

# Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der AAA<sup>+</sup> ATPasen Pontin und Reptin

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht von  
Diplom-Biochemiker Kai Frederik Albring  
geboren am 12 Juli 1976 in Pasadena/Kalifornien

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

Januar, 2010

Gutachter: Prof. Dr. Otmar Huber  
Prof. Dr. Gerd Multhaup

Disputationstermin: 01.03.2010

Für Anne & Joris

1	Einleitung.....	1
1.1	Die AAA <sup>+</sup> -ATPasen Pontin und Reptin.....	1
1.2	Pontin und Reptin bei der Zellteilung.....	3
1.3	Pontin und Reptin bei der Reifung und Assemblierung von snoRNPs und des Telomerase Holo-Enzyms.....	3
1.4	Pontin und Reptin als Komponenten von Chromatin-Remodelling-Komplexen.....	6
1.5	Pontin und Reptin im Wnt-Signalweg.....	7
1.6	Die Wirkung von Hint1 auf Pontin und Reptin im Wnt-Signalweg.....	8
1.7	Die Familie der HIT-Proteine.....	8
1.8	Das fragile Histidin-Triaden Protein Fhit.....	9
1.9	Regulation des Wnt-Signalwegs durch Fhit.....	11
1.10	Zielsetzung der Arbeit.....	13
2	Material.....	14
2.1	Reagenzien.....	14
2.2	Enzyme.....	16
2.3	Verwendete Kits.....	16
2.4	Antikörper.....	17
2.5	Plasmide.....	18
2.6	Zelllinien.....	18
2.7	Bakterienstämme.....	18
2.8	Geräte.....	19
2.9	Verbrauchsmaterialien.....	20
2.10	Software.....	20
2.11	Puffer und Stammlösungen.....	21
2.12	Bakterien- und Zellkulturmedien.....	25
2.13	Lösungen für Immunfluoreszenz.....	26
3	Methoden.....	27
3.1	Molekularbiologische Techniken.....	27
3.1.1	Restriktionsverdau von DNA.....	27
3.1.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	27
3.1.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA.....	28
3.1.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	28
3.1.5	Dephosphorylierung von DNA.....	29
3.1.6	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA.....	29
3.1.7	Ethanol-Präzipitation von DNA.....	29
3.1.8	Ligation von DNA.....	30
3.1.9	Transformation von <i>E. coli</i> nach Ligation.....	30

---

3.1.10	Transformation von <i>E.coli</i> für Proteinexpression oder DNA-Präparation.....	30
3.1.11	Isolierung und Präparation von DNA.....	31
3.1.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
3.1.13	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	32
3.2	Proteinchemische und Chromatographische Methoden.....	33
3.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	33
3.2.2	Western-Blot-Analyse.....	34
3.2.3	Färbung mit Coomassie-Blue .....	34
3.2.4	Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen.....	35
3.2.5	Expression und Reinigung von MBP-Fusionsproteinen.....	35
3.2.6	Expression und Reinigung von His <sub>6</sub> -Fusionsproteinen.....	36
3.2.7	Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen.....	36
3.2.8	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	37
3.2.9	In vitro Proteininteraktions-Assay.....	37
3.2.10	Gelfiltration von Proteinen.....	38
3.2.11	Konzentration und Umpufferung von Proteinen.....	38
3.3	Zellbiologische Methoden.....	38
3.3.1	Transfektion von Zellen mit Calcium-Phosphat-Präzipitaten.....	38
3.3.2	Transfektion von Zellen mit Fugene HD.....	39
3.3.3	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	39
3.3.4	Immunpräzipitation von Proteinen.....	39
3.3.5	Chromatin-Immunopräzipitationen.....	40
3.3.5.1	Einfache Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	40
3.3.5.2	Doppel-Chromatin-Immunopräzipitation (Re-ChIP).....	42
3.3.5.3	Nachweis der spezifischer DNA-Fragmente nach ChIP und Re-ChIP.....	42
3.3.6	Reportergenanalyse.....	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen $\beta$ -Catenin Interaktionspartnern .....	45
4.1.1	Pontin und Reptin binden direkt an mit Fhit.....	45
4.1.2	Kartierung der Fhit-Bindungsepitope in Pontin und Reptin.....	47
4.1.3	Fhit bildet einen Komplex mit Pontin, Reptin und Tip60 in HEK-293 Zellen.....	48
4.1.4	Nachweis endogener Fhit-Pontin- und Fhit-Reptin-Komplexe in HEK293 Zellen .....	49
4.1.5	Tip60 bindet direkt an Fhit.....	50

---

4.2	Wirkung von Fhit, Pontin und Reptin auf die $\beta$ -Catenin/Lef-1/TCF4 vermittelte Transkription.....	52
4.3	Fhit-Pontin und Fhit-Reptin-Komplexe binden an die Promotoren von $\beta$ -Catenin Zielgenen.....	54
4.4	Die intrazelluläre Lokalisation von Pontin, Reptin und Fhit.....	55
4.4.1	Immunofluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Pontin, Reptin und Fhit.....	55
4.4.2	Spezifität der verwendeten Antikörper.....	57
4.5	Die nukleolären Funktionen von Pontin.....	61
4.5.1	Pontin kolokalisiert mit Fibrillarin, UBF und RNA-Polymerase I im Nukleolus....	61
4.5.2	Analyse der intranukleolären Lokalisation von Pontin durch Elektronenmikroskopie.....	63
4.5.3	Zellzyklus-abhängige Lokalisation von Pontin.....	64
4.5.4	Endogenes Pontin assoziiert mit RNA-Polymerase I.....	64
4.5.5	Chromatin-Immunopräzipitation zur Untersuchung der Assoziation von Pontin und c-Myc mit den rDNA-Clustern in HeLa Zellen.....	65
4.5.6	Effekt von Pontin auf die nukleoläre Transkription.....	66
4.5.7	Untersuchung der Lokalisation von Pontin während der Mitose.....	67
4.6	Analyse der Struktur von Pontin/Reptin Komplexen.....	68
4.6.1	Expression und Reinigung von His <sub>6</sub> -Pontin und His <sub>6</sub> -Reptin.....	68
4.6.2	Koexpression von Pontin und Reptin mit dem pET-Duet-1 System.....	70
4.6.3	Koexpression von Pontin und Reptin mit dem pQLink-System.....	72
5	Diskussion.....	74
5.1	Das Tumorsuppressorprotein Fhit als Interaktionspartner von Pontin und Reptin.....	75
5.2	Fhit moduliert die Wirkung von Pontin und Reptin auf die $\beta$ -Catenin/LEF-1/ TCF-4-vermittelte Transkription.....	76
5.3	Pontin, Reptin und Fhit liegen im Nukleus vor und binden an die Promotor-Regionen von Wnt-Zielgenen.....	76
5.4	Das Tumorsuppressorprotein Fhit interagiert mit dem Chromatin-Remodelling-Faktor Tip60.....	77
5.5	Pontin lokalisiert in den fibrillären Zentren des Nukleolus.....	78
5.6	Pontin und Reptin bilden hetero-hexamere und hetero-dodecamere Komplexe.....	81
6	Zusammenfassung / Summary.....	83
7	Literatur .....	85
8	Anhang.....	94
9	Publikationsverzeichnis.....	99
10	Danksagung.....	100
11	Eidesstattliche Erklärung.....	101

---

## 1 Einleitung

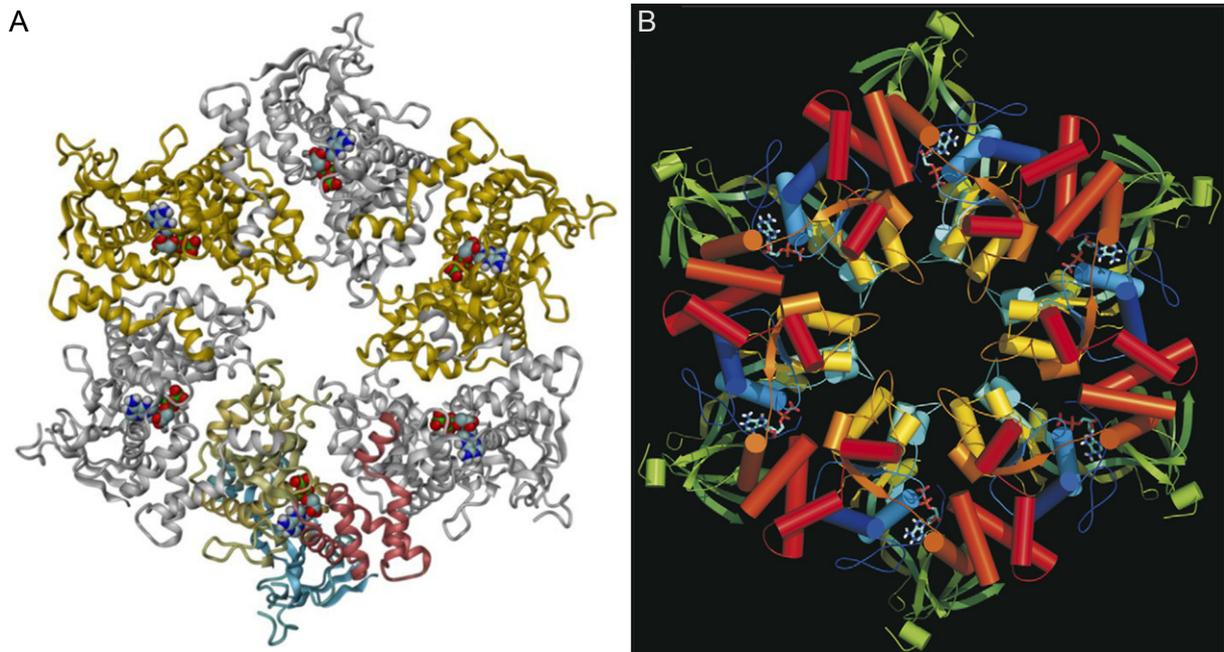
### 1.1 Die AAA<sup>+</sup> ATPasen Pontin und Reptin

Der Begriff AAA<sup>+</sup> ATPase (ATPases associated with various cellular activities) leitet sich aus der Beobachtung ab, dass das Spektrum der Aktivitäten der Vertreter dieser Protein-Superfamilie von der Regulation des Zellzyklus, Kontrolle der Apoptose, Proteinfaltung und -abbau, Organellen-Biogenese, DNA/RNA-Stoffwechsel, Steuerung von Membranfusionen hin bis zum Transport von Proteinen durch Membranen reicht [1]. Die AAA<sup>+</sup> ATPasen enthalten eine Reihe charakteristischer Sequenz- und Struktur motive, die an der Hydrolyse von ATP beteiligt sind und die dabei frei werdende Energie in mechanische Energie umsetzen. AAA<sup>+</sup> ATPasen liegen in ihrer aktiven Form als zyklische Penta-, Hexa- oder Heptamere vor. Charakteristische Merkmale einer AAA<sup>+</sup> ATPase sind die Walker A bzw. P-Loop (GXXXXGKT), Walker B (DEXH/N) [2], Sensor I, Arginin-Finger und Sensor II Motive. Jedes dieser Motive ist für die ATPase-Aktivität von AAA<sup>+</sup> ATPasen essentiell. Die Walker A und Walker B Motive sind zusammen mit dem Arginin-Finger an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt. Die Sensor I und Sensor II Motive erkennen, ob ATP, ADP oder kein Adenin-Nukleotid im katalytischen Zentrum gebunden ist [3]. Der Arginin-Finger ist somit ein entscheidender Faktor für die Kooperativität der AAA<sup>+</sup> ATPase Untereinheiten in den multimeren Enzymkomplexen. Dabei ragt der Arginin-Finger einer Untereinheit in das katalytische Zentrum der direkt benachbarten Untereinheit und ist somit direkt an der Hydrolyse von ATP in dieser Untereinheit beteiligt. Deshalb besitzen AAA<sup>+</sup> ATPasen nur in ihrer multimeren Form, nicht aber als monomere Untereinheiten eine ATPase-Aktivität [4,5].

Pontin und Reptin sind die zwei Vertreter der Tip49 Familie aus der Klasse der AAA<sup>+</sup> ATPasen [6]. Auf Grund der zeitgleichen Entdeckung durch verschiedene, unabhängige Arbeiten ist Pontin auch unter den Namen Pontin52, Ruvbl1, Rvb1, Tip49, Tip49a, NMP238, ECP54, Tap54 $\alpha$  bekannt. Für Reptin finden sich in der Literatur auch die Namen Reptin52, Ruvbl2, Tip48, Tip49b, ECP51, Tap54 $\beta$  und CGI-46[7]. Sowohl Pontin als auch Reptin besitzen alle typischen AAA<sup>+</sup> ATPase-Motive wie Walker A, Walker B, Sensor 1, Sensor 2 und den Arginin-Finger. Sie zeichnen sich allerdings durch eine einzigartige Domäneninsertion zwischen den typischen Walker A und B Motiven aus, die in dieser Art nur in Pontin und Reptin vorhanden ist [3]. Deshalb werden sie einer eigenen Subfamilie der AAA<sup>+</sup> ATPasen zugeordnet [8]. Beide Vertreter dieser Familie sind in vielen Organismen hoch konserviert. Von einem einzelnen Vertreter in manchen Archaea-Bakterien spaltet sich die Tip49-Familie in höheren Eukaryoten in zwei eng verwandte Gruppen auf, namentlich Pontin und Reptin [1]. Zudem zeigte sich, dass beide Proteine für das Überleben der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* [9], der Fruchtfliege

*Drosophila melanogaster* [10] und des Nematoden *Caenorhabditis elegans* essentiell sind [www.wormbase.org]. Zwischen Pontin mit 456 und Reptin mit 463 Aminosäuren besteht ein hoher Grad der Konservierung, so sind Pontin und Reptin zu 42% aus identischen und zu 65% aus homologen Aminosäuren aufgebaut [12]. Die starke evolutionäre Konservierung zeigt sich zum Beispiel zwischen humanem Pontin und dem Pontin der Ratte (*Rattus norvegicus*), das sich nur in einer einzigen Aminosäure unterscheidet [13]. Für die neuartige Domäne II in Pontin, die zwischen den Walker A und Walker B Motiven liegt und in den bekannten Pontin Proteinen eine Länge von etwa 170 Aminosäuren aufweist, konnte gezeigt werden, dass sie ssDNA, dsDNA und ssRNA binden kann [11]. Die räumliche Anordnung ihrer  $\alpha$ -Helices und der  $\beta$ -Faltblätter weist starke Ähnlichkeiten zur DNA-bindenden Domäne des RPA (replication protein A) auf [11]. Die Domäne II von Reptin bindet dagegen weder DNA noch RNA, was möglicherweise einen entscheidenden Unterschied zwischen den beiden eng verwandten Proteinen darstellen könnte [14]. Pontin und Reptin können sowohl homo- als auch heterohexamere Komplexe ausbilden, die sich wiederum zu dodekameren Komplexen bisher unbekannter Stoichiometrie zusammenlagern [11,15-17]. Für Pontin wurde die Kristallstruktur des Homohexamers aufgeklärt (Abb. 1 a,b), für Reptin war dies bisher jedoch nicht möglich [11]. Es liegen jedoch kryo-elektronenmikroskopische Analysen von dodekameren Pontin-Reptin-Komplexen vor, die allerdings auf Grund der großen Strukturähnlichkeiten von Pontin und Reptin nicht klären konnten, ob die Dodekamere aus jeweils einem Homohexamer von Pontin und Reptin, oder aus zwei Pontin/Reptin heterohexameren Ringen aufgebaut sind [18].

Für Pontin und Reptin wurden eine Vielzahl Funktionen in verschiedenen Zusammenhängen gezeigt, die im Folgenden genauer erläutert werden sollen. Auf Grund ihrer partiellen Ähnlichkeit zu RuvB wurden Pontin und Reptin eine Funktion als DNA-abhängige Helikasen zugesprochen [13,19,20]. Die für Pontin [13] und Reptin [12] beschriebenen Helikase-Aktivitäten konnte aber in anderen Publikationen nicht bestätigt werden [9,21].



**Abb. 1:** Kristallstruktur des Pontin Homohexamers. A) Ribbon-Darstellung des Pontin Hexamers (Aufsicht). Benachbarte Untereinheiten sind in hellgrau und gold dargestellt. Die gebundenen ADP-Moleküle sind als Kalottenmodell dargestellt (nach Matias et al [11]). B) Schematische Darstellung des Pontin Hexamers (Aufsicht). Die Polypeptidketten sind in Regenbogenfarben vom N-Terminus (rot) zum C-Terminus (blau) dargestellt. Gebundene ADP-Moleküle sind in Ball und Stick-Darstellung gezeigt (nach Gallant [7]).

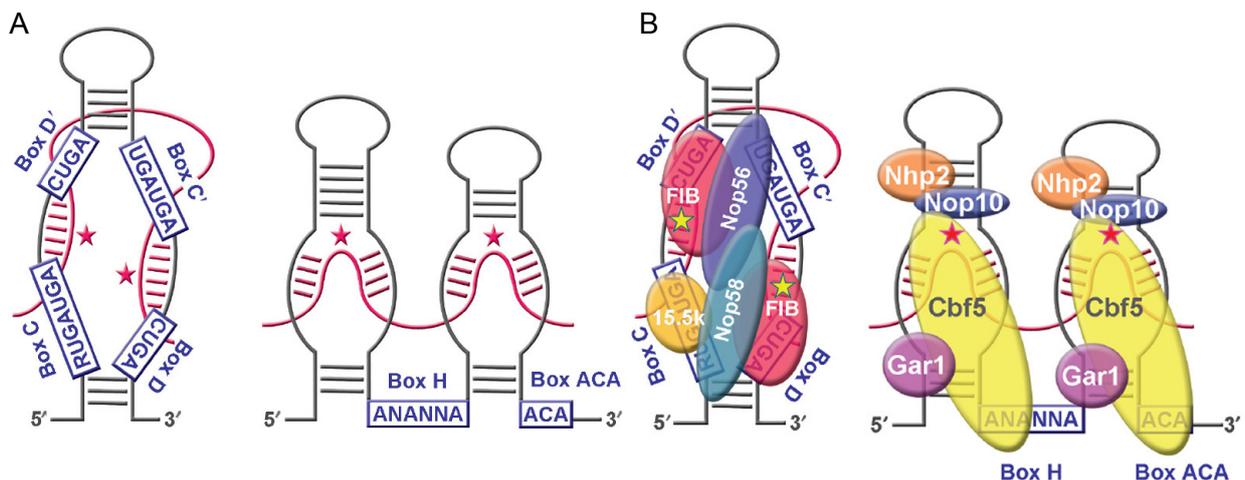
## 1.2 Pontin und Reptin bei der Zellteilung

Pontin und Reptin liegen während der G1/S-Phase hauptsächlich im Zellkern und teilweise im Zytoplasma vor [22,23]. Für beide Proteine wurde eine Assoziation mit  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tubulin während der Mitose nachgewiesen [24,25]. So ist Reptin im Bereich der Metaphase-Platte und an den Zentrosomen lokalisiert, wohingegen Pontin mehr in den Bereichen dazwischen vorliegt. Für eine direkte Beteiligung von Pontin an der Mitose spricht, dass es für die korrekte Lokalisation der ILK (Integrin-linked kinase) an den Zentrosomen essentiell ist. Eine Verminderung von Pontin durch siRNA führt zu einer veränderten Lokalisation von ILK und zur Bildung abnormaler Zentrosomen. Diese fehlerhaften Zentrosomen zeigen entweder eine perizentrische Lokalisation oder es kommt zur Ausbildung von einer Vielzahl von Zentrosomen, wodurch die so behandelten Zellen schließlich zu Grunde gehen [25,26].

