit der Zellkultur wurden ausschließlich mit sterilen Materialien und in einer Sterilbank BSB 4 A (Gelaire Flow Laboratories, Opera (Italien)) mit laminalem Luftzug ausgeführt. Dabei wurden die Zellkulturen als Einschichtkulturen, sogenannte Zell-Monolayer in Plastik-Zellkulturflaschen, -Zellkulturschalen oder -Zellkulturplatten in Brutschränken bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> gehalten.

### II.4.1 Zellkultur

Sowohl die Erhaltung der Kultur von HeLa Zellen, als auch die der MEF Tet-Off™ Zellen erfolgte als Einschichtkultur in T-25- bzw. T-75-Zellkulturflaschen bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub>. Eine optimale Zellproliferation wurde mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) w/o

NaPyruvat + 4500mg/l Glucose + Pyridoxin HCl erzielt, die folgende Komponenten enthielt:

HeLa Zellen: +10% fötales Kälberserum (FKS)  
+ 1% Penicillin / Streptomycin

MEF Tet-Off™ Zellen: +10% FKS  
+50µg/ml Geneticin (G418)

nicht-induzierter MEF Tet-Off™ Klon: +10% FKS  
+50µg/ml G418  
+100µg/ml Hygromycin  
+1µg/ml Doxycyclin

induzierter MEF Tet-Off™ Klon: +10% FKS  
+50µg/ml G418  
+100µg/ml Hygromycin

Befanden sich die Zellen in einem subkonfluenten Zustand (80-90% Konfluenz), wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 1x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) ohne  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  (Gibco BRL, Karlsruhe) gewaschen, dann mit Hilfe von Trypsin/EDTA in PBS 0,25%/1mM von Gibco (Karlsruhe) 5min bei 37°C abgelöst und in einem hinreichenden Verhältnis in frisches, temperiertes Kulturmedium gemäß der Größe der Zellkulturflasche passagiert. Dabei sollte die Aussaat der passagierten Zellen entsprechend der empfohlenen Zelldichte erfolgen.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen galt, dass alle 2 bis maximal 3 Tage das Kulturmedium erneuert und die Zellen passagiert wurden. Wies jedoch der Farbindikator (Phenolrot) des Kulturmediums Verfärbungen auf, so wurde das Medium öfters gewechselt bzw. die Kultur passagiert.

#### **II.4.1.1 Herstellung und Verwendung von kryokonservierten Zellen**

Die Herstellung von kryokonservierten Zellpassagen erfolgte mit Hilfe eines Kryomedium (90%FKS+10%DMSO). Dabei wurden die trypsinisierten Zellen in 1ml Kryomedium aufgenommen, gemischt, in Kryoröhrchen überführt und schrittweise (30min bei 4°C, ü.N. bei -20°C, 24Stunden bei -80°C, abschließend bei -196°C) eingefroren.

Das Auftauen der Zellen erfolgte rasch im Wasserbad bei 37°C. Nach dem Auftauen wurden die Zellen direkt zum Medium in die Kulturflasche gegeben, unter entsprechenden Bedingungen (37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert und nach 24Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt.

#### **II.4.1.2 Zellzahlbestimmung**

Das Zählen von Zellen erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Dabei wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin/EDTA Lösung behandelt, zum Auszählen in einem entsprechend Volumen Kulturmedium aufgenommen und ein Aliquot in die Zählkammer pipettiert. Vier große Eckquadrate der Neubauer-Kammer wurden ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Die ermittelte Zellzahl wurde mit 10<sup>4</sup> multipliziert und ergab eine Zellzahlwert pro ml.

#### **II.4.2 Transfektion**

Die Transfektion gereinigter Plasmid-DNS in Fibroblasten der Maus bzw. HeLa Zellen erfolgte entweder mit Hilfe eines liposomalen Transfektionsreagenz DOTAP (Roche, Mannheim) oder unter Verwendung der Kalziumphosphat Methode (CHEN und OKAYAMA, 1987) auf 10cmØ Platten bzw. „chamber slides“ (Nunc, Wiesbaden). DOTAP ist eine Liposomen-Präparation aus dem kationischen Lipid N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat, das

Nukleinsäuren komplexieren kann. Die Fusion dieses Komplexes mit Zellen führt zur Aufnahme und Expression der DNS. Die zur Transfektion eingesetzten Empfängerzellen ergaben zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50% bei stabiler Transfektion bzw. 80% bei transienter Transfektion. Beide Transfektionsarten wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt

Bei der Kalziumphosphat Kopräzipitation sind die beiden entscheidenden Komponenten Kalzium- und Phosphationen. Bei dieser Technik wird die DNS mit einer Kalziumchloridlösung gemischt, durch Zugabe einer Lösung, die Phosphat enthält, fällt Kalziumphosphat als Präzipitat aus und die DNS, die auch Phosphatgruppen hat, wird komplexiert und mit dem Kalziumphosphat in die Zellen aufgenommen. Dabei wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro 10cmØ Schale bzw. 300.000 Zellen pro „chamber slide“ (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und ü.N. bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. 1 bis 2 Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz entsprechend folgendem Protokoll durchgeführt:

|                        |            |
|------------------------|------------|
| DNS                    | 4µg / 6µg* |
| bidest. Wasser         | ad 32µl    |
| 1,5M CaCl <sub>2</sub> | 32µl       |
| 2x BES                 | 65µl       |

\* bei Kotransfektion Expressionsplasmid  
zu Selektionsplasmid im Verhältnis 3:1

Die Mengenangaben gelten für die Verwendung einer 10cmØ Schale bzw. eines „chamber slides“ (Nunc, Wiesbaden).

Die Komponenten wurden in der Reihenfolge wie oben aufgeführt pipettiert, wobei 2x BES langsam unter leichtem Schütteln zugetropft wurde. Das Präzipitat wurde 15min bei RT inkubiert, kurz durch auf- und abpipettieren gemischt und anschließend auf die Zellen gleichmässig verteilt. Die Zellen wurden ü.N. bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und am nächsten Tag erfolgte entsprechend der gewünschten Transfektionsart der Medienwechsel.

2x N-N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethane-  
sulfonic acid (BES) (pH 7,0)

|                                        |           |
|----------------------------------------|-----------|
| 50mM 2x BES                            | 1,07g     |
| 280mM NaCl                             | 1,6g      |
| 1,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,021g    |
| bidest. Wasser                         | add 100ml |

sterilfiltriert

### II.4.3 Immunfluoreszenzen von transfizierten Zellen

Die Zelllinien wurden mit der indirekten Immunfluoreszenz mittels monoklonalen Antikörper gegen AP-2α bzw. Etop-tagHA auf Expression, Lokalisation bzw. Koloalokalisation der Proteine Ap-2α und Mehmet getestet. Die Visualisierung erfolgte mit einem zweiten Antikörper gegen Maus-IgG bzw. Kanninchen-IgG, die mit verschiedenen Fluorochromen konjugiert waren. Dabei ist das optische System so eingerichtet, dass das Anregungs- und Emissionslicht der beiden Fluorochrome gut voneinander getrennt sind. Bei Stimulation des grünen Fluorochrom z.B. durch optische Absorption bei 490nm erfolgte dann eine Emission von heller, photostabiler Fluoreszenz mit einem Maximum bei 520nm. Nach der Subkultivierung der Zellen in

„chamber slides“ (Nunc, Wiesbaden) und Blockieren mit 1x PBS+2% BSA, wurden die Zellen 10min bei RT in 4%Formaldehydlösung inkubiert. Dann wurden die Zellen 3x 5min in 1x PBS gewaschen und die Fixierung mit 1%TritonX-100 Lösung 15min bei RT beendet. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit der anti-HA.11 bzw. anti-AP-2 Antikörper-Lösung in einer Verdünnung von 1:1000 in 1x PBS+2% BSA 60min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Wegwaschen der Lösung wurde die Immunreaktion mit „green-fluorescent Alexa Fluor 488“ bzw. „red-fluorescent Alexa Fluor 594“-konjugiertem Sekundärantikörper der Firma Molecular Probes (Leiden, Niederlande) in einer Verdünnung von 1:400 in 1x PBS+2% BSA detektiert. Dabei wurde das Serum 60min bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Abschließend wurden die Präparate erneut gewaschen und mit „Fluorescent mounting medium“ (Dako, Hamburg) eingedeckelt. Zur Analyse und Dokumentation wurde ein DM LB2 Fluoreszenz-Photomikroskop der Firma Leica (Bensheim) mit einer JVC Digital-Kamera KYF70B (Leica, Bensheim) und einem optischen Auswertungssystem der Firma Hilgers (Königswinter) (Diskus ver 4.30.203#281 Fluoreszenz F70B) genutzt, in dem die Färbung als grüne oder rote Fluoreszenz sichtbar wurde. Die Lagerung der Schnitte erfolgte im Dunkeln bei 4°C

#### **II.4.4 Zell-Proliferation und Apoptose**

Sowohl die Quantifizierung der Zellproliferation, als auch die des Zelltodes wurden mit Hilfe von zwei verschiedenen Reagenzien der Firma Roche (Mannheim) basierend auf der Spaltung des Tetrazolium Salzes WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenase und zum anderen auf der Messung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität durchgeführt. Ergänzend zur Bestimmung der Apoptose wurde ausserdem eine Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS)-Analyse eingesetzt.

#### II.4.4.1 WST-1 Experimente

Bei Zell-Proliferation-Tests sind besonders Tetrazolium Salze wie z.B. WST-1 von Nutzen, da sie durch das „succinat-tetrazolium-reductase“ System zu Formazan gespalten werden können. Dieses System, das zu der Atmungskette der Mitochondrien gehört, ist nur in metabolisch intakten Zellen aktiv. Beim Vergleich der Zell-Proliferation verschiedener Zell-Klone wurden  $2 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  und  $2 \times 10^4$  Zellen pro well in 6-well Platten ausgesät und ü.N. bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden sowohl mit 10% FKS, als auch mit 0,5% FKS kultiviert. Vor Zugabe von 10% WST-1 Reagenz wurde das Medium gewechselt und die Zellen 30min bis 4Stunden bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Jeweils nach Inkubationsablauf wurden je 100µl Überstand in 96-well Platten überführt. Der Überstand wurde dann mit Hilfe eines Mikroplatten-Lesegerätes (Bio-Tek Instruments, Vermont (USA)) bei einer Wellenlänge von 450nm colorimetrisch erfasst.

#### II.4.4.2 LDH Experimente

Der Zelltod kann anhand der Schädigung der Plasmamembran gemessen werden, wobei die Abgabe der Laktat-Dehydrogenase vom Cytosol geschädigter Zellen in den Zellkultur-Überstand colorimetrisch bestimmt werden kann. Dazu wurden  $5 \times 10^3$  und  $10 \times 10^3$  Zellen unterschiedlicher Zell-Klone pro well in 6-well Platten ausgesät, ü.N. bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und schließlich das Kulturmedium durch neues Medium mit zwei verschiedenen FKS-Konzentrationen (10% und 0,5% FKS) ausgetauscht. Die Zellen wurden 1 bis 7Tage bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und jeweils nach Inkubationsende 100µl Überstand in 96-well Platten überführt. Zur Herstellung der Substratlösung wurden 250µl Katalysator zu 11,25ml Färbelösung hinzugegeben, 1:1 mit dem Überstand gemischt und 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Farbumschlag der Substratlösung im Mikroplatten-Lesegerätes (Bio-Tek

Instruments, Vermont (USA)) bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen.

#### II.4.5 FACS

Bei der Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS)-Analyse werden, ähnlich wie bei der Fluoreszenzmikroskopie, Antigene auf der Oberfläche oder innerhalb der Zellen mit fluoreszenz-markierten Antikörpern nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der FACS-Analyse der Prozess der Apoptose an unterschiedlichen Zelltypen verglichen. Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit und ohne 1µM Camptothecin-Lösung 5Stunden bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend mit Trypsin/EDTA Lösung behandelt und 2-3x mit 1x PBS gewaschen. Nach Zentrifugation (8min/1500Upm/RT) wurde das Pellet mit 1x Annexin-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert (8min/1500Upm/RT) und in 1x Annexin-Puffer mit einer 1:1000 Annexin V-PE Antikörper-Verdünnung aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen mit einer zweiten Antikörper-Lösung, 7-AAD, ebenfalls 1:1000 verdünnt, für weitere 5min im Dunkeln inkubiert, wie oben beschrieben zentrifugiert (8min/1500Upm/RT) und das Pellet in 1x Annexin-Puffer aufgenommen. Schließlich wurden die angefärbten Zellen in einem FACSDiVa Option – Scan Gerät (BD Clontech, Heidelberg), das vom Institut für molekulare Medizin und experimentelle Immunologie der Universität Bonn freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, analysiert.

##### 10x Annexin-Puffer

|                     |      |
|---------------------|------|
| CaCl <sub>2</sub>   | 25mM |
| HEPES/NaOH (pH 7,4) | 0,1M |
| NaCl                | 1,5M |

sterilfiltriert

### III Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Charakterisierung eines neuen Interaktionspartners des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  untersucht werden. AP-2 $\alpha$  gehört neben AP-2  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  zu einer Familie aus fünf konservierten sequenzspezifischen DNS-Bindeproteinen und wurde als 52kDa grosses Kernprotein aus HeLa Zellen isoliert (WILLIAMS *et al.*, 1988). Durch Expressionsanalysen von AP-2 $\alpha$  wurde dem Transkriptionsfaktor eine Funktion bei verschiedenen Differenzierungsprozessen während der Embryonalentwicklung zugewiesen. Wie jedoch AP-2 $\alpha$  seine vielfältige Funktion erfüllt, ist weitgehend noch nicht geklärt. Um eine Klärung diesbezüglich zu finden, sucht man nach interagierenden Proteinen. Protein-Protein Interaktionen kontrollieren zahlreiche biologische Prozesse. Im Fall von Proteinen mit unbekannter oder ungenügend bekannter Funktion, kann die Identifizierung solcher interagierender Proteine einen Einblick in die zelluläre Funktion bieten (YARDEN und BRODY, 2001). Um schließlich ein Protein, das mit einer bestimmten Domäne des Zielproteins interagiert, zu isolieren, kann ein Far-Western-Screen eingesetzt werden, eine Methode, die auf direkter Protein-Bindung beruht. (KAELIN *et al.*, 1992).

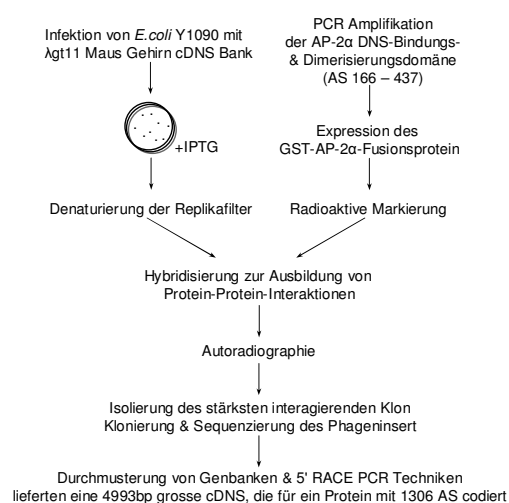


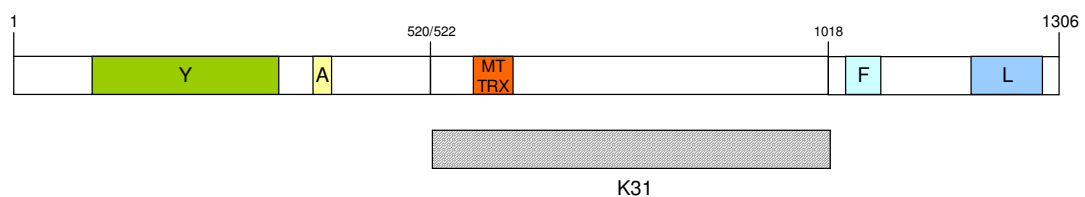
**Abb.4: Schematische Darstellung einer Variante der Far-Western-Technik und Isolierung von Mehmet**

Bei der Methode zur Analyse von Wechselwirkungen zwischen dem Transkriptionsfaktor AP-2 $\alpha$  und interagierenden Proteinen wurden *E.coli* Zellen des Stammes Y1090 mit einer Bakteriophagen Lambda gt11 Maus Gehirn cDNS Bank infiziert. Nach Induktion der Proteinexpression durch IPTG wurden die gebundenen Proteine mit 6M Guanidinium Hydrochlorid in HBBNP (20mM HEPES/HCl pH 7,8; 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT; 0,1% v/v NP-40) denaturiert. Die kodierende Sequenz der AP-2 $\alpha$  DNS-Bindungs- & Dimerisierungsdomäne (Aminosäuren (AS) 166-437) wurde mit Hilfe von PCR amplifiziert und in einen GST-Expressionsvektor pGEX2TK kloniert. Nach Zugabe des zu untersuchenden GST-Fusionsproteins, welches radioaktiv markiert wurde, bindet dieses an entsprechender Stelle auf dem Filter und kann nach erfolgter Reaktion mit seinem Interaktionspartner durch Autoradiographie lokalisiert werden. So ist es möglich, Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen.

Zur Identifizierung von mit AP-2 $\alpha$  interagierenden Proteinen erwies sich die Klonierung von *in vitro* interagierenden Proteinen durch die Far-Western-Screen Methode als erfolgreiche Strategie. Für diese biochemische *in vitro* Interaktion wurde als Zielprotein ein  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP markiertes rekombinant exprimiertes AP-2 $\alpha$  Protein, bestehend aus der DNS-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (AS 166-437), und fusioniert an Gluthation-S-Transferase verwendet. Diese Form des AP-2 $\alpha$  Proteins zeigt viele funktionelle Eigenschaften des Gesamtproteins, wie z.B. DNS-Bindung, Dimerisierung und Kernlokalisation (IMHOF, 1992). Mit diesem markierten Fusionsprotein wurde eine Maus Gehirn cDNS Bibliothek durchgemustert. Eines der identifizierten Klone stellte ein neues Protein als potentieller Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  dar. Die durch den Far-Western-Screen isolierte und identifizierte cDNS zeigte den am stärksten interagierenden Klon K31. Dieser Klon K31 stellt ein Protein dar, was sich über die AS 522 bis AS 1018 erstreckt und den zentralen Teil des Mehmet-Proteins beschreibt. Ausgehend von dieser Sequenz (AS 522-1018) wurde die Vollängen cDNS durch 5' RACE-PCR und erneuter Durchmusterung einer cDNS Bibliothek gewonnen. Dieses neue Protein wurde aufgrund von Homologien zu bekannten Proteinen (Protein containing **Me**CP-1 **h**omology region similar to DNA-**M**ethyltransferase and mammalian **T**rithorax proteins) Mehmet genannt.

### III.1 Strukturanalyse der Mehmet cDNS

Die Mehmet cDNS enthält in den ersten 300bp drei ATGs in den Positionen 26, 173 und 266 im Leserahmen, die mögliche Translationsstartpunkte darstellen. Nach Prüfung der umgebenden Sequenzen der ersten drei ATGs ergab sich, dass keines eine optimale Kozak-Sequenz (KOZAK, 1987) enthielt, wobei jedoch ATG<sup>26</sup> und ATG<sup>173</sup> die Erfordernisse einer „Minimal“-Kozaksequenz erfüllten. Bei der Annahme von ATG<sup>26</sup> als Translationsstartpunkt und dem identifizierten TAG Stop Codon an Position 3944 kodiert die Mehmet cDNS für ein Protein von 1306 AS mit einem erwarteten Molekulargewicht von etwa 144kDa. Das Protein lässt sich in drei Abschnitte mit jeweils charakteristischen Sequenzmerkmalen einteilen.



#### Abb.5: Schematische Domänenstruktur des Mehmet-Proteins

Die Mehmet cDNS kodiert bei der Annahme des Initiationscodon an Position 26 (ATG<sup>26</sup>) für ein Protein von 1306 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von etwa 144kDa.

Y: Yeast-Box; A: saure Domäne; MT/TRX: 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferase / *Drosophila* Trithorax Protein; F: F-Box Region, ein Rezeptor-Motiv für den Ubiquitin-Ligase-Komplex; L: Leucin-Repeats

K31: durch Far-Western-Screen isolierte und identifizierte cDNS, die ein Protein darstellt, das sich über die AS 522 bis AS 1018 erstreckt. Die Positionen 1, 520/522, 1018 und 1306 bezeichnen die Grenzen der drei Domänen und beziehen sich jeweils auf die Aminosäure-Positionen.

Der Amino-Terminus (AS 1-520) von Mehmet zeigt Homologien zu verschiedenen Hefe-Proteinen aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* auf, wodurch diese Region Y-Box (Yeast-Box, AS 98-331) benannt wurde. Darüberhinaus findet sich im Anschluss von AS 374-397 eine kurze saure Region (A).

Im zentralen Bereich (AS 522-1018) wurden Homologien zu 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferasen und zum *Drosophila* Trithorax Protein (AS 574-623) gefunden. Basierend auf den genannten Homologien erfolgte die Namensgebung für das Protein. Diese Zentraldomäne (K31) stellt den anfänglich durch den Far-Western-Screen gefundenen cDNS Anteil von 1488bp des Gesamtmoleküls dar. Die C-terminale Region (AS 1018-1306) zeigt zwei Homologie Regionen bestehend aus einer F-Box Region (AS 1038-1082) und einem Leucin-Repeat Motiv (AS 1195-1284).

Eine Existenz von *Drosophila melanogaster* gefundenem Mehmet-Homolog konnte mit dem Gen CG11033 bestätigt werden. Konform zur murinen Mehmet cDNS findet man mit der PCCX-2 cDNS eine sehr analoge humane Sequenz, die eine Deletion der etwa ersten 300bp im N-Terminus aufweist. Da in einem der nachfolgenden Kapitel noch detailliert auf die Homologien zwischen Maus-Mehmet und *Drosophila*-Mehmet eingegangen wird, soll hier der Vergleich zwischen dem humanen und murinen Mehmet-Protein aufgezeigt werden.

Das murine Mehmet-Protein mit 1306 AS und das humane Protein, bestehend aus 1336 AS, zeigen eine sehr ähnliche Grösse, mit entsprechend analogem Molekulargewicht (144kDa und 147kDa). Beide Proteine lassen sich durch charakteristische Merkmale in drei Abschnitte unterteilen (Abb.6). Der Amino-Terminus beim Maus-Mehmet besteht neben den Homologien zu Hefe-Proteinen aus einer kurzen sauren Region. Im humanen Mehmet-Protein PCCX-2 findet sich in der N-terminalen Region eine JmjC Domäne (BERGE-LEFRANC *et al.*, 1996). Sowohl das Maus-Jumonji Gen, als auch das humane Ortholog, zeichnen sich durch eine solche Domäne aus und spielen eine grosse Rolle in der Neuralrohr Bildung und der Entwicklung und Funktion des Herzens. In zentralen Abschnitt, korrespondierend zur Methyltransferase-Homologie im murinen Protein, zeigt sich im humanen Protein eine Zinkfinger-Domäne. Diese Domäne besteht aus acht konservierten Cystein Resten, die Zinkmoleküle binden können. Proteine, die Cytosin methylieren oder Methylcytosin binden, zeigen häufig eine solche Domäne. Zinkfinger Strukturen sind bei Transkriptionsfaktoren zu

finden und spielen somit eine Schlüsselrolle bei der Genaktivität, der Regulation der Transkription.

Der C-Terminus weist ein in beiden Proteinen identisches Motiv auf, die F-Box Region. Die durch das F-Box Motiv ausgezeichneten F-Box Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der selektiven Degradation von kurzlebigen Proteinen, die meist durch das Ubiquitin-System vermittelt wird.

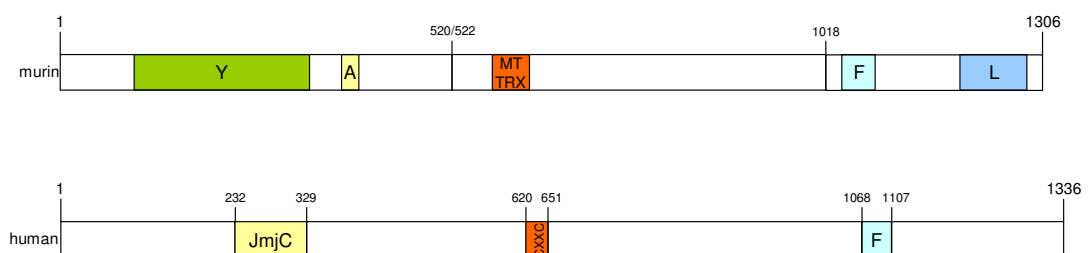


**Abb.6: Schematischer Vergleich der Domänenstruktur des humanen und murinen Mehmet-Proteins**

Die Maus-Mehmet cDNS kodiert für ein Protein von 1306 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von etwa 144kDa.

Y: Yeast-Box; A: saure Domäne; MT/TRX: 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferase / *Drosophila* Trithorax Protein; F: F-Box Region; L: Leucin-Repeats

Die Positionen 1, 520/522, 1018 und 1306 bezeichnen die Grenzen der drei Domänen und beziehen sich jeweils auf die Aminosäure-Positionen.

Die humane Mehmet cDNS kodiert für ein Protein von 1336 Aminosäuren mit einem erwarteten Molekulargewicht von etwa 147kDa.

JmjC: Domäne, die bei Jumonji Proteinen auftritt, die notwendig sind für die Neuralrohrentwicklung; CXXC: Zinkfinger-Domäne, die aus 8 konservierten Cystein Resten besteht, die Zink binden können ; F: F-Box Region Die Positionen 1, 232, 329, 620, 651, 1068, 1107 und 1336 bezeichnen die Grenzen der jeweiligen Domänen und beziehen sich auf die Aminosäure-Positionen.

## III.2 Expressionsmuster von Mehmet

Um erste Hinweise über das Genprodukt von Mehmet zu bekommen, wurden Untersuchungen zur Expression durchgeführt. Dabei sollte mit der Fragestellung welches der drei ATGs funktional ist, in erster Linie die Grössenbestimmung des Mehmet-Transkriptes geklärt werden. Zudem sollte auch eine Expressionsverteilung des Transkriptes nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Northern Blot-Analysen lassen sich dabei initiale Informationen finden, die durch RT-PCR detailliert werden können.

### III.2.1 Northern Blot-Analyse

Zur Bestimmung der Grösse der mRNS des murinen Mehmet-Gens und deren Gewebsverteilung wurden Northern Blot-Analysen mit kommerziell erworbenen murinen „multiple tissue“ Northern Blots der Firma BD Clontech (Heidelberg) durchgeführt. Der Northern Blot beinhaltete je 2µg Poly A<sup>+</sup> RNS aus Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden, die auf einem 1% denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit Hilfe von UV-Bestrahlung fixiert worden war. Der Nachweis der Mehmet-Transkripte erfolgte mit einer  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP markierten Mehmet K31-cDNS-Sonde (1566-3054bp), die dem Aminosäurebereich AS 522-1018 entspricht. Wie die Abb.7 zeigt, konnte ein 4,4kB grosses Transkript sowohl in der Leber, als auch in der Niere als RNS-cDNS-Hybridbande nachgewiesen werden (angezeigt durch den Pfeil). In den anderen Organen war kein Signal detektierbar. Zur Kontrolle für die einheitliche Quantität und Qualität der RNS wurde eine Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde für das humane  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Die Kontrollhybridisierung bestätigte eine gleichmäßige Poly A<sup>+</sup> RNS-Beladung.

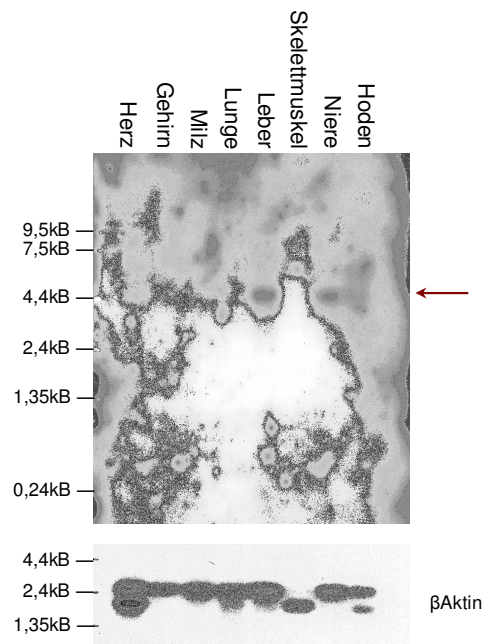


**Abb.7: Northern Blot-Analyse zum Nachweis der Mehmet-Transkripte in verschiedenen murinen Geweben**

Der kommerziell erworbene murinen Gewebe-Northern Blot (mouse multiple tissue Northern Blot, Cat-Nr. 7762-1; BD Clontech, Heidelberg) enthielt 2µg Poly A<sup>+</sup> RNS von folgenden Maus-Geweben : Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden. Der MTN<sup>TM</sup> Blot wurde mit einer α-<sup>32</sup>P dCTP markierten Mehmet (Nt 1566-3054 entspricht AS 522-1018)-cDNS-Sonde hybridisiert, der Röntgenfilm nach 16 Tagen durch das Kodak-Entwickler-Fixierer-System X-omat 100 1 entwickelt und die Grössenabschätzung der Signale erfolgte anhand einer Kennzeichnung der Banden eines RNS-Grössenstandards. Der Nachweis des Haushaltsgens β-Actin diente als Kontrollansatz für die Beladung der Poly A<sup>+</sup> RNS-Mengen (Expositionsende: nach 4 Stunden).

Die Northern Blot-Analyse bestätigte als erstes durch die Transkriptgrösse von 4,4kB die Annahme des funktionalen ATGs an Position 26 als Translationsstartpunkt. Desweiteren konnte die Existenz des murinen Mehmet-Gens in der Leber und der Niere gezeigt werden. Bei der Identifikation der Mehmet cDNS wurde eine Gehirn Bank gescreent. Da bei der Bestimmung der Gewebsverteilung der Mehmet mRNS im Northern Blot kein Signal im Gehirn gezeigt werden konnte, wurde als weitere Möglichkeit zum Nachweis der Mehmet mRNS eine sensitivere Methode, die reverse Transkription mit anschließender PCR ausgewählt.

### III.2.2 RT-PCR

Durch die Methode der reversen Transkription mit anschließender PCR ist der Nachweis geringer Transkriptmengen möglich. Nach Isolierung der Gesamt-RNS ausgewählter Maus-Gewebe wurde diese mit synthetischen Hexanukleotiden revers transkribiert, anschließend mit verschiedenen Primerkombinationen über eine 25-35 Zyklen PCR amplifiziert und die Reaktionsprodukte auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Dabei konnte mit der Primerkombination Mehmetfor2 und Mehr3 (II.1.7), die ein Produkt von 580bp amplifizieren, die Existenz von Mehmet-Transkripten in allen ausgewählten Geweben spezifisch nachgewiesen werden. So zeigte sich in der Niere, im Hoden, im Gehirn, der Milz und der Leber ein sehr starkes Signal mit der entsprechenden Grösse von 580bp. Im Herzen deutet sich die 580bp grosse Bande mit einem etwas schwächeren Signal an. Es wurden weitgehend die Organe analysiert, die bereits in der Northern Blot-Analyse verwendet wurden, um eine Übereinstimmung und zusätzliche Transkriptsignale zu finden. Zur Kontrolle der eingesetzten cDNS-Konzentrationen wurde eine Amplifikationsreaktion des Transkriptes für das Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Gen angesetzt und auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Das Ergebnis mit gleich starken Signalen in allen Geweben zeigt, dass gleiche Konzentrationen eingesetzt wurden.

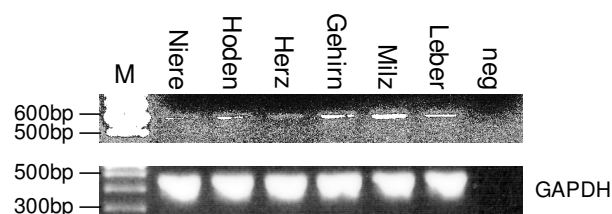


**Abb.8: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der Mehmet mRNS aus der reversen Transkription mit anschließender PCR für die Mehmet-Transkripte und für das Haushaltsgen GAPDH**

Die Gesamt-RNS wurde aus verschiedenen Maus-Geweben mit dem TRIZOL®-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert, mit Hilfe der „Superscript™II RNaseH- Reverse Transcriptase“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) in cDNS umgeschrieben und anschließend in einen PCR-Ansatz entweder mit Mehmet-spezifischen Primern Mehmetfor2 und Mehr3 (II.1.7) oder mit GAPDH-spezifischen Primern GAPDHfor und GAPDHback (II.1.7) eingesetzt. Ein Drittel Volumen des Mehmet PCR-Ansatzes und ein Fünftel Volumen des GAPDH PCR-Ansatzes wurden jeweils auf ein 2% Agarosegel aufgetragen. M = Marker (Auftragsvolumen: 5µl der 100 base pair DNA ladder der Firma Invitrogen (Karlsruhe))

neg = negativ Kontrolle, hier wurde die Menge an cDNS durch steriles bidest. Wasser ersetzt.

Durch die RT-PCR konnte nicht nur gezeigt werden, dass in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Northern Blot-Analyse der Nachweis der Mehmet mRNS in Niere und Leber erfolgte, sondern auch, dass Mehmet-Transkripte im Hoden, im Herz, im Gehirn und in der Milz nachgewiesen werden konnten. So lässt sich festhalten, dass es eine nahezu ubiquitäre Verteilung, bezüglich der ausgewählten Maus-Gewebe, von Mehmet gibt und dass eine Überlappung der Expressionsmuster von AP-2α und Mehmet bestätigt werden konnte. Denn Untersuchungen zur Verteilung der Expression von AP-2α ergaben ein Muster in den Zellen und Derivaten der Neuralleiste, der Haut und des Urogenitaltraktes. Diese Koexpression von AP-2α und Mehmet lässt die Frage nach einer möglichen Interaktion der beiden Partner aufkommen.

### III.3 Bestätigung der Interaktion zwischen AP-2α und Mehmet

Um diese Interaktion *in vitro* zu belegen, wurden GST Fusionsprotein Interaktionsexperimente (kurz GST-„pull down“) durchgeführt. Diese Experimente bieten die Möglichkeit zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen, die z.B. mit *in vitro* translatierten [<sup>35</sup>S]-Methionin markierten Proteinen inkubiert werden. Dabei wird das Fusionsprotein an eine Glutathion-S-Sepharose-Matrix immobilisiert und mit radioaktiv markierter Proteinlösung in einem geeigneten Puffer inkubiert. Findet eine Interaktion statt, wird das mit [<sup>35</sup>S]-Methionin

markierte Protein gebunden, nach Waschschritten, Elution, und Auftrennung mittels SDS-PAGE durch Autoradiographie schliesslich der Protein-Protein-Komplex nachgewiesen.

Um festzustellen, ob das Mehmet-Protein an verschiedene Transkriptionsfaktoren der AP-2 Familie bindet, wurden GST-„pull down“ Experimente mit AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$  durchgeführt. Dabei wurde zum einen bakteriell exprimiertes GST-Mehmet Fusionsprotein (AS 522-1018) an eine Glutathion-S-Sepharose-Matrix gebunden, mit [ $^{35}$ S]-Methionin markiertem *in vitro* translatiertem AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  oder AP-2 $\gamma$  Protein inkubiert, gebundene Protein-Protein-Komplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Im reziproken Experiment wurde ein GST-AP-2 $\alpha$  Fusionsprotein (AS 165-437) und ein *in vitro* translatiertes und mit [ $^{35}$ S]-Methionin markiertes Mehmet-Protein (AS 522-1018) getestet. Im ersten Ansatz konnte, wie die Abb.8 zeigt, eine Interaktion zwischen der zentralen Region von Mehmet und allen drei AP-2 Proteinen festgestellt werden. Die zur Herstellung des GST Fusionsprotein verwendete Region von Mehmet entsprach der durch den Far-Western-Screen gefundenen cDNS, die ein Protein darstellt, was sich über die AS 522-1018 erstreckt und Homologien zu 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferasen und dem *Drosophila* Trithorax Protein aufweist.

Der reziproken Versuch konnte die Wechselwirkung zwischen der verkürzten Form von AP-2 $\alpha$  (AS 165-437) und der *in vitro* translatierten Zentralregion von Mehmet bestätigen. Die in diesem Ansatz verwendete AP-2 $\alpha$  Form besteht aus der DNS-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne, welche sich über die zweite Hälfte des AP-2 $\alpha$  Proteins erstreckt. Um sicherzustellen, dass es sich um eine spezifische Interaktion zwischen AP-2 und Mehmet handelt, wurde als Kontrolle GST-Protein eingesetzt.

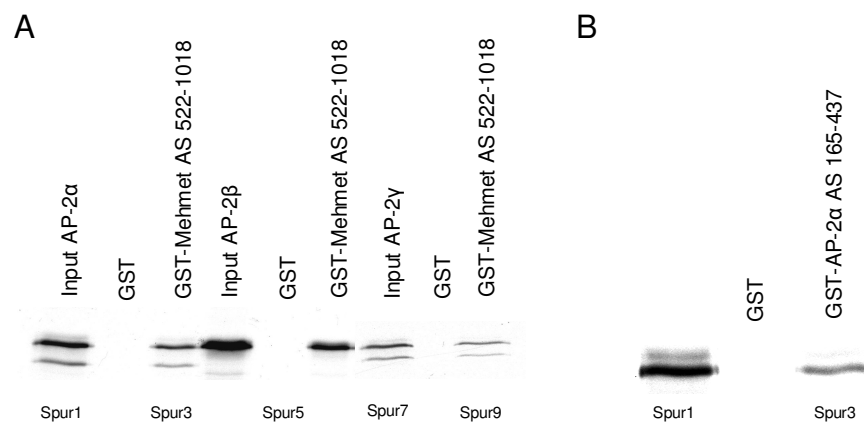


**Abb.8: Nachweis der Interaktion von Mehmet mit AP-2 Proteinen**

**A:** 2µg GST-Mehmet-Protein bzw. 2µg GST-Protein wurden an 20µl vorgewaschene Gluthationsepharose bei 4°C 1Stunde gekoppelt und mit 5µl *in vitro* translatierten [<sup>35</sup>S]-Methionin markiertem AP-2α, β oder γ im Interaktionspuffer bei 4°C 1Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden gebundene Proteine in SDS-Ladepuffer aufgenommen, auf ein 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und nach Autoradiographie sichtbar gemacht. **B:** im reziproken Versuch wurden 2µg GST-AP-2α (AS 165-437) bzw. 2µg GST-Protein an eine gewaschene Gluthation-S-Sepharose Matrix 1Stunde bei 4°C gebunden, mit 5µl [<sup>35</sup>S]-Methionin markiertem Mehmet-Protein (AS 522-1018) inkubiert (4°C, 1Stunde) und anschließend 3x gewaschen. Die Proteinkomplexe wurden in SDS-Ladepuffer aufgenommen, auf einem 10% SDS-PAA-Gel aufgetrennt und autoradiographisch nachgewiesen.

10% des in den Experimenten verwendeten [<sup>35</sup>S]-Methionin markierten A: AP-2α, AP-2β und AP-2γ bzw. B: Mehmet-Protein (AS 522-1018) wurden als Input-Kontrollen mit auf das Gel aufgetragen.

Die Zentralkomäne von Mehmet (AS 522-1018) interagiert *in vitro* spezifisch mit AP-2α, AP-2β und AP-2γ. Die Bindung zwischen Mehmet und AP-2α, β und γ ist hochaffin, da die Signalstärke der gebundenen AP-2 Moleküle der des Inputs entspricht (vgl. Abb.8A Spur 1 und 3). Die Protein-Interaktion wird spezifisch durch Mehmet hervorgerufen und nicht durch den GST-Anteil im Fusionsprotein, da das GST-Protein keine Interaktion mit Mehmet zeigt (siehe Abb.8A Spur 2, 5 und 8).

Im reziproken Ansatz zeigt sich ebenfalls eine spezifische Interaktion zwischen der DNS-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne von AP-2 $\alpha$  (AS 165-437) und der zentralen Domäne von Mehmet (AS 522-1018). Auch hier wurde, dargestellt in Abb.8B, Spur 2, sichergestellt, dass es sich bei der Interaktion um eine zwischen AP-2 $\alpha$  und Mehmet spezifischen Wechselwirkung handelt, da keine Interaktion zwischen dem GST-Anteil und AP-2 $\alpha$  stattgefunden hat.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in den GST-„pull down“ Experimenten eine spezifische Interaktion von Mehmet und AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$  bestätigt werden konnte.

Da eine solche Interaktion nur dann Sinn macht, wenn sich beide Proteinpartner in denselben Zellkompartimenten befinden, sollte die Lokalisation von Mehmet und AP-2 $\alpha$  in Immunfluoreszenzen transient transfizierter HeLa Zellen untersucht werden.

### **III.4 Bestätigung der Kolokalisation von AP-2 $\alpha$ und Mehmet**

Zur Bestimmung der Lokalisation von überexprimiertem Mehmet-Protein in transient transfizierten Zellkulturzellen wurden immuncytochemische Experimente mit HeLa Zellen durchgeführt. Basierend auf den Erkenntnissen, dass AP-2 $\alpha$  und Mehmet *in vitro* interagieren, wurde eine transiente Kotransfektion von AP-2 $\alpha$  und Mehmet in HeLa Zellen angesetzt, die Aufschlüsse über eine mögliche Kolokalisation von AP-2 $\alpha$  und Mehmet-Protein auf zellulärer Ebene geben sollte.

### III.4.1 Kolokalisation von Mehmet und AP2 $\alpha$ in transienter Expression

Um zu überprüfen, ob AP-2 $\alpha$  und Mehmet in Zellen kolokalisieren, wurden Immunfluoreszenz-Versuche mit transient kotransfizierten HeLa Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Expressionsplasmide pCMXpl2\_hAP-2 $\alpha$  und pCMXpl2\_HA-Mehmet in HeLa Zellen kotransfiziert.

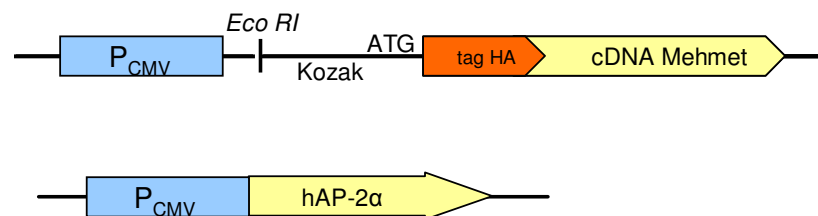


**Abb.9: Schematische Darstellung der Expressionsplasmide pCMXpl2\_hAP-2 $\alpha$  und pCMXpl2\_HA-Mehmet**

P<sub>CMV</sub>: Promotor des Cytomegalovirus; tagHA: Influenza-Hämagglutinin Epitop; GAATTC: *EcoRI* Restriktionsschnittstelle; CCACC: Kozak-Sequenz; ATG: Start Codon  
Das in der Darstellung gewählte Format der einzelnen Abschnitte stimmt nicht mit den tatsächlichen Grössen überein.

Beide Proteine wurden in den fixierten Zellen mit Hilfe eines monoklonalen Antikörper gegen AP-2 $\alpha$  aus Kanninchen bzw. gegen Epitop-tagHA aus Maus nachgewiesen. Die Visualisierung erfolgte mit einem zweiten Antikörper gegen Maus-IgG bzw. Kanninchen-IgG, „green-fluorescent Alexa Fluor 488“ bzw. „red-fluorescent Alexa Fluor 594“-konjugierter Sekundärantikörper. Im Falle des grünen Fluorochroms wurde die Anregung bei einer Wellenlänge von 490nm (blau) und die Emission bei 520nm (grün) durchgeführt, rotes Fluorochrom wurde bei einer Wellenlänge von 580nm (gelb) angeregt und die Emission erfolgte bei 650nm (rot). Bei der Auswertung der Fluoreszenz-Färbungen konnten in den Zellen bezüglich der AP-2 $\alpha$  Lokalisation deutlich rote Fluoreszenz-Signale im

Zellkern festgestellt werden. Wie auch Abb.10 zeigt, finden sich hinsichtlich Mehmet Signale im Cytoplasma und im Zellkern, besonders deutlich zu sehen bei der überlagerten Aufnahme (Abb.10 merge).

Aus diesem Ergebnis konnte gefolgert werden, dass eine Kolokalisation von AP-2 $\alpha$  und Mehmet im Zellkern besteht.

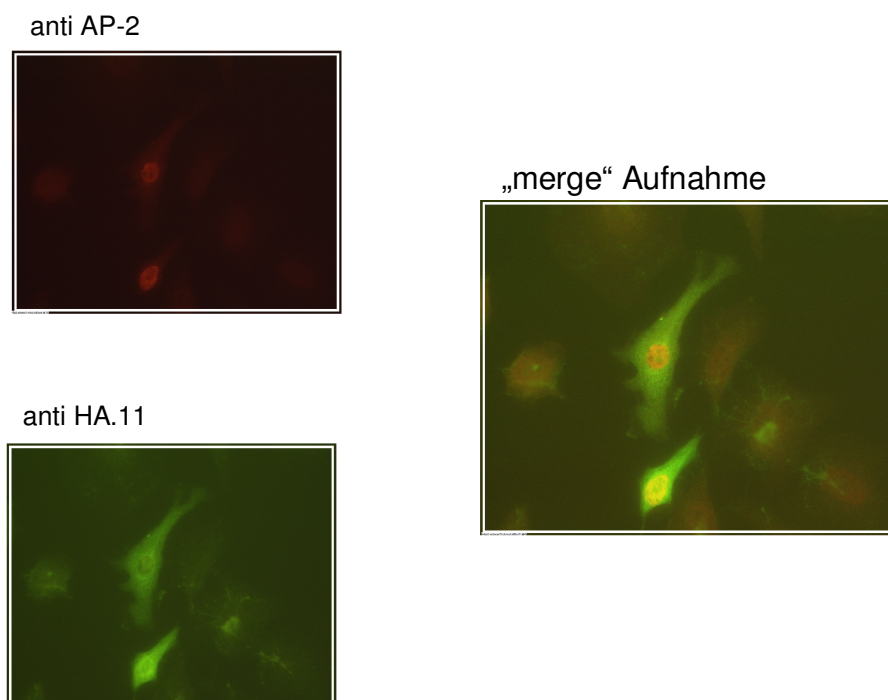


**Abb.10: Immunfluoreszenz-Bilder der mit AP-2 $\alpha$ - und Mehmet-Expressionsplasmiden transient transfizierte HeLa Zellen**

HeLa Zellen wurden durch die in II.4.2 beschriebene Methode mit Expressionsplasmiden für AP-2 $\alpha$  und tagHA-Mehmet transient transfiziert. AP-2 $\alpha$  und Mehmet transfizierte Zellen wurden auf „chamber slides“ kultiviert, mit Formaldehyd und TritonX-100 fixiert und mit einem murinen monoklonalen Antikörper HA.11 (Babco, Richmond (USA)) und einem polyklonalen Kaninchen anti-AP-2 Antikörper (Geneka, Rixensart (Belgien)) in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen. Als Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper wurden „green-fluorescent Alexa Fluor 488“ bzw. „red-fluorescent Alexa Fluor 594“ (Molecular Probes, Leiden (Niederlande)) verwendet. Zur Analyse und Dokumentation wurde ein DM LB2 Fluoreszenz-Photomikroskop mit einer JVC Digital-Kamera KYF70B (Leica, Bensheim) und einem optischen Auswertungssystem der Firma Hilgers (Königswinter) (Diskus ver 4.30.203#281 Fluoreszenz F70B) genutzt.

Diese Ergebnisse stehen in gutem Einklang zu den Daten aus den zuvor dargestellten GST Fusionsprotein-Interaktionsexperimenten, die eine Bestätigung der Wechselwirkung zwischen AP-2 $\alpha$  und Mehmet zeigten. Eine Interaktion lässt vermuten, dass beide Partner in gleichen Zellkompartimenten vorkommen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Versuche konnte die Kolo-kalisation von AP-2 $\alpha$  und Mehmet und damit die Präsenz beider Proteine im Zellkern nachgewiesen werden.

### **III.5 Funktionsanalyse des Mehmet-Proteins**

Nachdem die Analyse der Expressionsverteilung Angabe über die Organe, in denen das Transkript von Mehmet bestimmt werden konnte, lieferte und Protein-Protein Wechselwirkungen in GST-„pull down“ Experimente zwischen Mehmet und AP-2 $\alpha$  bestätigt werden konnten, sollte die Funktion von Mehmet geklärt werden. Dabei sollten folgende Aspekte beleuchtet werden: es sollte eine Mehmet-überexprimierende Zelllinie generiert und dessen exprimierte Proteine nachgewiesen werden. Neben der Gewebsverteilung sollte auch die zelluläre Lokalisation von Mehmet bestimmt werden, ausserdem die Wirkung von Mehmet auf die endogene AP-2 $\alpha$  Expression untersucht werden und Hinweise auf verändertes Proliferations- bzw. Apoptoseverhalten gefunden werden.

### III.4.1 Induzierbare Expression von Mehmet in Fibroblasten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Etablierung einer stabilen induzierbaren Mehmet exprimierenden Zelllinie angestrebt. Dabei wurden murine embryonale Fibroblasten (MEF) mit einem sogenannten Tet-Off™-System ausgewählt (BD Clontech, Heidelberg). Das Tet-Off™-System basiert auf einer kontrollierten Genexpression, bei der durch Bindung eines funktionellen Transaktivators an seinen Operator die Transkription eines benachbarten Gens aktiviert wird. Die Bindung des Transaktivators an den Operator wird indirekt durch einen Liganden reguliert und kann nur erfolgen, wenn der Ligand nicht an den Transaktivator gebunden wurde. Das Prinzip dieses genetischen „Ein- und Ausschalters“ wird von vielen Organismen genutzt wie beim Tryptophan-Repressor von *E. coli*. Dem gleichen Mechanismus unterliegen auch die Gene des Tetracyclinresistenz-Operons der Bakterien, auf dem das Tet-Off™-System beruht (Gossen und Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995).

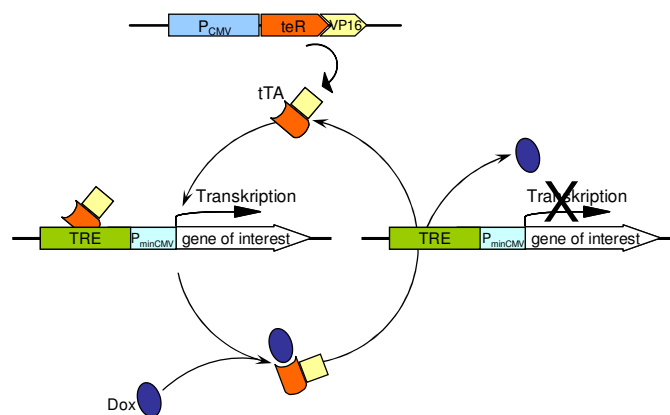


**Abb.11: Funktionsweise des Tet-Off™-Systems**

P<sub>CMV</sub>: Promotor des Cytomegalovirus; teR: AS 1-207 des Tetracyclin Repressor Protein; VP16: Aktivierungsdomäne des *Herpes simplex* Virus; tTA: Tetracyclin kontrollierter Transaktivator; TRE: „tetracyclin responsive element“; P<sub>minCMV</sub>: Minimal-Promotor des Cytomegalovirus; Dox: Doxycyclin (Derivat des Tetracyclins)  
Die Bindung des tTA an pTRE erfolgt im Tet-Off™-System nur bei fehlendem Liganden, woraufhin das klonierte Gen transkribiert wird und exprimiert werden kann. Als Ligand dient Tetracyclin oder dessen Derivat Doxycyclin. Die Transkription ist abhängig von der zugefügten oder entfernten Menge des Antibiotikums, so dass die Expression des klonierten Gens aus- bzw. angeschaltet werden kann.

Das Tet-Off™-System besteht aus zwei wichtigen Komponenten: einem regulatorischen Protein und einem sogenannten „response“ Plasmid. Das regulatorische Protein ist in diesem System ein 37kDa grosses Fusionsprotein aus den ersten 207 Aminosäuren des Wildtyp Tetracyclin Repressor Protein (teR) und der Aktivierungsdomäne des *Herpes simplex* Virus VP16. VP16 agiert in Säugetierzellen als Transkriptions-Aktivator (Triezenberg *et al.*, 1988), so dass teR nunmehr als Aktivator fungiert. Das Hybridprotein aus Repressor Protein und Aktivierungsdomäne wird auch als Tetracyclin kontrollierter Transaktivator (tTA) bezeichnet und ist durch eine Region auf dem Regulationsplasmid pTet-Off kodiert. Als Operator und zweite Komponente dient ein weiterer Vektor, das sogenannte „response“ Plasmid. Das Plasmid beinhaltet das „gene of interest“ unter der Kontrolle des „tetracyclin responsive element“ (TRE), das aus sieben Kopien der 42bp langen Tet-Operatorsequenz zusammensetzt ist und als pTRE bezeichnet wird. Der Operator liegt oberhalb des CMV Minimal-Promotors ( $P_{\min\text{CMV}}$ ), an den die multiple Klonierungsstelle des Vektors angrenzt. In diese multiple Klonierungsstelle wird dann das entsprechende Zielgen eingesetzt.

Die verwendeten embryonalen Fibroblasten hatten zunächst nur den Tetracyclin kontrollierten Transaktivator (tTA) stabil integriert und wurden zur Herstellung stabiler Klone mit einem „response“ Plasmid (pTRE\_Zielgen) und einem Selektionsplasmid transfiziert.

#### III.4.1.1 Herstellung stabiler MEF Klone

Für die Untersuchungen einer Mehmet-überexprimierende Zelllinie wurde zunächst das tagHA-Mehmet-Konstrukt in den pTRE-Vektor kloniert. Unter Verwendung der Kalziumphosphat Methode (II.4.2) wurden MEF Tet-Off™-Zellen, die bereits mit dem Regulationsplasmid pTet-Off transfiziert wurden, in einer Kotransfektion mit den Expressionsplasmide pTRE\_HA-Mehmet und pTK-Hyg stabil transfiziert.

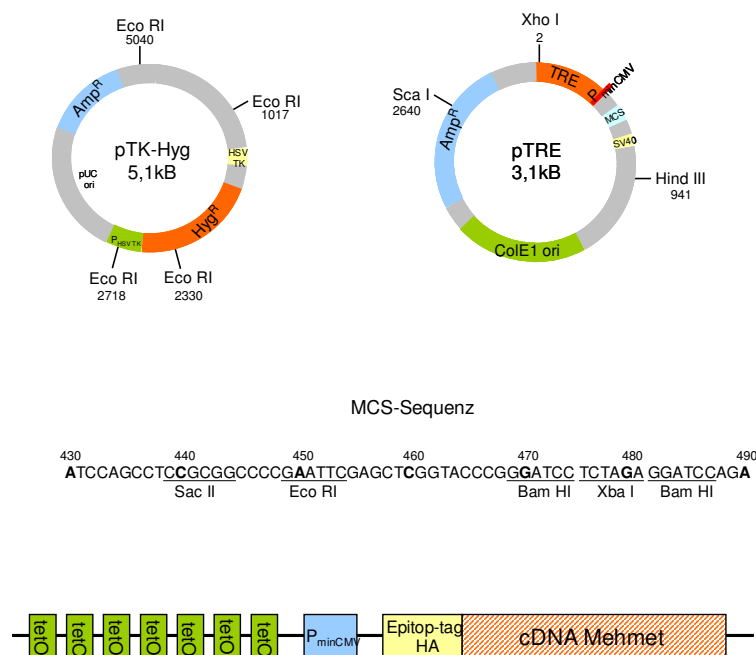


**Abb.12: Kartierungskarten der Expressionsplasmide pTRE und pTK-Hyg und schematische Darstellung des pTRE\_HA-Mehmet Konstruktes**

HSV TK: *Herpes simplex* Virus Fragment mit Poly A Signal; Hyg<sup>R</sup>: Hygromycin-Resistenzgen (2577-1540bp); P<sub>HSV TK</sub>: Promotor des Thymidin Kinase Gens des HSV; Amp<sup>R</sup>: Ampizillin-Resistenzgen (3973-4833bp); ColE1 ori: *E.coli* Replikationsursprung; SV40: Simian Virus 40 Fragment mit Poly A Signal; MCS: multiple Klonierungsstelle // Polylinker als Sequenz aufgeführt; TRE: „tetracyclin responsive element“ bestehend aus sieben Kopien der 42bp langen Tet Operator (tetO) Sequenz; tetO: 42bp lange Tetracyclin Operator Sequenz; P<sub>minCMV</sub>: Minimal-Promotor des Cytomegalovirus

Die Generierung des pTRE\_HA-Mehmet Konstruktes wurde anhand folgender Schritten durchgeführt :

aus dem Plasmid pCMXpl2.3HA.10His\_Mehmet wurde mittels *EcoRI* Restriktion die Epitop-tagHA markierte Mehmet Vollängen cDNS geschnitten, das Insert isoliert und in den mit *EcoRI* geschnittenen und vorbereiteten pTRE Vektor ligiert. Die Orientierung des Insert im rekombinanten Vektor wurde durch eine *EcoRI* Restriktion nachgewiesen. Desweiteren erfolgte die Überprüfung und Bestätigung des Konstruktes durch Sequenzierung.



Antibiotikums Doxycyclin wurde verwendet, wenn die Transkription und damit verbundene Expression des klonierten Mehmet-Gens ausgeschaltet werden sollte. Die entwickelte stabile Zelllinie erzielte 20 induzierbare Klone, die nach Expansion durch Expressionsanalysen untersucht und bei nicht vorhandener Mehmet-Expression aussortiert wurden.

#### **III.4.1.2 Western Blot-Analyse – zellulärer Mehmet Spiegel**

Die Expressionsanalyse des überexprimierten Mehmet-Protein beschränkt sich, wie auch die folgenden Experimenten, auf ein bis vier ausgewählte stabile MEF Klone: MEFK1 bzw. MEFK1ind, MEFK2 bzw. MEFK2ind, MEFK10 bzw. MEFK10ind und MEFK11 bzw. MEFK11ind. In der Western Blot-Analyse sollte das in den Zellen überexprimierte Mehmet-Protein über den Epitop-tagHA nachgewiesen und dessen Grösse bestimmt werden. Die gewonnen Proteinextrakte wurden auf ein denaturierendes SDS-PAA-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Der immunologische Nachweis erfolgte über den Epitop-tagHA mit einem murinen Nachweis-Antikörper HA.11 und „horse raddish peroxidase“ (HRP)-konjugierte Ziege-anti-Maus Antikörper. Die in Abb.13 präsentierte Western Blot-Analyse belegt, dass das Mehmet-Konstrukt in den Proteinextrakten der induzierten Klone, MEFK1ind, MEFK10ind und MEFK11ind mit einer Grösse von 144kDa spezifisch nachgewiesen werden konnte (gekennzeichnet durch den Stern). Dagegen zeigt die Detektion der dazugehörigen nicht-induzierten Klone MEFK1, MEFK10 und MEFK11 kein Signal. Beim MEFK1ind Klon wurde zudem auch eine Bande von 98kDa detektiert, wobei es sich wahrscheinlich um ein Degradationsprodukt handelt. Auch die Proteinextrakte des MEFK10ind Klones wiesen neben der 144kDa grossen Bande multiple niedriger bandierte Signale auf, die ebenfalls auf degradierte Proteinprodukte schliessen lassen. Eine Quantifizierung der Mehmet-Expression der jeweiligen MEF Klone zeigte beim induzierten Klon MEFK10ind die stärkste regulierbare Proteinexpression, gefolgt von Klon MEFK11ind und Klon MEFK1ind. Diese Unterschiede lassen sich

möglicherweise durch Abweichungen in der Aufarbeitung der Proteinproben erklären, die auch Grund für degradierte Proteinprodukte sein könnten. Andererseits wäre auch eine heterogene Antwort bezüglich der Induzierbarkeit eine denkbare Erklärung. Der Extrakt des *in vitro* translatierten Konstruktes pCMXpl2\_HA-Mehmet diente als Positivkontrolle und wurde mit Hilfe des TNT<sup>®</sup> Quick coupled transcription / translation System der Firma Promega (Mannheim) (II.2.14) hergestellt. Auch hier konnte das zu erwartende Signal mit einer Grösse von 144kDa nachgewiesen werden (durch Stern gekennzeichnet). Als Negativkontrolle wurde ein ebenfalls *in vitro* translatiertes Lysat des Leervektors pCMXpl2 verwendet, das kein Signal zeigte. Der Nachweis des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin wies deutlich gleich starke Signale in allen Proteinfractionen auf und konnte somit eine gleichmässige Beladung bestätigen.

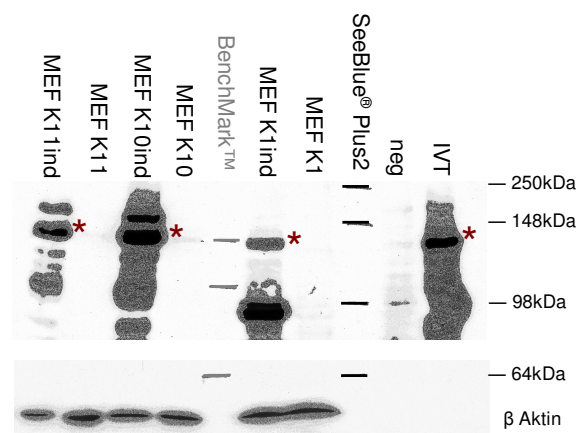


**Abb.13: Western Blot-Analyse zum Nachweis von Mehmet aus den stabil transfizierten MEF Klonen**

Die Gesamtproteine wurden aus den MEF Zellen, die Mehmet exprimieren, hergestellt (II.3.1). Die Proteinextrakte wurden auf ein reduzierendes, 6% SDS-PAA-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen (II.3.5). Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem murine monoklonale Antikörper HA.11 als primären Antikörper und einem sekundären, HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper. Die Signalentwicklung erfolgte nach Zugabe der Chemilumineszenz-Substratlösungen (II.3.5.1) mit einer Belichtungszeit von 20s.