## 1.3 Pontin und Reptin bei der Reifung und Assemblierung von snoRNPs und des Telomerase Holo-Enzyms

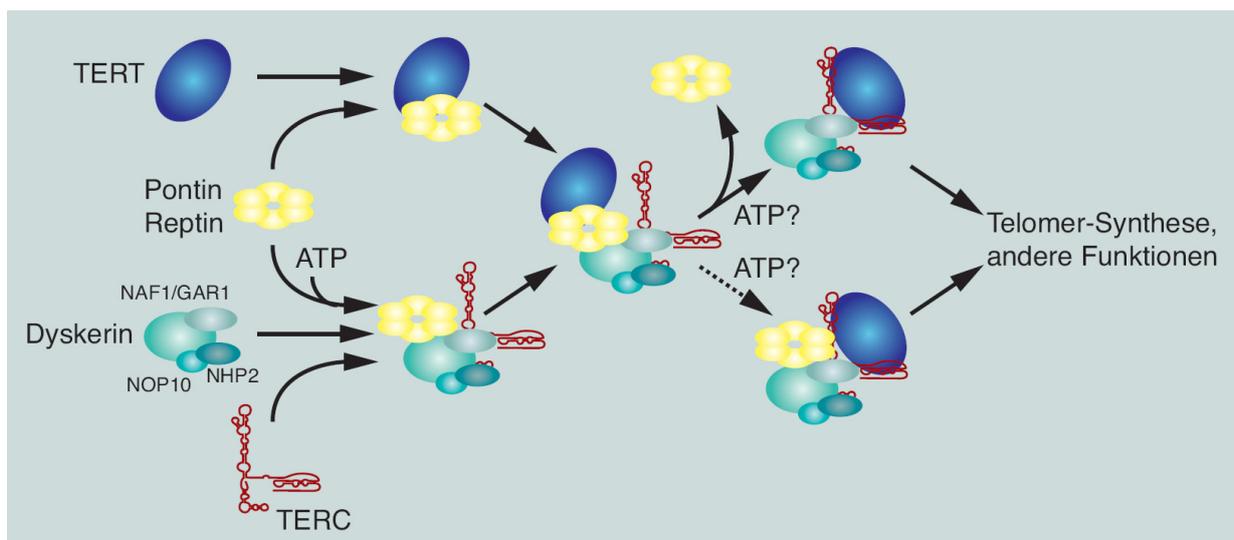
Im Nukleolus, der auffälligsten und am deutlichsten abgetrennten Substruktur des Zellkerns, erfolgt die Synthese und Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten und der rRNAs. Der Nukleolus ist nicht durch eine Membran begrenzt und besteht aus snoRNPs (small nucleolar ribonucleoprotein partikels), rRNA, tRNA, snoRNA (small nucleolar RNA) und den NORs

(nucleolar organizer regions) des Chromatins. Die NORs sitzen beim Menschen auf fünf acrozentrischen Chromosomen und enthalten insgesamt etwa 400 rRNA-Gen-Cluster [27]. Die vielfältige Population von kleinen, nicht-codierenden, nukleolären RNAs bildet zusammen mit bestimmten Proteinen die snoRNPs. Es gibt zwei Hauptgruppen der snoRNPs, die Box H/ACA und die Box C/D snoRNPs. Grundsätzlich sind sie ähnlich aufgebaut, sie bestehen aus einem konstanten snoRNA-Anteil, den Box H/ACA oder den Box C/D snoRNAs (Abb. 2 a), die als Gerüst dienen, und zusätzlich einem variablen snoRNA Anteil, der zur Erkennung der zu modifizierenden pre-rRNA-Sequenz dient. Die Box H/ACA snoRNPs enthalten die  $\psi$ -Synthase Cbf-5, welche Pseudouridylierungen in die pre-rRNA einführt. Die Box C/D snoRNPs enthalten die Methyltransferase Fibrillarin, welche die Ribose 2'-O-Methylierungen ausführt. Diese beiden Arten von Modifikationen dienen zur Stabilisierung der pre-rRNA und sorgen für die richtige Faltung und Assemblierung der Ribosomen. Ziele der snoRNPs sind die pre-rRNAs, während diese im Nukleolus transkribiert, prozessiert und schließlich zu den ribosomalen Untereinheiten aufgebaut werden. Pontin und Reptin interagieren mit den nukleolären snoRNP-Proteinen Fibrillarin, 15.5K, BCD1, NOP17 und TAF9 und sind essentiell für die Reifung von Box C/D und Box H/ACA snoRNPs [28]. Da Pontin und Reptin mit fast allen Komponenten der Box C/D und Box H/ACA snoRNPs interagieren, wird vermutet, dass sie die sequentielle Assemblierung der snoRNP-Proteine mit dem RNA-Anteil modulieren [29]. Bei der Hefe *saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Pontin und Reptin direkt an der Reifung der snoRNA-Varianten Box C/D U3, U14, U18 und den Box H/ACA snR4, snR45 und snR13 beteiligt sind [30].



**Abb. 2:** A) Schematische Darstellung der Box C/D und Box H/ACA guide-RNAs (grau) im Komplex mit den variablen target-RNAs (rot). B) Schematische Darstellung der Box C/D und H/ACA snoRNPs: guide-RNAs (grau), target-RNAs (rot) Proteine mit enzymatischer Aktivität (gelber bzw. roter Stern) (nach Reichow et al. [31])

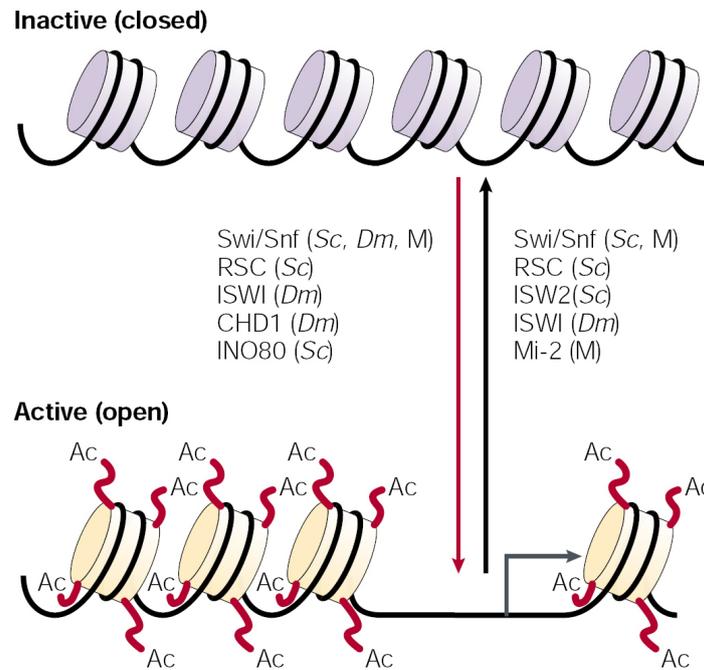
Neben der Assemblierung von snoRNPs sind Pontin und Reptin entscheidend an der Assemblierung und Reifung der Telomerase beteiligt, welche wie die snoRNPs aus einem Protein- und einem RNA-Anteil aufgebaut ist. Die Telomerase ist ein Multiproteinkomplex der die 5.000-15.000 Basenpaar langen Wiederholungen der Sequenz TTAGGG in den Telomeren an den Enden der Chromosomen synthetisiert. Bei jeder Zellteilung wird die gesamte genomische DNA repliziert, hierbei kommt es jedoch auf Grund der Primer-abhängigen Initiation der DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase nur zu einer unvollständigen Replikation und somit zu einer Verkürzung der Enden der Chromosomen um etwa 100 Basenpaare [32,33]. Die Enden der Chromosomen müssen durch die Telomerase aufgefüllt werden, um letztendlich einen Verlust an genetischer Information zu verhindern. Das Telomerase Holo-Enzym besteht aus der Reversen-Transkriptase TERT (telomerase reverse-transcriptase), dem RNA-Anteil TERC (telomerase RNA component), der als Vorlage bei der Auffüllung der DNA-Enden dient, und dem TERT-bindenden Protein Dyskerin. Pontin und Reptin haben ähnlich wie bei den snoRNPs eine entscheidende Funktion bei der Assemblierung des Telomerase Holo-Enzyms bestehend aus TERT, TERC und Dyskerin. Hierbei interagieren Pontin und Reptin zuerst mit TERT und sind essentiell für die folgende Verbindung von TERT mit TERC/Dyskerin [34].



**Abb. 3:** Schematische Darstellung einer möglichen Funktion von Pontin und Reptin bei der Assemblierung des Telomerase-Holo-Enzyms (Züngsdorf und Dingermann [35]).

#### 1.4 Pontin und Reptin als Komponenten von Chromatin-Remodelling-Komplexen

Proteine der Pontin/Reptin Familie wurden sowohl in Hefen als auch in Säugetieren als essentielle Komponenten verschiedener Chromatin-Remodeling Komplexe identifiziert [7]. In eukaryotischen Zellen liegt die genomische DNA in Verbindung mit einer Vielzahl von Proteinen als Chromatin verpackt vor. Das Nukleosom stellt dabei die kleinste organisatorische Einheit des Chromatins dar und besteht aus ca. 145 Basenpaaren DNA, die um ein Histon-Oktamer gewunden sind. Ein Histon-Oktamer ist aus jeweils zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut. Diese Nukleosomen können sich wiederum in höhere Struktur wie der „Perlen auf einer Kette“-Form, der 30nm Faser und schließlich den Chromosomen organisieren. Die Organisation bzw. der Aufbau des Chromatins ist hoch dynamisch und reguliert damit fast alle DNA-assoziierten Prozesse, einschließlich Transkription, Replikation und Reparatur. Die dynamische Veränderung der Chromatinstruktur ist ein mehrstufiger Prozess, in dem erstens ATP-abhängig die Histon-Zusammensetzung oder die Position der Nukleosome auf der DNA verändert wird, zweitens durch Histon-modifizierende Enzyme Acetyl-, Methyl- oder Phosphatgruppen auf Aminosäurereste der Histone übertragen bzw. entfernt werden, wodurch deren Affinität zueinander und zur DNA moduliert wird. Die Enzyme, die diese Prozesse regulieren sind hochspezifisch und gehören einer Vielzahl von Enzymklassen wie Histon-Acetyltransferasen (HAT), -Deacetylasen (HDAC), -Methyltransferasen, Demethylasen, -Kinasen, -Ubiquitin-Ligasen und einer Reihe weiterer Enzymklassen an. Pontin und Reptin sind in der Hefe im Ino80-, dem Polycomb-, BAF53a- und dem Swr1-Chromatin-Remodelling-Komplex [36] und in Säugetieren im SRCAP- und dem TRRAP/Tip60-Chromatin-Remodelling-Komplex enthalten, welche zur Familie der Histon Acetyltransferasen gehören [21]. Da diese Chromatin-Remodeling-Komplexe die Transkription einer Vielzahl von Genen regulieren sind Pontin und Reptin vermutlich auch direkt an deren Regulation beteiligt. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass Pontin und Reptin die Transkription von ca. 5% der Gene in Hefe direkt beeinflussen [37]. Zu ihrer Rolle in Chromatin-Remodelling Komplexen kommt, dass Pontin und Reptin mit dem transkriptionsassoziierten Protein  $\beta$ -Catenin [10] und den Transkriptionsfaktoren TBP [10], c-Myc [38], ATF2 (nur Reptin) [39] und E2F1 (nur Pontin) interagieren. Zusätzlich konnten Pontin und Reptin in Komplexen mit Tip60 an den Promotoren verschiedener Zielgene von c-Myc [38,40], E2F1 [41] und NF $\kappa$ B [42] nachgewiesen werden.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Chromatin-Zustände an/aus (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Dm: *Drosophila melanogaster*; M: Mammalia) (nach Tsukiyama[43])

### 1.5 Pontin und Reptin im Wnt-Signalweg

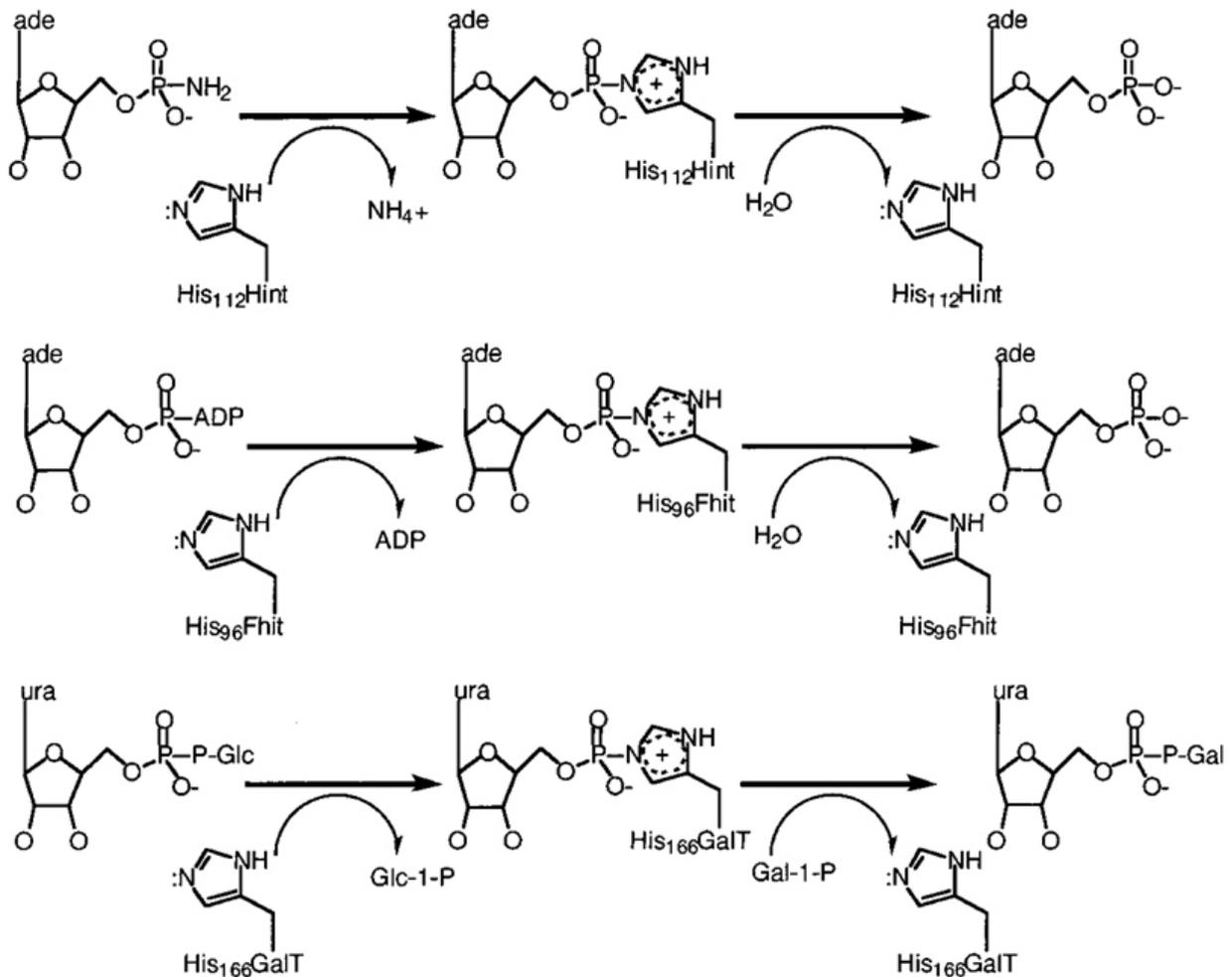
Pontin und Reptin interagieren mit der N-terminalen Domäne von  $\beta$ -Catenin und zeigen einen antagonistischen Einfluss auf die  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF vermittelte Transkription [10,22]. Hierbei wirkt Pontin als Aktivator und Reptin als Repressor der Transkription von Wnt-Zielgenen wie Siamois [10] und ITF-2 [44]. Beide Proteine können sowohl mit  $\beta$ -Catenin als auch mit TBP interagieren und verbinden somit vermutlich den  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-Komplex über das TBP mit der basalen Transkriptionsmaschinerie [10]. Bisher ist wenig von den molekularen Grundlagen bekannt, wie Pontin und Reptin ihre transkriptionsregulierende Funktion ausüben. Vermutlich spielen dabei die Wechselwirkungen von Pontin und Reptin mit verschiedenen Interaktionspartnern eine Rolle. Am Beispiel des Metastasierungs-Suppressorgens KAI1 wurde gezeigt [42], dass in nicht-metastasierenden Zellen Pontin/Tip60 Komplexe an den Promotor binden, was mit einer aktiven Transkription einhergeht. In metastatisierenden Zellen dagegen waren  $\beta$ -Catenin/Reptin Komplexe auf den Promotorbereichen nachweisbar und lösten eine Inaktivierung der Transkription des KAI1-Gens aus. Für die antagonistische Wirkung von Pontin und Reptin auf die  $\beta$ -Catenin-vermittelte Transkription werden ähnliche Mechanismen vermutet [45].

## 1.6 Die Wirkung von Hint1 auf Pontin und Reptin im Wnt-Signalweg

Das Histidin-Triaden (HIT)-Protein Hint1 (histidine triad nucleotide-binding protein 1) wurde in einem Yeast-Two-Hybrid-Screen als Interaktionspartner von Pontin identifiziert [10]. Hint1 interagiert neben Pontin auch mit Reptin. Hint1 inhibiert den Einfluss beider Proteine auf die  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF-vermittelte Transkription. Hint1 liegt zusammen mit Pontin oder Reptin im  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-Komplex vor, zeigt jedoch keine direkte Interaktion mit  $\beta$ -Catenin oder LEF-1 [46]. Nach der Strukturaufklärung des Pontin Hexamers zeigte sich, dass Hint1 in Pontin einen Aminosäureabschnitt bindet bzw. maskiert, der vermutlich für die Interaktion zwischen Pontin und Reptin-Hexameren notwendig ist [14].

## 1.7 Die Familie der HIT-Proteine

Die HIT-Proteine repräsentieren eine in vielen Organismen stark konservierte Familie und zeichnen sich durch ein charakteristisches Aminosäuremotiv, der Histidin-Triade (HXHX-HXX, X=hydrophobe Aminosäure) aus. Es werden auf Grund von Aminosäuresequenz, Substratspezifität und Enzymaktivität fünf verschiedene Subfamilien unterschieden: Die Gruppe der Hint Proteine (histidine triad nucleotide-binding protein) mit den Vertretern Hint1, Hint2 und Hint3. Die Fhit Gruppe (fragile histidine triad) mit dem einzigen Vertreter Fhit. Die Gruppen der GalT-Proteine (galactose-1-phosphat-uridyl-transferase), der DcpS (scavenger decapping enzyme)-Proteine und der Aprataxine. Für die Vertreter der HIT-Protein-Superfamilie wird eine Nukleotid-Hydrolase- bzw. Nukleotid-Transferase-Aktivität angenommen, mit der Histidin-Triade als katalytisch aktivem Zentrum [47]. Bei diesen Reaktionen bindet das mittlere Histidin der Histidin-Triade in einem Intermediat kovalent an die  $\alpha$ -Phosphat-Gruppe und ist somit für die katalytische Aktivität der HIT-Proteine essentiell [47,48]. Für die HIT-Proteine wurden verschiedene potenzielle Substrate wie ADP, ATP, Ap3A, Ap4A und AMP-X-Verbindungen identifiziert, allerdings werden diese mit deutlich unterschiedlicher Spezifität gebunden und umgesetzt [48,49]. Neben den gut beschriebenen Molekülen ADP und ATP rückten die Verbindungen Ap3A und Ap4A ins Zentrum der Untersuchungen von HIT-Proteinen [50]. Diese Diadenosin-Polyphosphate werden von einigen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen unter zellulärem Stress gebildet [51,52]. Fhit besitzt eine ApnA-Hydrolase Aktivität und setzt bevorzugt Ap3A in AMP und ADP um (Abb. 5). Somit ist Fhit an der Regulation des intrazellulären Verhältnisses von Ap3A zu Ap4A beteiligt. Schon seit längerem werden Ap3A und Ap4A als Signalmoleküle angesehen, die über einen bisher nicht geklärten Mechanismus Prozesse wie Proliferation und Apoptose regulieren [50]. Das Verhältnis von Ap3A zu Ap4A soll hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Neben Ap3A und Ap4A wurden noch weitere Substrate von Proteinen der HIT-Familie wie zum Beispiel AMP-NH<sub>2</sub> identifiziert. Derartige Substrate könnten beispielsweise AMP-Modifikationen von Lysin-Resten repräsentieren [48,53].