Spur 1: Positivkontrolle: 5 $\mu$ l *in vitro* translatiertes Mehmet-Protein

Spur 2: Negativkontrolle: 5 $\mu$ l *in vitro* translatiertes pCMXpl2 Vektor (ohne Insert)

Spur 3: SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained Proteinstandard (Auftragsvolumen: 7 $\mu$ l)

Spur 4: 16µl Proteinextrakt von MEFK1 (nicht induziert)

Spur 5: 16µl Proteinextrakt von MEFK1ind

Spur 6: BenchMark™ Prestained Protein Ladder (Auftragevolumen: 7µl)

Spur 7: 16µl Proteinextrakt von MEFK10 (nicht induziert)

Spur 8: 16µl Proteinextrakt von MEFK10ind

Spur 9: 16µl Proteinextrakt von MEFK11 (nicht induziert)

Spur 10: 16µl Proteinextrakt von MEFK11ind

Der Nachweis des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle für die Ladeverhältnisse der Proteinextrakte (Expositionsende: nach 15s)

Dieses Ergebnis zeigt, dass in den drei hier exemplarisch dargestellten stabilen MEF Klonen eine starke Mehmet-Expression mit der entsprechend richtigen Grösse von 144kDa nachgewiesen werden konnte. Mit Hilfe der Etablierung dieser stabil induzierbaren Mehmet exprimierenden Zelllinie sollte die zelluläre Lokalisation von Mehmet untersucht werden.

### **III.4.2 Zelluläre Lokalisation von Mehmet**

Zur Bestimmung der Lokalisation von überexprimiertem Mehmet-Protein in stabil transfizierten Zellkulturzellen wurden immuncytochemische Experimente mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) durchgeführt. Die bereits beschriebenen stabilen MEF Klone lieferten erste Angaben über die vorherrschende Verteilung des Mehmet-Proteins in den Zellkompartimenten.

#### **III.4.2.1 Immunfluoreszenzen der stabilen MEF Klone**

Die unter III.4.1 beschriebenen MEF Klone wurden zum einen hinsichtlich der Mehmet-Protein Expression und zum anderen in Bezug auf die Bestimmung der Lokalisation von Mehmet untersucht. Bei der Bestimmung der zellulären Lokalisation von Mehmet wurde exemplarisch ein stabiler MEF Klon MEFK1 bzw. MEFK1ind ausgewählt, der in der Western Blot-Analyse starke regulierbare Proteinexpression zeigte. Nach Kultivierung und Fixierung der Zellen auf entsprechende Objektträger, wurde die Lokalisation des Mehmet-Proteins durch einen monoklonalen Maus-Antikörper gegen den Epitop-

tagHA und einem „green-fluorescent Alexa Fluor 488“-konjugierten Sekundärantikörper detektiert. Alle Zellen des induzierbaren Klon MEF K1ind zeigten eine deutliche Fluoreszenz im Cytoplasma, wie die Abb.14 belegt. Nicht-induzierte Zellen konnten hingegen keine Fluoreszenz erkennen lassen. Auch weitere Fluoreszenzfärbungen anderer Zellklone mit induzierter und nicht-induzierter Mehmet Expression bestätigten die Resultate dieser Experimente.

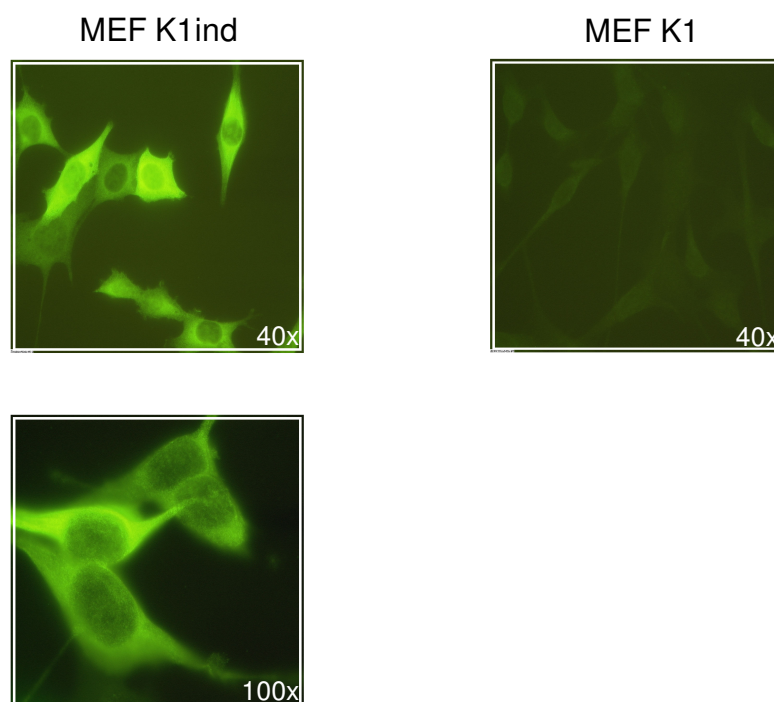


**Abb.14: Immunfluoreszenz-Bilder von MEF K1 und MEF K1ind in verschiedenen Vergrößerungen (40- und 100-fach)**

Murine embryonale Fibroblasten wurden mit den Expressionsplasmiden pTRE\_HA-Mehmet und pTK-Hyg gemäß den Angaben im Methodenteil dieser Arbeit stabil transfiziert. Überexprimiertes Mehmet-Protein wurde durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen, indem die transfizierten Zellen auf „chamber slides“ kultiviert, mit Formaldehyd und TritonX-100 fixiert und mit einem murine monoklonale Antikörper HA.11 (Babco, Richmond (USA)) und einem „green-fluorescent Alexa Fluor 488“-konjugiertem Sekundärantikörper (Molecular Probes, Leiden (Niederlande)) detektiert wurden. Die photographische Auswertung erfolgte mit einem DM LB2 Mikroskop mit JVC digital camera KYF70B (Leica, Bensheim) und einem optischen Auswertungssystem der Firma Hilgers (Königswinter) (Diskus ver 4.30.203#281 Fluoreszenz F70B).

Die Versuche zur Bestimmung der Lokalisation von überexprimiertem Mehmet-Protein in stabil transfizierten Zellkulturzellen konnten eine deutliche Verteilung von Mehmet in der Zelle festlegen, und zwar eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation bei induzierter Mehmet-Expression. Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der transienten und stabilen Transfektion zeigt eine unterschiedliche Lokalisation des Mehmet-Proteins. Auf seiten der transienten Transfektion befindet sich Mehmet im Cytoplasma und im Zellkern. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der stabilen Transfektion eine hauptsächlich cytoplasmatische Lokalisation des Mehmet-Proteins. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse könnte darin begründet liegen, dass die zwei Formen der Transfektion als gemeinsames Ziel die Expression der Fremd-DNS haben, jedoch sich aufgrund folgender Merkmale wesentlich unterscheiden: bei der instabilen/transienten Transfektion liegt die transfizierte DNS in der Empfängerzelle extrachromosomal vor und es gibt keine regelmässige Weitergabe an die nächste Zellgeneration. Bei der stabilen/permanenten Transfektion wird die transfizierte DNS ins Genom der Empfängerzelle integriert und es erfolgt eine stabile Weitergabe mit dem Genom an die nachfolgenden Zellgenerationen.

Die Diskrepanz der Lokalisation bei transientser und stabiler Transfektion muss über das Zeitmaß dieser Arbeit hinaus genauer untersucht werden.

#### **III.4.3 Die Mehmet „knock-out“ Maus**

Neben den bereits beschriebenen Experimenten sollten zur Analyse der Mechanismen der AP-2 Expression murine Defektmutanten erzeugt werden und deren Phänotyp auch bezüglich der AP-2 Regulation *in vivo* studiert werden. Die im folgenden aufgeführten Ergebnisse wurden freundlicherweise von PD Dr. rer. nat. Markus Moser (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried München) zur Verfügung gestellt.

Mit Hilfe einer Mehmet-spezifischen Probe konnte bei *in situ* Hybridisierungen an Maus-Embryo Paraffinschnitten verschiedener Stadien eine spezifische Mehmet Expression in der peripheren nephrogenen Zone

der Niere, in den cranialen und Spinalganglien und im Vorderhirn festgestellt werde. Vor allem die Expression in der Niere und im peripheren Nervensystem überlappen signifikant mit dem Expressionsmuster von AP-2 $\alpha$ . Um die Bedeutung des Proteins Mehmet für die Entwicklung und Differenzierung von Organen und eine mögliche Interaktion mit AP-2 $\alpha$  *in vivo* zu studieren, wurde mit der Methode des „gene targeting“ der Mehmet Genlokus im Maussystem zerstört.

Nach Elektroporation des „targeting Vektors“ in embryonale Stammzellen und einer einwöchigen G418 Selektion zeigten neun von 250 resistenten Klone mittels SouthernBlot-Analyse neben einer 9kB Wildtyp Bande ein zweites auf 5kB verkürztes Fragment. Nach Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten konnten von zwei Klonen keimbahngängige Chimären erzeugt werden. Heterozygote Tiere zeigten keine histologischen Veränderungen. Zur Untersuchung des Phänotypes von Mehmet defizienten Mäusen wurden heterozygote Tiere verpaart. Analysen an verschiedenen Embryonalstadien zeigten, dass Mehmet defiziente Mäuse am Tag 9 deutlich wachstumsretardiert waren und schwere craniofaciale Defekte und Exenzephalie aufzeigten.

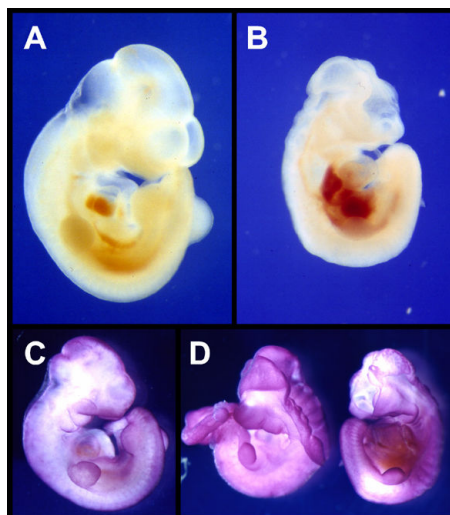


**Abb.15: Vergleich von Wildtyp Mausembryonen und Mehmet defizienten Embryonen an Tag 11**

Mehmet defiziente Mausembryonen (B&D) sind im Gegensatz zu Wildtyp Embryonen (A&C) wachstumsretardiert und zeigen einen fehlerhaften Verschluss des Neuralrohres im Kopfbereich (Exenzephalie genannt) und undifferenziertes Gewebe im Gesichtsschädelbereich.

Dabei bleibt das komplette Neuralrohr beginnend mit dem Vorderhirn einschließlich den Rhombomeren des Nachhirns geöffnet (Abb.15D). Ursache des undifferenzierten, degradierten Gewebes im Kopfbereich ist eine massive Apoptose in allen strukturierten Geweben. Auch die extraembryonale Gefäßbildung ist durch die Inaktivierung des Mehmet-Gens in ihrer Entwicklung gestört. Während Wildtyp-Embryonen am Tag 11 einen gut vaskularisierten Dottersack besitzen, entwickeln Mehmet-Mutanten nur Blutinseln bis zu diesem Zeitpunkt. Zwischen Tag 11 und Tag 12 während der Maus-Embryogenese sterben Mehmet defiziente Tiere. Nach der Geburt konnten keine Mehmet-Mutanten genotypisch nachgewiesen werden. Immunhistologische Färbungen mit einem anti AP-2 $\alpha$  Antikörper an Wildtyp und Mehmet defizienten Tieren weisen eine stärkere AP-2 $\alpha$  Färbung im Mesenchym des ersten und zweiten Kiemenbogens der Mehmet-Mutante nach. Die Frage, ob Mehmet bei der Proteasom vermittelten Degradation von AP-2 beteiligt ist, sollte in Zellkulturexperimenten mit regulierbarer Proteinexpression von Mehmet untersucht werden.

#### **III.4.4 Untersuchungen des AP2 $\alpha$ -Spiegels**

Hinsichtlich der Domänenstruktur von Mehmet zeigen sich im Carboxy-Terminus zwei Homologie Regionen bestehend aus einer F-Box Region (AS 1038-1082) und einem Leucin-Repeat Motiv (AS 1195-1284). Die F-Box ist ein Rezeptor Motiv für den Ubiquitin-Ligase Komplex, der eine wichtige Rolle im Proteasom-abhängigen Degradationweg spielt.

Der Mechanismus der Ubiquitin Ligase Reaktion ist ein hoch selektiver Prozess, der die nacheinandergeschaltete Aktivität von drei Enzymen erfordert.

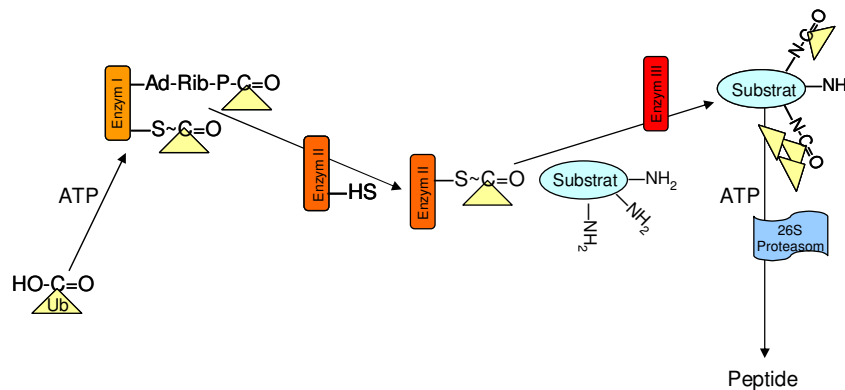


**Abb.16: Schematische Darstellung einer Ubiquitin vermittelten Protein Degradation**

Der C-terminale Glyzin-Rest von Ubiquitin wird in einer ATP-verbrauchenden Reaktion von einem spezifischen Enzym I aktiviert. Dabei wird ein intermediäres Ubiquitin-Adenylat gebildet und Pyrophosphat freigesetzt, worauf Ubiquitin in einer Thioester-Bindung an einen Cystein Rest des Enzym I gebunden wird. Aktiviertes Ubiquitin wird dann auf einem Cystein Rest eines Ubiquitin Träger Protein (Enzym II) transferiert. In einem dritten Schritt, der von einer Ubiquitin Ligase (Enzym III) katalysiert wird, wird Ubiquitin über seinen C-Terminus in einer Amid-Isopeptid Bindung an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines LysinRestes des Substratproteins gebunden. Polyubiquitinierte Proteine werden in der Regel dann in ATP abhängiger Weise durch das 26S Proteasom degradiert. Das 26S Proteasom generiert verschiedene Produkte: freie Peptide, Peptid-Ubiquitin-Konjugate und Polyubiquitin-Ketten.

Aufgrund dieser Homologiepräsenz des F-Box Motives und den Ergebnissen der Mehmet defizienten Tiere wurde eine degradierende Wirkung von Mehmet auf die endogene AP-2 Expression vermutet. Um zu untersuchen, ob die Expression von Mehmet einen möglichen Einfluss auf die Stabilität des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  hat und dabei AP-2 $\alpha$  als physiologischer Interaktor von Mehmet einem Proteasom-abhängigen Abbau unterliegt, Mehmet somit AP-2 $\alpha$  degradiert, wurden die Mehmet überexprimierende Zellklone auf den zellulären AP-2 $\alpha$  Spiegel hin untersucht.

#### III.4.4.1 Western Blot-Analyse

In der Western Blot-Analyse sollte der AP-2 $\alpha$  Spiegel in Mehmet überexprimierenden Zellen von unterschiedlichen MEF Klonen bestimmt werden. Es wurden neben vier Mehmet exprimierenden Zellklone auch HeLa Zellen zur Analyse ausgewählt. Je 16 $\mu$ l der gewonnen Proteinextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Der immunologische Nachweis des endogenen AP-2 $\alpha$  Spiegels erfolgte mit einem den Carboxyterminus von AP-2 $\alpha$  erkennenden polyklonalen Kaninchen anti-AP-2 $\alpha$  Serum (Santa Cruz Biotechnology, California (USA)) und einem HRP-markiertem Ziege-anti-Kaninchen-Serum (DAKO, Hamburg). Betrachtet man exemplarisch die ersten vier Protein Fraktionen der Abb.17A (Spur 1-4), lassen sich zwei wesentliche Aussagen zur dargestellten Western Blot-Analyse machen. Zum einen findet man keine Signale in den cytoplasmatischen Proteinextrakten der induzierten, als auch nicht-induzierten Zellen des MEF Klons MEFK1. Zum anderen zeigen die Kern-Proteinextrakte derselben Zellen wie erwartet deutliche Signale mit der entsprechenden Grösse des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  von 50kDa. So konnte kein AP-2 $\alpha$  in der Cytoplasmafraktion, sondern AP-2 $\alpha$  nur in der Kernfraktion mit einem Molekulargewicht von 50kDa nachgewiesen werden. Desweiteren kann man keinen signifikanten Unterschied in der Signalintensität zwischen den Kernextrakten der induzierten und der nicht-induzierten Zellen erkennen. Diese Erkenntnisse bestätigen einerseits die Existenz des endogenen AP-2 $\alpha$  Spiegels ausschließlich im Nucleus und andererseits die Stabilität des zellulären AP-2 $\alpha$  Levels in Gegenwart einer Mehmet-Überexpression. Auch die Vergleiche der Proteinextrakte aus den anderen Mehmet überexprimierenden Zellen der MEF Klone MEFK2, MEFK10 und MEFK11 (siehe Abb.17A+B) weisen gleich starke Signale mit ebenfalls genauer Grösse von 50kDa auf. Die in Abb.17A+B dargestellten Western Blot-Analysen belegten somit, dass der AP-2 $\alpha$  Spiegel in den vergleichenden Proteinextrakten der induzierten und nicht-induzierten Zellklone keine signifikanten Unterschiede aufzeigt. Als Positivkontrolle wurde mit Hilfe des TNT<sup>®</sup> Quick coupled transcription / translation System

der Firma Promega (Mannheim) (II.2.14) *in vitro* translatiertes AP-2 $\alpha$  Protein, ausgehend von dem Konstrukt pCMXpl2\_hAP-2, synthetisiert und wies eine Bande bei richtiger Grösse von 50kDa auf. Die aus den HeLa Zellen gewonnenen Proteinextrakte diente aufgrund des vorhandenen hohen endogenen AP-2 Spiegels in HeLa Zellen WILLIAMS *et al.*, 1988), neben dem *in vitro* Translatat als zusätzliche Positivkontrolle. In beiden Abb.17A und Abb.17B zeigte sich ein starkes Signal mit der erwarteten Grösse von 50kDa.

Zur Kontrolle der Ladungsverhältnisse der einzelnen Proteinextrakte wurde ein Nachweis für das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Die Detektion von  $\beta$ -Aktin zeigte deutlich gleich starke Signale in allen Proteinfractionen und konnte somit eine gleichmässige Beladung bestätigen, was zudem die Stabilität des AP-2 $\alpha$  Spiegels unterstreicht.

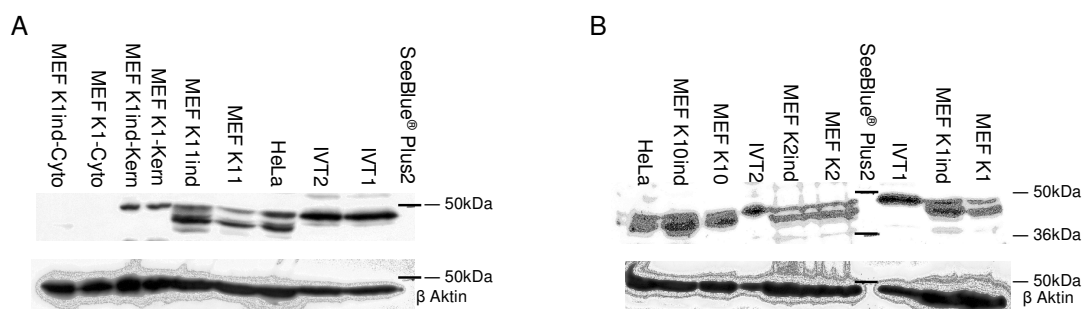


**Abb.17: Western Blot-Analyse zum Nachweis des AP-2 $\alpha$  Spiegels aus den stabil transfizierten MEF Klonen**

Gesamt-Proteinextrakte wurden aus einzelnen stabil transfizierten MEF Zellklonen isoliert (II.3.1), auf ein reduzierendes, 10% SDS-PAA-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen (II.3.5). Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen anti-AP-2 $\alpha$  Serum (Santa Cruz Biotechnology, California (USA)) als primären Antikörper und einem sekundären, HRP-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper. Die Signalentwicklung erfolgte nach Zugabe der Chemilumineszenz-Substratlösungen (II.3.5.2) mit einer Belichtungszeit von 30s.

**A:**

- Spur 1: 16 $\mu$ l Cytoplasma-Proteinextrakt von MEFK1ind
- Spur 2: 16 $\mu$ l Cytoplasma-Proteinextrakt von MEFK1 (nicht induziert)
- Spur 3: 16 $\mu$ l Kern-Proteinextrakt von MEFK1ind
- Spur 4: 16 $\mu$ l Kern-Proteinextrakt von MEFK1 (nicht induziert)

Spur 5: 16µl Proteinextrakt von MEFK11ind  
Spur 6: 16µl Proteinextrakt von MEFK11 (nicht induziert)  
Spur 7: 16µl Proteinextrakt von HeLa Zellen  
Spur 8: Positivkontrolle II: 5µl *in vitro* translatiertes AP-2α Protein  
Spur 9: Positivkontrolle: 5µl *in vitro* translatiertes AP-2α Protein  
Spur 10: SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Proteinstandard (Auftragevolumen: 7µl)

**B:**

Spur 1: 16µl Proteinextrakt von HeLa Zellen  
Spur 2: 16µl Proteinextrakt von MEFK10ind  
Spur 3: 16µl Proteinextrakt von MEFK10 (nicht induziert)  
Spur 4: Positivkontrolle II: 5µl *in vitro* translatiertes AP-2α Protein  
Spur 5: 16µl Proteinextrakt von MEFK2ind  
Spur 6: 16µl Proteinextrakt von MEFK2 (nicht induziert)  
Spur 7: SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Proteinstandard (Auftragevolumen: 7µl)  
Spur 8: Positivkontrolle I: 5µl *in vitro* translatiertes AP-2α Protein  
Spur 9: 16µl Proteinextrakt von MEFK1ind  
Spur 10: 16µl Proteinextrakt von MEFK1 (nicht induziert)

Die Detektion des Haushaltsgens β-Aktin diene als Kontrolle für die Ladeverhältnisse der Proteinextrakte (Expositionsende: nach 10s)

Zusammenfassend ermöglichte das Ergebnis der Western Blot-Analyse die Aussage, dass eine Überexpression von Mehmet keinen Einfluss auf die Stabilität des endogenen AP-2α Spiegels in den Zellen zeigt und somit eine mögliche Degradation von AP-2α nicht nachgewiesen werden konnte. Die Idee einer degradierenden Funktion von Mehmet konnte dadurch vorerst widerlegt werden und so wurden Hinweise auf verändertes Proliferations- und Apoptoseverhalten untersucht.

### III.4.5 Proliferations- und Apoptosetests

Zur weiteren Erörterung der Frage nach einer möglichen Funktion des Mehmet-Proteins und seiner Rolle bei physiologischen Aspekten wurde die Wirkung einer Überexpression von Mehmet auf das Wachstum und die Absterberate von murinen embryonalen Fibroblasten überprüft. Dazu wurden zwei colorimetrische Experimente zur Quantifizierung der Zellproliferation bzw. des Zelltodes durchgeführt. Ergänzend zum Nachweis der Apoptose wurde eine Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS)-Analyse eingesetzt.

#### III.4.5.1 Proliferationstest : WST-1

Im Falle der Bestimmung der Zellproliferation und Zellvitalität wurde das von Roche (Mannheim) erhältliche WST-1 Zellproliferations-Reagenz eingesetzt. Der Grad des WST-1 Umsatzes ist ein Mass für die Lebensfähigkeit der Zelle. WST-1 ist ein Tetrazolium Salz, das durch das „succinat-tetrazolium-reductase“ System zu Formazan gespalten werden kann. Dieses System, das zu der Atmungskette der Mitochondrien gehört, ist nur in metabolisch intakten Zellen aktiv. Ein Ziel dieses Versuches war es, einen möglichen Unterschied in der Proliferation von Mehmet exprimierenden und Mehmet nicht-exprimierenden Zellen nachzuweisen. In einem weiteren Aspekt sollte die Auswirkung einer physiologischen Stresssituation im Vergleich zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellklonen beurteilt werden. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen, sowohl 0,5% FKS als auch 10% FKS, kultiviert. Für das Experiment wurden verschiedene Zellzahlen der einzelnen MEF Klone gemäss den Angaben im Methodenteil dieser Arbeit behandelt. Die gezeigten Ergebnisse beziehen sich im Folgenden auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^4$  Zellen und repräsentativ für alle anderen stabilen MEF Klone werden die Resultate des stabilen MEF Klons MEFK1 und MEFK1ind gezeigt. Als Kontrollansatz wurden die Zellen der untransfizierten MEF Tet-Off™ Zelllinie verwendet. Das Diagramm (Abb.18) zeigt in allen drei Ansätzen und bei beiden Serumkonzentrationen eine wachsende Proliferationsrate bei laufender Inkubationszeit. So steigen die Werte von MEFK1ind beispielhaft von 0,216 (30min) auf 0,334 (4Stunden), was einer Zuwachsrate von etwa 35% entspricht. Innerhalb der drei beteiligten Zellklone lassen sich beim Einsatz von 0,5% und 10% FKS über die gesamte Inkubationszeit bei beiden Konzentrationen nahezu gleiche Werte erkennen. MEFK1 zeigt nach 60min sowohl bei 0,5%, als auch bei 10% FKS einen Wert von 0,245. Dieser divergiert auch nach 4Stunden nur unwesentlich zwischen 0,341 (10%FKS) und 0,336 (0,5% FKS). Desweiteren kann kein signifikanter Unterschied bezüglich des Proliferationsverhaltens aufgrund der regulierbaren Proteinexpression von Mehmet bei MEFK1 und MEFK1ind festgestellt werden. Wie aus dem Diagramm ersichtlich ist,

wachsen die WST-1 Werte innerhalb der Messzeiten bei den Mehmet exprimierenden, als auch Mehmet nicht-exprimierenden Zellen von 0,21 (30min) auf 0,34 (4Stunden) an. Hinzu zeigen die Werte des Kontrollansatzes vergleichbare Ergebnisse wie die der induzierten und nicht-induzierten Zellen. Das Resultat bestätigt zudem, dass die Zugabe von Hygromycin und Doxycyclin, die bei MEFK1 und MEFK1ind eingesetzt werden, keinen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten der jeweiligen Zellen hat.

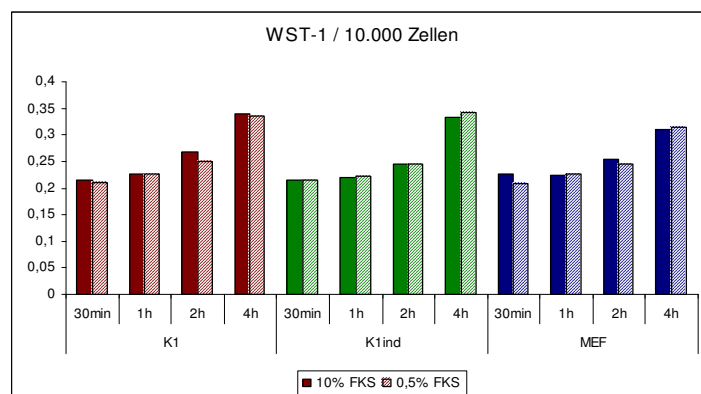


**Abb.18: Vergleich der WST-1 Werte von MEFK1, MEFK1ind und MEF Tet-Off™ Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten**

1x 10<sup>4</sup> Zellen wurden pro well in 6-well Platten mit 0,5% bzw. 10% FKS im Medium ausgesät und ü.N. bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor Zugabe von 10% des WST-1 Reagenz wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden 30min bis 4Stunden bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und jeweils nach Inkubationsablauf je 100µl Überstand in 96-well Platten überführt. Der Überstand wurde mit Hilfe eines Mikroplatten-Lesegerätes (Bio-Tek Instruments, Vermont (USA)) bei einer Wellenlänge von 450nm colometrisch erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte. gefüllte Balken: 10% FKS; gestreifte Balken: 0,5% FKS

Aufgrund dieser Ergebnisse kann festgehalten werden, dass weder das Fehlen, noch die Existenz der Mehmet-Expression und weder 10% FKS, noch 0,5% FKS einen signifikanten Unterschied in der Proliferationsrate der entsprechenden Zellen bewirkt.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Selektions- und Induktionsantibiotika in diesem Fall keinen Einfluss auf die Zellproliferation

hat. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass Mehmet die Proliferation der murinen embryonalen Fibroblasten nicht beeinflusst.

#### III.4.5.2 Apoptosetest : LDH

Mit dem Gebrauch eines „cytotoxicity detection kit“ (Roche, Mannheim) kann die Abgabe des cytoplasmatischen Enzym Laktat-Dehydrogenase vom Cytosol geschädigter Zellen in den Zellkultur-Überstand spektrophotometrisch gemessen werden. Wie zuvor im Proliferationsversuch beschrieben, sollte auch hier der Vergleich zwischen induzierten und nicht-induzierten und mit 0,5% und 10% FKS kultivierten Zellen untersucht werden. Es sollte die Apoptoserate, gemessen an der Schädigung der Plasmamembran und colorimetrisch bewertet durch die Katalyse des Tetrazolium Salzes INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyltetrazolium Chlorid) bestimmt werden.

Die Untersuchungen wurden mit unterschiedlichen Zellzahlen der gesamten stabilen MEF Klone wie unter den in Abschnitt II.4.4.2 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Bei den hier gezeigten Resultaten wurde exemplarisch eine Zellzahl von  $1 \times 10^4$  Zellen und der induzierbare MEF Klon MEFK1 und MEFK1ind stellvertretend für alle anderen stabil transfizierten MEF Klone dargestellt. Zellen der MEF Tet-Off™ Zelllinie dienten als Kontrollansatz. Hinsichtlich der Messwerte (Abb.19) lassen sich folgende Aussagen treffen: es fällt auf, dass die Laktat-Dehydrogenase Aktivität bei der Behandlung der Zellen mit 0,5% FKS deutlich geringer ist, als bei der Zugabe von 10% FKS. Beispielsweise lässt sich eine Differenz von etwa 80% Aktivität zwischen 0,5% und 10% FKS an Tag 2 beim Klon MEFK1 erkennen. Einen Aktivitäts-Unterschied von annähernd 70% findet man an Tag 7 beim Klon MEFK1ind. Da Wachstumsfaktoren u.a. die Differenzierung von Zellen modulieren, könnte der Zusatz von geringfügigeren Wachstumsfaktoren veränderte Vorgänge steuern und dadurch eine niedrigere Apoptoserate bewirken.

Im Vergleich zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen bei normalen Kulturbedingungen (10%FKS) zeigten die Messwerte, dass die Apoptoserate innerhalb der Inkubationszeit beim nicht-induzierten Klon MEFK1 de facto etwas höher lag, als die der induzierten Zellen, was durch die Doxycyclin-Zugabe begründet werden könnte und um etwa 20% zunahm. Ähnliche Resultate (22% Apoptosesteigerung) wurden auch bei den Kontrollzellen gemessen. Hingegen beim induzierten Klon MEFK1ind konnte während der Messzeit eine nahezu 40% Zunahme der Lactat-Dehydrogenase Aktivität festgestellt werden (Tag 1: 1,289; Tag 7: 2,03). Bei der Kultivierung der Zellen mit 0,5% FKS verringerte sich die Differenz der Apoptoserate zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen von 20% auf 10%. Zusammenfassend lassen die Werte keinen wirklich signifikanten Unterschied bezüglich des Apoptoseverhaltens aufgrund der regulierbaren Proteinexpression von Mehmet bei MEFK1 und MEFK1ind zu.

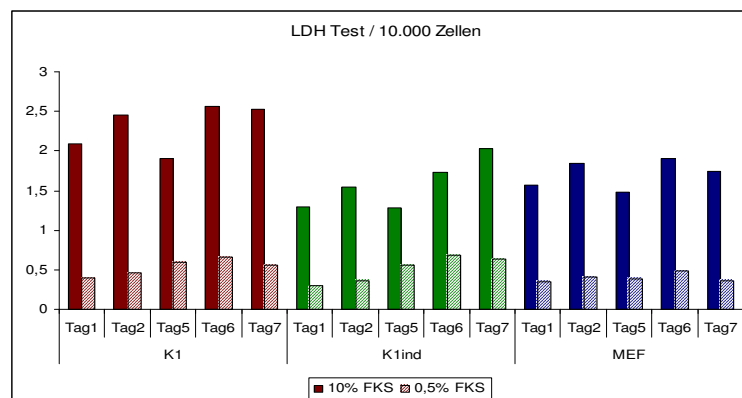


**Abb.19: Vergleich der LDH Werte von MEFK1, MEFK1ind und MEF Tet-Off™ Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten**

Es wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro well in 6-well Platten ausgesät, ü.N. bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und schließlich das Kulturmedium durch neues Medium mit zwei verschiedenen FKS-Konzentrationen (0,5% und 10% FKS) ausgetauscht. Die Zellen wurden 1 bis 7 Tage bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und jeweils nach Inkubationsende 100µl vom Überstand in 96-well Platten überführt. Zur Herstellung der Substratlösung wurden 250µl Katalysator zu 11,25ml Färbelösung hinzugegeben, 1:1 mit dem Überstand gemischt und 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Farbumschlag der Substratlösung im Mikroplatten-Lesegerätes (Bio-Tek Instruments, Vermont (USA)) bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte. gefüllte Balken: 10% FKS; gestreifte Balken: 0,5% FKS

Die Ergebnisse des LDH-Testes zeigten im Gesamten, dass sich auch im Apoptoseverhalten die Mehmet exprimierenden Zellen von den Mehmet nicht-exprimierenden Zellen nicht signifikant unterscheiden. Die minimalen Differenzen in der Zunahme der Lactat-Dehydrogenase Aktivität zwischen beiden Zelltypen sollten in weiteren Versuchen zur Detektion des Apoptoseverhaltens mit Hilfe der FACS-Analyse kontrolliert werden.

#### III.4.5.3 FACS-Analyse

Um die Ergebnisse des LDH-Testes zu bestätigen oder zu widerlegen, wurde eine Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS)-Analyse mit den stabilen MEF Klonen durchgeführt. Hierzu sollten die Zellen, die sich im Apoptose-Stadium befinden, mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen und verglichen werden.

Der Prozess der Apoptose ist gezeichnet von verschiedenen morphologischen Merkmalen, wobei der Verlust der Plasmamembran zu den frühesten zählt. Dabei wird das membranäre Phospholipid Phosphatidylserin (PS) in den extrazellulären Raum abgegeben. Annexin V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, das Zellen, die Phospholipid Phosphatidylserin exponieren, bindet. Für die FACS-Analyse wurde eine Phycoerythrin (PE)-konjugierte Annexin V Antikörperlösung eingesetzt und zusätzlich ein sogenannter Vitalitätsfarbstoff 7-Amino-actinomycin D (7-AAD), als Gegenprobe verwendet. So lassen sich leicht apoptotische Zellen identifizieren, nämlich solche Zellen die Annexin V positiv und 7-AAD negativ sind.

Die Versuche zur Detektion von apoptotischen Zellen wurden mit allen stabilen MEF Klonen entsprechend der unter II.4.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Die folgenden Ergebnisse zeigen beispielhaft die Resultate des induzierbaren MEF Klon MEFK1 und MEFK1ind. In den Abbildungen (Abb.20 AI-BII) ist der Bereich gekennzeichnet, der ein sogenanntes „gate“ für die Annexin-V positiven und gleichzeitig 7-AAD negativen Zellen darstellt und somit die Region der apoptotischen Zellen festlegt.

In Abb.20A sind die Zellen der beiden Zellklone MEFK1 und MEFK1ind abgebildet, die ohne Zugabe von Camptothecin gemessen wurden.

Camptothecin ist ein Alkaloid, das als DNS Topoisomerase I Inhibitor wirkt und dadurch das Zellwachstum stoppt. Die Darstellung dient als Kontrollansatz und zeigt, dass in dem eingegrenzten Bereich, weder Zellen des nicht-induzierten Klons (MEFK1), noch Zellen des induzierten Klons (MEFK1ind) nachgewiesen werden konnten. Dieser Ansatz zeigt, dass sich ohne Induktion von Apoptose weder Mehmet exprimierende, noch Mehmet nicht-exprimierende Zellen im Apoptose-Stadium befinden und bestätigt somit die Ergebnisse des LDH-Testes.

Nach Induktion von Apoptose beider Zellklone durch Camptothecin wurden die Diagramme der Abb.20B erstellt.

Wie aus den Diagrammen ersichtlich ist, konnte in beiden Fällen (MEFK1 und MEFK1ind) Apoptose induziert werden. Sowohl in Abb.20BI, als auch in Abb.20BII konnten apoptotische Zellen im markierten Bereich detektiert werden. Die Anzahl der apoptotischen Zellen wiesen bei beiden Klonen keinen signifikanten Unterschied in der Reaktionsantwort auf den Apoptosewirkstoff Camptothecin auf.

Hinsichtlich der Ergebnisse lässt sich kein Unterschied in der Sensibilität gegenüber dem Apoptose-Induktor aufgrund der regulierbaren Proteinexpression von Mehmet feststellen, denn weder der induzierte Klon MEFK1ind, zeigte auffällig mehr oder weniger apoptotische Zellen, als der nicht-induzierte Klon MEFK1, noch entgegengesetzt.

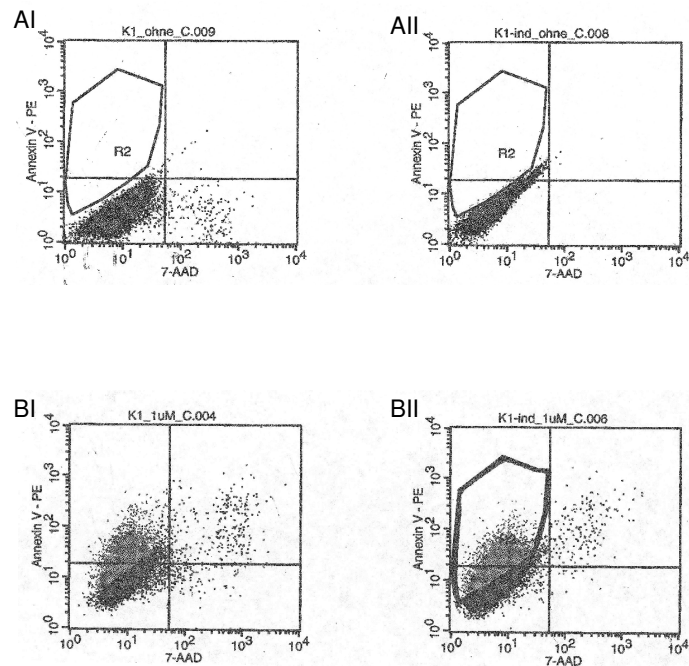


**Abb.20: Vergleich der FACS-Analyse zwischen MEFK1 und MEFK1ind mit und ohne Camptothecin-Behandlung**

MEFK1 und MEFK1ind Zellen wurden mit und ohne 1  $\mu$ M Camptothecin-Lösung 5 Stunden bei 37°C, 99% H<sub>2</sub>O-Sättigung und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, trypsinisiert und 2-3x mit 1x PBS gewaschen. Nach Zentrifugation (8min/1500Upm/RT) wurde das Pellet mit 1x Annexin-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1x Annexin-Puffer mit einer 1:1000 Annexin V-PE Antikörper-Verdünnung aufgenommen. Nach 5minütiger Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen mit einer zweiten Antikörper-Lösung, 7-AAD (1:1000), für weitere 5min im Dunkeln inkubiert, wie beschrieben zentrifugiert und das Pellet in 1x Annexin-Puffer aufgenommen. Die angefärbten Zellen wurden in einem FACSDiVa Option – Scan Gerät (BD Clontech, Heidelberg) analysiert.

**A:** Behandlung der Zellen ohne Camptothecin – I: MEFK1, II: MEFK1ind  
**B:** Induktion von Apoptose durch Camptothecin – I: MEFK1, II: MEFK1ind  
 der eingezeichnete Bereich umfasst die Annexin-V positiven und 7-AAD negativen Zellen (gleichbedeutend mit apoptotischen Zellen)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl Mehmet exprimierende, als auch Mehmet nicht-exprimierende Zellen gleichermassen auf eine Induktion von Apoptose durch Camptothecin reagieren und dabei keine unterschiedlichen Zellzahlen betreffend des Apoptose-Stadiums

nachgewiesen werden konnten. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied im Apoptoseverhalten ohne Camptothecin zwischen induzierten und nicht-induzierten MEF Zellen gezeigt werden. Resultat dieser Experimente ist, dass Mehmet in einem überexprimierenden Zellsystem keine Apoptose bewirkt.

Da entsprechende homologe Gene von Mehmet als auch von AP-2 in *Drosophila melanogaster* identifiziert werden konnten, wollte man mit Hilfe eines einfacheren Organismus und dessen konservierten Signalwegen ebenfalls der Funktionsfrage nachgehen.

### III.5 Struktur- und Funktionsanalyse des *Drosophila* Homologs

Das Mehmet-Protein wurde, wie bereits beschrieben, bei einem Screen für AP-2 interagierende Proteine in der Maus gefunden. Datenbank-Analysen konnten ein hoch konserviertes Mehmet-Gen in *Drosophila melanogaster* identifizieren. Das laut Datenbank gefundene und benannte *Drosophila* Mehmet-Gen CG11033 (GenBank Accession Number NM\_141607), wird im weiteren Textverlauf mit dMehmet bezeichnet. Das zum Maus-Mehmet homologe *Drosophila*-Protein lässt sich ebenfalls in drei Domänen einteilen, wie in Abb.21 schematisch dargestellt ist.

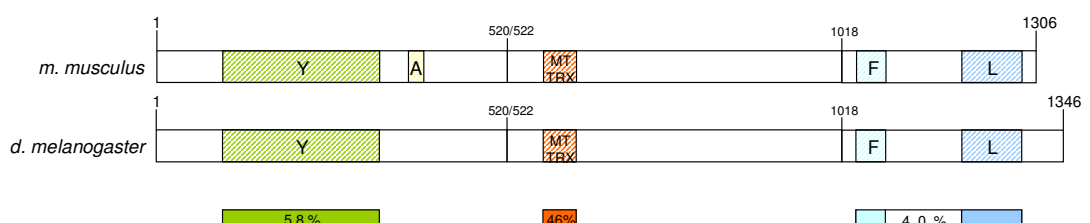


**Abb.21: Homologiestrukturen zwischen Maus-Mehmet-Protein und *Drosophila*-Mehmet-Protein**

Die Mehmet cDNS kodiert für ein Protein von 1306 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von etwa 144kDa, die *Drosophila* cDNS für ein Protein von 1346 Aminosäuren mit einem erwarteten Molekulargewicht von etwa 148kDa. Y: Yeast-Box; A: saure Domäne; MT/TRX: 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferase / *Drosophila* Trithorax Protein; F: F-Box Region, ein Rezeptor-Motiv für den Ubiquitin-Ligase-Komplex; L: Leucin-Repeats

Die Positionen 1, 520/522, 1018 und 1306 bzw. 1346 bezeichnen die Grenzen der drei Domänen und beziehen sich jeweils auf die Aminosäure-Positionen.

Der Amino-Terminus mit den Homologien zu verschiedenen Hefe-Proteinen, die sogenannte Y-Box (Y) zeigt eine 58% Homologie auf Aminosäureebene zwischen beiden Proteinen. Der zentrale Bereich mit den Homologie zur 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferase und dem *Drosophila* Trithorax Protein weist eine 46% Homologie bei beiden Partner auf und im Carboxy-Terminus liegen die Homologiewerte bei 40%.

Da weder das Expressionsmuster, noch die Funktion des *Drosophila* Mehmet-Gens bekannt waren, sollte sich zu Beginn auf die Analyse der Expression von dMehmet in verschiedenen Entwicklungsstadien, sowohl durch Northern Blot-Analysen, als auch durch RT-PCR Experimente, konzentriert werden.

### III.5.1 Northern Blot-Analyse

Die Expressionsstudien des dMehmet-Protein sollten während der einzelnen Entwicklungsstufen von *Drosophila melanogaster* und anhand von Northern Blot-Analysen durchgeführt werden. Ziel dieses Versuches war, neben der Bestimmung der Grösse der mRNA, auch die Existenz des entsprechend grossen Transkriptes in den ausgewählten Stadien nachzuweisen. Es sollte festgestellt werden, wieviel und ob dMehmet-Transkript zu verschiedenen Zeiten der *Drosophila* Entwicklung produziert wird.

Nach Isolierung der Gesamt-RNS von verschiedenen Entwicklungsstadien Embryo, Larve II. und III. Stadium, Puppe und adultes Tier, wurden jeweils 6µg Gesamt RNS unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Hybond-XL-Nylonmembran transferiert und mit einer

$\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dCTP markierten dMehmet-cDNS-Sonde hybridisiert. Der Nachweis der dMehmet-Transkripte mit der entsprechenden Grösse von 4,4kB konnte, wie in Abb.22 mit einem Pfeil gekennzeichnet ist, in der Spur 3 dem Embryo RNS Extrakt durch ein deutliches Signal bestätigt werden. Es konnte kein Signal in den Entwicklungsstadien Larve II. und III. Stadium, Puppe und adultes Tier detektiert werden.

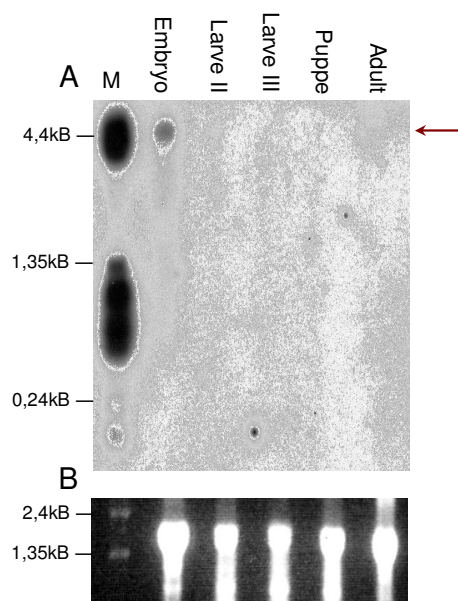


**Abb.22: Northern Blot-Analyse (A) zum Nachweis der Mehmet-Transkripte in verschiedenen Entwicklungsstufen von *Drosophila melanogaster* und Agarosegelelektrophorese (B) der isolierten Gesamt RNS aus Embryo, Larve II. und III. Stadium, Puppe und adultem Tier**

**A:** Die Gesamt RNS-Isolate aus verschiedenen Entwicklungsstufen wurden auf ein denaturierendes 1% Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Nach Immobilisierung der RNS an die Matrix wurde diese mit einer  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  dCTP markierten dMehmet-cDNS-Sonde hybridisiert. Nach fünf Tagen wurde die Belichtung des Röntgenfilmes gestoppt und die Signalentwicklung mit Hilfe des Kodak-Entwickler-Fixierer-System X-omat 100 1 durchgeführt. Die Grössenabschätzung der Signale erfolgte anhand der rRNS Banden des mit Ethidiumbromid gefärbten Gels. Der Nachweis der rRNA diente als Kontrollansatz für die Beladung der RNS-Mengen

**B:** Die Gesamt RNS wurde aus den einzelnen Entwicklungsstufen mit Hilfe des TRIZOL Reagenz isoliert, jeweils 6 $\mu\text{g}$  RNS auf ein denaturierendes 1% Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen, 3½ Stunden bei 80 Volt elektrophoretisch aufgetrennt, die 18S und 28S ribosomale RNS Banden im Ethidiumbromid gefärbten Gel bei einer Wellenlänge von 302nm visualisiert und mit der Geldokumentationsanlage (Intas, Göttingen) fotografiert.

Spur 1: 0.24-9.5 kb 3µl RNS Marker  
Spur 3: 9µl Embryo RNS Extrakt  
Spur 5: 15µl Larve II. Stadium RNS Extrakt  
Spur 7: 4µl Larve III. Stadium RNS Extrakt  
Spur 9: 18µl Puppe RNS Extrakt  
Spur 11: 23µl Adult RNS Extrakt

Die Analyse des Expressionsmusters durch die Northern Blot-Analyse bestätigte ein 4,4kB adäquat grosses dMehmet-Transkript im Embryo. Bereits Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen zeigten ein dominantes, ubiquitäres Signal im Embryo. Um auch Hinweise über das Vorhandensein des dMehmet Transkriptes in den anderen Entwicklungsstadien zu bekommen, wurde die Möglichkeit der reversen Transkription mit anschließender PCR zum Nachweis ausgewählt.

### III.5.2 RT-PCR

Das Ergebnis der Northern Blot-Analyse zeigte ein deutliches Signal des 4,4kB grossen Transkriptes von dMehmet im Embryo. Um das Expressionsmuster in den übrigen Entwicklungsstadien zu komplementieren, wurden die isolierten RNS-Extrakte mit synthetischen Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primern und der reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben und in Amplifikationsreaktionen eingesetzt. Dabei wurde eine Amplifikation der dMehmet Sequenz mit dem Primerpaar dMehmet5 und dMehmet-reverse (II.1.7) durchgeführt und die Reaktionsansätze auf ein 2% Agarosegel aufgetrennt. Die ausgewählte Primerkombination sollte ein Produkt von 270bp amplifizieren. Der Nachweis des Transkriptes aus Gesamt-RNS des Embryos zeigte mit der entsprechenden Grösse von 270bp das stärkste Signal (siehe Abb.23). Vergleichbar schwächere Banden amplifizierter 270bp grosser Fragmente konnten in den RNS-Isolaten aus dem III. Larvenstadium, Puppe und adultem Tier gezeigt werden. Eine Detektion des Transkriptes aus der RNS-Isolierung des II. Larvenstadiums war zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Die Amplifikation des Transkriptes für Aktin5C diente als Kontrolle der gleichmässig eingesetzten cDNS-Mengen.

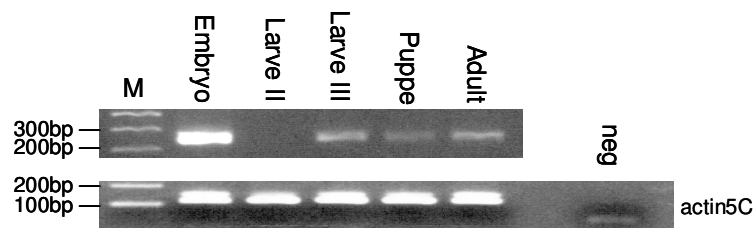


**Abb.23: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der dMehmet mRNA aus der reversen Transkription mit anschließender PCR für die dMehmet Transkripte und für Aktin5C**

Mit Hilfe des TRIZOL<sup>®</sup>-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) wurde aus fünf verschiedenen Entwicklungsstufen von *Drosophila melanogaster* die Gesamt-RNS isoliert, durch das Enzym „Superscript<sup>™</sup> II RNaseH- Reverse Transcriptase“ (Invitrogen, Karlsruhe) in cDNS transkribiert und anschließend in einen PCR-Ansatz sowohl mit Mehmet-spezifischen Primern dMehmet5 und dMehmet-reverse (II.1.7) als auch mit Aktin-spezifischen Primern actin5C5' und actin5C3' (II.1.7) eingesetzt. Zwei Fünftel Volumen des Mehmet PCR-Ansatzes und ein Fünftel Volumen des Aktin PCR-Ansatzes wurden jeweils auf ein 2% Agarosegel aufgetragen, 60min bei 80 Volt elektrophoretisch aufgetrennt, das Ethidiumbromid gefärbte Gel bei einer Wellenlänge von 302nm visualisiert und mit der Geldokumentationsanlage der Firma Intas (Göttingen) aufgenommen. M = Marker (Auftragevolumen: 5µl der 100 base pair DNA ladder der Firma Invitrogen (Karlsruhe))

neg = negativ Kontrolle, hier wurde die Menge an cDNS durch steriles bidest. Wasser ersetzt.

In Konsens mit dem Ergebnis der Northern Blot-Analyse konnte auch durch die RT-PCR der Nachweis der *Drosophila* Mehmet mRNA im Embryo gezeigt werden. Zusätzlich wurden auch Transkripte von dMehmet im Larvenstadium III, der Puppe und im adulten Tier nachgewiesen, wodurch ein durchgehendes Expressionsmuster in nahezu allen Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* erkennbar ist. Diese Ergebnisse stellen eine wichtige Voraussetzung u.a. für transgene Fliegenmodelle dar. So sind Experimente mit Fliegenstämmen z.B.: von *Drosophila* AP-2-Mutanten und dMehmet-Mutanten geplant, deren gewonnenen Erkenntnisse zur besseren Charakterisierung der Genfunktion im Säugersystem genutzt werden können.

### III.6 Herstellung einer AP-2 $\alpha$ überexprimierenden Zelllinie

Neben dem Kernaspekt der Charakterisierung von Mehmet, einem Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$ , sollte eine Zelllinie generiert werden, die ausser der endogenen, auch eine induzierbare AP-2 $\alpha$  Expression aufweisen konnte. Dazu wurde eine murine embryonale Fibroblasten (MEF) Zelllinie ausgewählt, die einen relativ geringen endogene AP-2 $\alpha$  Spiegel besitzt, wie z.B. im Vergleich zu HeLa Zellen, um somit die Identifizierung von AP-2 $\alpha$  abhängigen Genen leichter zu untersuchen. Die stabile Induzierbarkeit der AP-2 $\alpha$  Expression wurde mit Hilfe des Tet-Off™ Systems gewährleistet, wobei zwei verschiedene Selektionsvektoren zum Einsatz kamen.

#### III.6.1 Klonierungsstrategie der Konstrukte pUHD10-3\_HA-AP-2 $\alpha$ und pCMXpl2\_HA-AP-2 $\alpha$

Bei der Etablierung einer AP-2 $\alpha$  überexprimierenden stabilen Zelllinie sollten zunächst ein tetracyclin-abhängiges Epitop-markiertes hAP-2 $\alpha$  Konstrukt hergestellt werden. Ausgehend von der cDNS des humanen Ap-2 $\alpha$  wurde mit Hilfe AP-2 $\alpha$  spezifischer Primer, AP2-Eco-HAfor und AP2-Ecoback (II.1.7) ein modifiziertes AP-2 $\alpha$  Fragment, das über eine *EcoRI* Schnittstelle und einen Epitop-tagHA verfügt, amplifiziert. Der Epitop-tagHA ist ein Epitop im Hämagglutininprotein des humanen Influenzavirus und wurde bereits bei der Erzeugung der Mehmet-überexprimierenden Zelllinie verwendet und lässt sich somit mit einem käuflichen murinen monoklonalen Antikörper HA.11 (Babco, Richmond (USA)) nachweisen.

Dieses modifizierte Ap-2 $\alpha$  Fragment hat mit 445 AS eine Grösse von ca. 49kDa und setzt sich aus dem Epitop-tagHA und der Transaktivierungsdomäne und der DNS-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne der cDNS des humanen AP-2 $\alpha$ , beinhaltet somit das Vollängen-Protein, zusammen.

### III.6.1.1 Konstruktion von pUHD10-3\_HA-AP-2 $\alpha$

Zur Herstellung des Konstruktes pUHD10-3\_HA-AP-2 $\alpha$  wurde das AP-2 $\alpha$ -Fragment als 1352Bp-Fragment aus dem Vektor pCMXpl2\_AP-2 $\alpha$  mittels PCR unter Verwendung der HA-AP-2 $\alpha$  spezifischen Primer AP2-Eco-HAfor und AP2-Ecoback amplifiziert (II.2.9). Das amplifizierte AP-2 $\alpha$ -Fragment wurde isoliert (II.2.8), mit dem Enzym *EcoRI* restringiert (II.2.1) und aufgereinigt (II.2.9.1) in den mit *EcoRI* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pUHD10-3 ligiert (II.2.2). Nach Transformation (II.2.12.2) und Amplifikation des Vektors pUHD10-3\_HA-AP-2 $\alpha$  im *E-coli* Stamm XL-1 Blue sowie anschließender Plasmidisolierung (II.2.13.1) wurde das entstandene Konstrukt über eine Restriktionskartierung kontrolliert.

Die Überprüfung erfolgte durch eine *EcoRI* und *BamHI* Restriktion, wobei im analytischen Agarosegel (II.2.7.1) mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* eine 1352Bp grosse Insert-Bande und eine 3,15kB grosse Vektor-Bande erkennbar waren (siehe Abb.24). Dieses Bandenmuster bewies die Korrektheit des Vektors pUHD10-3\_HA-AP-2 $\alpha$ . Über die Restriktionsschnittstelle *BamHI* wurde ein ca. 900Bp grosses Insert-Fragment und ein 3,6kB grosses Vektor-Fragment in der analytischen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend visualisiert. Das resultierende Bandenmuster bestätigte die Richtigkeit der Insert-Orientierung im rekombinanten Vektor. Desweiteren wurde das Konstrukt mit AP-2 $\alpha$ -spezifischen Primern mittels Sequenzierung verifiziert. Der Leserahmen konnten vollständig gelesen werden, war mit den Original-Sequenzen identisch und wies fehlerfrei den eingebauten Epitop-tagHA auf. Der sich als korrekt erwiesene Vektor pUHD10-3\_HA-AP-2 $\alpha$  wurde abschließend in eine Tet-Off™ MEF Zelllinie transfiziert (II.4.2)

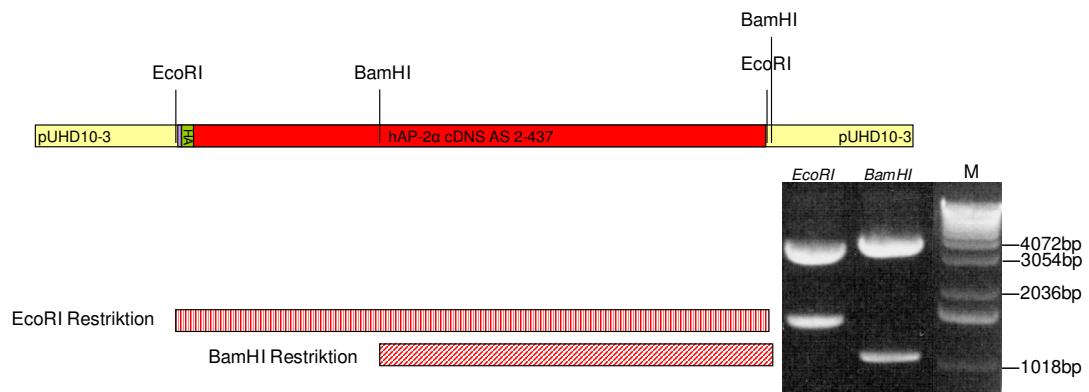


**Abb.24: Schematische Darstellung des pUHD10-3\_HA-AP-2 $\alpha$  Konstruktes und Agarosegelelektrophorese der *EcoRI* und *BamHI* Restriktion**

M = Marker (Auftragsvolumen: 5 $\mu$ l der 1kb DNA ladder der Firma Invitrogen (Karlsruhe))

### III.6.1.2 Konstruktion von pCMXpl2\_HA-AP-2 $\alpha$

Um sicherzustellen, dass der Nachweis der Expression des pUHD10-3\_HA-AP-2 $\alpha$  Konstruktes erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde parallel ein zweites Konstrukt ausgewählt, das als Positiv-Kontrolle in der Western Blot-Analyse eingesetzt werden sollte. Dabei wurde das TNT<sup>®</sup> Quick coupled transcription / translation System der Firma Promega (Mannheim) (II.2.14) verwendet, das eine *in vitro* Transkription und Translation des HA-AP-2 $\alpha$  Fragmentes aufgrund der T7 Promotor-Sequenzen des Vektors zuließ. Ausgehend vom pCMXpl2\_Ap-2 $\alpha$ -Konstrukt wurde in einer PCR mit den Primern AP2-Eco-HAfor und AP2-Ecoback das 1352Bp grosse modifizierte AP-2 $\alpha$  Fragment amplifiziert und isoliert. Mit Hilfe einer *EcoRI* Restriktion wurde das HA-AP-2 $\alpha$  Fragment nachgeschnitten und anschließend aufgereinigt in den vorbereiteten Vektor pCMXpl2 ligiert. Nach erfolgreicher Transformation, Amplifikation und Plasmidisolierung wurde eine Kontrolle des nun vorliegenden Vektors HA-AP-2 $\alpha$  in pCMXpl2 anhand einer *EcoRI* Restriktion durchgeführt. Die in der analytischen Agarosegelelektrophorese aufgetrennten und sichtbargemachten Insert- (1352Bp) und Vektor- (4,5kB) Fragmente bewiesen, dass das Konstrukt bezüglich der Fragmentgrößen richtig war (siehe Abb.25). Im nächsten Schritt wurde der Vektor über die Schnittstelle *BamHI* restringiert, mittels analytischer

Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend das Bandenmuster mit dem etwa 420Bp grossen Insert- und einem 5,4kB grossen Vektor-Fragment visualisiert. Die *Bam*HI Restriktion weist die richtige Orientierung des Inserts im Vektor. Mit Hilfe Vektor- und AP-2 $\alpha$  spezifischer Primer wurde das Konstrukt über Sequenzierung vollständig geprüft.