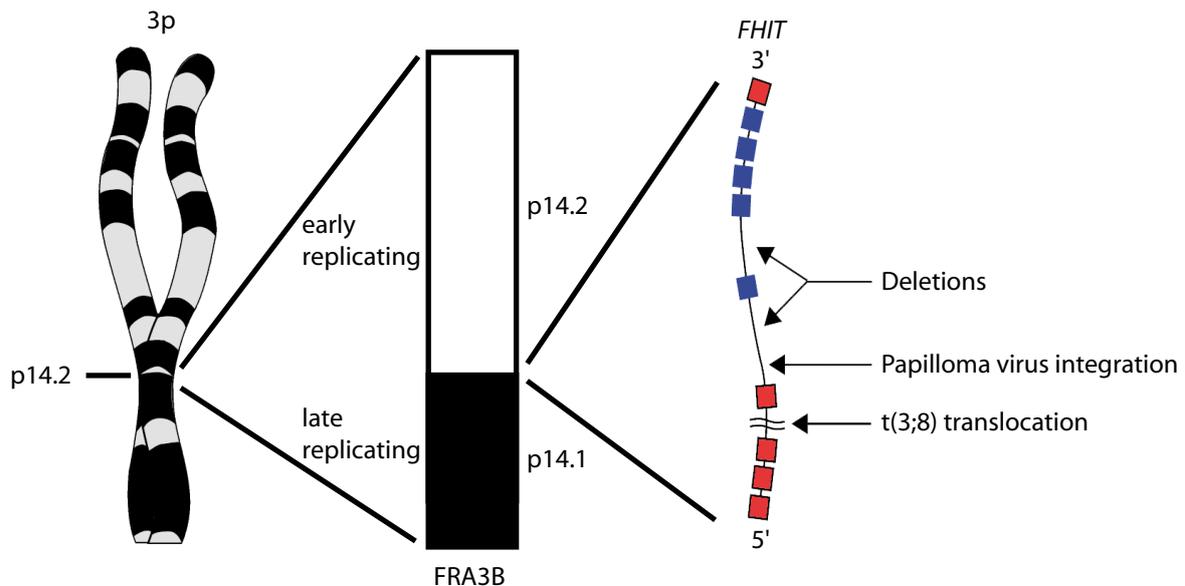
**Abb.5:** Reaktionschema der von Hint1, Fhit und GalT katalysierten Reaktionen (nach Brenner et al [47]).

## 1.8 Das fragile Histidin-Triaden Protein Fhit

Das Fhit (fragile histidine triad) Gen liegt im FRA3B-Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 an der Position p14.2 und stellt einen der instabilsten Bereiche des menschlichen Genoms dar [54,55]. Der FRA3B-Locus ist bei einer Vielzahl von Tumoren von genomischen Veränderungen wie Chromosomenbrüchen, Translokationen oder auch epigenetischer Inaktivierung betroffen, was zum Verlust bzw. zu Verminderung der Expression von Fhit führt. Das Fhit-Gen hat eine Länge von mehr als 1 Million Basenpaare und codiert mit seinen 10 kleinen Exons für eine nur 1,1 Kilobasen lange mRNA. Somit besteht das Fhit-Gen zu 99.99% aus Intron-Bereichen. Von den 10 Exons codieren allerdings nur die Exons 5 bis 9 für das Protein mit 147 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 16,8 kDa [56] (Abb. 6). Chromosomenbrüche im Fhit-Gen wurden häufig bei Karzinomen der Niere, der Lunge und des Gastrointestinaltraktes beschrieben und lassen für Fhit eine mögliche Funktion als Tumorsuppressor vermuten. Zudem stellt das Fehlen der Expression von Fhit einen guten Marker für starkes Tumorwachstum und Metastasierung mit äußerst schlechter Prognose für die Patienten dar [57,58]. Eine Re-Expression von Fhit

in verschiedenen Fhit-negativen Tumorzelllinien führte in Nacktmaus-Tumormodellen und bei Fhit Knock-Out Mäusen zur Inhibition des Tumorwachstums [48,56,58,59]. Diese und weitere Untersuchungen identifizierten Fhit als haploinsuffizienten Tumorsuppressor, dessen Funktionen auf seine proapoptotische Aktivität und seine repressive Wirkung auf verschiedene Signalwege zurückgeführt wurden, welche an der Entstehung von verschiedenen Krebsarten beteiligt sein können. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht vollständig verstanden. Von unserer Arbeitsgruppe beschriebene Untersuchungen zeigten, dass Fhit mit  $\beta$ -Catenin interagiert und dessen Transkriptionsaktivität reprimiert und somit durch Repression der Transkription von Zielgenen des Wnt-Signalwegs als Tumorsuppressor wirken kann [60]. Ein weiterer durch Fhit regulierter Signalweg ist der NF $\kappa$ B-Signalweg. Dort verhindert Fhit die Phosphorylierung von I $\kappa$ Ba (Inhibitor von Kappa B) und hemmt dadurch die Signalübertragung durch NF $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B) [61]. Die Ras/Rho GTPase-Signalübertragung wird ebenfalls durch Fhit inhibiert, da Fhit die Expressionsniveaus von mehreren Komponenten wie RAN, Rab, Rac, Rap, and Ral verringert [62].

Regionen wie der FRA3B-Locus werden auch als CFS (common fragile sites) bezeichnet und zeichnen sich strukturell durch einen sehr niedrigen G/C- und einen hohen A/T-Gehalt aus und werden häufig erst sehr spät in der S-Phase, teilweise sogar erst in der G2-Phase repliziert. Der Eintritt von einzelsträngigen DNA-Bereichen in die G2-Phase wird als einer der Hauptfaktoren für die Anfälligkeit gegenüber Chromosomenbrüchen und Rekombinationen angesehen [63]. Die Lokalisation, Größe und Organisation des Fhit-Gens ist evolutionär konserviert. So ist das Fhit-Gen zum Beispiel in Mäusen ebenfalls sehr groß, aus zehn Exons aufgebaut und stellt eine der instabilsten Regionen (Fra14A2) des Genoms dar. An dieser Beobachtung ist erstaunlich, dass derartig instabile Bereiche im menschlichen Genom evolutionär so hoch konserviert sind. In diesem Zusammenhang wird spekuliert, dass zwischen dem Fhit-Gen und der Instabilität des FRA3B Locus ein wichtiger Zusammenhang bestehen könnte [64].

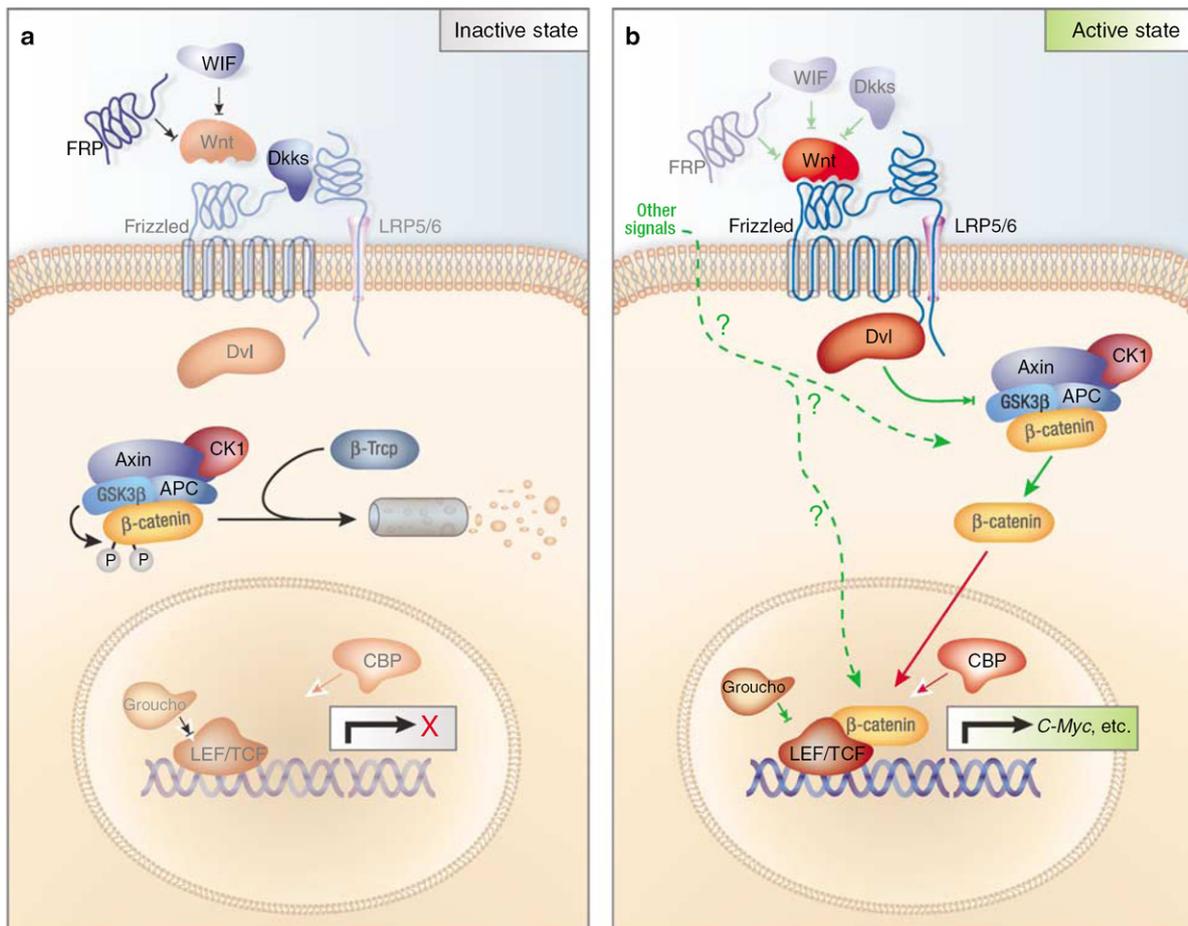


**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Fhit Gens im FRA3B-Locus  
Lage der früh und spät replizierenden Bereiche des FRA3B Locus auf Chromosom 3. Struktur des Transkripts des Fhit Gens; codierende Exons sind blau, nicht codierende sind rot dargestellt (angepasst nach Pekarsky et al [65] und Pichiorri et al [63]).

## 1.9 Regulation des Wnt-Signalwegs durch Fhit

Der Wnt-Signalweg stellt eine evolutionär hoch konservierte Signaltransduktions-Kaskade dar, die essentielle Funktionen in verschiedenen entwicklungsbiologischen Prozessen besitzt. Als Wingless-Signalweg erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und später als Int-1 bei der Maus beschrieben, entstand der Name Wnt durch den Zusammenschluss der Namen Wingless und Int-1. Später zeigte sich, dass der Wnt-Signalweg bei Differenzierungs-, Proliferations- und Morphogenese-Prozessen in der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle spielt [66]. Das entscheidende Ereignis bei der kanonischen Wnt-Signaltransduktion ist die zytoplasmatische Akkumulation und nachfolgende Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Nukleus. Unter nicht-stimulierten Bedingungen wird durch den  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplex, bestehend aus den Proteinen Axin, Adenomatous Polyposis Coli (APC), Glycogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3- $\beta$ ) und Casein Kinase 1 $\alpha$  (CK1) die Menge an  $\beta$ -Catenin durch dessen Phosphorylierung und folgende Ubiquitinierung gering gehalten (Abb. 7 A). Durch die Bindung von Liganden wie Wnt1 und Wnt3a an den Frizzled/LRP-5/6 Co-Rezeptorkomplex wird in einem immer noch nicht genau verstandenen Prozess die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch den  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplex gehemmt. In der Folge kommt es zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und seiner nachfolgenden Translokation in den Nukleus. Dort bindet  $\beta$ -Catenin an Transkriptionsfaktoren aus der LEF-1/TCF-Familie (lymphoid enhancer-binding factor/T-cell factor) und aktiviert damit letztlich die Transkription von Zielgenen wie c-Myc, Cyclin D1, Axin2, MMP-14 und Survivin (Abb. 7 B).

Da der Wnt-Signalweg Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert, ist der Wnt-Signalweg wie viele andere entwicklungsbiologisch bedeutsame Signalwege häufig an der Entstehung von Tumoren wie dem Kolonkarzinom, hepatozellulärem Karzinom, Prostatakarzinom und Melanom beteiligt. So sind z.B. bei bis zu 90% aller Kolonkarzinome Veränderungen des Wnt-Signalwegs vorhanden, die eine permanente Aktivierung des Wnt-Signalwegs verursachen und zur Akkumulierung von  $\beta$ -Catenin führen. Diese Aktivierung wird entweder durch inaktivierende Mutationen von Komponenten des  $\beta$ -Catenin-Degradationskomplexes oder durch Mutation der Phosphorylierungsstellen in  $\beta$ -Catenin selber hervorgerufen [67-70].



**Abb. 7:** Vereinfachte Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs: A) Inaktiver Wnt-Signalweg. B) Aktiver Wnt-Signalweg (nach Luo et al [70]).

Bei der Charakterisierung von Fhit als Repressor des Wnt-Signalwegs stellte sich heraus, dass Fhit direkt mit dem C-Terminus von  $\beta$ -Catenin interagiert und dessen Transaktivierungsaktivität hemmt. Durch Bindung an den C-Terminus von  $\beta$ -Catenin konkurriert Fhit möglicherweise mit Faktoren wie CBP/p300 oder Parafibromin und unterbindet dadurch deren Funktionen als Aktivatoren der Transkription [72,73]. Die enzymatische Aktivität von Fhit ist weder für die tumorsuppressive Wirkung [74], noch für die hemmende Wirkung auf  $\beta$ -Catenin notwendig, da die katalytisch inaktive Variante Fhit-H96N vergleichbare Effekte wie das Wildtyp-Protein zeigt [60]. Eine Verminderung von Fhit durch shRNA verstärkte die Wirkung von  $\beta$ -Catenin auf die Transkription der klassischen Zielgene CyclinD1 um das Dreifache, bei Axin2 hingegen sogar

um mehr als das Hundertfache. In Soft-Agar Tumorassays zeigte sich, dass eine verminderte Expression von Fhit bei gleichzeitiger Überexpression von  $\beta$ -Catenin zu einer deutlich verstärkten Ausbildung von Zell-Kolonien führte, wohingegen bei einer Verminderung von  $\beta$ -Catenin und gleichzeitiger Überexpression von Fhit die Koloniebildung fast vollständig ausblieb [60]. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der Rolle von Fhit bei Kolonkarzinomen, für die gezeigt werden konnte, dass in bis zu 67% dieser Tumore die Expression von Fhit verringert oder gar nicht vorhanden war und nur in 10% sicher nachgewiesen werden konnte [75].

### **1.10 Zielsetzung der Arbeit**

Die HIT-Proteine Hint1 und Fhit partizipieren beide im Wnt-Signalweg und wirken als Inhibitoren auf die  $\beta$ -Catenin-vermittelten Transkription. Für Hint1 ist der zu Grunde liegende Mechanismus relativ gut aufgeklärt, für Fhit ist dagegen noch vieles ungeklärt. Ziel dieses Teilprojekts war es weitere Interaktionspartner von Fhit aus der Gruppe der Proteine, die an der  $\beta$ -Catenin-vermittelten Transkription beteiligt sind zu identifizieren und näher zu charakterisieren, um die für Fhit beschriebene Wirkung besser erklären zu können.

Pontin ist in der Literatur als essentieller Kofaktor bei der Reifung von snoRNPs beschrieben worden. Eine Lokalisation von Pontin im Nukleolus, dem Ort dieser Prozesse konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden. Ziel des letzten Teilprojekts dieser Arbeit war es monoklonale Antikörper die gegen Pontin gerichtet sind zu charakterisieren, die Verwendung für indirekte Immun-Fluoreszenzfärbungen von Zellen zu prüfen und die Lokalisation von Pontin genauer zu studieren.

Über die Struktur und Stoichiometrie der von Pontin und Reptin ausgebildeten Komplexe sind in der Literatur teilweise widersprüchliche Ergebnisse vorhanden, deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Pontin und Reptin in *E.coli* Zellen zu exprimieren, zu reinigen und die Komplexbildung zu untersuchen. Hierbei sollten beide Proteine mit hoher Reinheit und Ausbeute erhalten, in die hochmolekularen Komplexe assembliert und mittels Kryoelektronenmikroskopie untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Merck
Agar	Difco
Agarose, ultra pure	Invitrogen
Ampicillin, Natriumsalz	Roth
APA-Advanced Protein Assay	Cytoskeleton
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Tryptone	Difco
BACTO-Yeast extract	BD Sciences
BCA-Protein Assay Reagent Kit	Pierce
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
BSA Fraktion V	Sigma
Chloramphenicol	Fluka
Chloroform	Merck
Complete-EDTA	Roche
Complete-EDTA free	Roche
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck
DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid)	Roche
DMEM	PAA Laboratories
DMSO	Sigma
dNTPs PCR-Grade	Roche
DTT	Sigma
EDTA	Merck
EGTA	Merck
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen)	Sigma
Fötale Kälberserum	Biochrom
Glucose monohydrat	Roth
Glutamax	Invitrogen
Glycerol	Roth
Glycin	Roth

---

Glycogen	Roche
Imidazol	Merck
Immersions Öl Immersol 518F	Zeiss
IPTG	AppliChem
Isopropanol	J.T.Baker
Kanamycindisulfat (Merck, Darmstadt)	Merck
KCl	Merck
LiCl	Sigma
Lipofectamine 2000 transfection reagent	Invitrogen
Methanol	J.T.Baker
MgCl <sub>2</sub>	Merck
MgSO <sub>4</sub>	Merck
Milchpulver	Nutricia-Zoetermeer
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaAcetat/NaCl/NaOH	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Natrium Deoxycholat	Roth
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Nonidet P-40	Merck
OPTIMEM	Gibco
Paraformaldehyd	Sigma
PEG	Sigma
Penicillin/Streptomycin 100x	Invitrogen
Phenol	Roth
Phosphorsäure	Merck
PIPES	Sigma
Protein Agarose A/G	Roche
Protein-A-Sepharose CL-4B	Amersham Biosciences
Rothiphorese Gel 30	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure, rauchend	Merck
SDS	Merck
TEMED	Sigma
Tris	Merck
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma
Xylencyanol	Sigma

## 2.2 Enzyme

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm	Roche
Benzonase	Roche
BamHI	Roche
BamHI	New England Biolabs
PacI	New England Biolabs
Paq5000 DNA Polymerase	Stratagene
Pwo-DNA-Polymerase	Roche
Pwo-Master	Roche
Quick T4 DNA-Ligase	Promega
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
Shrimp alkaline Phosphatase	Roche
Swal	New England Biolabs
T4-Polymerase	Roche

## 2.3 Verwendete Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Nucleobond PC-100	Macherey&Nagel
Nucleobond PC-500	Macherey&Nagel
DNA Sequencing Kit (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Version 1.1)	PE Applied Biosystems