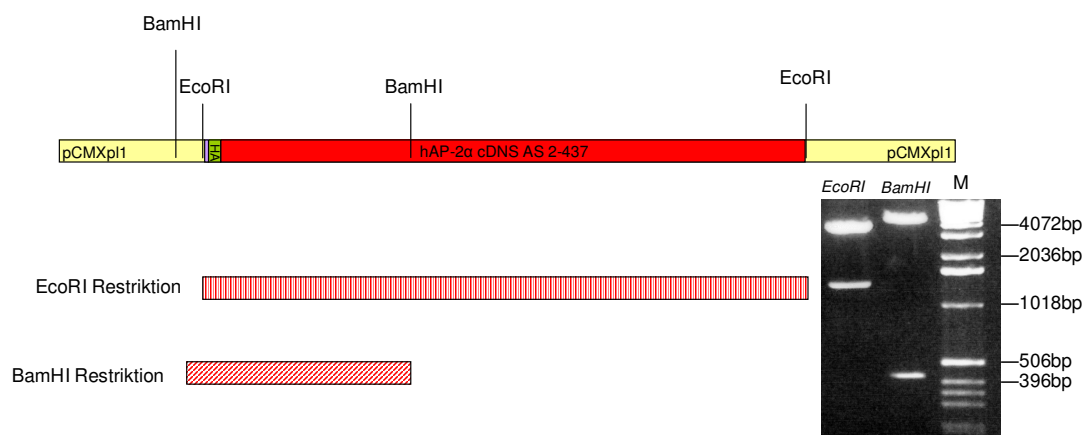


**Abb.25: Schematische Darstellung des pCMXpl1\_HA-AP-2 $\alpha$  Konstruktes und Agarosegelelektrophorese der *Eco*RI und *Bam*HI Restriktion**

M = Marker (Auftragevolumen: 5 $\mu$ l der 1kb DNA ladder der Firma Invitrogen (Karlsruhe))

### III.6.2 Analyse stabiler MEF Transformanden

Für die stabile Transformation der Fibroblasten wurden neben dem Expressionsvektor pUHD10-3\_HA-AP-2 $\alpha$  zwei verschiedene Selektionsvektoren verwendet. Zum einen konnten die stabil transfizierten Zellen über die Zugabe von Puromycin selektiert werden, wobei als Selektionsvektor, der Vektor pSV2-Puro verwendet wurde. Zum anderen verlief die Selektion mit Hilfe von Hygromycin, wenn der Vektor pTK-Hyg kotransfiziert wurde.

Dabei wurden die Zellen unter den in Abschnitt II.4.2 angegebenen Bedingungen transfiziert und folgende Transfektionsansätze durchgeführt:

1. Transfektionsansatz:

Selektion über Puromycin: pUHD10-3\_HA-Ap-2 $\alpha$  + pSV-Puro Expressionsvektor zu Selektionsvektor im Verhältnis 3:1 und im Verhältnis 5:1

Von sechs 10cmØ Platten wurden vier Platten mit einem 3:1 Verhältnis Expressionsvektor zu Selektionsvektor eingesetzt, die restlichen zwei Platten mit einem 5:1 Verhältnis. Als Puromycin-Konzentration wurde 2,0 $\mu$ g/ml ausgewählt, wobei insgesamt drei Platten mit bzw. ohne Doxycyclin [1 $\mu$ g/ml] behandelt wurden.

2. Transfektionsansatz:

Selektion über Hygromycin: pUHD10-3\_HA-Ap-2 $\alpha$  + pTK-Hyg Expressionsvektor zu Selektionsvektor im Verhältnis 3:1 und im Verhältnis 5:1

Dieser Ansatz wurde entsprechend dem 1. Transfektionsansatz durchgeführt mit einer Hygromycin-Konzentration von 200 $\mu$ g/ml.

Die beim ersten Transfektionsansatz entstandenen Klone wurden als Gesamt-Proteinextrakte auf ein reduzierendes 10% SDS-PAA-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Detektion wurde der murine monoklonale Antikörper HA.11 und der POD-konjugierte Ziege-anti-Maus Antikörper verwendet. Da die Western Blot-Analyse keine eindeutigen Beweise für die Expression des AP-2 $\alpha$  Proteins zeigen konnten, wurden Zellextrakte zur Isolierung der Gesamt-RNS angesetzt. Zum Zeitpunkt der Fertigung dieser Arbeit wurden die Experimente weiterhin durchgeführt.

## IV. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur und Funktion eines neuen Interaktionspartners des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  untersucht. Die durch einen Far-Western-Screen identifizierte partielle cDNA des potentiell mit AP-2 $\alpha$  interagierenden Protein, wurde genutzt um das Volllängen Protein zu isolieren. Der offene Leserahmen kodiert für ein Protein mit 1306 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 144kDa. Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz des isolierten Klons weist signifikante Homologien zu 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferasen und zum *Drosophila* Trithorax Protein auf, was zur Namensgebung Mehmet (Protein containing **Me**CP-1 homology region similar to DNA-**Me**thyltransferase and mammalian Trithorax proteins) führte.

### IV.1 Expressionsmuster, Interaktion und Kolokalisation von Mehmet und AP-2 $\alpha$

Durch Northern Blot-Analysen und RT-PCR Methoden konnte eine Koexpression von AP-2 $\alpha$  mRNS und Mehmet mRNS gezeigt werden. So konnte eine Expression von Mehmet auch in den Hauptexpressionsorten von AP-2 $\alpha$ , Gehirn und Niere, nachgewiesen werden. Die Überlappung der Expressionsmuster von AP-2 $\alpha$  und Mehmet lässt vermuten, dass die gefundene Interaktion der beiden Partner auch im Organismus von physiologischer Bedeutung sein könnte.

Mit Hilfe von GST Fusionsprotein Interaktionsexperimente wurde die physikalische und direkte Interaktion von Mehmet und AP-2 $\alpha$  bewiesen. Die Zentralkomäne von Mehmet, die einer Proteinregion zwischen AS 522 und 1018 entspricht, vermittelt dabei diese spezifische Interaktion. Dieser Bereich enthält eine Homologie zu 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferasen. Seitens AP-2 $\alpha$  ist die Region der DNS-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne, der Bereich von AS 165 bis AS 437, sowohl notwendig, als auch hinreichend für

die *in vitro* Interaktion.

Desweiteren konnte eine spezifische Interaktion zwischen Mehmet und AP-2 $\beta$  und  $\gamma$  nachgewiesen werden. Sowohl AP-2 $\beta$ , als auch AP-2 $\gamma$  zeigen die charakteristische Domänenstruktur von AP-2 $\alpha$  und sind in der Lage *in vitro* an gleiche DNS-Sequenzen wie AP-2 $\alpha$  zu binden. Neben der gewonnenen Erkenntnis, dass AP-2 $\alpha$  und Mehmet *in vitro* interagieren, konnte weiterhin eine Kolo-kalisation beider Proteine bestätigt werden.

Bei der transiente Kotransfektion von Voll-längen Mehmet cDNS und Voll-längen AP-2 $\alpha$  cDNS in HeLa Zellen, konnte eine deutliche Anreicherung von AP-2 $\alpha$  im Zellkern gezeigt werden. Da Transkriptionsfaktoren DNS-bindende Proteine sind, die positiv oder negativ regulierend auf die Transkription eines oder mehrere Gene einwirken, wird eine Lokalisation dieser „trans-wirkenden“ Faktoren im Zellkern gefordert. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass bei transienter Mehmet-Proteinexpression in Gegenwart von AP-2 $\alpha$  Mehmet in der Lage ist, sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert zu sein.

Parallelen zu dieser funktionellen Interaktion und Lokalisation lassen sich in der Wechselwirkung zwischen Beta-Catenin und dem Lymphocyten-Enhancer-Faktor LEF-1 finden. Während Beta-Catenin, eine Komponente der Zell-Adhäsions-Maschinerie, normalerweise im Cytoplasma lokalisiert ist, kommt es bei Koexpression von LEF-1 und Beta-Catenin in Säugetierzellen zur Bildung eines Komplexes und Kolo-kalisation beider Partner im Nucleus (HUBER *et al.*, 1996; BEHRENS *et al.*, 1996).

Zieht man die Resultate der Strukturanalyse der Mehmet cDNS mit Sequenz- und Homologiestrukturen hinzu, findet man in der zentralen Domäne ein sogenanntes nuclear localization signal (NLS). Proteine, die ein derartiges basisches Kernlokalisationssignal besitzen gelangen durch einen selektiven Mechanismus in den Zellkern. Dabei wird das NLS mit der minimalen Konsensus-Sequenz —Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val— an den Kernporen von einem NLS-bindenden Protein erkannt und es kommt so zur Translokation dieser Proteine (KALDERON *et al.*, 1984).

Dieser Mechanismus der Translokation könnte sich auch zwischen AP-2 $\alpha$  und Mehmet abspielen, indem AP-2 $\alpha$  Mehmet in den Kern zieht. Bleibt die Frage, warum Mehmet nicht vollständig mit AP-2 $\alpha$  im Zellkern kolokalisiert.

Zum einen lässt sich vermuten, dass Mehmet nicht die alleinige Determinante für den Transkriptionsfaktor AP-2 $\alpha$  ist. Verschiedene Untersuchungen belegen, dass AP-2 $\alpha$  mit einer Vielzahl von Proteinen wie c-myc oder Rb direkt interagiert (GAUBATZ *et al.*, 1995; BATSCHE und CREMISI, 1999; WU und LEE, 1998). Zum anderen könnte die Erklärung in den Mengenverhältnissen beider exprimierter Proteine liegen. Obwohl gleiche Mengen an Plasmid-DNS beider Expressionsplasmide eingesetzt wurden, können dennoch unterschiedliche Transfektionseffizienzen für jedes Plasmid auftreten. So könnte beispielsweise eine grössere Menge an Mehmet-Protein im Gegensatz zu AP-2 $\alpha$  vorhanden sein. Wo Mehmet ohne eine gesteuerte AP-2 $\alpha$ -Expression lokalisiert ist, konnten Experimente zur Bestimmung der Lokalisation von überexprimiertem Mehmet-Protein in stabil transfizierten Zellkulturzellen zeigen. Hierbei konnte eine deutliche Verteilung von Mehmet und zwar eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation bei induzierter Mehmet-Expression nachgewiesen werden.

Zur Etablierung der stabilen induzierbaren Mehmet exprimierenden Zelllinie wurden murine embryonale Fibroblasten mit einem sogenannten Tet-Off<sup>TM</sup>-System ausgewählt. Das Tet-Off<sup>TM</sup>-System basiert auf einer kontrollierten Genexpression, bei der durch Bindung eines funktionellen Transaktivators an seinen Operator die Transkription eines benachbarten Gens aktiviert wird. Bei der Generierung der stabilen Zelllinie wurden schliesslich vier Klone ausgewählt, die eine starke Mehmet-Expression aufwiesen. Bei der stabilen Transfektionen beobachtet man, dass die eingebrachte DNS in das Wirtgenom zufällig integriert und mit diesem repliziert, d.h. an die Tochterzellen weitergegeben wird. Die Aktivität von Genen, die durch die fremde DNS in die Zellen gelangt sind, unterliegt hierbei Einflüssen, welche durch die genaue Position der Integrationsstelle, z.B. in aktive oder inaktive Bereichen des Chromatins (Eu- oder Heterochromatin) bestimmt

sind (REUTER und SPIERER, 1992). Einen durch die Lokalisation innerhalb des Genoms zustande kommenden Einfluss auf den Aktivitätsgrad bestimmter Gene wird als positiver oder negativer Positionseffekt bezeichnet (LLOYD *et al.*, 2003).

Das durch solche Positionseffekte bedingte Aktivitätsmuster des Mehmet Gens zeigt sich deutlich in den Ergebnissen der Immunfluoreszenz der stabil transfizierten Zellklone. So findet man bei verschiedenen Zellklonen (z.B. MEF K1 und MEF K11 Daten nicht gezeigt) auch Zell-Populationen mit gering fluoreszierenden Zellen. Das bestätigt, dass die Expression fremder Gene auch bei sonst gleichen Bedingungen aufgrund des Positionseffektes unterschiedlich sein kann. Beispielsweise kann die Fremd-DNS in Euchromatin oder in Heterochromatin und damit in unterschiedlich aktiven Regionen des Chromatins integrieren. Die Integration in Bereiche des Euchromatins verspricht eine hohe Transkriptionsaktivität, wohingegen die Integration in Bereiche des Heterochromatins die Transkription inaktiviert (ZHIMULEV und BELIAEVA, 2003).

## IV.2 Die Mehmet KO Maus

Neben der durch GST Interaktions-Experimenten bestätigten *in vitro* Interaktion von AP-2 $\alpha$  und Mehmet und das mit Hilfe von RNS-Analysen nachgewiesene überlappende Expressionsmuster beider Proteine, ergaben auch Expressionsanalysen von Mehmet durch *in situ* Hybridisierungen während der Mausentwicklung Übereinstimmungen im Verteilungsmuster mit AP-2 $\alpha$ .

Vor allem Orte starker AP-2 $\alpha$  Expression, wie Gesichtsmesenchym, Spinalganglien, Gliedmassen und periphere nephrogene Zone der Niere sind auch Hauptexpressionsorte von Mehmet und lassen somit eine Interaktion *in vivo* zu (MOSEER *et al.*, unveröffentlicht). Um die Bedeutung des Mehmet-Proteins für die Entwicklung und Differenzierung von Organen und eine mögliche Interaktion mit AP-2 $\alpha$  *in vivo* zu studieren, wurden mit Hilfe der „gene targeting“ Technologie das murine Mehmet-Gen inaktiviert.

Zur Zerstörung des Mehmet-Gens wurde eine NTR- $\beta$ -Gal-Neo-Selektionskassette in das Exon 1 des Mehmet-Genlokus inseriert, das für den zentralen Bereich des Mehmet-Proteins kodiert und für die Interaktion mit AP-2 $\alpha$  verantwortlich ist.

Heterozygote Mehmet-Mäuse zeigten einen normalen Phänotyp und waren fertil. Aufgrund der Insertion des  $\beta$ -Galaktosidase Gens in den Mehmet-Genlokus dienten diese Tiere zur genaueren Analyse der Mehmet Expressionsverteilung während der Embryogenese. Neben den bereits beschriebenen gemeinsamen Expressionsmuster von AP-2 $\alpha$  und Mehmet konnten anhand von X-Gal-Färbungen weitere Expressionorte von Mehmet, wie Vorderhirn und Dermatomyotom, die sehr geringe oder keine AP-2 $\alpha$  Mengen exprimieren, gezeigt werden, sodass weitere Interaktionspartner oder Funktionen von Mehmet zu vermuten sind. Homozygote Mehmet-Mutanten hingegen vollendeten die Embryonalentwicklung nicht und starben zwischen Tag 11 und Tag 12. Mehmet defiziente Mäuse zeigen bezüglich der Exenzephalie und den schweren craniofacialen Defekten einen ähnlichen Phänotypen wie homozygote AP-2 $\alpha$  Defektmutanten. Während bei AP-2 $\alpha$  Mutanten nur spezielle von Neuralleisten Zellen gebildete Organstrukturen wie craniale Ganglien und Gesichtsknochen degenerieren (SCHORLE *et al.*, 1996), befällt der massiv auftretende Zelltod bei den Mehmet defizienten Tieren alle strukturierten Zellverbände. Die Exenzephalie umfasst das komplette Gehirn, vom Vorderhirn bis einschließlich der Rhombomeren des Hinterhirns und lässt ein schwammartiges Mesenchym zurück. So lässt sich der Zelltod der homozygoten Mehmet Defektmutanten nicht mit dem apoptotischen Zelltod der AP-2 Mutanten vergleichen. Zudem weisen Mehmet „knock-out“ Mäuse ebenfalls im kompletten Rumpfbereich einen drastischen Zelltod auf, der wahrscheinlich durch eine ungenügende Versorgung des Embryos bedingt sein könnte. Während Wildtyp-Embryonen einen gut vaskularisierten Dottersack besitzen, lassen Mehmet defiziente Embryonen zu diesem Zeitpunkt nur einzelne Blutinseln erkennen.

Stellt sich die Frage, was zu dieser genomischen Instabilität führt und Grund für den massiven Zelltod in den Mehmet defizienten Mäusen sein könnte.

Das mittlere Drittel von Mehmet enthält eine 50 Aminosäuren lange Zinkfinger-ähnliche 5'-Cytosin-DNA-Methyltransferase-Homologieregion (AS 574-623), die nachweislich AP-2 $\alpha$  bindet. Für diese Zinkfinger-ähnliche Domäne, die auch bei Proteinen gefunden wird, die in Chromatinregulation (HRX) und DNA-Methylierung (5'-Cytosin-DNA-Methyltransferasen, MeCP1-Protein) involviert sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Region in der Lage ist, selbst DNS zu binden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Entstehung dieser Domäne mit dem Besitz vom methylierter DNS an der Vertebraten-Invertebraten Grenze einhergeht. DNS Methylierung hat in Vertebraten unter anderem genregulatorische Funktion z.B. bei Allel-spezifischer Genexpression (Imprinting) und transkriptioneller Inaktivierung endogener retroviraler Sequenzen (WALSH und BESTOR, 1999). Eine kausale Rolle für DNA Methylierung bei der Expression gewebespezifischer Gene wird schon lange kontrovers diskutiert. So wird ihr sowohl eine Art Schutzfunktion in der limitierenden Expression von Fremd-DNS und endogenen Transposons, als auch die Regulation der Expression verschiedener Gene, die an der Differenzierung beteiligt sind, zugesprochen (EHRLICH, 2003).

Während die meisten RNA Polymerasen II Transkriptionsfaktoren zu Beginn der Mitose vom kondensierenden Chromatin dissoziieren und während der Mitose im mitotischen Cytoplasma der Zelle lokalisiert sind, besitzt AP-2 $\alpha$  die Eigenschaft, während der gesamten Mitose an Chromatin gebunden zu bleiben (MARTINEZ-BALBAS *et al.*, 1995).

Somit könnte Mehmet über die Zinkfinger-ähnliche Domäne in anderen homologen Proteinen Chromatinassoziation während der Mitose oder sogar AP-2 $\alpha$  Bindung vermittelt. Die Vorstellung, dass über die 5'-Cytosin-DNA-Methyltransferase-Homologieregion eine direkte Bindung an die DNS möglich sein könnte, lässt eine Beteiligung bei der Chromatidenverteilung nicht ausschliessen. Eine fehlerhafte Teilung könnte Ursache für den massiven Zelltod bei Mehmet defizienten Tieren sein.

### IV.3 Mehmet bewirkt keine AP-2 $\alpha$ Degradation

Im Carboxy-Terminus von Mehmet befinden sich zwei Homologie Regionen bestehend aus einer F-Box Region (AS 1038-1082) und einem Leucin-Repeat Motiv (AS 1195-1284). Die F-Box ist ein Rezeptor Motiv für den Ubiquitin-Ligase Komplex, der eine wichtige Rolle im Proteasom-abhängigen Degradationweg spielt. Die Rolle des evolutionär hochkonservierten Proteins Ubiquitin bei der Proteindegredation, sowie die wichtigsten enzymatischen Reaktionen wurden durch biochemische Studien in einem zellfreien System aufgeklärt (HERSHKO, 1996). In diesem System werden Proteine durch kovalente Bindung an das 76 Aminosäure grosse Protein Ubiquitin für den proteolytischen Abbau markiert. Die Ubiquitin-Ligase Reaktion erfordert die nacheinandergeschaltete Aktivität von drei Enzymen. Der C-terminale Glyzin-Rest von Ubiquitin wird in einer ATP-verbrauchenden Reaktion von einem spezifischen Enzym E1 aktiviert. Dabei wird ein intermediäres Ubiquitin-Adenylat gebildet und Pyrophosphat freigesetzt, worauf Ubiquitin in einer Thioester-Bindung an einen Cystein Rest des E1 gebunden wird. Aktiviertes Ubiquitin wird dann auf einem Cystein Rest eines Ubiquitin Träger Protein (Enzym E2) transferiert. In einem dritten Schritt, der von einer Ubiquitin Ligase (E3) katalysiert wird, wird Ubiquitin über seinen C-Terminus in einer Amid-Isopeptid Bindung an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysin-Restes des Substratproteins gebunden. E3 Enzyme scheinen hauptsächlich für die Spezifität der Ubiquitin Substrat Ligation verantwortlich zu sein. Dies wird durch die direkte Bindung an Substratproteinen erreicht, die spezielle Erkennungssignale enthalten. Nach der Bindung des ersten Ubiquitin Moleküls wird durch die Aktivität eines E4 Enzyms in der Regel eine Poly-Ubiquitin Kette gebildet, in der der C-Terminus jedes Ubiquitin Moleküls an einen spezifischen Lysin Rest (meist Lys48) des vorangehenden Ubiquitins gebunden wird. Polyubiquitinierte Proteine werden in der Regel dann in ATP abhängiger Weise durch das 26S Proteasom degradiert. Das 26S Proteasom generiert verschiedene Produkte: freie Peptide, Peptid-Ubiquitin-Konjugate und Poly-Ubiquitin-Ketten.

Aufgrund der Homologie zum F-Box Motiv im C-terminalen Bereich des Mehmet-Proteins, wurde zunächst der Einfluss von Mehmet auf den zellulären AP-2 Spiegel untersucht. Dabei wurden zunächst Experimente mit transient transfizierten HeLa Zellen durchgeführt, die auf eine Degradation des endogenen AP-2 $\alpha$ -Protein hinweisen könnten (WERNER, 1999). Die Verwendung von Expressionsplasmid-Varianten der Mehmet Vollängen cDNS zeigten, dass nur eine intakte F-Box Region im Mehmet-Protein zur beschriebenen Degradation von AP-2 $\alpha$  durch Mehmet führt. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass durch die Behandlung der Zellen mit MG132, einem Proteasom-Inhibitor, eine partielle Inhibition des AP-2 $\alpha$  Verlustes erzielt werden konnte. Die Tatsache, dass der Proteasom-Inhibitor MG132 nur partiell den Mehmet-vermittelten AP-2 $\alpha$  Abbau blockiert ist unter Umständen darauf zurückzuführen, dass MG132 ein reversibler Inhibitor des Proteasom ist und eine Rest-Proteasom-Aktivität verbleibt, die für den AP-2 $\alpha$  Abbau verantwortlich ist. Für die AP-2 $\alpha$  Transkription wurde gezeigt, dass diese selbst abhängig von AP-2 $\alpha$  ist und damit einer positiven Autoregulation unterliegt (IMHOFF *et al.*, 1999). Da in den beschriebenen Experimenten ein Mehmet Expressionsplasmid transient in HeLa Zellen transfiziert wird und MG132 erst 24Stunden nach Beginn der Transfektion zugegeben wird, ist es denkbar, dass AP-2 $\alpha$  Protein bereits bei Zugabe des Inhibitors degradiert ist und wegen des autoregulatorischen Loops nicht mehr in entsprechender Menge gebildet wird. Da Zeitverlaufexperimente bei transienten Transfektionen schwierig durchzuführen sind, wurde eine mit einem induzierbaren Mehmet-Konstrukt stabil transfizierte Zelllinie hergestellt. Hierbei sollte zunächst die degradierende Wirkung von Mehmet auf die endogene AP-2 $\alpha$  Expression überprüft und bei Bestätigung detaillierte Experimente zur Abbaukinetik durchgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Mehmet in stabil transfizierten murinen Fibroblasten keinen Einfluss auf den endogenen AP-2 $\alpha$  Spiegel hat und somit konnte eine mögliche Degradation von AP-2 $\alpha$  durch überexprimiertes Mehmet-Protein nicht nachgewiesen werden. Ergänzend dazu konnte auch in stabil transfizierten HeLa Zellen, die

ebenfalls Mehmet überexprimieren, kein durch Mehmet bewirkter AP-2 $\alpha$  Abbau nachgewiesen werden (HILGER-EVERSHEIM, unveröffentlicht). Bleibt die Frage, ob AP-2 $\alpha$  nicht dennoch ein potentielles Substrat für Mehmet darstellen kann. Bisherige Untersuchungen zur Proteinstabilität stellten fest, dass Voraussetzung für eine Markierung mit Ubiquitin durch den SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex eine vorangehende Phosphorylierung des Zielproteins ist, was für das AP-2 $\alpha$  Protein *in vitro* gezeigt werden konnte (GARCIA *et al.*, 1999). Untersuchungen an Transkriptionsfaktoren von Hefe belegen, dass die Ubiquitinylierung von Zielproteinen nicht notwendigerweise deren Degradation zur Folge haben muss. So konnte eine Inhibition der transkriptionellen Aktivierung nach Ubiquitinylierung beobachtet werden (KAISER *et al.*, 2000). Diese Hemmung der Transaktivierung könnte durch Störung bei der Formierung von aktiven Proteinkomplexen an der DNS hervorgerufen werden. So könnte Mehmet eine Komponente eines AP-2 $\alpha$  enthaltenden Proteinkomplex darstellen und möglicherweise an der Regulation der AP-2 $\alpha$  Aktivität durch Störung bei der Formierung von Proteinkomplexen beteiligt sein.

#### IV.4 Proliferations- und Apoptoseverhalten

Die Ergebnisse der murinen Defektmutanten des Mehmet-Gens zeigten, wie bereits beschrieben, starken auftretenden Zelltod nicht nur im Gehirn, sondern auch im kompletten Rumpfbereich der Mehmet defizienten Tiere. Gründe für diese massive Apoptoserate lassen sich in der möglichen Beteiligung von Mehmet an der Separierung und Verteilung der Chromatiden während der Mitose vermuten. Ob ähnliche Beobachtungen auch in einem Mehmet überexprimierenden System gefunden werden konnten, sollten Wachstums- und Apoptose-Experimente mit Hilfe colorimetrischer Test und FACS-Analysen klären. Sowohl Versuche zur Bestimmung der Zellproliferation und Zellvitalität (anhand von WST-1 Tests), als auch Versuche zum Nachweis der Apoptoserate (mit Hilfe von LDH- und FACS-Analysen) konnten erstens nachweisen, dass eine regulierbare Mehmet

Expression keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferations- bzw. Apoptoserate hat. Desweiteren zeigte eine induzierte Stresssituation durch Reduzierung der Serumskonzentration von 10%FKS auf 0,5%FKS keinen signifikanten Unterschied in der Proliferations- bzw. Apoptoserate. Auch die Zugabe von Selektions- und Induktionsantibiotika (Hygromycin und Doxycyclin) hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstums- bzw. Absterbeverhalten, sowie bei der Induktion von Apoptose durch Camptothecin (ein DNS Topoisomerase I Inhibitor) reagierten Mehmet exprimierende, als auch Mehmet nicht-exprimierende Zellen gleichermassen bezüglich der in Apoptose befindlichen Zellzahl.

Durch die Generierung eines transgenen Zellmodells, wo eine regulierbare Überexpression von Mehmet gelang, konnte nicht der gleiche Effekt erzielt werden, wie bei den Mehmet defizienten Tieren, bei denen der Mehmet Genlokus zerstört wurde.

Werden beide Situationen, überexprimierte Zelllinie und „knock-out“ Maus, gegenübergestellt, so muss konstatiert werden, dass im Falle der generierten Zelllinie das Mehmet-Protein überexprimiert wird und auf seiten der Maus-Mutante ein disruptiertes und somit nicht exprimiertes Mehmet-Protein „vorhanden ist“. Feststeht, dass eine Überexpression von Mehmet weder den Abbau von AP-2 $\alpha$  bewirkt, noch einen Einfluss auf die Proliferation und Apoptose der Zellen hat. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint der Einfluss des Mehmet-Proteins bei fehlender Existenz weitaus grösser und relevanter zu sein, als bei Überexpression des Proteins.

Die Strukturanalyse der Mehmet cDNS konnte, wie bereits beschrieben, im zentralen Bereich (AS 522-1018) des Proteins Homologie-Sequenzen zu 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferasen nachweisen. Aufgrund dieser Homologie zu Methyltransferasen, lassen sich womöglich Parallelen zu den um 1996 erstmals beschriebenen Ubiquitin-ähnliche Proteine ziehen (BAGCHI *et al.*, 1996; SHEN *et al.*, 1996).

SUMO-Peptide regulieren verschiedene zelluläre Prozesse, wie Transport in den Nucleus, Signaltransduktion, Stressantworten und den Verlauf des

Zellzyklus (MÜLLER *et al.*, 2001). SUMO-Peptide sind ubiquitin-verwandte Modifikationen, die im Gegensatz zur Ubiquitinylierung keine Degradation des Zielproteins bewirken, sondern dessen Stabilität steigern oder dessen zelluläre Entwicklung modulieren.

Die enzymatische Maschinerie der Sumoylierung ist die der Ubiquitinylierung sehr verwandt (man verwendet die gleiche Nomenklatur für die beteiligten Enzyme). So erfordert auch die SUMO-Konjugation eine aufeinanderfolgende Aktivität von Enzymen. Die enzymatische Kaskade benötigt sowohl SUMO-spezifische heterodimere E1-Enzyme, als auch ein einzelnes Typ E2 Enzym (Ubc9). Während bei der Ubiquitin-Ligase Reaktion, eine Ubiquitin-Ligase (E3) für die Substraterkennung und die Bildung einer Isopeptid Bindung zwischen Ubiquitin und dem Zielprotein notwendig ist, scheint bei der Sumoylierung die Aktivität von Ubc9 ausreichend zu sein. Hefe „Two Hybrid Screens“ konnten zeigen, dass Ubc9 mit allen bislang bekannten SUMO Substraten interagiert (SCHMIDT und MÜLLER, 2002). Zurückkommend auf die möglichen Analogien zu Mehmet, könnte man sich vorstellen, dass durch die Homologie zu 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferasen im Mehmet-Protein zum einem Parallelen zur Funktionsweise dieser Zinkfinger-ähnlichen Domäne, zum anderen aber auch Affinitäten zu Methyltransferasen bestehen. Diese Affinitäten könnten möglicherweise eine Modulation bewirken. So konnten Experimente von LING *et al.* (2004) zeigen, dass Sumoylierung der DNS Methyltransferase Dnmt3a die Interaktion mit der Histon Deacetylase HDAC1/2 verhindert. Ausserdem konnte nachgewiesen werden, dass unter Bedingungen, die zu einer Steigerung der Sumoylierung führen, es zu einer Inhibition der Transkriptionsrepression durch Dnmt3a kommt.

Während DNS Methyltransferasen eine entscheidene Rolle in der embryonalen Entwicklung, der genomische Prägung, die eine gezielte bevorzugte Expression bestimmter Gene bewirkt, und dem „transcriptional silencing“ spielen, sind Topoisomerasen wichtige Enzyme bei der Nukleinsäuresynthese und –verarbeitung.