## 2.4 Antikörper

Name	WB	IP	IF	Tier	Hersteller
Anti- $\beta$ -catenin	1:5.000	2 $\mu$ g	1:1000	Maus	Transduction Laboratories
Anti-FLAG-M2	1:10.000	2 $\mu$ g	1:2000	Maus	Sigma
Anti-myc 9E10	1:5.000	2 $\mu$ g		Maus	Hybridoma Überstand (Barbara Kosel)
Anti-Pontin 5G3-11	1:1.000	2 $\mu$ g	1:500	Maus	Hybridoma Überstand (Barbara Kosel)
Anti-Pontin 3A4-1	1:2.000	2 $\mu$ g	1:500	Maus	Hybridoma Überstand (Barbara Kosel)
Anti-Reptin L12E	1:1000	2 $\mu$ g	1:1000	Meerschwein	Dr. J. Pineda Antikörper- Service
Anti-Reptin L12E	1:1000		1:500	Kaninchen	Dr. J. Pineda Antikörper- Service
Anti-GST	1:10.000			Kaninchen	J. Wienands, Uni Bielefeld
Anti-MBP MBP-17	1:4000			Maus	Sigma
Anti-HA	1:1.000			Maus	Sigma
Anti-Fibrillarin 17C12	1:1.1000	2 $\mu$ g	1:500	Maus	K.M. Pollard, The SCRIPPS Research Institute, CA
Anti-SART3	1:2.000			Kaninchen	David Staněk
Anti-Mouse-POD	1:10.000			Ziege	Dianova
Anti-Rabbit-POD	1:10.000			Ziege	Dianova
Anti-Guineapig-POD	1:10.000			Ziege	Dianova
Alexa Fluor™ 488 Anti-Maus			1:1000	Ziege	Molecular Probes
Alexa Fluor™ 594 Anti-Hase			1:1000	Ziege	Molecular Probes
Alexa Fluor™ 488 Anti-Hase			1:1000	Ziege	Molecular Probes
Alexa Fluor™ 594 Anti-Maus			1:1000	Ziege	Molecular Probes

## 2.5 Plasmide

Name	Herkunft
pCS2+ und pCS2+myc <sub>6</sub>	(Dr. Ralph Rup, MPI für Entwicklungsbiologie)
pCMV4-FLAG und pCMV10-FLAG	Sigma
pGEX-4T1	Amersham Pharmacia Biotech
pGL3B-S01234	David Kimelman
pGL3B-S	David Kimelman
pGL3B-OT	Bert Vogelstein
pGL3B-OF	Bert Vogelstein
pQE40	Qiagen
pCH110	Amersham Pharmacia Biotech
pHRLnull	Promega
pQLinkN, pQLinkH und pQLinkG	Daniel Kümmel

## 2.6 Zelllinien

HEK293:	humane, embryonale Nierenzelllinie (adhärent, epithelial)
MCF-7:	humane, Adenocarcinom Brustzelllinie (adhärent, epithelial)
HeLa:	humane, Zervixcarcinom Zelllinie (adhärent, epithelial)
COS-7:	Cercopithecus aethiops, SV40 transformierte Nierenzelllinie (adhärent, fibroblast)
SW480:	humane, kolorektale Adenocarcinom Zelllinie (adhärent, epithelial)

## 2.7 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Ref.	Genotyp
<i>E. coli</i> BL21	[70]	dcm, gal, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), ompT, F <sup>-</sup>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	[70]	hsdS, gal (λcIts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7 gene 1)
<i>E. coli</i> M15 (pREP4)	[71]	dcm, gal, hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), ompT, F <sup>-</sup> , pREP4
<i>E. coli</i> HB101	[72,73]	F-D(gpt-proA)62leuB6glnV44, ara-14, galK2, lacY1, D(mcrC-mrr), rpsL20(Str <sup>r</sup> ), xyl-5, mtl-1, recA13, thi-1
<i>E. coli</i> DH5α	[74]	deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), recA1, relA1, supE44, thi-1, D(lacZYA-argFV169), f80lacZDM15, F <sup>-</sup>
<i>E. coli</i> XL1blue	[75]	endA1, gyrA96, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), lac, recA1, relA1, supE44, thi-1, F <sup>'</sup> [proAB, lacI <sup>q</sup> ZDM15, Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]

## 2.8 Geräte

Name	Hersteller
ABI Prism Genetic Analyzer 310	PE Applied Biosystems
Begasungs-Brutschrank Function Line	Heraeus-Christ
Branson Sonifier Ultraschall	Ultraschall & Labortechnik
Brutschrank Function Line	Heraeus-Christ
Elektrophorese-Apparatur Dual Vertical Mini Gel	C.B.S.
Film-Entwicklereinheit Optimax TR	MS Laborgeräte
Flusscytometer FACS Calibur	Becton Dickinson
FPLC-Gerät ÄKTA™-Explorer 100 Air	Amersham Pharmacia Biotech
Fuji FLA-3000	Raytest Isotopenmessgeräte
Geltrockner Model 583	BioRad
Gene Amp PCR-System 2700	PE Applied Biosystems
GSA-Rotor	Kendro
Heizblock QBT	Grant Instruments
Incubator Shaker C25KC	New Brunswick Scientific Edison
LAS 1000	Raytest Isotopenmessgeräte
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss
LSM 510 Meta	Carl Zeiss MicroImaging
Luminometer Lumat LB 9507	Berthold Technologies
Microcomputer Elektrophoresis Power Supply E802	Consort
MS1 Minishaker	IKA-Labortechnik
MultiCal pH526 pH-Meter	WTW
Multiplate Reader SpectraMax 340PC	Molecular Devices
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Nicool LM10	Air Liquide
Optima L-90K Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter
Power Pac 300	BioRad
Sorvall Evolution RC Superspeed	Kendro
SS34-Rotor	Kendro
Standard Power Pack P25	Biometra
Sterile Werkbank Hera Safe HS12	Heraeus-Christ
Stickstofftank zur Lagerung von Zellen	Taylor-Wharton
SW28-Rotor	Beckmann Coulter
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5417R, gekühlt	Eppendorf

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
Transblot Cell	BioRad
Universal-Thermostat Wasserbad	Lange
UP 50H Sonicator Ultraschallgerät	Hielscher Ultraschall Technologie
UV-Photometer DU640	Beckman Instruments
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik
Zeiss LSM 510 Meta	Zeiss
Zellzentrifuge Megafuge 2.0R, gekühlt	Kendro

## 2.9 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Amershan Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare
Biomax MR Imaging Film	Kodak
Filterpapier Whatman 3MM	Biometra
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche
Micropure-EZ, Centrifugal Filter Devices	Millipore
Plasmid Mini und Midi Präparationskits	Macherey & Nagel
PolyScreen, PVDF Transfer Membrane	NEN
Sterilfilter Minisart, Porengröße 0,2 µm	Sartorius
Visking Dialyseschläuche, Ausschlussgröße 10kDa	Roth

Sterile Einwegmaterialien wie Pipetten, Schraubdeckel-Röhrchen, Platten und Schalen für Bakterien- und Zellkultur wurden von Falcon/Becton-Dickinson (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) oder Greiner Labortechnik (Frickhausen) bezogen.

## 2.10 Software

Adobe CS2

Microsoft Office 2003 Microsoft

WebCutter 2.0 Copyright by Max Heiman

NIH Image 1.62b Copyright by Wayne Rasband

BLAST NCBI

## 2.11 Puffer und Stammlösungen

### P1-Puffer (Resuspensions-Puffer)

50 mM Tris-HCl pH 8,0  
100 µg/ml RNase A  
10 mM EDTA

### P3-Puffer (Neutralisations-Puffer)

3 M Kaliumacetat pH 5,5

### 1x TAE-Puffer

40 mM Tris-HCl pH 8,5  
1 mM EDTA  
50 mM Essigsäure

### 2x SDS-Probenpuffer

65 mM Tris-HCl pH 6,8  
3% (w/v) SDS  
30% (v/v) Glycerin  
5% (w/v) 2-Mercaptoethanol  
4 mg/ml Bromphenolblau  
4 mg/ml Pyronin G

### Entfärbelösung

10% (v/v) Essigsäure (96%)  
20% (v/v) Methanol

### Anodenpuffer II

30 mM Tris-HCl pH 9,4

### P2-Puffer (Lyse-Puffer)

200 mM NaOH  
1% (w/v) SDS

### 1 x TBE-Puffer

90 mM Tris-HCl pH 8,0  
89 mM Borsäure  
2 mM EDTA  
6 x DNA-Ladepuffer

### SDS-Laufpuffer

24,8 mM Tris-HCl  
192 mM Glycerin  
0,01% (w/v) SDS

### Coomassie-Blue-Färbelösung

30% Methanol  
10% (v/v) Ethanol  
0,1% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R-250

### Anodenpuffer I

300 mM Tris-HCl pH 9,4

### Kathodenpuffer

25 mM Tris-HCl  
40 mM Aminocaprinsäure  
0,1% (w/v) SDS

**TST-Puffer (tris-saline-tween)**

10 mM Tris-HCl pH 7,5  
150 mM NaCl  
0,1% (v/v) Tween 20

**GST-Elutionspuffer**

20 mM Glutathion  
0,1 mM Tris-HCl  
pH 8,0, 100 mM NaCl

**His<sub>6</sub>-Lyse-Puffer**

50 mM Tris-HCl pH 8  
150 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>

**His<sub>6</sub>-Elutionspuffer**

50 mM Tris-HCl pH 8  
150 mM NaCl  
300 mM Imidazol pH 8  
3 mM MgCl<sub>2</sub>

**MBP-Elutionspuffer**

20 mM Maltose  
20 mM Tris/HCl, pH 8,0

**PBS (phosphate buffered saline)**

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Dialyse-Puffer**

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
50 mM NaCl

**His<sub>6</sub>-Wasch-Puffer**

50 mM Tris-HCl pH 8  
300 mM NaCl  
50 mM Imidazol pH 8

**MBP-Lyse-Puffer**

40 mM Tris-HCl pH 8,0  
100 mM NaCl

**Gelfiltrations-Puffer**

50 mM Tris-pH 8  
150 mM NaCl  
3 mM MgCl<sub>2</sub>

**Assoziations-Puffer**

0,2 mM NaCl  
50 mM Tris pH 8,0  
0,2% (v/v) Triton X-100  
2 mM MgCl<sub>2</sub>

**Trypanblau-Lösung**

0.5% (w/v) Trypanblau in PBS

**CaCl<sub>2</sub>-Lösung**

2,5 M CaCl<sub>2</sub>

**ChIP Lyse-Puffer**

5 mM Pipes pH 8  
85 mM KCl  
0,5% (v/v) NP40  
1 mM PMSF  
Protease inhibitor cocktail (Roche)

**Lyse-Puffer A**

100 mM KCl  
300 mM Sucrose  
20 mM Imidazol pH 6.8  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM EGTA  
1 mM NaF  
1 mM Na<sub>2</sub>MbO<sub>4</sub>  
1 mM NaVO<sub>3</sub>  
0,2 % (v/v) Triton X-100  
Protease inhibitor cocktail (Roche)

**2x HBS-Puffer**

55 mM HEPES/NaOH pH 7,03  
274 mM NaCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**ChIP-Formaldehyd-Lösung**

1% Formaldehyd in PBS

**RIPA-Puffer**

50 mM Tris-HCl pH 8  
150 mM NaCl  
1 % (v/v) NP40  
0,5 % (w/v) Na-Desoxycholat  
0,1 % (w/v) SDS  
1 mM PMSF  
Protease inhibitor cocktail (Roche)

**ChIP Hochsalz-Puffer**

100 mM Tris-HCl pH 8  
500 mM LiCl  
1 % (v/v) NP40  
0,5 % (w/v) Na-Desoxycholat  
Protease inhibitor cocktail (Roche)

**TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl pH 8  
1 mM EDTA

**Proteinase K Puffer**

50 mM Tris-HCl pH 7,5  
25 mM EDTA  
1,25 % (w/v) SDS

**Tip60-Puffer**

50 mM Tris-HCl pH 8.0  
150 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,2% (v/v) Triton-X 100

**Re-ChIP Puffer**

10 mM DTT  
10 mM Tris pH 8

## 2.12 Bakterien- und Zellkulturmedien

### LB-Medium

1% (w/v) Bacto-Tryptone,  
5% (w/v) Bacto-Yeast Extract  
86 mM NaCl

### Expressionsmedium

LB-Medium  
1% (w/v) Glucose  
50 µg/ml Ampicillin  
75 µg/ml Kanamycin

### 2x DMEM (Instamed, Biochrom)

20% (v/v) FKS  
2% Penicillin/Streptomycin  
88 mM NaHCO<sub>3</sub>  
200 µM Natrium-Pyruvat  
(sterilfiltriert)

### 3x 0,3% Low-melting Agarose

0,9% (w/v) SeaKem LE Agarose  
(autoklaviert)

### LB-Amp-Agar

1,5% (w/v) Agar in LB-Medium  
50 µg/ml Ampicillin

### DMEM

10 % (v/v) fötales Kälberserum  
1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

### 3x 0.6% Low-melting Agarose

1,8% (w/v) SeaKem LE Agarose  
(autoklaviert)

## 2.13 Lösungen für Immunfluoreszenz

### FxTx-Lösung

PBS

3 % (w/v) Formaldehyd

0,5 % (v/v) Triton X-100

### Block-Lösung

PBS

1% (v/v) Ziegen-Serum

### Permiabilisierungs-Lösung

PBS

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

### Quenching-Lösung

PBS

125 mM Glycin pH 6,5

### PFA-Fixierungs-Lösung

PBS

3% (w/v) Formaldehyd

### Kristallviolett-Lösung

20% (v/v) Methanol

0.005% (w/v) Kristallviolett

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Techniken

##### 3.1.1 Restriktionsverdau von DNA

Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurde ca. 1 µg der zu verdauenden DNA mit 1-5 Units Restriktionsenzym versetzt und für mindestens 1 h bei der optimalen Temperatur für das Enzym und unter geeigneten Pufferbedingungen inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Analyse des Verdau in einer Agarose-Gelelektrophorese (3.1.2).

<b>Reaktionsansatz:</b>	<b>Volumen</b>
Millipore Wasser	16,5 µl
10x Puffer	2 µl
DNA	1 µl
Restriktionsenzym	0,5 µl
Gesamtvolumen:	20 µl

##### 3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode für die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten im Größenbereich von 500-10.000 Basenpaaren. Die DNA-Fragmente wurden durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid detektiert. Durch die Variation der Agarose-Konzentrationen im Bereich von 0,3 - 2 % (w/v) können verschiedene Trennbereiche der DNA-Fragmente erzielt werden.

Die Agarose wurde durch Aufkochen in TBE- oder TAE-Puffer gelöst, bei einer Temperatur von ca. 50°C mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,1 µg/µl) versetzt und das Gel danach in die Gelkammer gegossen. Beim anschließenden Erkalten gelierte die Agarose bei Temperaturen unter 37°C. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und nach Überschichtung des Gels mit TBE- oder TAE-Puffer in die durch einen Kamm geformten Geltaschen geladen. Um die Größe der DNA-Fragmente zu ermitteln wurde ein Größenstandard (1 kb DNA-Leiter) parallel aufgetragen. Das Ergebnis der Trennung wurde unter UV-Licht ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) photographisch dokumentiert.

### 3.1.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmente im Trennbereich von 6-2000 Basenpaaren angewandt.

Die Polyacrylamid-Elektrophorese wurde in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem der Firma C.B.S mit Gelen der Größe 80 x 85 x 0,75 mm durchgeführt. Die Acrylamid-Konzentration des Sammelgels (ca. 15 mm Höhe) betrug 5 %. Die Konzentration des Trenngels (ca. 65 mm) betrug 7,5 - 14 %.

#### Zusammensetzung der Trenngele:

Lösungen	2x Ansatz	4x Ansatz	6x Ansatz
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	2,66 ml	5,32 ml	8,00 ml
ddH <sub>2</sub> O	5,23 ml	10,46 ml	15,67 ml
5 x TBE	2,00 ml	4,00 ml	6,00 ml
10% APS	0,10 ml	0,20 ml	0,30 ml
TEMED	0,01 ml	0,02 ml	0,03 ml
Gesamtvolumen	10 ml	20 ml	30 ml

Das Polyacryamidgel wurde in die Gelkammer gegossen und der Kamm hinein gesteckt. Nun erfolgte für ca. 30 min die Polymerisation.

Die Proben werden im Verhältnis 1:5 mit 6x DNA-Lade-Puffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophoresen wurden mit 170 V Spannung durchgeführt. Die Trennung erfolgt bis der Farbstoff Xylencyanol an das untere Ende des Gels erreicht hat.

### 3.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Um DNA-Fragmente aus einem Agarose-Gel zu isolieren wurden diese ausgeschnitten und durch Zentrifugation über UltraFree<sup>®</sup>DA (Millipore) aus der Agarose eluiert. Dabei wurde das Agarosestück auf einen Zentrifugeneinsatz gebracht, welcher die Agarose bei einer anschließenden Zentrifugation zerkleinerte, zurückhält und nur die wässrige Phase durchläßt. Der Durchfluss nach der Zentrifugation enthält nur die DNA und den TBE- oder TAE-Puffer.

### 3.1.5 Dephosphorylierung von DNA

Die 5'-Enden von Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) oder mit der alkalischen Phosphatase aus Shrimps (SAP) dephosphoryliert, um eine Religation der linearisierten Vektoren zu verhindern.

<u>Reaktionsansatz CIP</u>		<u>Reaktionsansatz SAP</u>	
	Volumen		Volumen
Millipore Wasser	16 µl	Millipore Wasser	16 µl
10x CIP-Puffer	2 µl	10x SAP-Puffer	2 µl
Plasmid nach Verdau	1 µl	Plasmid nach Verdau	1 µl
CIP	1 µl	SAP	1 µl
Gesamtvolumen:	20 µl	Gesamtvolumen:	20 µl
Inkubation bei 37°C	15 min	Inkubation bei 37°C	60 min
Inaktivierung bei 65°C	15 min	Inaktivierung bei 65°C	15 min

### 3.1.6 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Um Proteine und andere Verunreinigungen aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung zu entfernen, wurde diese in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß mit einem gleichen Volumen Phenol versetzt und vollständig vermischt. Nach Zentrifugation (20.800g, 4°C, 5 min) wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in einem neuen 1,5ml Eppendorf-Gefäß mit einem gleichen Volumen Chloroform versetzt. Danach wurde wieder vollständig vermischt und nach Zentrifugation (20.800g, 4°C, 5 min) die obere wässrige Phase abgenommen und eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt.

### 3.1.7 Ethanol-Präzipitation von DNA

Die Ethanol-Präzipitation dient zur Fällung und Konzentrierung von DNA aus wässrigen Lösungen. Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetat-Lösung pH 5.5 versetzt und gut gemischt. Anschließend wurden 2,5 Volumen eiskalter, absoluter Ethanol (-20°C) zugegeben und erneut gemischt. Die gefällte DNA wurde bei der folgenden Zentrifugation (20.800 g, 4°C, 20 min) sedimentiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Präzipitat mit 300 µl eiskaltem 70% (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut zentrifugiert (20.800 g, 4°C, 5 min). Nach Entfernung des 70% Ethanol wurde das Präzipitat getrocknet und in 20–50 µl ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer resuspendiert.

### 3.1.8 Ligation von DNA

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten werden die 5'-Phosphate des Inserts durch die T4-DNA-Ligase unter ATP-Verbrauch mit den 3'-OH-Gruppen des Vektors kovalent verknüpft.

Hierzu wurden der CIP- oder SAP-behandelte Vektor und das zu integrierende DNA-Fragment mit Quick T4 DNA Ligase für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz der Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz für die Transformation von Bakterien eingesetzt (siehe 3.1.9)

### 3.1.9 Transformation von *E.coli* nach Ligation

Die Transformation von Plasmid-DNA erfolgte nach Hitzeschock-Behandlung kompetenter *E.coli* Zellen der Stämme XL1 blue, DH5 $\alpha$  und HB101.

Für die Transformation der Bakterien wurden 150  $\mu$ l kompetente Zellen mit 20  $\mu$ l Ligationsansatz versetzt, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 42°C für 1 min in einem Heizblock inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz sofort mit 500  $\mu$ l LB-Medium versetzt und für 30-45 min (abhängig vom notwendigen Antibiotikum) bei 37°C inkubiert. Nach dem Ausstreichen von 100  $\mu$ l vorgewärmte LB-Agarplatten mit dem für die Selektion erforderlichen Antibiotikum wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C kultiviert.

### 3.1.10 Transformation von *E.coli* für Proteinexpression oder DNA-Präparation

Die Transformation von Plasmid-DNA erfolgte nach Hitzeschock-Behandlung kompetenter *E.coli* Zellen der Stämme XL1 blue, DH5 $\alpha$ , HB101, BL21, BL21 (DE3) und M15.