Bei Untersuchungen an *Xenopus* bezüglich des Zellzykluses konnte gezeigt werden, dass Topoisomerase II während der Mitose durch SUMO-Peptide

modifiziert wird. In Kontrollversuchen mit Hilfe von dominant negativen Mutanten des Ubc9-Enzyms konnte keine veränderte Topoisomerase II Aktivität festgestellt werden. Die durch die Mutante bedingte Inhibition der SUMO-Aktivität erhöhte jedoch die Menge an Chromosomen gebundene Topoisomerase II. Zusammenfassend scheint die Konjugation von SUMO-Peptiden eine wichtige Rolle bei der Segregation der Chromosomen zu spielen. Ausserdem wird postuliert, dass die Verbindung der Topoisomerase II ans Chromatin eine Schlüsselrolle für diese Verteilung darstellt (AZUMA *et al.*, 2003).

Die Überlegungen einer direkten Bindung von Mehmet an die DNS aufgrund der zentralen Proteindomäne mit Homologien zu den 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferasen, die überwiegend an CpG Inseln in Genpromotoren binden (MOMPARLER und BOVENZI, 2000), lässt eine Beteiligung Mehmet bei der Separierung von Chromatiden nicht ausschliessen. So könnte auch hier ein Zusammenhang zwischen der möglichen Funktion von Mehmet und der Aktivität der SUMO-Peptide gesehen werden.

#### **IV.5 *Drosophila* Mehmet**

Die Familie der AP-2 Transkriptionsfaktoren ist in Vertebraten und Invertebraten hochkonserviert. Während in der Maus die AP-2 Familie fünf verschiedene Isoformen (AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ ) umfasst, existiert in *Drosophila melanogaster* nur ein homologes AP-2 Gen (BAUER *et al.*, 1998). Im Vergleich der Phänotypen von Maus- und *Drosophila* AP-2 Mutanten lassen sich auffallend starke Ähnlichkeiten feststellen. Parallelen der mutanten Phänotypen erstrecken sich von den Cranofacialdefekten bishin zu den Defekten bei Wachstum von Gliedmaßen in Maus und *Drosophila* (KERBER *et al.*, 2001; MONGE *et al.*, 2001). Dieser Nachweis verleiht AP-2 eine konservierte Rolle während des Entwicklungsprozesses und lässt die Frage aufkommen, wie AP-2 seine Funktion in Zusammenarbeit mit potentiellen Interaktionspartnern erfüllt.

Zur Identifizierung von mit AP-2 $\alpha$  interagierenden Proteinen wurde, wie bereits beschrieben, durch einen Far-Western-Screen das Mehmet-Protein identifiziert. Der homologe Mehmet-Genlokus in *Drosophila melanogaster* konnte durch Datenbank-Analysen gefunden werden und zeigte, dass das *Drosophila* Mehmet Gen CG11033 hochkonserviert und sowohl Expression, als auch Funktion bislang noch unbekannt sind. *Drosophila melanogaster* ist als Organismus besonders geeignet, um die Hierarchie von Proteininteraktionen mit klassischen genetischen Methoden zu charakterisieren. Der Vergleich der vollständig bekannten DNS-Sequenz des *Drosophila*-Genoms mit der von Säugern zeigt nicht nur, dass zahlreiche Signalwege, die Entwicklung und Differenzierung steuern, konserviert sind, sondern, dass die Funktion von Säuger-Genen in *Drosophila* untersucht werden kann. Beispiele dafür sind die Steuerung der *Drosophila*-Augenentwicklung durch das Produkt des menschlichen PAX6-Gens (HALDER *et al.*, 1995) oder die Pathogenese humaner neurodegenerativer Erkrankungen nach Expression von Glutamin„repeat“-Proteinen im Fliegenauge (WARRICK *et al.*, 1998).

So sollte der aufgrund genannter Vorteile gewählte Organismus *Drosophila melanogaster* bei den Untersuchungen, ob und wie Mehmet die AP-2 $\alpha$  Funktion moduliert, von Nutzen sein.

RNS-Analysen von *Drosophila* Mehmet konnten ein deutliches Expressionsmuster in verschiedenen Entwicklungsstadien (Embryo, Larve III. Stadium, Puppe und adultes Tier) von *Drosophila melanogaster* nachweisen. Vergleicht man Expressionsanalysen von *Drosophila* AP-2 und *Drosophila* Mehmet im Embryo, so zeigt sich eine Überlappung der Genexpression im Nervensystem und Kopfbereich. Dieses Resultat lässt Parallelen zum Maus-System zu, dass vermuten lässt, dass beide Proteine während bestimmter Stadien des Entwicklungsprozesses miteinander interagieren. Miteinander korrelieren auch die Expressionsmuster von *Drosophila* AP-2 mRNA und Protein im Embryo. Hauptsächliche Expressionorte sind der ventrale Nervenstrang, der Antennen- und Maxillar-Komplex, die optischen Loben und das sich angrenzende Gehirn. Das wiederum lässt Untersuchungsmethoden bezüglich der Wirkung von *Drosophila* Mehmet auf *Drosophila* AP-2

anschliessen. Dabei können einerseits „loss of function“ Experimente beispielsweise mit generierten P-Element Insertionslinien und andererseits „gain of function“ Versuche mit UAS-Fliegenlinien durchgeführt werden.

## IV.6 Zukunftsperspektiven

Die Struktur- und Funktionsanalyse von Mehmet, einem neuen Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  konnte zeigen, dass eine Mehmet-Expression in Leber, Niere, Gehirn, Hoden, Milz und Herz vorhanden ist, dass Mehmet *in vitro* mit AP-2 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  interagiert und dass Mehmet mit AP-2 $\alpha$  im Nucleus kolokalisiert. Desweiteren wurde nachgewiesen, dass Mehmet keinen Einfluss auf die Stabilität von AP-2 $\alpha$  hat und zudem Mehmet nicht das Proliferation- und Apoptoseverhalten verändert. Überlegungen zu weiteren Untersuchungen finden sich vor allem in der Überprüfung einer Bindung von Mehmet an Chromatinstrukturen und der möglichen Etablierung von Methylierungs-Assays, begründet in der existenten Homologie zu 5' Cytosin-DNS Methyltransferasen im zentralen Teil des Mehmet Proteins.

Der Einfluss der DNS-Methylierung auf die Genexpression lässt sich daran erkennen, dass aktiv transkribierte Gene im Allgemeinen zu einem geringeren Grad methyliert sind als inaktive. Ein weiterer möglicher Einfluss auf die Genregulation ergibt sich aus der Beeinflussung von Protein-DNS-Interaktionen, wenn eine Methylierungsstelle in der Erkennungssequenz eines Transkriptionsfaktors liegt.

Im Projekt „Funktionsanalyse von Mehmet in *Drosophila*“ konnten Untersuchungen zur Expression von dMehmet zeigen, dass ein durchgehendes Expressionsmuster in nahezu allen Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden konnte.

Diese Initialarbeiten lassen weitere Überlegungen und Experimenten, wie Expressionsstudien von dMehmet während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster* mit Hilfe von Immunfärbung an „whole mount“ Embryonen, zu. Desweiteren können genetische Analysen zum Expressionsmuster von dMehmet in AP-2 Mutanten und umgekehrt, sowie Untersuchungen der Expression von dMehmet in AP-2 überexprimierenden Fliegenstämmen und umgekehrt durchgeführt werden.

Die Beobachtungen zum Expressionsmuster von dMehmet während der *Drosophila* Entwicklung sollen dazu dienen, die wechselseitige Interaktion von dMehmet und dAP-2 genauer untersuchen zu können. Für solche biochemischen Untersuchungen ist es wichtig für beide Proteine einen spezifischen Antikörper zu haben. Für dAP-2 gibt es bereits einen von Dr. Bauer hergestellten polyklonalen Antikörper aus Kaninchen, die Erzeugung eines Antiserums gegen das dMehmet-Protein wurde bereits begonnen. In den Expressionsexperimenten kann dann das dMehmet *in situ* Muster während der Embryogenese mit den Antikörperanalysen verglichen werden. Fragen, ob das mRNS-Muster mit dem Proteinmuster übereinstimmt oder ob das dMehmet-Protein zeitlich verzögert im Vergleich zur RNS Synthese gemacht wird, sollen so beantwortet werden.

Die bereits von Dr. Bauer hergestellten transgenen UAS-dAP-2 Fliegenstämmen stehen bereits zu Funktionsanalysen zur Verfügung. Das UAS („upstream activating sequence“)-Element enthält Bindestellen für den Transkriptionsfaktor GAL4. Die gewebespezifische Expression wird durch Kreuzung der UAS-transgenen Fliegen mit einem zweiten Stamm erreicht, der den Transkriptionsfaktor GAL4 unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors exprimiert (BRAND und PERRIMON, 1993). Die ebenfalls mit dem GAL4-UAS-System generierte UAS-dMehmet Fliegenlinie soll nun zur Untersuchung der Funktion von dMehmet während der Entwicklung genutzt werden.

Um die Analyse der Regulation und Interaktion von dMehmet mit AP-2 eingehend untersuchen zu können, sind auch Experimente mit dAP-2- und dMehmet-Mutanten geplant. Neben der für dAP-2 existierenden P-Element Insertionslinie im dAP-2 Locus und Fliegenlinien mit dAP-2 Defizienzen (KERBER *et al.*, 2001), besteht auch für Mehmet eine P-Element Insertion in Exon 2 des Mehmet-Genlokus.

## V. Zusammenfassung

Durch einen Far-Western-Screen wurde ein neues AP-2 $\alpha$  interagierendes Protein identifiziert. Aufgrund von Sequenzhomologien wurde das neue Protein Mehmet (Protein containing **MECP-1** homology region similar to DNS **Methyltransferase** and mammalian trithorax proteins) genannt. Die Klonierung der cDNS zeigte, dass Mehmet ein neuartiges Multidomänenprotein darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zu Beginn Mehmet als neuer Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors AP-2 $\alpha$  mit Hilfe von RNS-Analysen charakterisiert. In Northern Blot-Analysen konnte eine 4,4kB grosses Transkript von Mehmet nachgewiesen werden und somit bestätigt werden, dass die Mehmet cDNS für ein Protein von 1306 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von etwa 144kDa kodiert. Weitere Expressionsanalysen in murinen Geweben konnten eine Mehmet Expression in Leber, Niere, Gehirn, Hoden, Milz und Herz nachweisen. Anhand dieses Expressionsmuster konnte eine Überlappung der Expressionsorte von AP-2 $\alpha$  und Mehmet bestätigt werden. Diese Koexpression von AP-2 $\alpha$  und Mehmet deutet auf eine physiologische Relevanz hin.

In GST Interaktionsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass AP-2 $\alpha$  *in vitro* spezifisch an Mehmet bindet. Die Interaktion wird durch eine Region in der Zentralkomäne (AS 522-1018) vermittelt, die ein Zinkfingermotiv (PHD) enthält. Auf Seiten von AP-2 $\alpha$  ist die DNS-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (AS 165-437) sowohl notwendig, als auch hinreichend für die Interaktion. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Mehmet außerdem mit AP-2 $\beta$  und AP-2 $\gamma$  interagiert.

Da es sich bei Mehmet sonach um einen physiologischen relevanten Interaktor von AP-2 $\alpha$  handelt, sollte durch Immunfluoreszenzstudien die Lokalisation beider Proteine untersucht werden. Es konnte bewiesen werden, dass die Überexpression von Mehmet zu einer cytoplasmatischen Lokalisation führt, wobei die Überexpression von AP-2 $\alpha$  und Mehmet eine erhöhte Lokalisation von Mehmet im Zellkern zeigt.

Um Hinweise bezüglich der Funktion von Mehmet zu finden, wurde mit Hilfe des Tet-Off<sup>TM</sup>-System ein transgenes Zellmodell entwickelt. Die generierten Zelllinien (murine embryonale Fibroblasten, MEF) verfügten über eine regulierbare starke Proteinexpression von Mehmet und zeigt im Gegensatz zu den aus der gezielten Zerstörung des Mehmet-Genlokus entstandenen Mehmet defizienten Mäusen, eine Überexpression des Mehmet-Proteins.

Die im Carboxy-Terminus enthaltene F-Box Homologie legt nahe, dass Mehmet in den SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex inkorporiert werden kann und somit als Spezifitätsfaktor zur Ubiquitylierung und Degradation von AP-2 $\alpha$  beitragen könnte.

Die Beteiligung von Mehmet an einer möglichen Proteasom-vermittelten Degradation von AP-2 $\alpha$  wurde mittels der Mehmet exprimierenden Zelllinien getestet. Western Blot-Analysen zeigten einen konstante AP-2 $\alpha$  Spiegel bei Mehmet überexprimierenden Zellen und konnten nachweisen, dass Mehmet keinen Einfluss auf die Degradation von AP-2 $\alpha$  hat.

Sowohl Experimente zur Bestimmung der Zellproliferation, als auch Versuche zur Apoptoserate konnten keine funktionelle Beeinträchtigung bei Überexpression von Mehmet in den verschiedenen MEF Klonen zeigen. Zusätzlich unterschied sich der Anteil an apoptotischen Zellen der transgenen Zelllinie in induzierten Zellen im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen in der FACS-Analyse nicht. Mehmet verändert somit in dem gewählten Zellmodell weder das Proliferations- noch das Apoptoseverhalten.

Desweiteren wurde im Rahmen der Arbeit die Expression des Mehmet-Homologs in *Drosophila melanogaster* untersucht. Northern Blot-Analysen bestätigten ein 4,4kB adäquat grosses dMehmet-Transkript im Embryo. Zusätzlich wurden auch Transkripte von dMehmet im Larvenstadium III, der Puppe und im adulten Tier durch RT-PCR Experimente nachgewiesen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den RNS-Analysen konnten bereits Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen ein ubiquitäres Signal im Embryo zeigen.

Die mit diesem einfachen und konservierten Organismus gewonnenen Erkenntnisse können zur besseren Charakterisierung der Genfunktion im Säugersystem genutzt werden und hilfreiche Resultate beim Aufschluss zur Funktionsanalyse von Mehmet erzielen.

## VI. Literatur

AUMAN, H.-J., NOTTOLI, T., LAKIZA, O., WINGER, Q., DONALDSON, S., WILLIAMS, T. (2002) Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development. *Development*, **129**(11): 2733-47

AUSUBEL, F.-M., BRENT, R. and KINGSTONE, R.-E. (1994) Current Protocols in Molecular Biology. *Wiley Interscience*, New York.

AZUMA, Y., ARNAOUTOV, A., DASSO, M. (2003): SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J. Cell Biol.*, **163**: 477-487.

BAGCHI, M., ROHER, A.-E., BANNERJEE, A., BARRETT, R., HAZLETT, L.-D., KASUNIC, T., MAISEL, H. (1996): Identification of a ubiquitin-like protein in the mammalian vitreous humor. *J Cell Biochem.*, **61**(1): 26-30.

BAI, C., SEN, P., HOFMANN, K., MA, L., GOEBL, M., HARPER, J.-W., ELLEDGE, S.-J. (1996): SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, **86**(2): 263-74

BATSCHKE, E. and CREMISI, C. (1999): Opposite transcriptional activity between the wild type c-myc gene coding for c-Myc1 and c-Myc2 proteins and c-Myc1 and c-Myc2 separately. *Oncogene*, **18**(41): 5662-71

BAUER, R., MCGUFFIN, M.-E., MATTOX, W., TAINSKY, M.-A. (1998) Cloning and characterization of the Drosophila homologue of the AP-2 transcription factor. *Oncogene*, **17**(15): 1911-22.

BEHRENS, J., VON KRIES, J.-P., KUHL, M., BRUHN, L., WEDLICH, D., GROSSCHEDL, R., BIRCHMEIER, W. (1996): Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, **382**(6592): 638-42.

BERGE-LEFRANC, J.-L., JAY, P., MASSACRIER, A., CAU, P., MATTEI, M.-G., BAUER, S., MARSOLLIER, C., BERTA, P., FONTES, M. (1996) Characterization of the human jumonji gene. *Hum Mol Genet.*, **5**(10): 1637-41.

BIRNBOIM, H.-C. and DOLY, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.*, **7**: 1513-1523

BLACKWELL, T.-K., KRETZNER, L., BLACKWOOD, E.-M., EISENMAN, R.-N., WEINTRAUB, H. (1990): Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science*, **250**(4984): 1149-51.

BOSHER, J.-M., TOTTY, N.-F., HSUAN, J.-J., WILLIAMS, T. and HURST, H.-C. (1996). A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene*, **13**: 1701-1707.

BOSHER, J.-M., WILLIAMS, T., HURST, H.-C. (1995) The developmentally regulated transcription factor AP-2 is involved in c-erbB-2 overexpression in human mammary carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **92**(3): 744-7.

BRAND, A.-H. and PERRIMON, N. (1993): Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**(2):401-15.

- BREWER, S., JIANG, X., DONALDSON, S., WILLIAMS, T., SUCOV, H.-M. (2002): Requirement for AP-2alpha in cardiac outflow tract morphogenesis *Mech Dev.*, **110**(1-2): 139-49
- BUETTNER, R., KANNAN, P., IMHOF, A., BAUER, R., YIM, S.-O., GLOCKSHUBER, R., VAN DYKE, M.-W., TAINSKY, M.-A. (1993) An alternatively spliced mRNA from the AP-2 gene encodes a negative regulator of transcriptional activation by AP-2. *Mol Cell Biol.*, **13**(7): 4174-85
- CHAZAUD, C., OULAD-ABDELGHANI, M., BOUILLET, P., DECIMO, D., CHAMBON, P., DOLLE, P. (1996) AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mech Dev.*, **54**(1): 83-94
- CHEN, C. and OKAYAMA, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**: 2745-2752
- CHIRGWIN, J.-M., PRZYBYLA, A.-E., MACDONALD, R.-J. and RUTTER, W.-J. (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**: 5294-5299
- CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159
- CHOMCZYNSKY, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem.*, **201**: 134-139.
- COLIGAN, J.-E., KRUISBEEK, A.-M. and MARGULIES, D.-H. (1994). Current Protocols in Immunology. Wiley Interscience, New York.
- DAGERT, M. and EHRLICH, S.-D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene*, **6**(1): 23-8.
- DECARY, S., DECESSE, J.-T., OGRYZKO, V., REED, J.-C., NAGUIBNEVA, I., HAREL-BELLAN, A., CREMISI, C.-E. (2002): The retinoblastoma protein binds the promoter of the survival gene bcl-2 and regulates its transcription in epithelial cells through transcription factor AP-2. *Mol Cell Biol.*, **22**(22): 7877-88
- DREYFUSS, G., HENTZE, M., LAMOND, A.-I. (1996) From transcript to protein. *Cell*, **85**(7): 963-72. Review.
- EHRLICH, M. (2003) Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J Cell Biochem.*, **88**(5): 899-910
- ELORANTA, J.-J. and HURST, H.-C. (2002): Transcription factor AP-2 interacts with the SUMO-conjugating enzyme UBC9 and is sumoylated in vivo. *J Biol Chem.*, **277**(34): 30798-804.
- EVAN, G.-I. and LITTLEWOOD, T.-D. (1993): The role of c-myc in cell growth. *Curr Opin Genet Dev.*, **3**(1): 44-9.
- FEINBERG, A.-P. and VOGELSTEIN, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.*, **132**(1): 6-13.
- FIELDS, S., and SONG, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**(6230): 245-6

- FOLEY, K.-P., LEONARD, M.-W. and ENGEL, J.-D. (1993): Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends in Genet.*, **9**: 380-384
- GARCIA, M.-A., CAMPILLOS, M., MARINA, A., VALDIVIESO, F., VAZQUEZ, J. (1999) Transcription factor AP-2 activity is modulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *FEBS Lett.*, **444**(1): 27-31.
- GAUBATZ, S., IMHOF, A., DOSCH, R., WERNER, O., MITCHELL, P., BUETTNER, R., EILERS, M. (1995) Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *EMBO J.*, **14**(7): 1508-19.
- GOSSEN, M. and BUJARD, H. (1992) Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *PNAS*; **89**: 5547-5551.
- GOSSEN, M., FREUNDLIEB, S., BENDER, G., MULLER, G., HILLEN, W., BUJARD, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**(5218): 1766-9.
- GUIOCHON-MANTEL, A., DELABRE, K., LESCOPE, P., MILGROM, E. (1994): Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **91**(15): 7179-83.
- HALDER, G., CALLAERTS, P., GEHRING, W.-J. (1995): Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. *Science*, **267**(5205): 1788-92
- HANAHAN, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning Volume I-A practical approach. Ed: Glover DM, *IRL Press*.
- HERDER (1984). Lexikon der Biologie. Spektrum, *Akademischer Verlag Heidelberg*.
- HERSHKO A. (1996) Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci.*, **21**(11): 445-9.
- HERSHKO, A. and CIECHANOVER, A. (1998): The ubiquitin system *Annu Rev Biochem.*, **67**: 425-79.
- HOGAN, B., COSTANTINI, F. and LACY, E. (1986): Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York
- HOLMES, D.-S. and QUIGLEY, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, **114**: 193.
- HUANG, S., JEAN, D., LUCA, M., TAINSKY, M.-A., BAR-ELI, M. (1998) Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J.*, **17**(15): 4358-69.
- HUBER, O., KORN, R., McLAUGHLIN, J., OHSUGI, M., HERRMANN, B.-G., KEMLER, R. (1996): Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev.*, **59**(1): 3-10.
- IMAGAWA, M., CHIU, R., KARIN, M. (1987): Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell*, **51**(2): 251-60.
- IMATAKA, H., NAKAYAMA, K., YASUMOTO, K., MIZUNO, A., FUJII-KURIYAMA, Y., HAYAMI, M. (1994): Cell-specific translational control of transcription factor BTEB expression. The role of an upstream AUG in the 5'-untranslated region. *J Biol Chem.*, **269**(32): 20668-73.

IMHOF, A., SCHUIERER, M., WERNER, O., MOSER, M., ROTH, C., BAUER, R., BUETTNER, R. (1999): Transcriptional regulation of the AP-2alpha promoter by BTEB-1 and AP-2rep, a novel wt-1/egr-related zinc finger repressor. *Mol Cell Biol.*, **19**(1): 194-204.

JIANG, M.-S., TANG, Q.-Q., McLENITHAN, J., GEIMAN, D., SHILLINGLAW, W., HENZEL, W.-J., LANE, M.-D. (1998) Derepression of the C/EBPalpha gene during adipogenesis: identification of AP-2alpha as a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**(7): 3467-71.

KAELIN, W.-G Jr., KREK, W., SELLERS, W.-R., DeCAPRIO, J.-A., AJCHENBAUM, F., FUCHS, C.-S., CHITTENDEN, T., LI, Y., FARNHAM, P.-J., BLANAR, M.-A., *et al.* (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell*, **70**(2): 351-64.

KAELIN, W.-G. Jr., PALLAS, D.-C., DeCAPRIO, J.-A., KAYE, F.-J., LIVINGSTON, D.-M. (1991) Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell*, **64**(3): 521-32.

KAISER, P., FLICK, K., WITTENBERG, C., REED, S.-I. (2000) Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF (Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell*, **102**(3): 303-14

KALDERON, D., ROBERTS, B.-L., RICHARDSON, W.-D., SMITH, A.-E. (1984): A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, **39**(3 Pt 2): 499-509

KANNAN, P. and TAINSKY, M.-A. (1999): Coactivator PC4 mediates AP-2 transcriptional activity and suppresses ras-induced transformation dependent on AP-2 transcriptional interference. *Mol Cell Biol.*, **19**(1): 899-908.

KANNAN, P., YU, Y., WANKHADE, S., TAINSKY, M.-A. (1999): PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res.*, **27**(3): 866-74.

KERBER, B., MONGE, I., MUELLER, M., MITCHELL, P.-J., COHEN, S.-M. (2001) The AP-2 transcription factor is required for joint formation and cell survival in Drosophila leg development. *Development*, **128**(8):1231-8.

KOZAK, M. (1987): An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic. Acids. Res.*, **15**: 8125-8148

LAEMMLI, U.-K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

LING, Y., SANKPAL, U.-T., ROBERTSON, A.-K., McNALLY, J.-G., KARPOVA, T., ROBERTSON, K.-D. (2004): Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription. *Nucleic Acids Res.*, **32**(2): 598-610. Print 2004

LLOYD, V.-K., DYMENT, D., SINCLAIR, D.-A., GRIGLIATTI, T.-A. (2003): Different patterns of gene silencing in position-effect variegation. *Genome*, **46**(6): 1104-17

LUSCHER, B., MITCHELL, P.-J., WILLIAMS, T., TJIAN, R. (1989) Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev.*, **3**(10): 1507-17.

MACONOCHIE, M., KRISHNAMURTHY, R., NONCHEV, S., MEIER, P., MANZANARES, M., MITCHELL, P.-J., KRUMLAUF, R. (1999) Regulation of Hoxa2 in cranial neural crest cells involves members of the AP-2 family. *Development*, **126**(7): 1483-94.

- MANDEL, M. and HIGA, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol.*, **53**(1): 159-62
- MARTINEZ-BALBAS, M.-A., DEY, A., RABINDRAN, S.-K., OZATO, K. and WU, C. (1995). Displacement of sequence-specific transcriptionsfactors from mitotic chromatin. *Cell*, **83**(1): 29-38
- McPHERSON, L.-A., BAICHWAL, V.-R., WEIGEL, R.-J. (1997) Identification of ERF-1 as a member of the AP2 transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **94**(9): 4342-7.
- MITCHELL, P.-J., WANG, C., TJIAN, R. (1987) Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell*, **50**(6): 847-61.
- MOHIBULLAH, N., DONNER, A., IPPOLITO, J.-A., WILLIAMS, T.(1999) SELEX and missing phosphate contact analyses reveal flexibility within the AP-2[alpha] protein: DNA binding complex. *Nucl. Acids. Res.*, **27**: 2760-2769
- MOMPARLER, R.-L. and BOVENZI, V. (2000): DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol.*, **183**(2): 145-54.
- MONGE, I., KRISHNAMURTHY, R., SIMS, D., HIRTH, F., SPENGLER, M., KAMMERMEIER, L., REICHERT, H., MITCHELL, P.-J. (2001) Drosophila transcription factor AP-2 in proboscis, leg and brain central complex development. *Development*, **128**(8): 1239-52.
- MONGE, I., MITCHELL, P.-J. (1998) DAP-2, the Drosophila homolog of transcription factor AP-2. *Mech Dev.*, **76**(1-2): 191-5.
- MOSER, M., IMHOF, A., PSCHERER, A., BAUER, R., AMSELGRUBER, W., SINOWATZ, F., HOFSTADTER, F., SCHULE, R., BUETTNER, R. (1995) Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta. *Development*, **121**(9): 2779-88.
- MOSER, M., PSCHERER, A., BAUER, R., IMHOF, A., SEEGER, S., KERSCHER, M., BUETTNER, R. (1993) The complete murine cDNA sequence of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res.*, **21**(20):4844.
- MOSER, M., PSCHERER, A., IMHOF, A., BAUER, R., KERSCHER, M., AMSELGRUBER, W., SINOWATZ, F., HOFSTÄDTER, F., SCHÜLE, R. BUETTNER, R. (1995): Molecular cloning and characterization of a second AP-2 transcription activator gene, AP-2β. *Development*, **121**: 2779 - 2788.
- MOSER, M., PSCHERER, A., ROTH, C., BECKER, J., MUCHER, G., ZERRES, K., DIXKENS, C., WEIS, J., GUAY-WOODFORD, L., BUETTNER, R., FASSLER, R. (1997) Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev.*, **11**(15): 1938-48.
- MOSER, M., RUSCHOFF, J., BUETTNER, R. (1997) Comparative analysis of AP-2 alpha and AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis. *Dev Dyn.*, **208**(1): 115-24.
- MÜLLER, H., ZIEGLER, B. und SCHWEIZER, B. (1993) UV/VIS-Spektroskopie in der Nukleinsäureanalytik. *BioTec*, **4**: 25-29.
- MÜLLER, S., HOEGE, C., PYROWOLAKIS, G., JENTSCH, S. (2001): SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **2**(3): 202-10.

MULLIS, K.-B., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. and ERLICH, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*. The polymerase-chain-reaction. Cold Spring Harbour Symp. *Quant. Biology*, **51**: 263

NOTTOLI, T., HAGOPIAN-DONALDSON, S., ZHANG, J., PERKINS, A., WILLIAMS, T. (1998): AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**(23): 13714-9

PFISTERER, P., EHLMANN, J., HEGEN, M., SCHORLE, H. (2002) A subtractive gene expression screen suggests a role of transcription factor AP-2 alpha in control of proliferation and differentiation. *J Biol Chem.*, **277**(8): 6637-44.

RESNITZKY, D., GOSSEN, M., BUJARD, H., REED, S.-I. (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol.*, **14**(3): 1669-79.

REUTER, G. and SPIERER, P. (1992): Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays*, **14**(9): 605-12

ROTH, C., SCHUIERER, M., GUNTHER, K., BUETTNER, R. (2000): Genomic structure and DNA binding properties of the human zinc finger transcriptional repressor AP-2rep (KLF12). *Genomics*, **63**(3): 384-90.

SAIKI, R.-K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.-B., HORN, G.-T., EHRLICH, H.-A. and ARNHEIM, N. (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1350-1354.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.-F. and MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning – A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> edition. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.

SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSEN, A.-R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **74**: 5463-5467

SCHMIDT, D. and MÜLLER, S. (2002): Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**(5): 2872-7

SCHORLE, H., MEIER, P., BUCHERT, M., JAENISCH, R., MITCHELL, P.-J. (1996) Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature*, **381**(6579): 235-8

SCHUIERER, M., HILGER-EVERSHIM, K., DOBNER, T., BOSSERHOFF, A.-K., MOSER, M., TURNER, J., CROSSLEY, M., BUETTNER, R. (2001): Induction of AP-2alpha expression by adenoviral infection involves inactivation of the AP-2rep transcriptional corepressor CtBP1. *J Biol Chem.*, **276**(30): 27944-9.

SCHULMAN, B.-A., CARRANO, A.-C., JEFFREY, P.-D., BOWEN, Z., KINNUCAN, E.-R., FINNIN, M.-S., ELLEDGE, S.-J., HARPER, J.-W., PAGANO, M., PAVLETICH, N.-P. (2000): Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature*, **408**(6810): 381-6.

SHEN, H., WILKE, T., ASHIQUE, A.-M., NARVEY, M., ZERUCHA, T., SAVINO, E., WILLIAMS, T., RICHMAN, J.-M. (1997): Chicken transcription factor AP-2: cloning, expression and its role in outgrowth of facial prominences and limb buds. *Dev Biol.*, **188**(2): 248-66.

- SHEN, Z., PARDINGTON-PURTYMUN, P.-E., COMEAUX, J.-C., MOYZIS, R.-K., CHEN, D.-J. (1996): UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics*, **36**(2): 271-9.
- TOWBIN, H., STAEBLIN, T. and GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **76**: 4350-4354.
- TRIEZENBERG, S.-J., KINGSBURY, R.-C., McKNIGHT, S.-L. (1988) Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.*, **2**(6): 718-29.
- TRIEZENBERG, S.-J., LAMARCO, K.-L., McKNIGHT, S.-L. (1988) Evidence of DNA: protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Dev.*, **2**(6): 730-42.
- TUMMALA, R., ROMANO, R.-A., FUCHS, E. and SINHA, S. (2003) Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family. *Gene*, **321**: 93-102
- TWEEDIE, S., CHARLTON, J., CLARK, V., BIRD, A. (1997) Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol Cell Biol.*, **17**(3): 1469-75.
- WALSH, C.-P. and BESTOR, T.-H. (1999): Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev.*, **13**(1): 26-34
- WANKHADE, S., YU, Y., WEINBERG, J., TAINSKY, M.-A., KANNAN, P. (2000) Characterization of the activation domains of AP-2 family transcription factors. *J Biol Chem.*, **275**(38): 29701-8.
- WARRICK, J.-M., PAULSON, H.-L., GRAY-BOARD, G.-L., BUI, Q.-T., FISCHBECK, K.-H., PITTMAN, R.-N., BONINI, N.-M. (1998): Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*, **93**(6): 939-49.
- WEINBERG, R.-A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**(3): 323-30.
- WERLING, U and SCHORLE, H. (2002): Conditional inactivation of transcription factor AP-2gamma by using the Cre/loxP recombination system. *Genesis*, **32**(2): 127-9
- WERLING, U. and SCHORLE, H. (2002): Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development. *Mol Cell Biol.*, **22**(9): 3149-56
- WERNER, O (1995) Analyse funktioneller Domänen des Transkriptionsfaktor AP-2. *Diplomarbeit an der Universität Regensburg*
- WERNER, O. (1999): Klonierung und Charakterisierung von Mehmet – einem neuen mit AP-2α assoziierten F-Box Protein *Dissertation an der Universität Regensburg*
- WILLIAMS, T., ADMON, A., LUSCHER, B., TJIAN, R. (1988) Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev.*, **2**(12A): 1557-69.
- WILLIAMS, T., TJIAN, R. (1991) Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.*, **5**(4): 670-82
- WILLIAMS, T., TJIAN, R. (1991) Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins. *Science*, **251**(4997): 1067-71.

WILSON, C.-M. (1983) Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. *Methods Enzymol.*, **91**: 236-47.

WINNING, R.-S., SHEA, L.-J., MARCUS, S.-J., SARGENT, T.-D. (1991): Developmental regulation of transcription factor AP-2 during *Xenopus laevis* embryogenesis. *Nucleic Acids Res.*, **19**(13): 3709-14.

WU, D.-Y., UGOZZOLI, L., PAL, B.-K. and WALLACE, R.-B. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biology*, **10**: 233-238

WU, F. and LEE, A.-S. (1998): Identification of AP-2 as an interactive target of Rb and a regulator of the G1/S control element of the hamster histone H3.2 promoter. *Nucleic Acids Res.*, **26**(21): 4837-45.

YARDEN, R.-I. and BRODY, L.-C. (2001) Identification of proteins that interact with BRCA1 by Far-Western library screening. *J Cell Biochem.*, **83**(4): 521-31

ZENG, Y.-X., SOMASUNDARAM, K., EL-DEIRY, W.-S. (1997) AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression. *Nat Genet.*, **15**(1): 78-82.

ZHANG, J., HAGOPIAN-DONALDSON, S., SERBEDZIJA, G., ELSEMORE, J., PLEHN-DUJOWICH, D., McMAHON, A.-P., FLAVELL, R.-A., WILLIAMS, T. (1996) Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature*, **381**(6579): 238-41.

ZHAO, F., SATODA, M., LICHT, J.-D., HAYASHIZAKI, Y., and GELB, B.-D. (2001) Cloning and Characterization of a Novel Mouse AP-2 Transcription Factor, Ap-2 $\delta$ , with Unique DNA Binding and Transactivation Properties. *J. Biol. Chem.*, **276**: 40755 - 40760.

ZHIMULEV, I.-F. and BELIAEVA, E.-S. (2003): Heterochromatin, gene position effect and gene silencing. *Genetika*, **39**(2): 187-201.

## Elektronische Datenbanken und Programme zur Sequenzanalyse

### BLAST

<http://www.ncbi.nlm.gov/blast/>

### Celera

<http://public.celera.com/cds/login.cfm>

### Ensembl

<http://www.ensembl.org/>

### GenBank

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html>

### GENSCAN

<http://genome.dkfz-heidelberg.de/cgi-bin/GENSCAN/genscan.cgi>

### HUSAR-Sequence Analysis Package

<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/>

### SMART

<http://smart.embl-heidelberg.de>

### Unigene

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>

### FlyBASE

<http://flybase.bio.indiana.edu/>

## VII. Abkürzungen

|                  |                                                                    |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| A                | Adenin (in Verbindung mit DNS)                                     |
| A                | Alanin (in Verbindung mit Aminosäuren)                             |
| AAD              | Amino-actinomycin D                                                |
| Abb.             | Abbildung                                                          |
| ad               | auffüllen auf                                                      |
| add              | addieren, beifügen                                                 |
| ADP              | Adenosin-Diphosphat                                                |
| Ak               | Antikörper                                                         |
| Amp              | Ampicillin                                                         |
| Amp <sup>R</sup> | Ampicillin-Resistenz                                               |
| AP               | alkalische Phosphatase                                             |
| APS              | Ammoniumpersulfat                                                  |
| AS               | Aminosäure                                                         |
| ATP              | Adenosintriphosphat                                                |
| BLAST            | Basic Local Alignment Search Tool                                  |
| bp               | Basenpaare                                                         |
| BSA              | Bovine serum albumin                                               |
| bzw.             | beziehungsweise                                                    |
| β-Gal            | β-Galaktosidase                                                    |
| °C               | Grad Celsius                                                       |
| C                | Cytosin (in Verbindung mit DNA)                                    |
| C-               | Carboxy-Terminus, carboxyterminal                                  |
| ca.              | circa                                                              |
| Ca <sup>2+</sup> | Calcium-Ion(en)                                                    |
| c-AMP            | zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat                                  |
| c-DNS            | copy-DNS, aus mRNS durch reverse Transkription gebildet            |
| Cl               | Chloroform, Isoamylalkohol [(24:1) (v/v)]                          |
| Ci               | Curie, Maßeinheit der Radioaktivität                               |
| cm               | Zentimeter                                                         |
| cm <sup>2</sup>  | Quadratzentimeter                                                  |
| cpm              | counts per minute                                                  |
| C-Terminus       | Carboxy-Terminus eines Proteins, entspricht dem 3'-Ende einer mRNS |
| CTP              | Cytidintriphosphat                                                 |
| d.h.             | das heisst                                                         |
| Da               | Dalton                                                             |
| DAB              | Diaminobenzidin                                                    |
| dATP             | Desoxy-Adenosintriphosphat                                         |
| dCTP             | Desoxy-Cytidintriphosphat                                          |
| DEAE             | Diethylaminoethyl                                                  |
| DEPC             | Diethylpyrocarbonat                                                |

|                                 |                                                                     |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| dGTP                            | Desoxy-Guanidintriphosphat                                          |
| DMEM                            | Dulbecco's Modification of Eagles Medium                            |
| DMSO                            | Dimethylsulfoxid                                                    |
| DNase                           | Desoxyribonuklease                                                  |
| DNS                             | Desoxyribonukleinsäure                                              |
| dNTP(s)                         | Desoxy-Nukleosidtriphosphat(e)                                      |
| DTT                             | Dithiotreitol                                                       |
| dTTP                            | Desoxy-Thymidintriphosphat                                          |
| dUTP                            | Desoxy-Uridintriphosphat                                            |
| E                               | Extinktion                                                          |
| E.coli                          | Escherichia coli                                                    |
| EDTA                            | Etylendiamintetraacetat                                             |
| <i>et al.</i>                   | in Verbindung mit Referenzangaben: „ <i>et altera</i> “, und andere |
| EtBr                            | Ethidiumbromid                                                      |
| EtOH                            | Ethanol                                                             |
| FACS                            | Fluorescence-Activated-Cell-Sorter                                  |
| FKS                             | Fötales Kälberserum                                                 |
| for                             | Synonym für vorwärts („sense“) bei Primerangaben                    |
| g                               | Gramm                                                               |
| G                               | Guanin (in Verbindung mit DNA)                                      |
| GAPDH                           | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase                            |
| GST                             | Glutathion-S-Transferase                                            |
| GTP                             | Guanosintriphosphat                                                 |
| h                               | Stunde(n)                                                           |
| HEPES                           | (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure])               |
| HRP                             | „horse raddish peroxydase“, Meerrettichperoxidase                   |
| HUSAR                           | Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources                         |
| ind                             | induzierbar (in Verbindung mit regulierbarem Zellklon)              |
| IPTG                            | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid                          |
| J                               | Joule                                                               |
| kb                              | Kilobasen                                                           |
| kDa                             | Kilodalton                                                          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Kaliumhydrogenphosphat                                              |
| Km                              | Kanamycin                                                           |
| Km <sup>R</sup>                 | Kanamycin-Resistenz                                                 |
| l                               | Liter                                                               |
| LacZ                            | $\beta$ -Galaktosidase                                              |
| LB                              | Luria-Bertani-Medium zur Kultivierung von E.coli                    |
| $\mu$ M                         | Mikromolar                                                          |
| M                               | Molar                                                               |
| mA                              | Milliampere                                                         |
| mbar                            | Millibar                                                            |

|                                  |                                                                  |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| mCi                              | Millicurie                                                       |
| mer                              | Nucleotidanzahl eines Primers                                    |
| MEF                              | murine embryonale Fibroblasten                                   |
| MEFKx                            | murine embryonale Fibroblasten Klon x                            |
| µg                               | Mikrogramm                                                       |
| mg                               | Milligramm                                                       |
| Mg <sup>2+</sup>                 | Magnesiumion(en)                                                 |
| Mg <sub>2</sub> Cl               | Magnesiumchlorid                                                 |
| Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | Magnesiumsulfat                                                  |
| min                              | Minute(n)                                                        |
| mJ                               | Millijoule                                                       |
| µl                               | Mikroliter                                                       |
| ml                               | Milliliter                                                       |
| mM                               | Millimolar                                                       |
| µm                               | Mikrometer                                                       |
| mm                               | Millimeter                                                       |
| MMLV                             | Moloney-Murine Leukemia Virus                                    |
| MOPS                             | 3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure                               |
| mRNS                             | Boten-(messenger)-Ribonukleinsäure                               |
| N                                | Normalität einer Lösung                                          |
| N-                               | Amino-Terminus, aminoterminal                                    |
| Na <sup>2+</sup>                 | Natriumion(en)                                                   |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>  | Natriumcarbonat                                                  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Natriumhydrogenphosphat                                          |
| NaAc                             | Natriumazetat                                                    |
| NaCl                             | Natriumchlorid                                                   |
| NAD                              | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid                                   |
| NaH <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | Natriumdihydrogencarbonat                                        |
| NaN <sub>3</sub>                 | Natriumazid                                                      |
| NaOH                             | Natriumhydroxid                                                  |
| NaP-Puffer                       | Natrium-Phosphat-Puffer                                          |
| neo                              | Neomycinresistenzgen                                             |
| ng                               | Nanogramm                                                        |
| nm                               | Nanometer                                                        |
| nmol                             | Nanomolar                                                        |
| NP-40                            | Nonidet P-40                                                     |
| N-terminus                       | Amino-Terminus eines Proteins, entspricht dem 5'-Ende einer mRNS |
| p.a.                             | Synonym für Analysenqualität                                     |
| PAA                              | Polyacrylamid                                                    |
| PAGE                             | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                  |
| PBS                              | Phosphat-gepufferte Salzlösung                                   |
| PBS-T                            | Phosphat-gepufferte Saline oder Salzlösung mit Tween-20          |
| PCI                              | Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v)               |

|                      |                                                                   |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------|
| PCR                  | „polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion             |
| PE                   | Phycoerythrin                                                     |
| PFA                  | Paraformaldehyd                                                   |
| pfu                  | plaque forming unit                                               |
| pH                   | negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration |
| pM                   | pikomolar                                                         |
| pmol                 | pikomol                                                           |
| POD                  | Peroxidase                                                        |
| PS                   | Phosphatidylserin                                                 |
| ®                    | registriertes Warenzeichen                                        |
| RACE                 | Rapid amplification of cDNA ends                                  |
| rev                  | Synonym für rückwärts („antisense“) bei Primerangaben             |
| RNase                | Ribonuklease                                                      |
| RNS                  | Ribonukleinsäure                                                  |
| rRNS                 | ribosomale RNS                                                    |
| RT                   | Raumtemperatur                                                    |
| RT-PCR               | Reverse Transkriptions-PCR                                        |
| s                    | Sekunde(n)                                                        |
| SDS                  | Natriumdodecylsulfat                                              |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                   |
| <i>S. pombe</i>      | <i>Schizosaccharomyces pombe</i>                                  |
| SSC                  | Standard Salzcitrat                                               |
| ™                    | registriertes Warenzeichen                                        |
| T                    | Thymin (in Verbindung mit DNA)                                    |
| Tab.                 | Tabelle                                                           |
| TAE                  | Tris-Acetat-EDTA                                                  |
| Taq                  | thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>         |
| TBE                  | Tris-Borat-EDTA-Puffer                                            |
| TE                   | Tris-EDTA                                                         |
| TEMED                | N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin                            |
| T <sub>p</sub>       | Primer-Anlagerungstemperatur                                      |
| Tris                 | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                  |
| tRNA                 | transfer-Ribonukleinsäure                                         |
| TTP                  | Thymidintriphosphat                                               |
| U                    | „unit(s)“ (Einheit der Enzymaktivität)                            |
| u.a.                 | unter anderem                                                     |
| ü.N.                 | über Nacht                                                        |
| UpM                  | Umdrehungen pro Minute                                            |
| UTP                  | Uridintriphosphat                                                 |
| UV                   | ultraviolett                                                      |
| V                    | Volt                                                              |

---

|       |                                                     |
|-------|-----------------------------------------------------|
| v/v   | volume per volume, Volumenprozent vom Gesamtvolumen |
| Vol.  | Volumenteil(e)                                      |
| W     | Watt                                                |
| w/v   | weight per volume, Massenprozent vom Gesamtvolumen  |
| x     | -fach                                               |
| X-Gal | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid   |
| z.B.  | zum Beispiel                                        |

## VIII. Anhang

### A. murine Mehmet cDNS-Sequenz des ORF für das Mehmet-Protein

rot mögliche ATG Positionen (ATG<sup>26</sup>, ATG<sup>173</sup> & ATG<sup>266</sup>)  
 blau Stop Codon  
 grün zunächst identifizierter cDNS Bereich - K31

```

AGTGTGCGCGCGCTCGTGGGGAGATGAGGCAGCTGCTGCGTGCGATTGACCGCCAGAG
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TCACACGCGCGCGAGCACCCCTCTACTCCGTCGACGACGCACGCTAACTGGCGGTCTC

ATACGACGAGAACGAAGACTTGTGCGACGTGGAGGAAATTGTCAGCGTCCGTGGCTTCAG
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TATGCTGCTCTTGCTTCTGAACAGCCTGCACCTCCTTTAACAGTCGCAGGCACCGAAGTC

CCTGGAGGAGAAGCTACGTAGCCAGTTATACCAGGGGGACTTCGTGCATGCTATGGAAGG
121  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGACCTCCTCTTCGATGCATCGGTCAATATGGTCCCCCTGAAGCACGTACGATACTTCC

CAAAGATTTTAACTATGAGTACGTACAGAGAGAAGCTCTCAGGGTCCCCCTGGTTTTTCG
181  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GTTTCTAAAATTGATACTCATGCATGCTCTCTTCGAGAGTCCCAGGGGGACCAAAAAGC

GGACAAGGATGGACTAGGGATCAAGATGCCAGACCCTGATTTCACAGTCCGAGACGTCAA
241  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCTGTTCTACCTGATCCCTAGTTCTACGGTCTGGGACTAAAGTGTCAAGGCTCTGCAGTT

ACTCCTGGTGGGGAGCCGCCGTTTGGTGGATGTCATGGACGTCAACACCCAGAAGGGTAC
301  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TGAGGACCACCCCTCGGCGGCAAACCACCTACAGTACCTGCAGTTGTGGGTCTTCCCATG

CGAGATGAGCATGTCCAGTTTGTGCGCTACTACGAGACACCAGAGGCACAGCGGGATAA
361  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
GCTCTACTCGTACAGGGTCAAACACGCGATGATGCTCTGTGGTCTCCGTGTCGCCCTATT

ACTGTACAACGTCATCAGCCTCGAGTTCAGCCATACGAAGCTGGAGCATCTGGTCAAGCG
421  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TGACATGTTGCAGTAGTTCGGAGCTCAAGTCGGTATGCTTCGACCTCGTAGACCAGTTCCG

TCCCACTGTGGTGGACCTGGTCGACTGGGTGGACAACATGTGGCCTCAGCATCTAAAGGA
481  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AGGGTGACACCACCTGGACCAGCTGACCACCTGTTGTACACCGGAGTCGTAGATTTCCT

AAAGCAGACAGAAGCCACCAATGCCCTTGACAGAGATGAAGTACCCCAAAGTGAAAAAGTA
541  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TTTCGTCTGTCTTCGGTGGTTACGGGAACGTCTCTACTTCATGGGGTTTCACTTTTTCAT

CTGTCTGATGAGCGTGAAGGGCTGTTTCACTGACTTCCACATTGACTTTGGAGGCACCTC
601  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GACAGACTACTCGCACTTCCCGACAAAGTGACTGAAGGTGTAAGTGAACCTCCGTGGAG

CGTGTGGTACCATGTGTTCCGTGGTGGCAAGATCTTTTGGCTGATCCCTCCAACCTGCA
661  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
GCACACCATGGTACACAAGGCACCACCGTTCTAGAAAACCGACTAGGGAGGTTGGGACGT

CAACTTGGCTTTGTACGAGGAGTGGGTGCTGTCTGGCAAACAGAGCGACATCTTTCTGGG
721  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
GTTGAACCGAAACATGCTCCTCACCCACGACAGACCGTTTGTCTCGCTGTAGAAAGACCC
  
```

AGACCGCGTGGAACGCTGCCAAAGAATTGAGCTGAAGCAAGGCTACACCTTTTTCATCCC  
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840  
TCTGGCGCACCTTGCGACGGTTTCTTAACCTCGACTTCGTTCCGATGTGGAAAAAGTAGGG  
TTCAGGTTGGATCCATGCGGTTTATACGCCTGTGGACTCTCTGGTGTTTCGGCGGGAACAT  
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
AAGTCCAACCTAGGTACGCCAAATATGCGGACACCTGAGAGACCACAAGCCGCCCTTGTA  
CCTGCATAGCTTCAACGTGCCCATGCAGCTGCGGATCTACGAGATCGAGGACAGGACCCG  
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960  
GGACGTATCGAAGTTGCACGGGTACGTCGACGCCTAGATGCTCTAGCTCCTGTCTGGGC  
GGTTCAGCCCAAGTTCCGTTACCCCTTCTACTATGAGATGTGCTGGTATGTCTTGAGAG  
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020  
CCAAGTCGGGTTCAAGGCAATGGGGAAGATGATACTCTACACGACCATAACAGAACCTCTC  
ATATGTGTACTGTGTGACCCAGCGCTCCTACCTCACTCAGGAATACCAGAGAGAATTAAT  
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
TATACACATGACACACTGGGTCGCGAGGATGGAGTGAGTCCTTATGGTCTCTCTTAATTA  
GCTTATTGATGCCCCAAGAAAAACCAGTGTAGACGGCTTTTCATCCGACTCCTGGCTGGA  
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
CGAATAACTACGGGGTTCTTTTGGTCACATCTGCCGAAAAGTAGGCTGAGGACCGACCT  
CATGGAGGAGGAGTCTGCGAGCAGCAGCCACAGGAGGAAGAGGAGGAGGAGGAGGACAA  
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
GTACCTCCTCCTCAGGACGCTCGTCGTCGGTGTCTCCTCTCTCCTCCTCCTCCTGTT  
GGAAGAGGAAGGAGATGGTGCAGATAAAACACCCAAGCCACCCACCGATGACCCACCTC  
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
CCTTCTCCTCCTCCTACACGTCTATTTTGTGGGTTTCGGTGGGTGGCTACTGGGGTGGAG  
ACCCACCAGCACCCCGCCGAAGACCAGGACAGCACAGGGAAGAAGCCTAAAGCCCCTGC  
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
TGGGTGGTCGTGGGGCGGGCTTCTGGTCCTGTCTGTCCCTTCTTCGGATTTCGGGGACG  
CATACGGTTCCTCAAGAGGACGTTGTCCAATGAGTCAGAGGAAAGTGTCAGTGCACCTC  
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380  
GTATGCCAAGGAGTTCTCCTGCAACAGGTTACTCAGTCTCCTTTCACAGTTCAGCTGGAG  
GATGCCCATGGACGATCCCAAGACGCCCACAGGCTCCCCGGCCACCGAGGTTTCTACCAA  
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440  
CTACGGGTACCTGCTAGGTTCTGCGGGTGTCCGAGGGGCCGGTGGCTCCAAAGATGGTT  
GTGGACTACCTTACCGAATTTGAACTGAAGGGCTTGAAAGCCCTGGTTGAAAAGCTAGA  
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500  
CACCTGAGTGGAATGGCTTAAACTTGACTTCCCGAACTTTCGGGACCAACTTTTCGATCT  
GTCCCTTCCGGAGAATAAGAAGTGTGTCCCTGAGGGAATCGAGGACCCCCAGGCCCTCCT  
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560  
CAGGGAAGGCCTCTTATTCTTCACACAGGACTCCCTTAGCTCCTGGGGTCCGGGAGGA  
GGAAGGTGTAAAGAATGTACTGAAAGAGCACGTGGATGACGACCCACCCCTGGCCATCAC  
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620  
CCTTCCACATTTCTTACATGACTTTCTCGTGACCTACTGCTGGGGTGGGACCGGTAGTG  
CGGGGTCCCTGTGGTCAGCTGGCCAAAGAAAAGTGCAAAGAACCGGTGGTGGGTGCGCC  
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680  
GCCCCAGGGACACCAGTCGACCGGTTTCTTTTGACGTTTCTTGGCCACCAACCCAGCCG  
TAAGGGCAAGTTGGGCCCGGCTCAGCGGTGAAGTTGGCTGCCAACCGAACAACAGCAGG  
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740  
ATTCCCGTTCAACCCGGGCGGAGTCGCCACTTCAACCGACGGTTGGCTTGTGTGCTCC  
AGCTCGCAGGCGCGGACGCGATGCCGCAAGTGCGAGGCCTGCCTGCGGACGGAGTGTGG  
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800  
TCGAGCGTCCGCGGCCTGCGCTACGGCGTTACGCTCCGGACGGACGCCTGCCTCACACC

```
AGAGTGCCACTTTTGCAAGGACATGAAGAAGTTTGGAGGTCCTGGGCGCATGAAGCAGAG
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
TCTCACGGTGAAAACGTTCTGTACTTCTCAAACCTCCAGGACCCGCGTACTTCGTCTC

CTGCATCATGCGGCAGTGCATCGCGCCAGTGCTGCCCCACACCGCCGTGTGCCTTGTGTG
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
GACGTAGTACGCCGTCACGTAGCGCGGTACGACGGGGTGTGGCGGCACACGGAACACAC

TGGCGAGGCAGGGAAGGAGGACACAGTGAAGAGGAAGAAGGCAAGTTTAAACCTCATGCT
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980
ACCGCTCCGTCCCTTCTCCTGTGTACCTTCTCCTTCTTCCGTTCAAATTGGAGTACGA

CATGGAATGCTCCATCTGCAACGAGATCATCCACCCTGGATGCCTTAAGATTAAGGAATC
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040
GTACCTTACGAGGTAGACGTTGCTCTAGTAGGTGGGACCTACGGAATTCTAATTCCTTAG

GGAGGGTGTGGTCAACGATGAGCTTCCCAACTGCTGGGAGTGTCCGAAGTGAACCATGC
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100
CCTCCACACCCAGTTGCTACTCGAAGGGTTGACGACCCTCACAGGCTTACATTGGTACG

CGGCAAGACCGGGAAGCCTACAAGCAAAAGCGTGGCCCTGGCTTTAAGTATGCCTCCAA
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
GCCGTTCTGGCCCTTTCGGATGTTTCGTTTTCGCACCGGGACCGAAATTCATACGGAGGTT

CCTGCCTGGCTCCTTGCTCAAGGAGCAGAAGATGAACCGGGACAACAAGGAAGGGCAAGA
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
GGACGGACCGAGGAACGAGTTCCTCGTCTTCTACTTGGCCCTGTTGTTCTTCCCGTTCT

GCCTGCCAAGCGGAGAAGTGAGTGTGAAGAGGCTCCCCGTCGGAGGTCAGACGAGCACCC
2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
CGGACGGTTCGCCTCTTCACTCACACTTCTCCGAGGGGCAGCCTCCAGTCTGCTCGTGGG

CAAAAAGGTGCCTGCAGATGGCATCCTCCGCCGAAAAGTCTGATGATGTGCACCTGAGGAG
2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
GTTTTTCCACGGACGTCTACCGTAGGAGGCGGCTTTCAGACTACTACGTGGACTCCTC

GAAGCGGAAATACGAGAAGCCCCAAGAGCTGAGTGGACGCAAGCGAGCCTCGTCGCTTCA
2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
CTTCGCCTTTATGCTCTTCGGGGTTCGACTCACCTGCGTTCGCTCGGAGCAGCGAAGT

AACGTCCCCCGGTTCTCCTCTCACCTCTCGCCGAGGCCCCCTCTAGGCAGCAGTCTCAG
2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460
TTGCAGGGGGCCAAGGAGGAGAGTGAGAGCGGCTCCGGGGGAGATCCGTGCTCAGAGTC

CCCTTGGTGGAGATCCAGTCTCACTTACTTCCAGCAGCAGCTAAAACCTGGCAAAGAAGA
2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520
GGGAACCACCTCTAGGTCAGAGTGAATGAAGGTCGTCGTCGATTTTGGACCGTTTCTTCT

TAAGCTTTTTCAGGAAAAAGCGCGGTCTTGAAGAACGCTGAGGATCGTCTGTCACTGGC
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580
ATTCGAAAAGTCCTTTTTCGCCGCCAGGACCTTCTTGCGACTCCTAGCAGACAGTGACCG

CAACAAGCCCCCTTCGGCGCTTTAAGCAGGAACCGGAGGACGATCTGCCTGAGGCACCTCC
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
GTTGTTTCGGGGAAGCCGCGAAATTCGTCCTTGGCCTCCTGCTAGACGGACTCCGTGGAGG

TAAGACCCGGGAGAGTGATCAGTCACGTTCCAGCTCACCCACTGCTGGTCCCAGCACTGA
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
ATTCTGGGCCCTCTCACTAGTCAGTGCAAGGTCGAGTGGGTGACGACCAGGGTCGTGACT

GGGAGCTGAAGGCCCAGAAGAGAAGAAAAAGGTGAAGATGCGCCGGAAGCGGCGACTTGT
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
CCCTCGACTTCCGGGTCTTCTCTTCTTTTCCACTTCTACGCGGCCTTCGCCGCTGAACA

TAACAAGGAGCTGAGCAAAGAGCTAAGCAAGGAGCTCAACCACGAGATCCAAAAGACGGA
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
ATTGTTCTCGACTCGTTTCTCGATTCTCCTCGAGTTGGTGCTCTAGGTTTCTGCCT
```

GAGCACCTGGCTCACGAGAGCCAGCAGCCCATCAAGTCAGAGCCTGAGAGCGAGAACGA  
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880  
CTCGTGGGACCGAGTGCTCTCGGTCTCGGGTAGTTTCAGTCTCGGACTCTCGCTCTTGCT

CGAGCCCAAGAGGCCCTTAAGCCACTGCGAGCGCCCCACCGCTTCAGCAAAGGGCTCAA  
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940  
GCTCGGGTCTCCGGGAATTCGGTGACGCTCGCGGGGTGGCGAAGTCGTTTCCCGAGTT

CGGCACACCTCGGGAGCTGCGGCACTCGCTGGGACCTGGCCTGCGTAGTCCACCTCGTGT  
2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000  
GCCGTGTGGAGCCCTCGACGCCGTGAGCGACCCTGGACCGACGCATCAGGTGGAGCACA

TATGTCCCGCCCCCGCCCTCTGCATCCCCACCCAAGTGCATCCAGATGGAGCGTCACGT  
3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060  
ATACAGGGCCGGGGGCGGGAGACGTAGGGGTGGGTTACGTAGGTCTACCTCGCAGTGCA

GATCCGGCCACCGCCCATCAGCCCCCACCTGACTCGCTGCCCTGGATGATGGAGCAGC  
3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120  
CTAGGCCGGTGGCGGGTAGTCGGGGGGTGGACTGAGCGACGGGGACCTACTACCTCGTCG

CCACGTCATGCATAGGGAGGTGTGGATGGCAGTCTTCAGCTACCTCAGCCACCGAGACCT  
3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180  
GGTGCAGTACGTATCCCTCCACACCTACCGTCAGAAGTCGATGGAGTCGGTGGCTCTGGA

GTGTGTCTGCATGCGGGTCTGCAGGACCTGGAACCGCTGGTGTGCGATAAGCGGTTGTG  
3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240  
CACACAGACGTACGCCAGACGTCTGGACCTTGGCGACCACGACGCTATTGCCAACAC

GACCCGCATCGACCTGAACCGCTGCAAGTCCATCACACCCCTGATGCTGAGCGGTATCAT  
3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300  
CTGGGCGTAGCTGGACTTGGCGACGTTACGGTAGTGTGGGGACTACGACTCGCCATAGTA

CCGGCGACAGCCTGTCTCCCTTGACCTCAGTTGGACCAACATCTCCAAGAAGCAGCTGAG  
3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360  
GGCCGCTGTCTGGACAGAGGGAACCTGGAGTCAACCTGGTTGTAGAGGTTCTTCGTCGACTC

TTGGCTCATCAACCGGTTGCCTGGGCTCCGAGACTTGGTGTGTGAGGCTGCTCATGGAT  
3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420  
AACCGAGTAGTTGGCCAACGGACCCGAGGCTCTGAACCACGACAGTCCGACGAGTACCTA

CGCTGTCTCAGCCCTCTGTAGCTCCAGTTGTCCATTGCTCCGGACCCTGGATGTCCAGTG  
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480  
GCGACAGAGTCGGGAGACATCGAGGTCAACAGGTAACGAGGCCTGGGACCTACAGGTCAC

GGTAGAAGGACTAAAGGATGCCCAGATGAGGGATCTCCTGTCTCCACCCACAGACAACAG  
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540  
CCATCTTCCTGATTTCTACGGGTCTACTCCCTAGAGGACAGAGGTGGGTGTCTGTTGTC

GCCAGGTCAGATGGACAATCGGAGCAAGCTCCGGAACATTGTAGAGCTGCGCCTAGCTGG  
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600  
CGGTCCAGTCTACCTGTTAGCCTCGTTCGAGGCCTTGTAACATCTCGACGCGGATCGACC