Für die Transformation der Bakterien wurden 20  $\mu$ l kompetente Zellen mit 0,2  $\mu$ g Plasmid-DNA versetzt, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 42°C für 1-2 min (je nach Bakterienstamm) in einem Heizblock inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz sofort mit 500  $\mu$ l LB-Medium versetzt und für 30-45 min (abhängig vom notwendigen Antibiotikum) bei 37°C inkubiert. Nach dem Ausstreichen von 50  $\mu$ l des Ansatzes auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit dem für die Selektion notwendigen Antibiotikum wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C kultiviert.

### 3.1.11 Isolierung und Präparation von DNA

Mini-Prep-Protokoll:

Für die Produktion und Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden die *E.coli*-Stämme XL1-blue und DH5 $\alpha$  verwendet, die zuvor mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden waren. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Medium, welches zur Selektion mit Ampicillin oder Kanamycin versetzt war. Abhängig von der gewünschten Plasmid-Menge wurden die Bakterien in Mini- (2 ml) oder Midi-Maßstab (50 ml) kultiviert.

Im Folgenden soll nun exemplarisch die Plasmidpräparation anhand einer Mini-Präparation erläutert werden:

2 ml einer mit einem Einzelklon angeimpften Übernachtskultur (16 h) wurden 5 min bei 6.000 g zentrifugiert, um die Bakterien zu sedimentieren. Nachdem der Überstand abgesaugt worden war, wurde erneut zentrifugiert (6.000 g, 4°C, 3 min), um die verbleibenden Reste des Mediums vollständig entfernen zu können. Anschließend wurde das Pellet (Bakterien-Sediment) in 150  $\mu$ l P1-Puffer vollständig resuspendiert. Durch die anschließende Zugabe von 150  $\mu$ l P2-Puffer wurden die Bakterien lysiert. Mit der Zugabe von 150  $\mu$ l P3-Puffer wurde das enthaltene SDS durch Kalium-Ionen zusammen mit den Proteinen gefällt und die Lösung neutralisiert. In der anschließenden Zentrifugation (20.800 g, 4°C, 10 min) wurden unlösliche Bestandteile wie Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA sedimentiert. Nachdem der Überstand mit den in Lösung verbliebenen Plasmiden in ein neues Reaktionsgefäß überführt worden war, wurden die Plasmide mit absolutem Ethanol gefällt, durch Zentrifugation (20.800 g, 4°C, 10 min) sedimentiert, der Überstand dekantiert und mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach der Abtrennung des 70% (v/v) Ethanol wurden die Plasmide bei 42°C getrocknet und anschließend in 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O oder 0,1x TE resuspendiert. In der Regel wurden bei dieser Art der Präparation ca. 10  $\mu$ g Plasmid-DNA gewonnen.

Die Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von Ionenaustauschchromatographie-Säulen aus den Plasmid-Midi-Kits (50  $\mu$ g Plasmid-DNA) oder Plasmid-Mega-Kits (2 mg) von Macherey und Nagel gemäß den Angaben der Hersteller durchgeführt.

### 3.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Technik der Polymerase-Kettenreaktion wurde verwendet, um bestimmte Abschnitte der DNA zu vervielfältigen. Die hierbei eingesetzten thermostabilen DNA-Polymerasen vervielfältigen hierbei ausgehend von Primern die DNA.

#### Typischer Reaktionsansatz:

Bestandteil	Menge
DNA	10-500ng / x $\mu$ l
10x PCR buffer	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	x $\mu$ l
dNTP Mix (jeweils 2,5 mM pro dNTP)	2 $\mu$ l
Vorwärts-Primer	2 $\mu$ l
Reverse-Primer	2 $\mu$ l
Taq- oder Pwo-Polymerase	1 $\mu$ l
Milli Q-Wasser ad	50 $\mu$ l

#### Typisches PCR-Temperaturprofil:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	25-35x
Primer-Anlagerung	50-72°C	30 sec	
Elongation	72°C	pro kB 1 min (Taq) pro kB 2 min (Pwo)	
Finale Elongation	72°C	5 min	1x
Lagerung	4°C	$\infty$	1x

### 3.1.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen in wässriger Lösung wurde das Spektralphotometer NanoDrop verwendet, welches mit einem Probenvolumen von 1  $\mu$ l ein Spektrum von 220-750 nm aufnimmt und über die zugehörige Software die Konzentration und Reinheit der Probe bestimmt. An diesem Gerät können DNA-Proben im Konzentrationsbereich von 2 ng/ $\mu$ l – 3,7  $\mu$ g/ $\mu$ l bestimmt werden.

## 3.2 Proteinchemische und Chromatographische Methoden

### 3.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Trennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Die Elektrophorese wurde in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem der Firma C.B.S mit Gelen der Größe 80 x 85 x 0,75 mm durchgeführt. Die Acrylamid-Konzentration des Sammelgels (ca. 15 mm Höhe) betrug 5 %. Die Konzentration des Trenngels (ca. 65 mm) betrug zwischen 7,5 und 14 %.

Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele für 2 x Ansatz:

Lösungen	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	2,50 ml	4,60 ml	0,50 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,50 ml	2,50 ml	
0,5 M Tris/HCl pH 6,8			0,83 ml
10 % SDS	0,10 ml	0,10 ml	0,033 ml
ddH <sub>2</sub> O	4,79 ml	2,79 ml	1,6 ml
10 % APS	0,10 ml	0,10 ml	33,3 µl
TEMED	13,4 µl	13,4 µl	6,7 µl
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	3 ml

Das Trenngel wurde hierbei zuerst in die Gelkammern gegossen, zum Glätten mit Isopropanol überschichtet und für ca. 30 min polymerisiert. Anschließend wurde das Isopropanol sorgfältig entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm hinein gesteckt. Die Polymerisation des Sammelgels erfolgte in ca. 30 min.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde mit 10 mA gestartet, um ein gleichmäßiges Einwandern der Proben in das Sammelgel zu erzielen und um eine scharfe Lauffront zu erhalten. Nach dem Einlaufen ins Trenngel wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Die Trennung erfolgt bis der Farbstoff Pyronin G das untere Ende des Gels erreicht hatte.

### 3.2.2 Western-Blot-Analyse

Um Proteine auf eine PVDF Membran zu übertragen, wurde eine Trans-Blot Semi Dry-Apparatur oder ein Transblot-Cell Gerät verwendet. Der Semi-Dry Blot erfolgte mit einem diskontinuierlichen Puffersystem. Die Dauer des Elektro-Transfers variierte je nach Proteinen zwischen 15-25 min. Die Stromstärke betrug  $2.8 \text{ mA/cm}^2$ . Der Tankblot erfolgte in einer Transblot-Cell im Nassblotverfahren bei einer Spannung von 100 mV für eine Stunde. Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran, können diese mit spezifischen Primärantikörpern und Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern durch die enzymatische Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrats nachgewiesen werden. Um die freien Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran abzusättigen, wurden die PVDF-Membranen nach dem Transfer für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit 10 ml TST-Puffer inkubiert. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgte mit in TST-Puffer verdünntem Antikörper für eine Stunde auf einem Kippschüttler. Danach wurde dreimal mit TST-Puffer gewaschen und anschließend für 30 min mit in TST-Puffer verdünntem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert und danach dreimal mit TST-Puffer gewaschen. Nach Dekantierung des TST-Puffers wurde die PVDF-Membran für 2 min mit dem Chemilumineszenz Substrat (Lumi-Light Western-Blotting Substrate) inkubiert und die Lumineszenz durch Exposition von Röntgenfilmen detektiert. Die Filmexposition variierte von 10 s bis 30 min.

### 3.2.3 Färbung mit Coomassie-Blue

Für den Nachweis der Proteine nach der Auftrennung in der SDS-PAGE wurde der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue R-250 verwendet. Coomassie-Brilliant-Blue ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich unspezifisch an Proteine anlagert und die Färbung nahezu aller Proteine ermöglicht. Zur Anfärbung der Proteine wurden die Gele nach Ende des Elektrophoreselaufs für 10 min in die Färbelösung gelegt und anschließend mit der Entfärbelösung inkubiert, Diese wurde mehrmals gewechselt, bis die Gelmatrix keinen Farbstoff mehr enthielt und nur noch die Proteinbanden eine Färbung aufwiesen. Zur Vorbereitung der Trocknung wurde das Gel für ca. 15 min in bidestilliertem Wasser inkubiert. Die Konservierung des Gels erfolgte durch Trocknung des Gels bei  $70^\circ\text{C}$  für 60 min zwischen Cellophanfolie in einem Geltrockner.

### 3.2.4 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden eine 100 ml Vorkultur (LB-Ampicillin) mit einem Einzelklon angeimpft und für ca. 16 Stunden bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden dann 20 ml zu 400 ml LB-Ampicillin mit 1% (w/v) Glucose gegeben und bei 30°C in einem Schüttler bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578} \approx 0,6-0,8$  kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert und für weitere 1-2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 6.000 g, 4°C für 15 min. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in 20 ml PBS resuspendiert und erneut bei 6.000 g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Für die Lyse der Zellen wurde das Bakterienpellet in 5 ml PBS mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung mit 4 x 30 Pulsen, Stufe 5, Duty 5 mit dem Branson Sonifier aufgeschlossen. Die Entfernung von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen erfolgte durch Zentrifugation bei 45.500 g, 4°C für 30 min. Das hierbei erhaltene geklärte Lysat wurde im Anschluß, wie unter 3.2.7 beschrieben einer Affinitätschromatographie unterzogen.

### 3.2.5 Expression und Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

Für die Expression von MBP-Fusionsproteinen wurde eine 100 ml Vorkultur mit (LB-Ampicillin) mit einem Einzelklon angeimpft und für ca. 16 Stunden bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden dann 20 ml zu 400 ml LB-Ampicillin mit 1 % (w/v) Glucose gegeben und bei 30°C in einem Schüttler bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578} \approx 0,6-0,8$  kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression mit einer Endkonzentration von 0,25 mM IPTG induziert und für weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 6.000 g, 4°C für 15 min. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in 20 ml MBP-Lysepuffer resuspendiert und erneut bei 6.000g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Für die Lyse der Zellen wurde das Bakterienpellet in 5 ml MBP-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung mit 4 x 30 Pulsen, Stufe 5, Duty 5 mit dem Branson Sonifier aufgeschlossen. Die Entfernung von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen erfolgte durch Zentrifugation bei 45.500 g, 4°C für 30 min. Das hierbei erhaltene geklärte Lysat wurde im Anschluß wie unter 3.2.7 beschrieben einer Affinitätschromatographie unterzogen.

### 3.2.6 Expression und Reinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen

Für die Expression von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen wurde eine 100 ml Vorkultur mit (LB-Ampicillin) mit einem Einzelklon angeimpft und für ca. 16 Stunden bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden dann 20 ml zu 400 ml LB-Ampicillin mit 1 % (w/v) Glucose gegeben und bei 30°C in einem Schüttler bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{578} \approx 0,6-0,8$  gezogen. Anschließend wurde die Proteinexpression mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert und für weitere 1-2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 6.000 g, 4°C für 15 min. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in 20 ml His<sub>6</sub>-Lysepuffer resuspendiert und erneut bei 6.000 g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Für die Lyse der Zellen wurde das Bakterienpellet in 5 ml His<sub>6</sub>-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung mit 4x 30 Pulsen, Stufe 5, Duty 5 mit dem Branson Sonifier aufgeschlossen. Die Entfernung von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen erfolgte durch Zentrifugation bei 45.500 g, 4°C für 30 min. Das hierbei erhaltene geklärte Lysat wurde im Anschluß wie unter 3.2.7 beschrieben einer Affinitätschromatographie unterzogen.

### 3.2.7 Affinitätschromatographische Reinigung von rekombinanten Fusions-Proteinen

Zur affinitätschromatographischen Reinigung von Fusionsproteinen aus *E.coli*-Lysaten wurde standardmäßig wie folgt vorgegangen. Alle Arbeiten erfolgten bei 4°C.

Vorbereitung der Säulen: 0,5 ml Säulenmaterial (Glutathion-Agarose, Amylose-Sepharose oder NiNTA-Agarose) wurden mit 10 Säulenvolumen des jeweiligen Lyse-Puffer äquilibriert. Anschließend wurden 5 ml *E.coli*-Lysat (wie unter 3.2.4-6 gewonnen) 2 mal auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 20 Säulenvolumen des jeweiligen Wasch-Puffers (GST: PBS; MBP: MBP-Lyse-Puffer; His<sub>6</sub>: His<sub>6</sub>-Wasch-Puffer) gewaschen und anschließend mit 10 Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert und 0,5 ml Fraktionen gesammelt (GST: GST-Elutions-Puffer; MBP: MBP-Elutions-Puffer; His<sub>6</sub>: His<sub>6</sub>-Elutions-Puffer). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und anschließend die Fraktionen mit ausreichend Protein drei mal einer Dialyse in 2 Liter Dialyse-Puffer für jeweils 8 Stunden unterzogen. Die nach der Dialyse erhaltenen Proben wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.2.8 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zell-Lysaten und gereinigten Proteinen wurden der BCA- oder der APA-Assay verwendet. Beim BCA-Assay (Bicinchoninsäure) beruht der Nachweis auf der Reaktion von Proteinen mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, welche unter alkalischen Bedingungen zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduziert werden. Diese  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen Komplex, der ein Absorptionsmaximum von 562 nm hat und photometrisch bestimmt werden kann. Die Menge an gebildetem  $\text{Cu}^{1+}$ -Bicinchoninsäure Komplex ist direkt proportional zur vorhandenen Menge an Protein.

Der APA-Assay (advanced protein assay) ist ein modifizierter Bradford-Assay [76], beim dem der Nachweis der Proteine auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an die Proteine beruht, wodurch sich dessen Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595 nm verschiebt. Die Stärke dieser Verschiebung kann photometrisch gemessen werden und ist direkt proportional zur vorhandenen Menge an Protein.

Für die Proteinbestimmung wurde mit BSA-Lösungen die folgende Standardreihe der Konzentrationen 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,75  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,125  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und 0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eine Referenzgerade erstellt. Von den zu untersuchenden Proteinlösungen wurden die Verdünnungen 1:1, 1:10, 1:50 und 1:100 vermessen. Die Messungen erfolgten immer in Doppelbestimmung. Die Messungen mit BCA oder APA wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

### 3.2.9 *In vitro* Proteininteraktions-Assay

Um zu untersuchen, ob zwischen zwei Proteinen eine direkte Bindung vorliegt, wurden *in vitro* Proteininteraktions-Assays durchgeführt. Dabei wurden GST-Fusionsproteine mit MBP- oder His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen des Interaktionspartners inkubiert und sich bildende Proteinkomplexe nach Bindung an Glutathion-Agarose isoliert.

Für die *in vitro*-Assoziation wurden 100  $\mu\text{l}$  2x Assoziations-Puffer mit 2  $\mu\text{g}$  eines GST-Fusionsproteins und 2  $\mu\text{g}$  eines MBP-Fusionsproteins versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 300  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen gebracht. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (20.100 g, 10 min, 4°C) und 270  $\mu\text{l}$  Überstand in ein neues 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Im Folgenden wurden 30  $\mu\text{l}$  in 1x Assoziations-Puffer äquilibrierte GSH-Beads zugegeben und wiederum für 1 Stunde in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze zentrifugiert (2700 g, 4°C, 1 min). Der Überstand wurde abgesaugt und 300  $\mu\text{l}$  1x Assoziations-Puffer zugegeben und 5x gewaschen. Danach wurden die GSH-Beads mit 2x SDS-Probenpuffer

versetzt, 5 min bei 96°C inkubiert und abzentrifugiert (20.800g, 4°C, 10 min). Die Proben wurden im Anschluss nach SDS-PAGE und Western-Blot mit anti-GST-, anti-MBP-Antikörpern oder bei His<sub>6</sub>-Fusionproteinen mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

### **3.2.10 Gelfiltration von Proteinen**

Zur Untersuchung der Größe von Proteinkomplexen wurden an einer FPLC-Anlage Gelfiltrationen mit Superdex 200 und Superose 6 Säulen durchgeführt. Zur Kalibrierung des Trennbereichs wurden die Proteinstandards Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (449 kDa), Catalase (232 kDa), IgG (150 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa) verwendet. Die während der Gelfiltrationen gesammelten Fraktionen wurden im Anschluß mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend mit Coomassie-Blue- oder Silber-Färbung nachgewiesen.

### **3.2.11 Konzentration und Umpufferung von Proteinen**

Die Konzentration und Umpufferung von Proteinen erfolgte mit Amicon Zentrifugen Rührchen mit einem Größenausschluss von 30kDa. Die Zentrifugation erfolgte bei 4000 upm, 4°C in 15 Minuten Zyklen, um eine zu starke Aufkonzentrierung zu vermeiden.

Für die Umpufferung wurden alternativ PD10 Säulen nach den Angaben des Herstellers verwendet.

## **3.3 Zellbiologische Methoden**

### **3.3.1 Transfektion von Zellen mit Calcium-Phosphat-Präzipitaten**

Für die Transfektion von HEK293 Zellen wurde die Calcium-Phosphat-Transfektion verwendet. Es wurden  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Zellen in 6-Well Schalen ausgesät und nach 24 h mit 2-4 µg DNA in einem 500 µl Transfektionsansatz transfiziert. Hierfür wurden 225 µl MilliQ Wasser mit 25 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt, die Plasmid-DNA zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dieser Ansatz tröpfchenweise zu 250 µl 2xHBS-Lösung unter leichtem Vortexen zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde dieser Ansatz tröpfchenweise, unter Schwenken zu den Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und nach 48 Stunden standen die Zellen zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

### 3.3.2 Transfektion von Zellen mit Fugene HD

Für die Transfektion von MCF7 Zellen wurde FugeneHD verwendet. Es wurden  $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Zellen in 6-Well Schalen ausgesät und nach 24 h mit 2  $\mu\text{g}$  DNA in einem 250  $\mu\text{l}$  Transfektionsansatz transfiziert. Hierfür wurden 2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit 250  $\mu\text{l}$  DMEM ohne FKS und Penicilin/Streptomycin versetzt und 10  $\mu\text{l}$  FugeneHD zugegeben. Nach 15 min wurde der Ansatz tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Nach 24-48 Stunden standen die Zellen zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

### 3.3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden  $5 \times 10^6$  Zellen auf runde 18 mm Deckgläschen ausgesät, die zuvor mit Collagen beschichtet worden waren. Nach dem Anwachsen der Zellen für 24 h wurden diese 2 mal mit PBS ++ gewaschen, in Deckgläschenhalter überführt und zur Fixierung und Permeabilisierung in Schalen mit 4°C kalter FxTx-Lösung überführt. Dort wurden sie für 15 min belassen und anschließend für 15 min in ein PBS-Bad überführt. Nach weiteren 15 min wurden sie in die Quenching-Lösung überführt, für 15 min bei 4°C inkubiert und dann erneut für 15 min in PBS gewaschen, bevor sie für 30 min in die Block-Lösung überführt wurden. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper erfolgte auf einem 200  $\mu\text{l}$  Tropfen auf Parafilm in einer Feuchtkammer für 1-24 Stunden. Anschließend wurden die Deckgläschen durch eine Reihe von fünf PBS Bädern geschwenkt und auf 200  $\mu\text{l}$  Tröpfchen mit dem Sekundären-Antikörper (AlexaFluor488/596) überführt und für 30 min inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurden die Deckgläschen jeweils kurz in fünf separaten PBS Bädern geschwenkt und schließlich eingedeckelt. Nach 24 Stunden Zeit zum Aushärten standen die Präparate für die Untersuchung durch Fluoreszenz-Mikroskopie und konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Verfügung. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einem Zeiss LSM510.

### 3.3.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Für die Immunpräzipitation von Proteinen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 6-Well Schalen ausgesät und nach 24 h mit 2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA transfiziert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen 2 mal mit 2 ml PBS ++ gewaschen, mit 300  $\mu\text{l}$  Lyse-Puffer A versetzt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Schalen gelöst, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert (20.800 g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und für die weiteren Versuche verwendet. Für die Immunpräzipitation wurden 200  $\mu\text{l}$  Lysat mit 2  $\mu\text{g}$  Antikörper versetzt und für 1-2 Stunden bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden 20  $\mu\text{l}$  Protein A-Sepharose zugegeben und für weitere 30 min

im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubation folgte eine Zentrifugation bei 770g für 5 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgesaugt und 400 µl Lyse-Puffer A zum waschen der Protein A-Sepharose zugegeben. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 5 mal wiederholt, bevor die Protein A-Sepharose in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert wurde. Anschließend wurden der Ansatz in einer SDS-PAGE aufgetrennt und einem Western-Blot unterzogen und die präzipitierten Proteinkomplexe mittels Antikörpern detektiert.

### **3.3.5 Chromatin-Immunopräzipitationen**

#### **3.3.5.1 Einfache Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)**

Die Technik der ChIP dient zur Untersuchung des Chromatins und damit der Analyse der an bestimmte DNA-Bereiche gebundenen Proteine. Hierfür wurden Zellen fixiert, die DNA fragmentiert, eine Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen potentielle DNA-gebundene Proteine durchgeführt und mittels spezifischer PCR-Primer die Anreicherung bestimmter DNA Fragmente nachgewiesen. Folgende Schritte wurden durchgeführt:

##### **A) Fixierung der Zellen:**

Zwanzig konfluente gewachsene 10 cm Schalen mit MCF7 Zellen wurden mit jeweils 10 ml PBS mit 1% Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 10 ml PBS wurde das überschüssige Formaldehyd mit 125 mM Glycin in PBS für 10 min abgesättigt.

##### **B) Lyse der Zellen:**

Anschließend wurden die Zellen von 10 cm Schalen mit 1 ml ChIP-Lyse-Puffer versetzt und für 10 min bei 4°C inkubiert, danach mit einem Zellschaber von den Zellkulturschalen gelöst und in einem 15 ml Falcon-Gefäß zusammengeführt. Nach Zentrifugation (2.700 g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in 500 µl RIPA-Puffer resuspendiert, für 10 min bei 4°C inkubiert und in 500 µl Portionen in 0,5 ml Eppendorf-Gefäßen aliquotiert.

##### **C) Fragmentierung der chromosomalen DNA:**

Die chromosomale DNA wurde durch Ultraschallbehandlung mit 3 x 20 sec Pulsen Ultraschall auf Stufe 3 mit 30 % Amplitude fragmentiert. Zwischen den einzelnen Pulsen wurden die Proben für mindestens 3 min auf Eis gestellt, um eine stärkere Erwärmung zu vermeiden. Dadurch entstanden DNA-Fragmente mit einer mittleren Größen von 500 Basenpaaren.

**D) Bestimmung der DNA Konzentration:**

Ein Aliquot von 50 µl Lysat wurde für 30 min bei 97°C inkubiert, um das Cross-Linking aufzuheben. Anschließend wurden die Proteine mittels Phenol/Chloroform Extraktion (siehe 3.1.6) entfernt, die DNA mittels Ethanol-Präzipitation (siehe 3.1.7) gefällt und anschließend in 50 µl Wasser aufgenommen. Die DNA Konzentration wurde am Nanodrop bestimmt.

**E) Chromatin-Immunopräzipitation:**

Anhand der DNA-Bestimmung wird soviel Lysat eingesetzt, dass 50 µg DNA in einem 300 µl Ansatz enthalten sind. Mit RIPA-Puffer werden die Ansätze auf 300 µl Endvolumen gebracht und 2 µg Antikörper pro Ansatz zugegeben. Die Bindung des Antikörpers erfolgt für 16 Stunden bei 4°C im Überkopfschüttler. Anschließend wurden 35 µl Protein A-Sepharose zu den Ansätzen gegeben und für weitere 60 min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert.

**F) Waschen der Ansätze:**

Zwischen jedem Wasch-Schritt wurde die Protein A-Sepharose durch Zentrifugation (1.000 g, 4°C, 3 min) sedimentiert und der Überstand verworfen. Die gesamte Waschprozedur wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

3x 300 µl RIPA-Puffer

3x 300 µl LiCl-Puffer

2x 300 µl TE-Puffer

**G) RNase A und Proteinase K Behandlung:**

Zur Spaltung der RNA wurden 200 µl TE-Puffer mit 50 ng/µl RNase A zugegeben und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Spaltung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 50 µl 5 fach Proteinase K Puffer und Proteinase K (Endkonzentration 50 ng/ml) und anschließender Inkubation bei 65°C für 16 Stunden unter leichtem Schwenken.

**H) Aufarbeitung der präzipitierten DNA**

Nach dem Proteinase K Verdau wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion (siehe 3.1.6) gefolgt von einer Ethanol Präzipitation (siehe 3.1.7) durchgeführt, die Ansätze für 60 min bei 42°C getrocknet und schließlich in 50 µl MilliQ Wasser aufgenommen.

Anschließend wurde die erhaltene DNA zur Analyse einer PCR unterzogen (siehe 3.3.5.3):

### 3.3.5.2 Doppel-Chromatin-Immunopräzipitation (Re-ChIP)

Die Technik der Doppel-Chromatin-Immunopräzipitation bzw. Re-ChIP dient zur Prüfung, ob zwei Proteinen innerhalb eines Komplexes an die DNA binden. Hierfür werden Zellen fixiert, die DNA fragmentiert, eine Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen potentiell DNA-bindende Proteine durchgeführt, gefolgt von einer zweiten Immunopräzipitation mit einem anderen Antikörper. Mittels spezifischer PCR-Primer wird dann die Anreicherung bestimmter DNA Fragmente nachgewiesen. Folgende Schritte wurden durchgeführt:

Schritte A-F wie unter 3.3.5.1 beschrieben

#### G) Reduzierung der Antikörper:

Zur Reduzierung der Antikörper wurden 125 µl Re-ChIP-Puffer zugegeben und für 60 min bei 37°C inkubiert.

#### H) Chromatin-Immunopräzipitation

Um das im Re-ChIP-Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol zu verdünnen, wurden mit RIPA-Puffer auf 5 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 2 µg des zweiten Antikörpers und 50 µl Protein A-Sepharose zugegeben und für 60 min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde dann durch Zentrifugation (1.000 g, 4°C, 5 min) sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl RIPA-Puffer resuspendiert.

Nun wurden die Schritte F-H wie unter 3.3.5.1 beschrieben durchgeführt

Anschließend wurde die erhaltenen DNAs zur Analyse einer PCR unterzogen (siehe 3.3.5.3):

### 3.3.5.3 Nachweis der spezifischer DNA-Fragmente nach ChIP und Re-ChIP

Der Nachweis der Anreicherung bestimmter DNA-Fragmente wurde mittels PCR durchgeführt. Hierbei wurde die Paq5000 DNA-Polymerase verwendet. Es wurden für die jeweiligen Primerpaare angepassten PCR-Bedingungen verwendet.

Für den Nachweis der rDNA Initiator-Region [77], Terminator-Region [77] und GAPDH-Promotor [8] wurden die unten aufgeführten und bereits gut charakterisierten Primerpaare und Bedingungen verwendet.

Primer zur Detektion der rDNA Initiator-Region H1:

Forward Primer: 5'-GGCGGTTTGAGTGAGACGAGA-3'

Reverse Primer: 5'-ACGTGCGCTCACCGAGAGCAG-3'

PCR-Produkt: 78 Basenpaare

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	10 sec	25x
Primer-Anlagerung	68°C	20 sec	
Elongation	72°C	20 sec	
Finale Elongation	72°C	5 min	1x
Lagerung	4°C	∞	1x

Primer zur Detektion der rDNA Terminator-Region H13:

Forward Primer: 5'-ACCTGGCGCTAAACCATTCGT-3'

Reverse Primer: 5'-GGACAAACCCTTGTGTCGAGG-3'

PCR-Produkt: 115 Basenpaare

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	10 sec	30x
Primer-Anlagerung	66°C	20 sec	
Elongation	72°C	20 sec	
Finale Elongation	72°C	5 min	1x
Lagerung	4°C	∞	1x

Primer zur Detektion der GAPDH Promotor-Region:

Forward Primer: 5'-TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3'

Reverse Primer: 5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'

PCR-Produkt: 166 Basenpaare

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95°C	10 sec	27x
Primer-Anlagerung	70°C	20 sec	
Elongation	72°C	20 sec	
Finale Elongation	72°C	5 min	1x
Lagerung	4°C	∞	1x

### 3.3.6 Reportergenanalyse

Die Reportergenanalysen wurden in HEK293 Zellen mit einem Luciferase/ $\beta$ -Galactosidase System durchgeführt. Hierfür wurden 500.000 Zellen/Well ausgesät und nach 24 Stunden mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Als interner Standard wurden 0,1  $\mu$ g des pCH110- $\beta$ -Gal Vektors verwendet, der konstitutiv das Enzym  $\beta$ -Galactosidase exprimiert. Als klassisches Reportergen wurde das für das  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-Zielgen Siamois bekannte Reporterkonstrukt pGL3B-S01234 Vektors verwendet, der den -0.8 kB Promotorbereich von Siamois mit 5 LEF-1/TCF4 Bindestellen enthält. Als Kontrolle hierzu wurden 1  $\mu$ g des pGL3B-S Vektors verwendet, welcher den -0.8 kB Promotorbereich mit mutierten LEF-1/TCF4 Bindestellen enthält. Außerdem wurden vom artifiziellen Reportergen Konstrukt pGL3B-OF 0,7  $\mu$ g verwendet, welches fünf optimale Konsensus-Sequenzen für eine LEF-1/TCF4 Bindung enthält. Als Kontrolle wurden 0,7  $\mu$ g pGL3B-OF verwendet, welches keine LEF-1/TCF4 Bindestellen enthält. Für die Expression von  $\beta$ -Catenin wurden 1  $\mu$ g pCS2+ $\beta$ -Catenin, von TCF4 0,5  $\mu$ g pCDNA3-hTCF4, von Pontin 0,5  $\mu$ g pCS2+Pontin52 und von Reptin 0,5  $\mu$ g pCS2+Reptin52 transfiziert. Die Ansätze wurden wenn nötig mit dem Leervektor pCS2+ auf eine konstante Gesamtmenge an Plasmid-DNA aufgefüllt. Zur Transfektion von Fhit wurden entweder 1  $\mu$ g pCS2+Fhit oder bei steigenden Mengen 0,5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 1,5  $\mu$ g oder 2  $\mu$ g pCS2+Fhit verwendet.

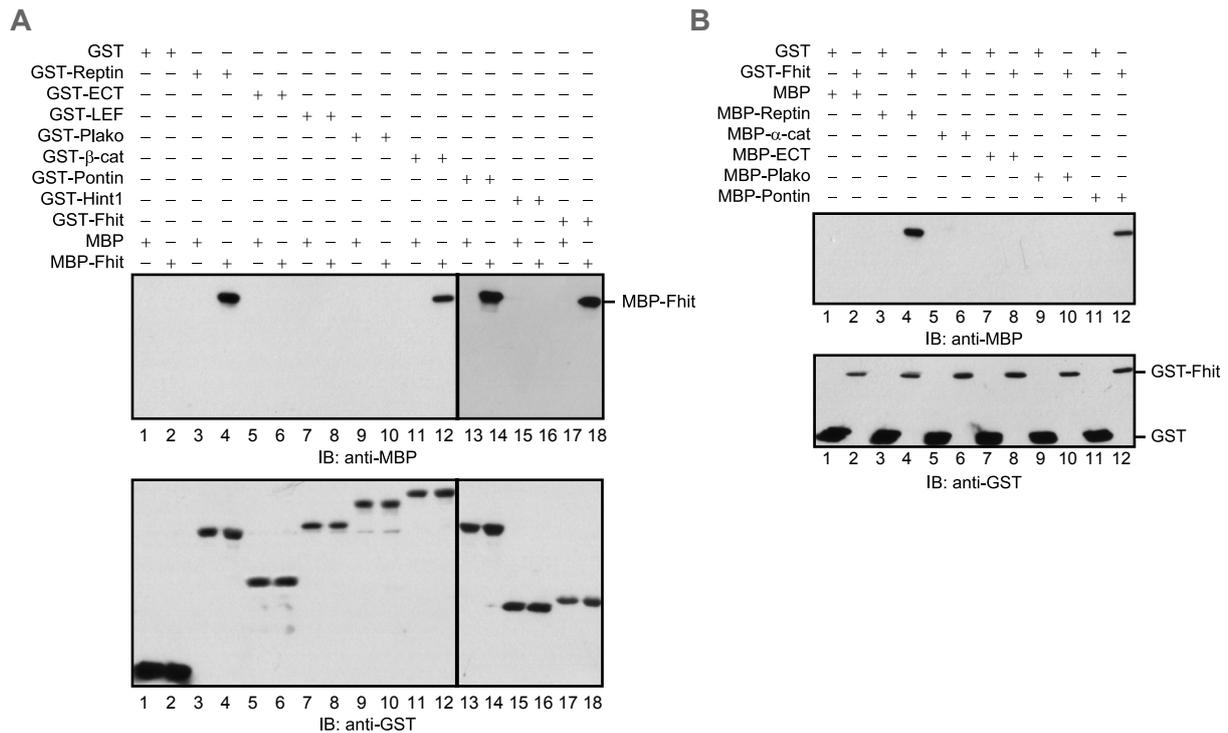
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen $\beta$ -Catenin Interaktionspartnern

Um die Protein-Protein Interaktionen von  $\beta$ -Catenin-assoziierten Proteinen zu analysieren, wurden mit rekombinanten, in *E.coli* exprimierten Proteinen *in vitro* Assoziations-Assays durchgeführt. Für die hier beschriebenen Untersuchungen waren besonders die Protein-Interaktionen mit dem kürzlich beschriebenen  $\beta$ -Catenin Bindungspartner Fhit von Interesse. Hierfür wurden bereits beschriebene Interaktionspartner von  $\beta$ -Catenin oder in  $\beta$ -Catenin-Komplexen enthaltene Proteine als GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und mit MBP-Fhit inkubiert. Als direkte Interaktionspartner wurden die Proteine E-Cadherin (ECT; E-Cadherin cytoplasmatischer Teil), LEF-1 (Lymphoid enhancer-binding factor 1), Pontin und Reptin verwendet. Als Protein, das im gleichen Komplex wie  $\beta$ -Catenin enthalten ist, wurde Hint1, und als Protein mit großer Ähnlichkeit zu  $\beta$ -Catenin wurde Plakoglobin verwendet. Als Positiv-Kontrollen in diesem Test diente  $\beta$ -Catenin als direkter Interaktionspartner von Fhit [8] und Fhit selbst, das Homodimere ausbilden kann.

#### 4.1.1 Pontin und Reptin binden direkt an Fhit

Für die Untersuchung der *in vitro* Assoziation wurden gleiche Mengen der verschiedenen GST-Fusionsproteine mit gleichen Mengen MBP oder MBP-Fhit inkubiert und die gebildeten Proteinkomplexe über GSH-Agarose isoliert. Die anschließende Analyse der Komplexbildung erfolgte anschließend mittels Western-Blot. Wie in Abb. 8 zu erkennen ist, konnte eine Bindung von MBP-Fhit an GST- $\beta$ -Catenin, GST-Fhit, GST-Pontin und GST-Reptin nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Interaktion von MBP-Fhit mit GST-ECT, GST-LEF-1, GST-Plakoglobin und GST-Hint1.



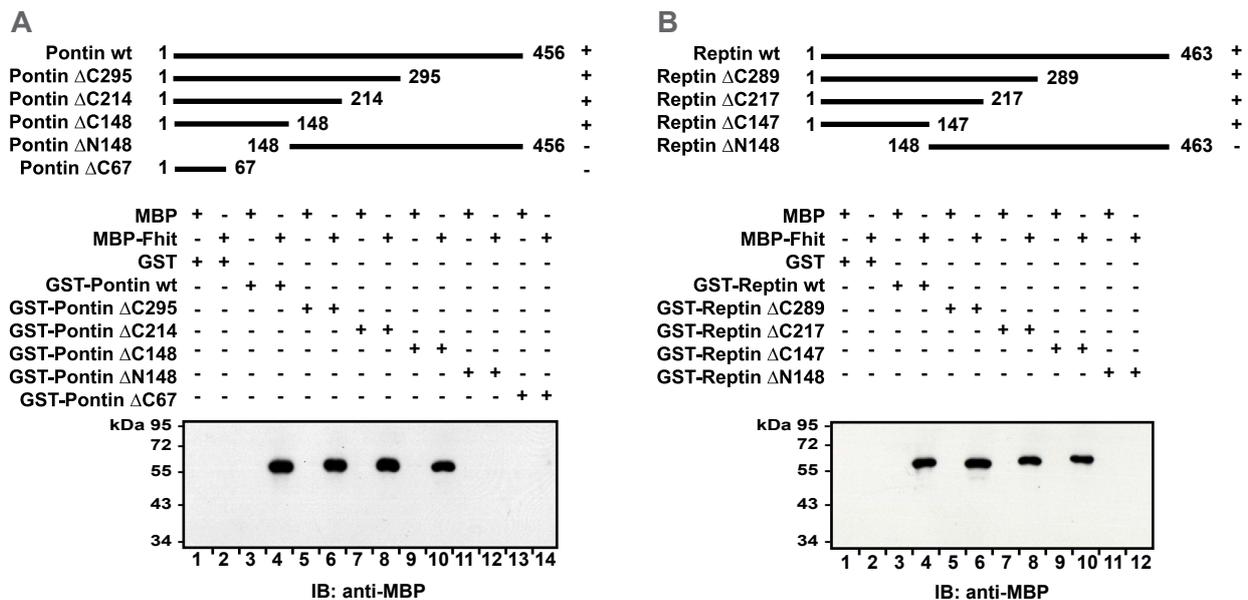
**Abb. 8:** Pontin und Reptin binden direkt an Fhit

A) Rekombinante GST-Fusionproteine von Reptin, E-Cadherin (cytoplasmatischer Teil), LEF-1, Plakoglobin, β-Catenin, Pontin, Hint1 wurden auf ihre Bindungseigenschaften zu MBP-Fhit untersucht. GST und MBP dienten als Kontrolle. Es wurden von jedem Protein 5 µg eingesetzt. MBP-Fhit interagiert spezifisch mit GST-Reptin, GST-β-Catenin, GST-Pontin und GST-Fhit. MBP bindet weder GST noch die GST-Fusionsproteine. MBP-Fhit interagiert nicht mit GST.

B) Eine Bindung von Fhit an Pontin und Reptin kann auch mit GST-Fhit und MBP-Reptin oder MBP-Pontin Fusionsproteinen nachgewiesen werden. Als Kontrollen dienten wiederum MBP und GST. Die dargestellten Experimente sind repräsentativ für mindestens 3 unabhängig voneinander durchgeführte Bindungsassays.

#### 4.1.2 Kartierung der Fhit-Bindungs epitope in Pontin und Reptin

Da bereits für verschiedene Interaktionspartner von Pontin und Reptin die Bindungsstellen in Pontin und Reptin identifiziert wurden, sollte der Bereich eingegrenzt werden, in dem Fhit an Pontin und Reptin bindet, um die Möglichkeit von Kompetitionen um die Bindung an Pontin und Reptin zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene N- und C-terminal deletierte Varianten von Pontin und Reptin als GST-Fusionproteine exprimiert und *in vitro* Assoziations-Assays mit MBP-Fhit durchgeführt. Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, wurde der Bereich für die Bindung von Fhit an Pontin auf die Aminosäuren 67-148 in Pontin und 1-147 in Reptin eingegrenzt.

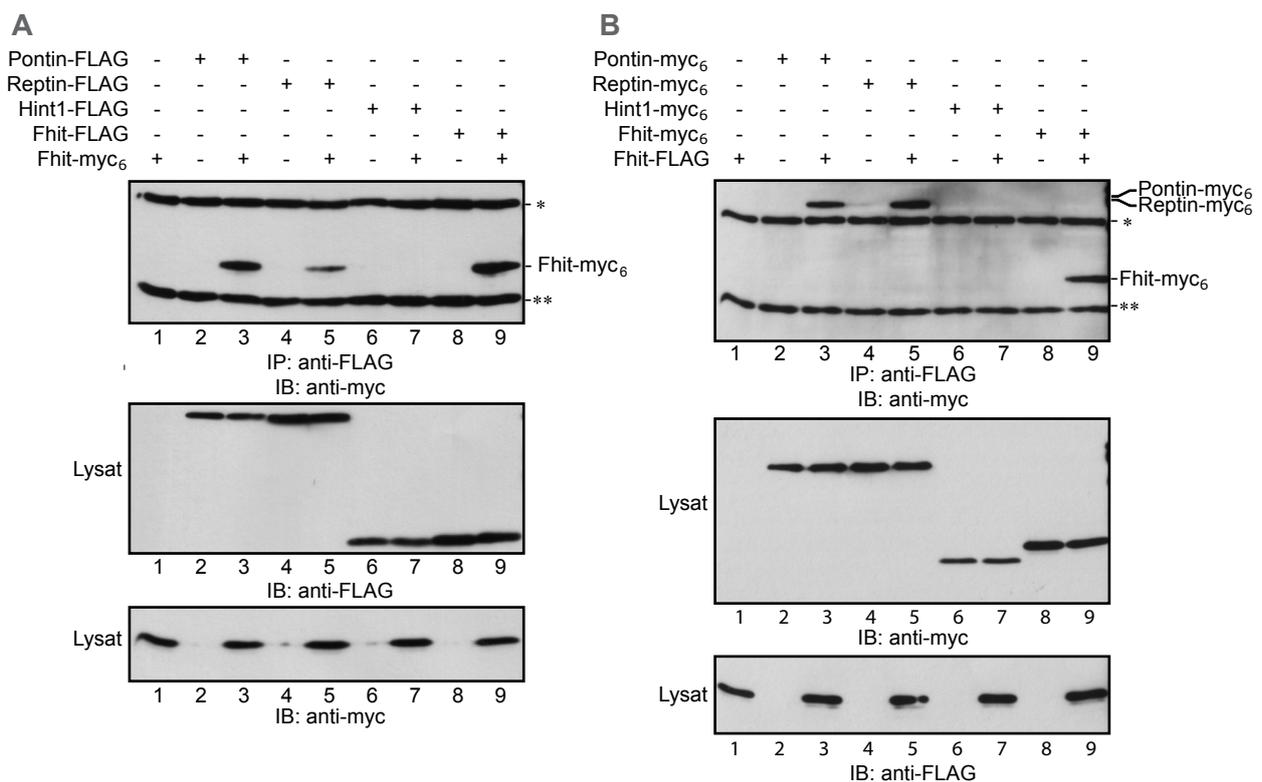


**Abb. 9:** Kartierung der Bindungsstellen von MBP-Fhit in GST-Pontin- und GST-Reptin-Deletionskonstrukten.

Verschiedene GST-Pontin- und GST-Reptin-Fusionproteine wurden auf ihre Bindungseigenschaften mit MBP-Fhit untersucht. Die oben dargestellte Western-Blots zeigen die über GSH-Agarose isolierten Protein-Komplexe. A) MBP-Fhit interagiert spezifisch mit GST-Pontin wt, GST-Pontin ΔC295, GST-Pontin ΔC214 und GST-Pontin ΔC148. B) MBP-Fhit interagiert spezifisch mit GST-Reptin wt, GST-Reptin ΔC289, GST-Reptin ΔC217 und GST-Reptin ΔC147. Die dargestellten Experimente sind repräsentativ für mindestens 3 unabhängig voneinander durchgeführte Bindungsassays.

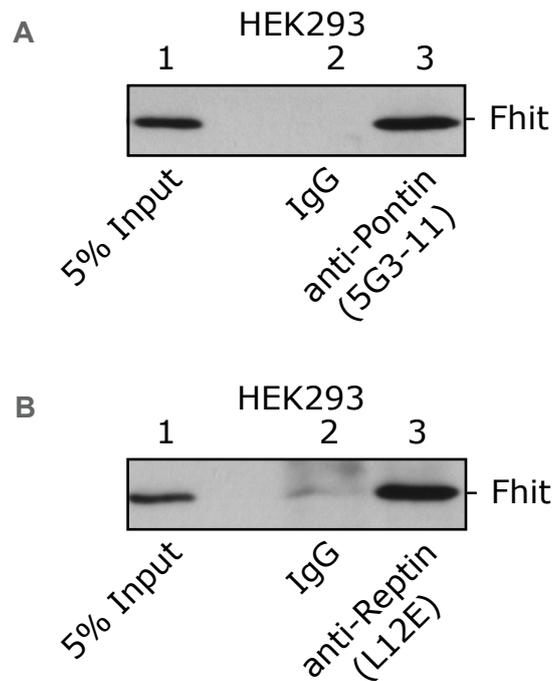
### 4.1.3 Fhit bildet einen Komplex mit Pontin und Reptin in HEK293 Zellen

Um zu prüfen, ob die *in vitro* nachweisbare Bindung von Pontin und Reptin an Fhit auch in HEK293-Zellen vorliegt, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät und mit Plasmiden transfiziert, die zu einer Überexpression von Fhit, Pontin oder Reptin als FLAG- bzw. Myc-getagten Varianten führten. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und  $100 \mu\text{g}$  Lysat mit  $2 \mu\text{g}$  anti-FLAG-M2- oder anti-Myc (9E10)-Antikörper versetzt. Nach der Präzipitation der Immunkomplexe mit Protein-A Sepharose Beads wurden diese in SDS-Probenpuffer aufgekocht, über SDS-PAGE getrennt und einem Western-Blot unterzogen. Die Detektion der präzipitierten Proteinkomplexe erfolgte wiederum mit anti-FLAG-M2- oder anti-Myc (9E10)-Antikörpern. Wie in Abbildung 10 A zu erkennen ist, interagieren sowohl Pontin-FLAG, als auch Reptin-FLAG mit Fhit-myc<sub>6</sub>. Als Positivkontrolle wurde die Dimerisierung von Fhit-FLAG mit Fhit-myc<sub>6</sub> nachgewiesen. In einem Kontrollexperiment wurden die Fusionspartner zwischen Pontin/Reptin mit Fhit ausgetauscht. Auch hier interagierten sowohl Pontin-myc<sub>6</sub>, als auch Reptin-myc<sub>6</sub> mit Fhit-FLAG. Als Positivkontrolle wurde die Dimerisierung von Fhit-myc<sub>6</sub> mit Fhit-FLAG nachgewiesen. In einer Negativkontrolle konnte keine Dimerisierung zwischen Hint1 und Fhit nachgewiesen werden.



#### 4.1.4 Nachweis endogener Fhit-Pontin- und Fhit-Reptin-Komplexe in HEK293-Zellen

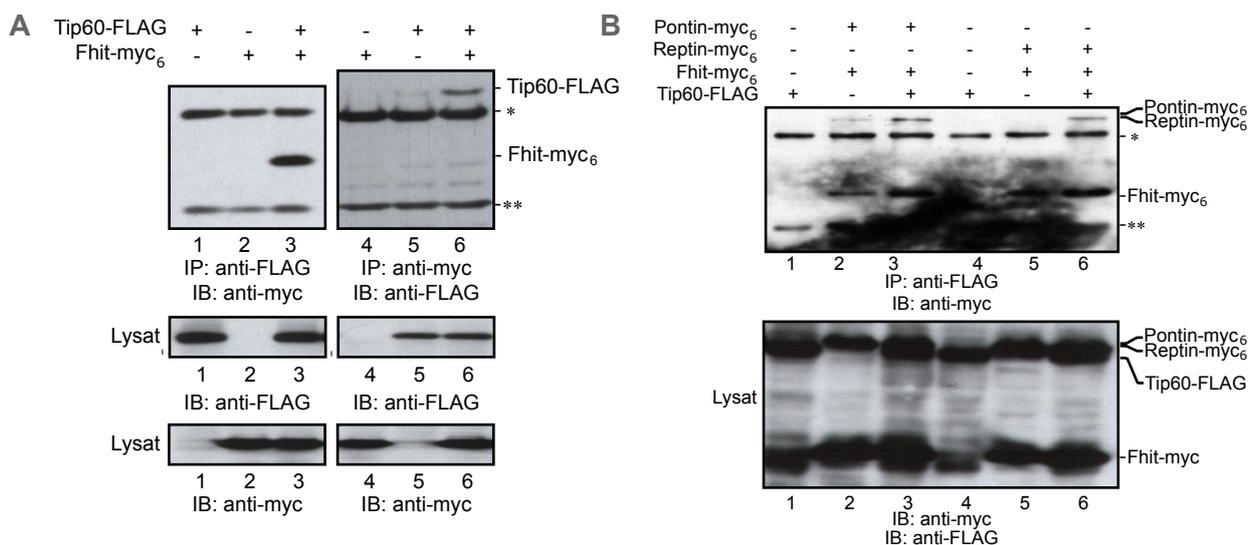
In einem nächsten Schritt sollten endogene Fhit-Pontin- und Fhit-Reptin-Proteinkomplexe nachgewiesen werden. Hierzu wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente mit dem monoklonalen Maus-Antikörper anti-Pontin (5G3-11) und dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper anti-Reptin (L12E) durchgeführt. Dabei co-präzipitierte Fhit mit dem anti-Pontin (5G3-11) Antikörper (Abb. 11 A) und dem anti-Reptin (L12E) Antikörper (Abb. 11B).



**Abb. 11:** Nachweis endogener Fhit-Pontin und Fhit-Reptin Komplexe in HEK293 Zellen  
Repräsentatives Ergebnis einer Co-Immunpräzipitation von endogenem Fhit mit Pontin oder Reptin aus HEK293-Zellen. Die Immunpräzipitation erfolgte mit jeweils 2  $\mu$ g monoklonalem anti-Pontin (5G3-11), oder dem polyklonalen anti-Reptin (L12E). Als Kontrolle wurden Maus IgG-Antikörper bzw. Kaninchen IgG-Antikörper eingesetzt. Die Western-Blot Analyse erfolgte mit einem polyklonalen anti-Fhit Antikörper.

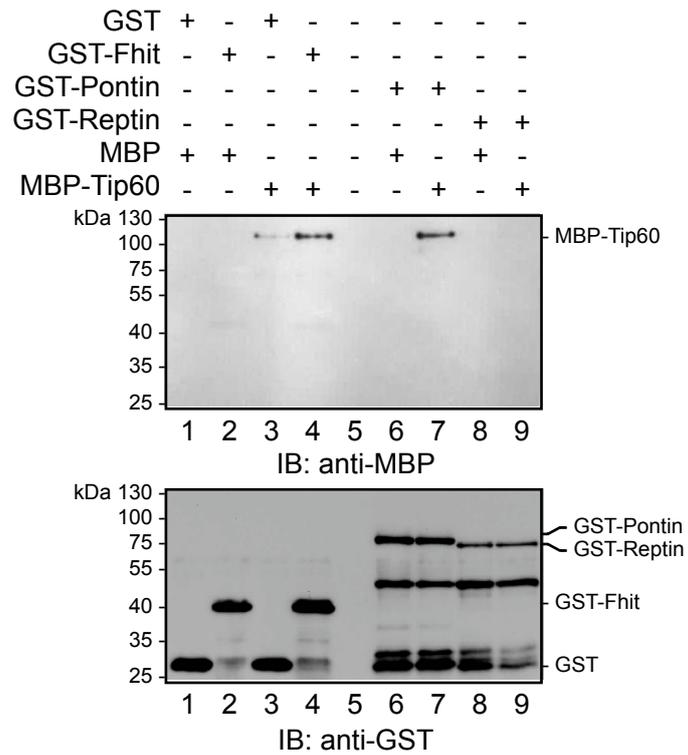
#### 4.1.5 Fhit bindet direkt an Tip60

Die Effekte von Pontin und Reptin auf die  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4 vermittelte Transkription sind vermutlich auf Veränderungen der Chromatin-Struktur zurückzuführen. Daher wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob Fhit auch mit der Histon-Acetyltransferase Tip60 in einem Komplex vorliegt. Bei der Analyse zellulärer Komplexe in HEK293 Zellen durch Immunpräzipitationen zeigte sich, dass Tip60 zusammen mit Fhit in einem Komplex vorliegt (Abb. 12 A). Bei der Immunpräzipitation von Tip60 in Gegenwart von Pontin oder Reptin wurden sowohl Pontin als auch Reptin zusammen mit Fhit co-präzipitiert. (Abb. 12 B). Zur Überprüfung einer direkten Interaktion wurde Tip60 als MBP-Fusionprotein in *E.coli* exprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt. In einem Pull-Down-Assay mit GST, GST-Fhit, GST-Pontin und GST-Reptin mit MBP und MBP-Tip60 zeigte sich, dass Tip60 direkt mit Fhit und Pontin interagiert. Für Reptin hingegen konnte keine direkte Interaktion mit Tip60 nachgewiesen werden (Abb. 13).



**Abb. 12:** Fhit interagiert mit Tip60, Pontin und Reptin in HEK293-Zellen

Für die Co-Immunpräzipitation von Fhit, Tip60, Pontin und Reptin wurden verschiedene Kombinationen von Pontin-myc<sub>6</sub>, Reptin-myc<sub>6</sub>, Fhit-myc<sub>6</sub>, Tip60-FLAG transfiziert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit den gekennzeichneten Antikörpern. A) Repräsentatives Ergebnis einer Co-Immunpräzipitation mit anti-FLAG-M2 Antikörper oder anti-Myc (9E10) Antikörper. Tip60-FLAG und Fhit-myc<sub>6</sub> konnten jeweils spezifisch präzipitiert werden. B) Bei gleichzeitiger Transfektion von HEK293 Zellen mit Fhit-myc<sub>6</sub>, Pontin-myc<sub>6</sub> oder Reptin-myc<sub>6</sub> und Tip60-FLAG konnten Fhit-myc<sub>6</sub> und Pontin-myc<sub>6</sub> oder Reptin-myc<sub>6</sub> co-präzipitiert werden.



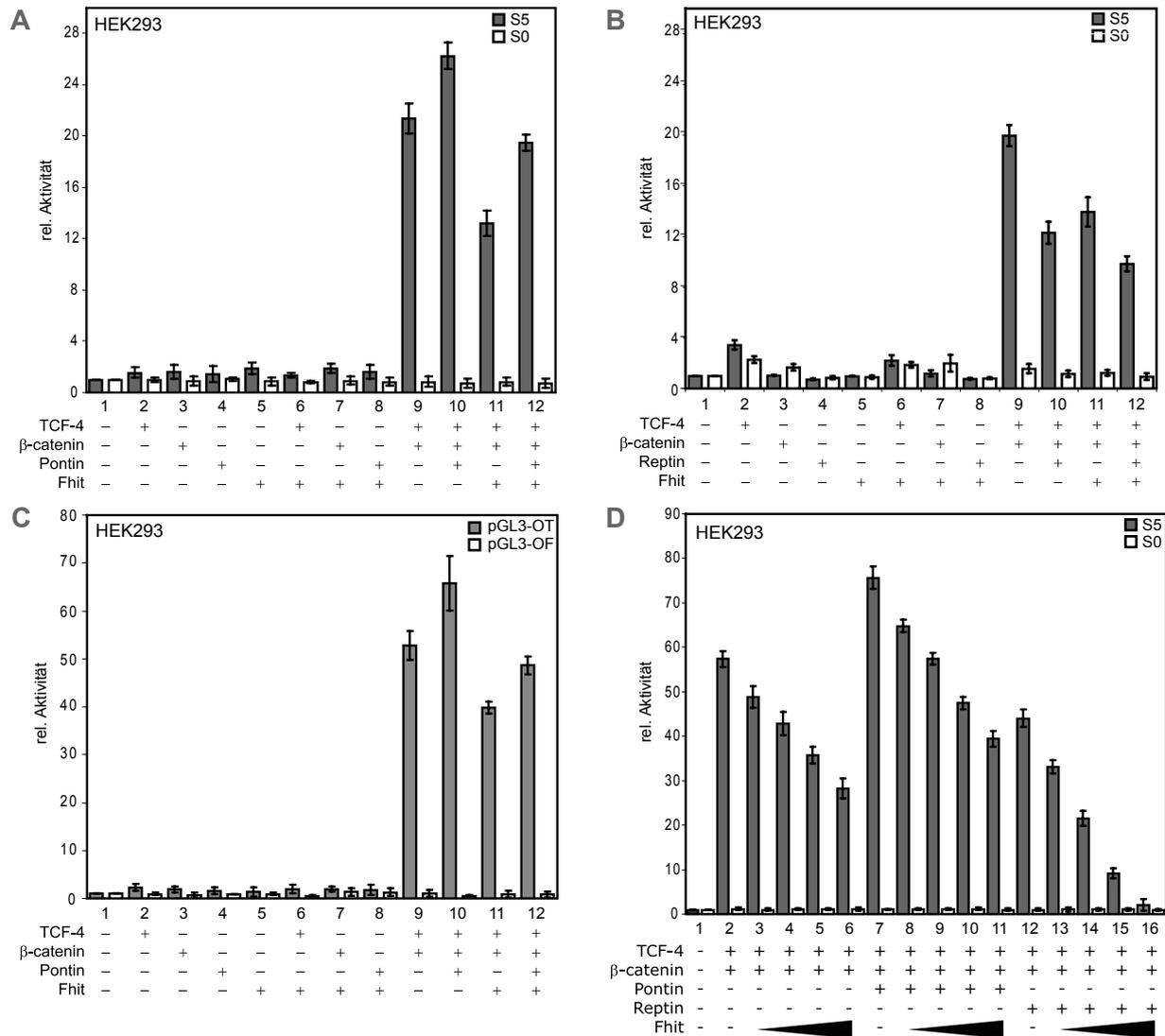
**Abb. 13:** Tip60 bindet direkt an Fhit und Pontin jedoch nicht an Reptin

Nach Inkubation von gereinigten rekombinanten GST-Fusionsproteinen von Fhit, Pontin und Reptin und MBP-Tip60 wurden sich ausbildende Proteinkomplexe über GSH-Agarosebeads isoliert und durch Western-Blot analysiert. GST und MBP dienten als Kontrolle. Dabei interagierten GST-Fhit und GST-Pontin mit MBP-Tip60, GST-Reptin jedoch nicht. Die dargestellten Experimente sind repräsentativ für mindestens 3 unabhängig voneinander durchgeführte Bindungsassays.

## 4.2 Wirkung von Fhit, Pontin und Reptin auf die $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4 vermittelte Transkription

Die Reportergenkonstrukte Siamois S5/S0 und Topflash/Fopflash sind als Standard-Luziferase-Reportergensysteme für die Analyse von Effektoren des Wnt-Signalwegs gut beschrieben. Das Siamois S5 Konstrukt (pGL3B-S01234) enthält den -0,8 kb-Bereich des *Xenopus laevis* Gens Siamois, welches fünf LEF-1/TCF4-Bindungsstellen enthält. Durch gleichzeitige Transfektion von  $\beta$ -Catenin und LEF-1 oder TCF4 wird eine starke Expression der nachgeschalteten Luziferase induziert. Das Siamois S0 Konstrukt (pGL3B-S) enthält den gleichen Bereich wie S5, allerdings sind die LEF-1/TCF4 Bindungsstellen durch Mutagenese so verändert, dass die Transkription dieses Reportergens nicht mehr durch  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4 aktiviert werden kann und es somit als Kontrolle der spezifischen Aktivierung dient. Die Reportergene Topflash/Fopflash (pGL3B-OT/pGL3B-OF) sind künstliche Konstrukte, die entweder drei optimale (Topflash) oder drei mutierte (Fopflash) LEF-1/TCF4 Konsensus-Sequenzen enthalten. Grundsätzlich funktionieren sie nach dem gleichen Prinzip wie S5/S0. In Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Weiske [60] wurden diese Reporterstrukturen verwendet, um den Einfluss von Fhit, Pontin und Reptin auf die  $\beta$ -Catenin-vermittelte Transkriptionsaktivität zu messen.

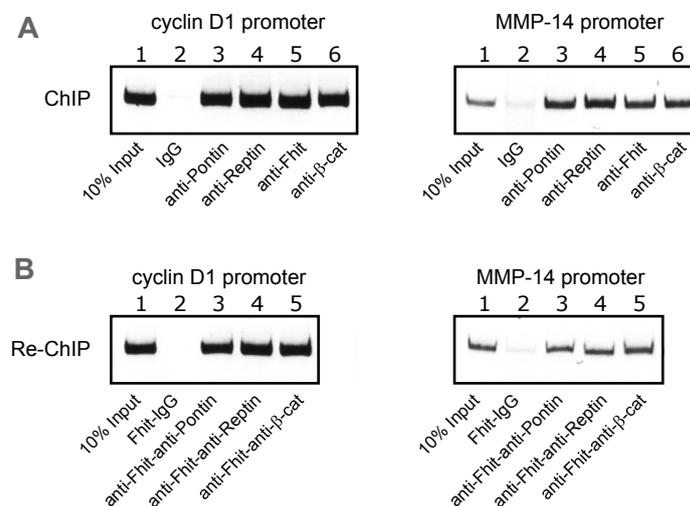
Für Reporteranalysen wurden  $5 \times 10^5$  HEK293 Zellen ausgesät und nach 24 Stunden mit den in Abbildung 12 beschriebenen Plasmidkombinationen transfiziert. Nach weiteren 42 Stunden wurde die Luziferase Aktivität in den einzelnen Ansätzen bestimmt. Bei der alleinigen Transfektion von TCF4,  $\beta$ -Catenin, Pontin und Fhit, sowie bei der Co-Transfektion von TCF4,  $\beta$ -Catenin, Pontin oder Reptin jeweils zusammen mit Fhit war kein Effekt nachweisbar (Abb. 14 A/B/C). Transfiziert man jedoch  $\beta$ -Catenin und TCF4 gleichzeitig, kommt es sowohl beim S5-Reporter (Abb. 14 A/B; Spur 9) als auch beim Topflash-Reporterkonstrukt zu einer starken Aktivierung (Abb. 14 C; Spur 9) im Vergleich zu den Kontrollen (Spur 1-8). Wird nun Pontin co-transfiziert, wird dieser aktivierende Effekt im Vergleich zu Spur 9 noch deutlich gesteigert, bei S5 auf Faktor 26 (Abb. 14 A; Spur 10) und bei Topflash auf Faktor 65 (Abb. 14 C; Spur 10). Im Gegensatz dazu erhält man durch die Co-Transfektion von Reptin bei S5 eine Hemmung auf Faktor 12 (Abb. 14 B; Spur 10). Die Co-Transfektion von Fhit bewirkt eine Hemmung auf Faktor 14 (Abb. 14 A/B) und bei Topflash eine Hemmung auf Faktor 40 (Abb. 14 C; Spur 11). Durch die Co-Expression von  $\beta$ -Catenin, TCF4, Fhit und Pontin wird der hemmende Effekt von Fhit durch Pontin größtenteils wieder aufgehoben (Abb. 14 A/C; Spur 12). Bei der Co-Transfektion von  $\beta$ -Catenin, TCF4, Fhit und Reptin kommt es zu einer stärkeren Hemmung, als durch Fhit oder Reptin alleine (Abb. 14 B; Spur 12). Die durch Fhit hervorgerufenen hemmenden Effekte verstärken sich dosisabhängig (Abb. 14 D).



**Abb. 14:** Modulation der  $\beta$ -Catenin/TCF4-Aktivität am Siamois-Promotor durch Pontin, Reptin und Fhit. A-C) HEK293-Zellen wurden jeweils mit pGL3B S01234 (S5) bzw. pGL3B-OT (Topflash) oder pGL3B S (S0) bzw. pGL3B-OF (Fopflash) und pCH110 ( $\beta$ -Galactosidase) oder pHRLnull (Renilla-Luciferase) und den verschiedenen angezeigten Kombinationen von TCF-4,  $\beta$ -Catenin, Pontin, Reptin und Fhit transfiziert. D) HEK293-Zellen wurden jeweils mit pGL3B S01234 (S5) oder pGL3B S und pCH110 ( $\beta$ -Galactosidase) transfiziert und den verschiedenen angezeigten Kombinationen von TCF-4,  $\beta$ -Catenin, Pontin, Reptin und steigenden Mengen Fhit transfiziert. Die Gesamtmenge der transfizierten DNA wurde jeweils durch Zugabe von Leervektor gleich gehalten. Die relativen Aktivitäten der S5/S0- bzw. Topflash/Fopflash-Reporter wurden in Duplikaten gemessen, gemittelt und mit der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bzw. Renilla-Luciferase-Aktivität normiert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten mit SEM (Standard Error of the Mean).

### 4.3 Fhit-Pontin und Fhit-Reptin-Komplexe binden an die Promotoren von $\beta$ -Catenin Zielgenen

Um zu prüfen, ob Pontin und Reptin zusammen mit Fhit und  $\beta$ -Catenin an die Promotoren von klassischen Wnt-Zielgenen binden, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Weiske [60] Chromatin-Immunpräzipitationen mit MCF-7 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden sowohl einfache ChIPs zum Nachweis der Promotorassoziation von Pontin, Reptin, Fhit oder  $\beta$ -Catenin, als auch Re-ChIPs zum Nachweis der gleichzeitigen Promotorassoziation von Fhit/Pontin, Fhit/Reptin, Fhit/ $\beta$ -Catenin und Fhit/Fhit durchgeführt. Für die ChIP wurden die Antikörper anti-Pontin (5G3-11), anti-Reptin (L12E), anti-Fhit und anti- $\beta$ -Catenin (C14) verwendet. Anschließend wurde mittels PCR geprüft, ob mit den oben genannten Antikörpern bzw. Antikörperkombinationen LEF-1/TCF4-Bindungsstellen enthaltende Bereiche der chromosomalen DNA des CyclinD1- und MMP-14-Promotors angereichert wurden. Als Kontrolle zum Ausschluss unspezifischer Bindung der DNA wurde IgG verwendet. In der ChIP mit den jeweiligen Antikörpern gegen Pontin, Reptin, Fhit und  $\beta$ -Catenin ließ sich die Bindung der jeweiligen Proteine sowohl an den CyclinD1- als auch an den MMP-14-Promotor nachweisen (Abb 15 A) In Re-ChIP-Experimenten, bei denen nach zwischenzeitlicher Kettenspaltung (Reduktion) des ersten Antikörpers, die angegebenen zweiten Antikörper zum Einsatz kamen ließ sich eine Bindung von Fhit im Komplex mit Pontin, Reptin und  $\beta$ -Catenin an die Promotorbereiche nachweisen.

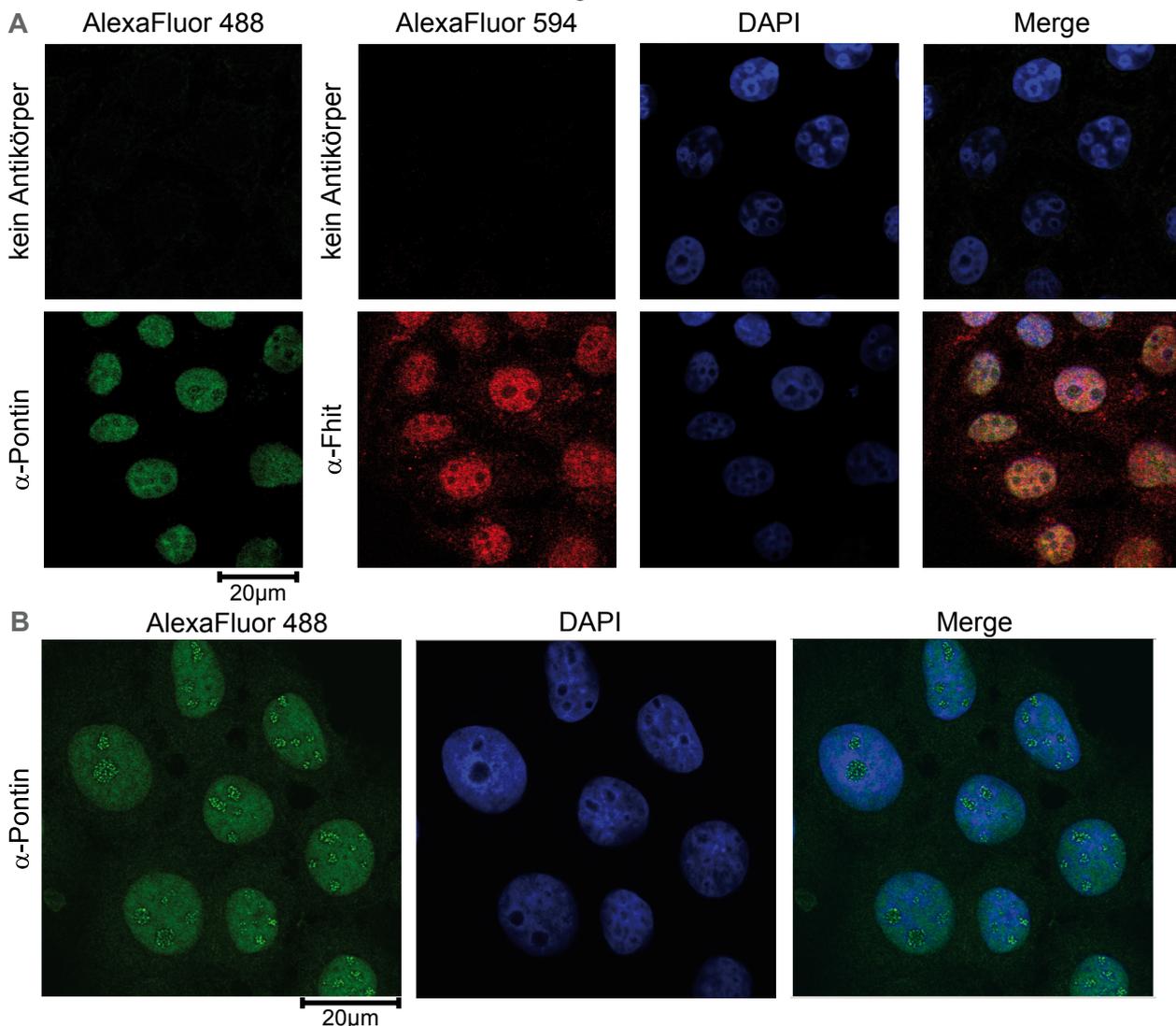


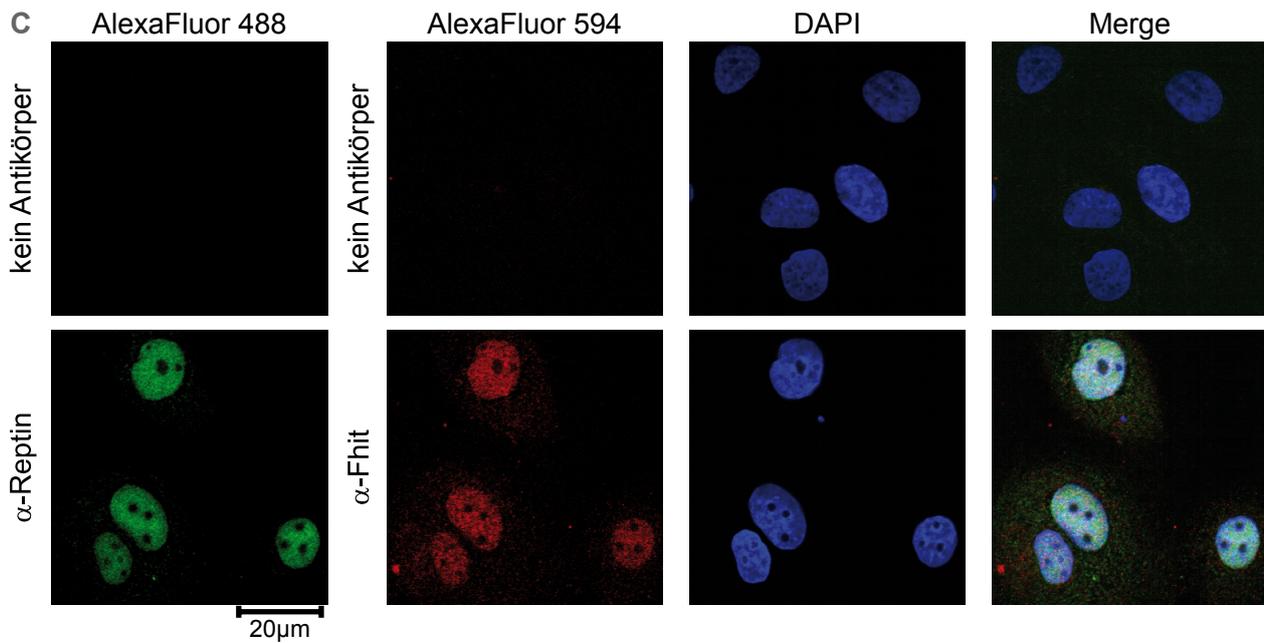
**Abb. 15:** Untersuchung der Assoziation von Pontin, Reptin, Fhit und  $\beta$ -Catenin an die Promotorbereiche von CyclinD1- und MMP-14-Promotor in MCF-7 Zellen. A) Durch ChIP mit den Antikörpern anti-Pontin (5G3-11), anti-Reptin (L12E), anti-Fhit und anti- $\beta$ -Catenin konnte eine spezifische Bindung dieser Proteine an die CyclinD1- und MMP-14-Promotoren nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde Maus IgG verwendet. B) Re-ChIP-Experimente mit den angegebenen Antikörper-Kombinationen zeigten, dass Fhit in einem Komplex mit Pontin, Reptin oder  $\beta$ -Catenin an den CyclinD1- und MMP-14-Promotoren binden.

#### 4.4 Die intrazelluläre Lokalisation von Pontin, Reptin und Fhit

##### 4.4.1 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Pontin, Reptin und Fhit

Um zu untersuchen, in welchen Kompartimenten Fhit, Pontin und Reptin in MCF-7-Zellen vorliegen, wurde eine konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Dazu wurden MCF-7-Zellen auf kollagenbeschichtete Deckgläschen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen gleichzeitig mit Formaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit den in Abb. 16 angegebenen primären und sekundären Antikörpern sowie DAPI angefärbt. Dabei zeigte sich für Pontin fast ausschließlich nukleäre Färbung (Abb. 16 A). Zudem war eine deutliche punktförmige Färbung im Nukleolus vieler Zellen sichtbar (Abb. 16 B). Fhit hatte eine leichte Färbung im Zytoplasma, es waren jedoch wesentlich stärkere Signale im Zellkern detektierbar (Abb. 16 A). Die Färbung von Reptin und Fhit zeigte unter diesen Fixierungsbedingungen eine leichte Färbung des Zytoplasma und erneut wesentlich stärkere Signale im Nukleus (Abb. 16 C). Pontin, Reptin und Fhit konnten somit in diesen Versuchen als hauptsächlich nukleär lokalisiert nachgewiesen werden und für Pontin wurde zudem eine Lokalisation im Nukleolus nachgewiesen.



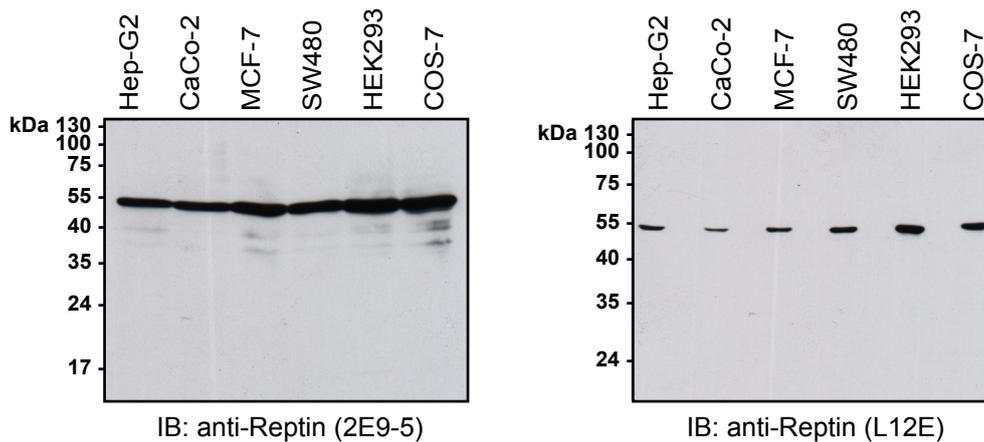


**Abb. 16:** Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der intrazellulären Lokalisation von endogenem Pontin, Reptin und Fhit.

A) MCF-7-Zellen wurden mit dem monoklonalen anti-Pontin (5G3-11) und dem polyklonalen Kaninchen anti-Fhit Antikörper gefärbt. Als Sekundär-Antikörper wurden AlexaFluor488 und AlexaFluor594 verwendet. B) MCF-7-Zellen wurden mit monoklonalem anti-Pontin (5G3-11) (1:500) gefärbt. Als Sekundär-Antikörper wurde AlexaFluor488 (anti-Maus; 1:1000) verwendet. Die DNA wurde mit DAPI (1:1000) angefärbt. C) Färbung von Reptin mit monoklonalem anti-Reptin (2E9-5) (1:200) und polyklonalem Kaninchen anti-Fhit (1:500) Antikörper. Als Sekundär-Antikörper wurden AlexaFluor488 (anti-Maus; 1:1000) und AlexaFluor594 (anti-Kaninchen; 1:1000) verwendet. Die Aufnahmen wurden an einem Konfokalen Laserscanningmikroskop LSM510 bei den Wellenlängen 488nm, 543nm und 405nm aufgenommen. Die optische Schichtdicke betrug 80µm.

#### 4.4.2 Spezifität der verwendeten Antikörper

Um die Spezifität des beobachteten Färbemusters zu überprüfen wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der verwendeten Antikörper durchgeführt. Hierfür wurden Lysate der Zelllinien HepG2, CaCo-2, MCF-7, SW480, HEK293 und COS-7 hergestellt, auf gleiche Proteinmenge eingestellt und einem Western-Blot unterzogen. Sowohl der monoklonale anti-Reptin (2E9-5), als auch der polyklonale anti-Reptin (L12E) Antikörper detektierten nur eine dominante Bande (Abb. 16).

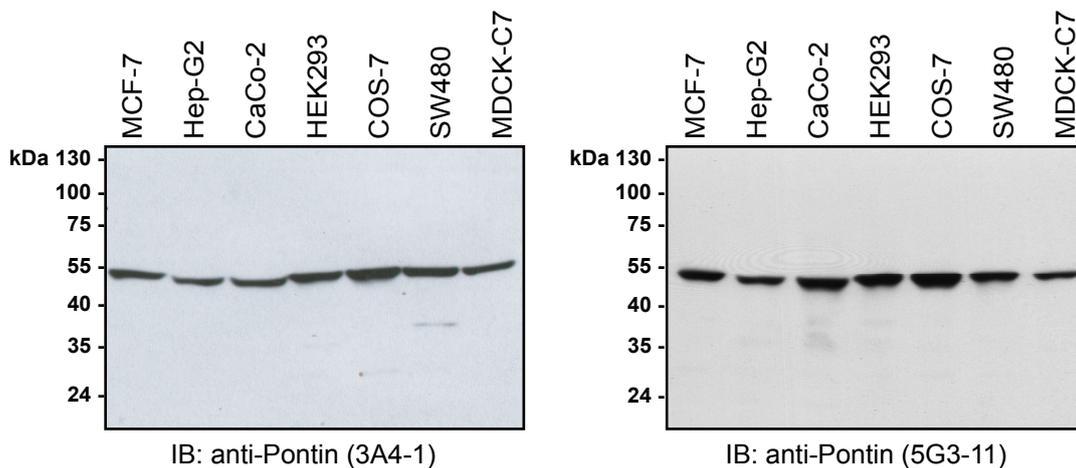


**Abb. 17:** Western-Blot Analyse von Zelllysaten mit anti-Reptin Antikörpern