CCTGGACATCACAGATGTCTCCCTGCGGCTCATTATTCGCCATATGCCCCGTCTCTCGAA  
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660  
GGACCTGTAGTGTCTACAGAGGGACGCCGAGTAATAAGCGGTATACGGGGACGAGAGCTT

GCTCCAACCTCAGTTACTGTAACCACATCAATGACCAGTCCATCAACCTGCTCACTGCCGT  
3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720  
CGAGGTTGAGTCAATGACATTGGTGTAGTTACTGGTCAGGTAGTTGGACGAGTGACGGCA

CGGCACCACCACCCGAGACTCGCTGACAGAGGTCAACCTATCAGACTGTAATAAGGTAAC  
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780  
GCCGTGGTGGTGGGCTCTGAGCGACTGTCTCCAGTTGGATAGTCTGACATTATTCCATTG

TGACCTGTGCCTGTCTTCTTCAAACGCTGTGGAAATATCTGTCATATTGACCTGAGGTA  
3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840  
ACTGGACACGGACAGGAAGAAGTTTGCACACCTTTATAGACAGTATAACTGGACTCCAT

```
CTGCAAGCAAGTCACCAAGGAAGGCTGTGAGCAATTCATAGCTGAAATGTCTGTGAGTGT
3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900
GACGTTTCGTTTCAGTGGTTCCTTCCGACACTCGTTAAGTATCGACTTTACAGACACTCACA

CCAATTTGGGCAAGTGGAAGAGAACTCCTGCAAAAACTAAGTTAGTTCCAGGACAAGTA
3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960
GGTTAAACCCGTTACCTTCTCTTTGAGGACGTTTTTGATTCAATCAAGGTCCTGTTTCAT
```

## B. Aminosäuresequenz des murinen Mehmet-Protein

|               |                                                                        |
|---------------|------------------------------------------------------------------------|
| grün          | Yeast-Box                                                              |
| gelb          | saure Domäne                                                           |
| rot           | 5'-Cytosin-DNS-Methyltransferase / <i>Drosophila</i> Trithorax Protein |
| türkis        | F-Box Region                                                           |
| blau          | Leucin-Repeats                                                         |
| grün umrandet | PHD-Finger                                                             |
| rot umrandet  | NLS                                                                    |
| blau umrandet | prolinreiche Domäne                                                    |

```

1  MRQLLRAIDR QRYDENEDLS DVEEIVSVRG FSLEEKLR SQ LYQGDFVHAM
51  EGKDFNYEYV QREALRVPLV FRDKDGLGIK MPDPDFTVRD VKLLVGSRRL
101 VDVMDVNTQK GTEMSMSQFV RYYETPEAQR DKLYNVISLE FSHTKLEHLV
151 KRPTVVDLVD WVDNMWPQHL KEKQTEATNA LAEMKYPKVK KYCLMSVKGC
201 FTFDHIDFGG TSVVYHVFRG GKIFWLIPPT LHNLALEYEW VLSGKQSDIF
251 LGDRVERCQR IELKQGYTFF IPSGWIHAVY TPVDSL VFGG NILHSFNVPM
301 QLRIYEIEDR TRVQPKFRYP FYYEMCWYVL ERYVYCVTQR SYLTQEYQRE
351 LMLIDAPRKT SVDGFSSDSW LDMEEESCEQ QPQEEEEEEE DKEEEGDGAD
401 KTPKPPTDDP TSPTSTPPED QDSTGKKPKA PAIRFLKRTL SNESEESVKS
451 TSPMPDDPKT PTGSPATEVS TKWTHLTEFE LKGLKALVEK LESLPENKKC
501 VPEGIEDPQA LLEGVKNVLK EHVDDDDPTLA ITGVPVSWP KKTAKNRVVG
551 RPKGKLG PAS AVKLAANRTT AGARRRRTRC RKCEACL RTE CGECHFC KDM
601 KKGFGPGRMK QSCIMRQ CIA PVL PHTAVCL VCGEAGKEDT VEEEGKFNL
651 MLMECSICNE IIHPGCLKIK ESEGVVNDEL PNCWECPKCN HAGKTGKAYK
701 QKRGPGFKYA SNLPGSLLKE QKMN RDNKEG QEPAKRRSEC EEAPRRRSDE
751 HPKKVPADGI LRRKSDDVH LRRKRKY EKPQ EL SGRKRASS LQTS PGSS SH
801 LSPRPPLGSS LSPWWRSSLT YFQQQLKPGK EDKLFRRKKRR SWKNAEDRLS
851 LANKPLRRFK QEPEDDLPEA PPKTRES DQS RSSSPTAGPS TEGAEGPEEK
901 KVKMRRKR R LVNKELSKEL SKELNHEIQK TESTLAHESQ QPIKSEPESE

```

951 NDEPKRPLSH CERPHRFSGK LNGTPREL RH SLGPGLRSPP RVMSRPPPSA

1001 SPPKCIQMER HVIRPPPISP PPDSLPLDDG AAHV MHR EVW MAVFSYLSHR

1051 DLCVCMRVCR TWRWCCDKR LWTRIDLNRK KSITPLMLSG IIRRPVSLD

1101 LSWTNISKKQ LSWLINRLPG LRDLVLSGCS WIAVSALCSS SCPLLRITLDV

1151 QWVEGLKDAQ MRDLLSPPTD NRPGQMDNRS KLRNIVELRL AGLDITDVSL

1201 RLIIRHMPLL SKLQLSYCNH INDQSINLLT AVGTTTRDSL TEVNLSDCNK

1251 VTDLCLSFFK RCGNICHIDL RYCKQVTKEG CEQFIAEMSV SVQFGQVEEK

1301 LLQKLS\*

**C. *Drosophila* Mehmet cDNS-Sequenz des *Drosophila* Gens CG11033  
(GenBank Accession Number NM\_141607)**

rot      ATG Position  
blau     Stop Codon

```

1  CAGAGAGGTCGGATCGCAGCGCTGCTGGATTTTTCAGCGATTTCGCGTACGAAAAAATCG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
   GTCTCTCCAGCCTAGCGTCGCGACGACCTAAAAAGTCGCTAAGCGCATGCCTTTTTTAGC

61  AGTACGTCCGAGTGC GGATTGCCAGAAATCCGTTTAAATAAGTGTTTATTGCTCTAGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
   TCATGCAGGCTCACGCCTAACGGGTCTTTAGGCAAATTTATTCACAAATAAACGAGATCA

121 CTGGCCAATAGAGTCCGTCGAGTGGAACCAGAAACGAGCTGCAACTATAAAGCGTTAACA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
   GACCGGTTATCTCAGGCAGCTCACCTTGGTCTTTGCTCGACGTTGATATTTCGCAATTGT

181 AAAAAGTATAAAATAGAAGGCAGCGATGTCACCGCCGTTGAAACGGGGTCGTCGCCTGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
   TTTTTCATATTTTATCTTCCGTCGCTACAGGTGGCGGCAACTTTGCCCCAGCAGCGGACG

241 CAAGAGCAATAGCAACAACAGTAGCAGTGGCGGCAACAACAACACGGCAACGGCAATCT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
   GTTCTCGTTATCGTTGTTGTCATCGTCACCGCCGTTGTTGTTGTTGCCGTTGCCGTTAGA

301 CAGTCCAAATGCAAAAGGCGTGACGCGCGCTCAACTGCGCGAGAGGAAGCAGCGCAAGCT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
   GTCAGGTTTACGTTTTCCGCACGTCGCCGAGTTGACGCGCTCTCCTTCGTCGCGTTTCCA

361 CTACCTGGAGGAATGGTCGCTGGGCGACGAGGATGGCGAGGGGACGCGGGGATTACGCGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
   GATGGACCTCCTTACCAGCGACCCGCTGCTCCTACCGCTCCCTGCGCCCCCTAAGTCGCA

421 TGCCGAGAAGCTCGAATCTTCAAAGTTCGCGCAGGCGGGAATGGTGCGCGAGATGCGCGG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
   ACGGCTCTTCGAGCTTAGAAGTTTCAAGCGCGTCCGCCCTTACCACGCGCTCTACGCGCC

481 ATGCGATCTCACCGTAGCTTTCCTCCAACAGCACGGCTTTAACATCCCGCTGTTATTCCG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
   TACGCTAGAGTGGCATCGAAAGGAGGTTGTCGTGCCGAAATTGTAGGGCGACAATAAGGC

541 GGACAAAGCGGGCTTAGGTTTACGAATGCCGATCCGCAGGAGTTACCGTGAACGATGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
   CCTGTTTCGCCCCGAATCCAAATGCTTACGGGCTAGGCGTCTCAAGTGGCACTTGCTACA

601 GCGACTGTGCGTGGGATCCAGGCGACTCCTCGATGTCATGGACGTGAACACGCAGAAGAA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
   CGCTGACACGCACCCTAGGTCCGCTGAGGAGCTACAGTACCTGCACCTGTGCGTCTTCTT

661 CCTGCAGATGACCATGAAGGAGTGGCAGCAGTACTATGACAGTCCGCAGAAAGACCGTCT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
   GGACGTCTACTGGTACTTCTCACCCTCGTCATGATACTGTCAGGCGTCTTCTGCGAGA

721 GCTAAACGTGATCTCTCTGGAGTTCTCGCACACCCGCCTGGACAGATTGTTTCAGAGTCC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
   CGATTTGCACTAGAGAGACCTCAAGAGCGTGTGGGCGGACCTGTCTAAGCAAGTCTCAGG

781 GGAGATCGTGCGCCAGATCGACTGGGTGGATGTGGTCTGGCCCAAGCAGCTTAAGGACGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
   CCTCTAGCACGCGGTCTAGCTGACCCACCTACACCAGACCGGGTTCGTGCAATTCCTGCG

```

CCAGCGGGAGGGACCAATCTGCTAGGCGGCATGATGTACCCAAAGGTGCAGAAATACTG  
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
GGTCGCCCTCCCGTGGTTAGACGATCCGCCGTACTACATGGGTTTCCACGTCTTTATGAC  
CCTGATGTCAGTGAAGAACTGCTACACGGATTTTACATTGACTTCGGTGGGACTTCCGT  
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960  
GGACTACAGTCACTTCTTGACGATGTGCCTAAAAGTGTAACTGAAGCCACCTGAAGGCA  
TTGGTATCACATCTTAAGAGGAAGCAAAGTATTTTGGCTAATTCCACCCACGGACCGTAA  
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020  
AACCATAGTGTAGAATTCTCCTTCGTTTCATAAAACCGATTAAGGTGGGTGCCTGGCATT  
TCTGCAGTTGTATGAAAAGTGGGTCTCTCTGGCAAACAGGCAGACATTTTCTTCGGAGA  
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
AGACGTCAACATACTTTTACCCAAGAGAGACCGTTTGTCCGTCTGTAAAAGAAGCCTCT  
TACAGTGGAGAAATGTGCCAGGGTTTATTTAACCGCGGGGAACACCTTCTTCATACCCAC  
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
ATGTCACCTCTTTACACGGTCCCAAATAAATTGGCGCCCTTGTGGAAGAAGTATGGGTG  
CGGCTGGATACACGCAGTCTACACGCCACCCAATCCCTCGTCTTTGGAGGAAATTTCT  
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
GCCGACCTATGTGCGTCAGATGTGCGGTGGGTAGGGAGCAGAAACCTCCTTTAAAGGA  
GCACTCCTTCGGGATAGTGAAGCAACTTAAAACCGCCAGTGTGAGGATAGCACGAAAGT  
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
CGTGAGGAAGCCCTATCACTTCGTTGAATTTTGGCGGTCACAACTCCTATCGTGCTTTCA  
GCCGCAGAAGTTCCGATATCCCTTCTTCACGGAGATGCTGTGGTACGTTCTTGCTCGCTA  
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
CGGCGTCTTCAAGGCTATAGGGAAGAAGTGCCCTACGACACCATGCAAGAACGAGCGAT  
TGTTACACGCTACTGGGCCACTCACATCTGGAAGGTGAGGCCTCGTTGAGCGAGGATGA  
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380  
ACAAGTGTGCGATGACCCGGTGAGTGTAGACCTTCCACTCCGGAGCAACTCGCTCCTACT  
AATGGCTGCCCGTCCGCATACCCATCTTACGCACCACGAGCTCTTTGGACTGAAGGAGAT  
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440  
TTACCGACGGGCAGGCGTATGGGTAGAATGCGTGGTGTGCGAGAAACCTGACTTCCTCTA  
CGTTATGTATTTGTACGATCTGCCGCCGAGAAGAAAAATGTGCCAGCCTGGTTCTGGA  
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500  
GCAATACATAAACATGCTAGACGGCGGCGTCTTCTTTTACACGGGTCCGACCAAGACCT  
TCCTGTGGCCCTGATCAAAGACGTCCGATCGTTGGTTCGAGCGTCACTGCAAGGATCAGCA  
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560  
AGGACACCGGGACTAGTTTCTGCAGGCTAGCAACCAGCTCGCAGTGACGTTCTAGTCGT  
AGATCTCGCGATTACTGGCGTGTGAGTGTAAAGTCGCCACCAGGATCGCAGCCCCCTT  
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620  
TCTAGAGCGCTAATGACCGCACAGTCACAATTTACGCGGTGGTCTAGCGTCGGGGGAA  
CTTGTTGTATGATCGCACACGCGTGAAACAGGAGATAAAGCAGGAAATTGCACGCAAGAA  
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680  
GAACAACATACTAGCGTGTGCGCACTTTGTCTCTATTTTCGTCCTTTAACGTGCGTTCTT  
TGCAGAGGTAATACGGGAACAACAGCAATTGGAGGCGGGCAGGGCCAGGGAGGCCGAATC  
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740  
ACGTCTCCATTATGCCCTTGTGTGCTTAACCTCCGCCCGTCCCGGTCCCTCCGGCTTAG  
GGATACATCTCAATCCACTGGAGTGGGATCAGTCATCGGAATGGGGGCCGGAGTCGAGTA  
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800  
CCTATGTAGAGTTAGGTGACCTCACCTAGTCAGTAGCCTTACCCCCGGCCTCAGCTCAT  
CAGTAACGGAGTTATGAAGAAGGAGCAATTGGAGAACGGTAGCGGAGTAACAGTTGGCGG  
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860  
GTCATTGCCTCAATACTTCTTCTCGTTAACCTCTTGCCATCGCCTCATTGTCAACCGCC

GCACGGATCACAGCCAGAGGCCACCTTTGCCCTGCCCACCGATACGCTTAAGTATCGCCC  
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920  
CGTGCCCTAGTGTCTCGGTCTCCGGTGAAACGGGACGGGTGGCTATGCGAATTCATAGCGGG  
  
ACCCAAGAAAATGCATTTGGCCACGGCGTTGGTGGCAGCCGCTGCAAGCAGCAGCTCTGG  
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1980  
TGGGTTCTTTTACGTAAACCGGTGCCGCAACCACCGTCGGCGACGTTTCGTCGTCGAGACC  
  
AGGAGGCGGACCAGTTGCAGGAGTGGGAGGATCCGCGGTGGTGGGAAGCAGCCATAGTCC  
1981 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2040  
TCCTCCGCTGGTCAACGTCCTCACCCTCCTAGGCGCCACCACCCTTCGTCGGTATCAGG  
  
TACCGGCGGAGGAGTGGGCCCAGTCACAGGAGCAGGCGGTGCTATTAGTGTGATTGCCAC  
2041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2100  
ATGGCCGCCTCCTCACC CGGT CAGTGTCTCGTCCGCCACGATAATCACACTAACGGTG  
  
CAGCTCCAGCTACATTGAAGGAGGACAAGTTGGAGGAATTCTCAACATGGACAATTGTCA  
2101 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160  
GTGCGAGGTCGATGTAACCTCCTCCTGTTCAACCTCCTTAAGAGTTGTACCTGTTAACAGT  
  
TTCTCCAGAAGGGGGTGGCGCTAAACTGTCTCCAAATCTTACCGGTACTGGACAACCAAG  
2161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220  
AAGAGGTCTTCCCCACCGCGATTTGACAGAGGTTTAGAATGGCCATGACCTGTTGGTTC  
  
ACGTCGCAGGACGCGCTGCAAGAACTGTGCCGCTGCCAGCGCTCCGACTGCGGCACCTG  
2221 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280  
TGCAGCGTCTCTGCGGACGTTCTTGACACGGCGGACGGTCGCGAGGCTGACGCCGTGGAC  
  
TCCCTTCTGTATGGATATGGTTAAGTTTGGTGGACCTGGTCGGGCCAAGCAAACGTGCAT  
2281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340  
AGGGAAGACATACCTATACCAATTCAAACCACCTGGACCAGCCCGTTTCGTTTGACGTA  
  
GATGCGACAATGTCTATCGCCAATGCTGCCGGTTACAGCGCAGTGTGTTTACTGTTCATCT  
2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400  
CTACGCTGTTACAGATAGCGGTTACGACGGCCAATGTCGCGTCACACAAATGACAGTAGA  
  
GGATGGGTGGCGTCAGACACCAGTCTCTCCGACAGACCAAGCAACTGGCTTCCGCCGATGG  
2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2460  
CCTACCCACCGCAGTCTGTGGTCAGAGAGGCGTCTGGTTCGTTGACCGAAGCGCGCTACC  
  
GCCCTCCGCTCTAATGGAGTGTTCGGTGTGCTACGAGATCGCCACCCGGACTGTGCTCT  
2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2520  
CGGGAGGCGAGATTACCTCACAAGGCACACGATGCTCTAGCGGGTGGGCCTGACACGAGA  
  
CTCGCAGTTAGATGGCACAGAGGATGCGGCGGACGCCAAGGGAATCGTAAATGAAGATCT  
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2580  
GAGCGTCAATCTACCGTGTCTCCTACGCCGCTGCGGTTCCCTTAGCATTTACTTCTAGA  
  
GCCAAACAGTTGGGAGTGTCCCAGCTGCTGCCGCTCTGGCAAAACTATGACTATAAGCC  
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640  
CGGTTTGTCAACCCTCACAGGGTCGACGACGGCGAGACCGTTTTTGATACTGATATTCCG  
  
TCGCCATTTTCGAGCACGGCAAAAGTCCTCCGAAGTGCGTCGCGTTTCTGTTTCCCATGG  
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700  
AGCGGTAAAAGCTCGTGCCGTTTTACAGGAGGCTTCACGCAGCGCAAAGACAAAGGGTACC  
  
TCAAGGAGGCGCCGAAGGCCACGCGGATGGAAATACATTGCTGCCGCCCCCGGTGGGCCA  
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760  
AGTTCCCTCCGCGGCTTCCGGTGCGCCTACCTTTATGTAACGACGGCGGGGCCACCCGGT  
  
GTATAATGACTTTGTCTTCACCAGTGAGTCGAAATGGAATCGGGTACTGTCTAGTGGCCA  
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820  
CATATTACTGAAACAGAAGTGGTCACTCAGCCTTTACCTTAGCCCATGACAGTCACCGGT  
  
CATGACACATTGGAACACGGAATGAAGCGCCACCATCAGCTGGAGGTTAAACGGAGCG  
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880  
GTACTGTGTAACCTTTGTGCCTTACTTCGCGGTGGTAGTCGACCTCCAATTTTGCTCGC

```
AAATAATAGCTGCGACACCCCATCTCCCGGCATTTACCAAATGCCATTGGCGGCGACTC
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
TTTATTATCGACGCTGTGGGGTAGAGGGCCGTAAAGTGGTTACGGTAACCGCCGCTGAG

CAAAGTAGGAAAGCGGCGTAAGAGCGACGACGGAACGAGCGTTAGTAGCAGCATGCACGA
2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
GTTTCATCCTTTGCGCCGATTCTCGCTGCTGCCTTGCTCGCAATCATCGTCGTACGTGCT

GAGTAATGACGCCCCATGTGGCTCTTCGGCGGAGGGAGCAGGTGGAGCGGGAAATGCAAA
3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
CTCATTACTGCGGGGTACACCGAGAAGCCGCCTCCCTCGTCCACCTCGCCCTTTACGTTT

TGTATCCACTAATCAGTGGAGTGGCAGTGGCGGCGGAGGTGGTTCCCGCAAGAAGAACTC
3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
ACATAGGTGATTAGTCACCTCACCGTCACCGCCGCCTCCACCAAGGGCGTTCTTCTTGAG

AATACGATCACAGCTGGCCCAGCAAATGCTGAACTCGTCGACCCGAGTCTCAAGAAACC
3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
TTATGCTAGTGTGACCGGGTCGTTTACGACTTGAGCAGCTGGGCTCAGGAGTTCTTTGG

CCAATATGTCGTGCGGCCAGCAAGTGAACCGGTTCTGCTCTCGTCCAGTGAAATGGAGG
3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
GGTTATACAGCACGCCGGTCGTTACCTTGCCAAGCAGAAGCAGGTCACCTTTACCTCC

TAGCGCATCCGCCACCAACGGAATCAGCAATGGCAGCAATCAAAGCGGTGCAAACTCCTG
3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
ATCGCGTAGGCGGTGGTTGCCTTAGTCGTTACCGTCGTTAGTTTCGCCACGTTTGAGGAC

TGGAGCTGGCAACGGCGAGCGAGGAACCAATAACGGAGGATTGAGCGGCTCAAACGGCTT
3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
ACCTCGACCGTTGCCGCTCGCTCCTTGTTATTGCCTCCTAACTCGCCGAGTTTGCCGAA

GGGCAATCAGCATTACAGTTTCATCACAAAATCTGGCGTTGGACCCAAGTGTGCTGAAGAT
3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
CCCGTTAGTCGTAATGTCAAGTAGTGTTTTAGACCGCAACCTGGGTTGACACGACTTCTA

CATATTTTCGTTACCTTCCGCAGGACACGCTGGTTACCTGTTGCTCAGTATGTAAGGTATG
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
GTATAAAGCAATGGAAGGCGTCCTGTGCGACCAATGGACAACGAGTCATACATTCCATAC

GTCGAACGCAGCGGTTCGATCCCGATTTGTGGAAGAAAATGAATTGCTCGGAGCACAAAGAT
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
CAGCTTGCGTCGCCAGCTAGGGCTAAACACCTTCTTTTACTTAACGAGCCTCGTGTTCTA

GTCAGCATCACTTTTGACAGCGATTGTGCGCAGGCAGCCGAGCATCTTATTTTGGACTG
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
CAGTCGTAGTGAAAACGTGTCGCTAACACGCGTCCGTCGGCCTCGTAGAATAAAACCTGAC

GACGCAGATTGCCAAGAGGCAGTTGGCGTGGCTGGTGGCTCGCCTCCCGGCGCTCAAGAA
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
CTGCGTCTAACGTTCTCCGTCAACCGCACCGACCACCGAGCGGAGGGCCGCGAGTTCTT

TCTCTCGCTGCAAACTGTCCCATCCAGGCAGTGTTGGCACTGCACACCTGCCTTTGTCC
3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
AGAGAGCGACGTTTTTGACAGGGTAGGTCCGTCACAACCGTGACGTGTGGACGGAACAGG

ACCGCTTCAAACCTCTGGATCTCAGCTTTGTGAGAGGATTGAACGATGCTGCAATAAGGGA
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
TGGCGAAGTTTGAGACCTAGAGTCGAAACACTCTCCTAACTTGCTACGACGTTATTCCTT

CATCCTTTACCTCCAAAGGATTCGCGACCTGGCTTAAGTGAAGTGAAGACGCGTCTAAG
3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3840
GTAGGAAAGTGAGGTTTCCCTAAGCGCTGGACCGAATTCAGTGAAGTCTGCGCAGATTTC

GGATCTTAAAGTAATGAAGCTGGCCGGAACAGATATCTCCGATGTGGCTGTGCGCTATAT
3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3900
CCTAGAATTTCACTTCTCGACCGGCCTTGTCTATAGAGGCTACACCGACACGCGATATA
```

```
CACGCAGTCGTTACCGTATCTGCGGCATCTGGATCTCTCCTCCTGCCAACGAATCACGGA
3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3960
GTGCGTCAGCAATGGCATAGACGCCGTAGACCTAGAGAGGAGGACGGTTGCTTAGTGCCCT

TGCGGGCGTGGCACAAATAGGAACCTCCACCACAGCCACCGCTCGTCTCACGGAGCTTAA
3961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4020
ACGCCCCGACCGTGTTTATCCTTGGAGGTGGTGTCGGTGGCGAGCAGAGTGCCTCGAATT

TCTGAGCGCCTGCAGGCTTGTGTCTGAGAACGCTCTGGAGCACCTGGCCAAGTGCGAAGG
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4080
AGACTCGCGGACGTCCGAACACAGACTCTTGCGAGACCTCGTGGACCGGTTACAGCTTCC

TCTCATCTGGCTGGACCTGCGCCATGTGCCCCAGGTCAGCACCCAGTCGGTGATTTCGCTT
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4140
AGAGTAGACCGACCTGGACGCGGTACACGGGGTCCAGTCGTGGGTGAGCCACTAAGCGAA

TGCAAGCAACTCCAAGCATGATCTTTGCGTCAGAGACATCAAGCTGGTAGAGCGAAGGCG
4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4200
ACGTTTCGTTGAGGTTTCGTACTAGAAACGCAGTCTCTGTAGTTCGACCATCTCGCTTCCGC

GAGGAACTCGACGACAGCAAACCGAAGCTGGCACCACGACTGAGCCACTGGCAGCTGGAG
4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 4260
CTCCTTGAGCTGCTGTCGTTTGGCTTCGACCGTGGTGCTGACTCGGTGACCGTCGACCTC
```

**D. Aminosäuresequenz des Drosophila Mehmet (dMehmet)-Protein**

1 MSTAVETGSS PAKSNSNNSS SGGNNNNGNG NLSPNAKGVQ RRQLRERKQR  
51 KLYLEEWSLG DEDGEGTRGF SVAEKLESSK FAQAGMVREM RGCDLTVAFL  
101 QQHGFNIPLL FRDKAGLGLR MPDPQEFTVN DVRLCVGSRR LLDVMDVNTQ  
151 KNLQMTMKEW QQYYDSPQKD RLLNVISLEF SHTRLDRFVQ SPEIVRQIDW  
201 VDVVWPKQLK DAQREGTNLL GMMYPKVQK YCLMSVKNCY TDFHIDFGGT  
251 SVWYHILRGS KVFWLIPPTD RNLQLYEKWV LSGKQADIFF GDTVEKCARV  
301 YLTAGNTFFI PTGWIHAVYT PTQSLVFGGN FLHSFGIVKQ LKTASVEDST  
351 KVPQKFRYPF FTEMLWYVLA RYVHTLLGHS HLEGEASLSE DEMAARPHTH  
401 LTHHELFGLK EIVMYLYDLP PQKKNVPSLV LDPVALIKDV RSLVERHCKD  
451 QQDLAITGVS VLKSPPGSQP PFLLYDRTRV KQEIKQEIAR KNAEVIREQQ  
501 QLEAGRAREA ESDTSQSTGV GSVIGMGAGV EYSNGVMKKE QLENGSGVTV  
551 GGHGSQPEAT FALPTDTLKY RPPKKMHLAT ALVAAAASSS SGGGGPVAGV  
601 GGSAVVGSSH SPTGGGVGPV TGAGGAISVI ATSSSYIEGG QVGILNMDN  
651 CHSPEGGAK LSPNLTGTGQ PRRRRTRCKN CAACQRSDCG TCPFCMDMVK  
701 FGGPGRAKQT CMMRQCLSPM LPVTAQCVYC HLDGWRQTPV SPQTKQLASA  
751 DGPSALMECS VCYEIAHPDC ALSQLDGTED AADAKGIVNE DLPNSWECPS  
801 CCRSGKNYDY KPRHFRARQK SSEVRRVSVS HGQGAEGHA DGNTLLPPP  
851 GQYNDFVFTS ESEMESGTVS GHMTHWKHGM KRHHQLEVKT ERNNSCDTPS  
901 PGISPNAIGG DSKVGKRRKS DDGTSVSSSM HESNDAPCGS SAEGAGGAGN  
951 ANVSTNQWSG SGGGGGSRKK NSIRSQLAQQ MLNSSTRVLK KPQYVVRPAS  
1001 GTGSSSSSGN GGSASATNGI SNGSNQSGAN SCGAGNGERG TNGGLSGSN  
1051 GLGNQHYSSS QNLALDPTVL KIIFRYLPQD TLVTCCSVCK VWSNAAVDPD  
1101 LWKKMNCSEH KMSASLLTAI VRRQPEHLIL DWTQIAKRQL AWLVARLPAL  
1151 KNLSLQNCPI QAVLALHTCL CPPLQTLDSL FVRGLNDAAI RDILSPPKDS  
1201 RPGLSDSKTR LRDLKVMKLA GTDISDVAVR YITQSLPYLR HLDLSSCQRI  
1251 TDAGVAQIGT STTATARLTE LNLSACRLVS ENALEHLAKC EGLIWLDLRH  
1301 VPQVSTQSVI RFASNSKHDL CVRDIKIVER RRRNSTANR SWHHD\*

## IX. Curriculum vitae

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   | PERSÖNLICHE DATEN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Name              | Anja Septinus                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| geboren am        | 07.Mai 1973 in Würselen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Familienstand     | ledig                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                   | SCHULAUSBILDUNG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 08/1979 - 07/1983 | Gemeinschaftsgrundschule Linden-Neusen, Würselen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 08/1983 - 06/1993 | Heilig-Geist-Gymnasium, Würselen<br>Abschluss: allgemeine Hochschulreife                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   | STUDIUM                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 10/1993 - 01/2000 | Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen<br><b>Diplom Biologin</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwerpunkte: Molekularbiologie, Mikrobiologie, Ökologie und molekulare Pathologie</li> <li>• Diplomarbeit: "Untersuchungen zur <i>in vivo</i> Assemblierung von Immunotoxinen in <i>Nicotiana tabacum</i>"</li> <li>• Abschluss: sehr gut</li> </ul>                                                                                                                                                |
| 04/2000 – 02/2004 | Universitätsklinikum der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn<br><b>Promotion</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dissertation: "Analysen zur Funktion von Mehmet, einem neuen Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors AP-2<math>\alpha</math>, sowie Charakterisierung von Mehmet in <i>Drosophila melanogaster</i>"</li> <li>• Doktorvater: Professor Dr. med. R. Büttner<br/>Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Bonn</li> <li>• Abschluss: magna cum laude (sehr gut)</li> </ul> |
|                   | BESCHÄFTIGUNGSVERHÄLTNISSE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 01/1998 - 07/1998 | Universitätsklinikum Aachen<br>Institut für Pathologie<br>Funktion: studentische Hilfskraft                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 04/1999 - 11/1999 | RWTH Aachen<br>Institut für Biologie I Botanik und Molekularbiologie<br>Funktion: studentische Hilfskraft                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 04/2000 - 02/2004 | Universitätsklinikum Aachen und Bonn<br>wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pathologie<br>Tätigkeitsbereich: Promotionsarbeit                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |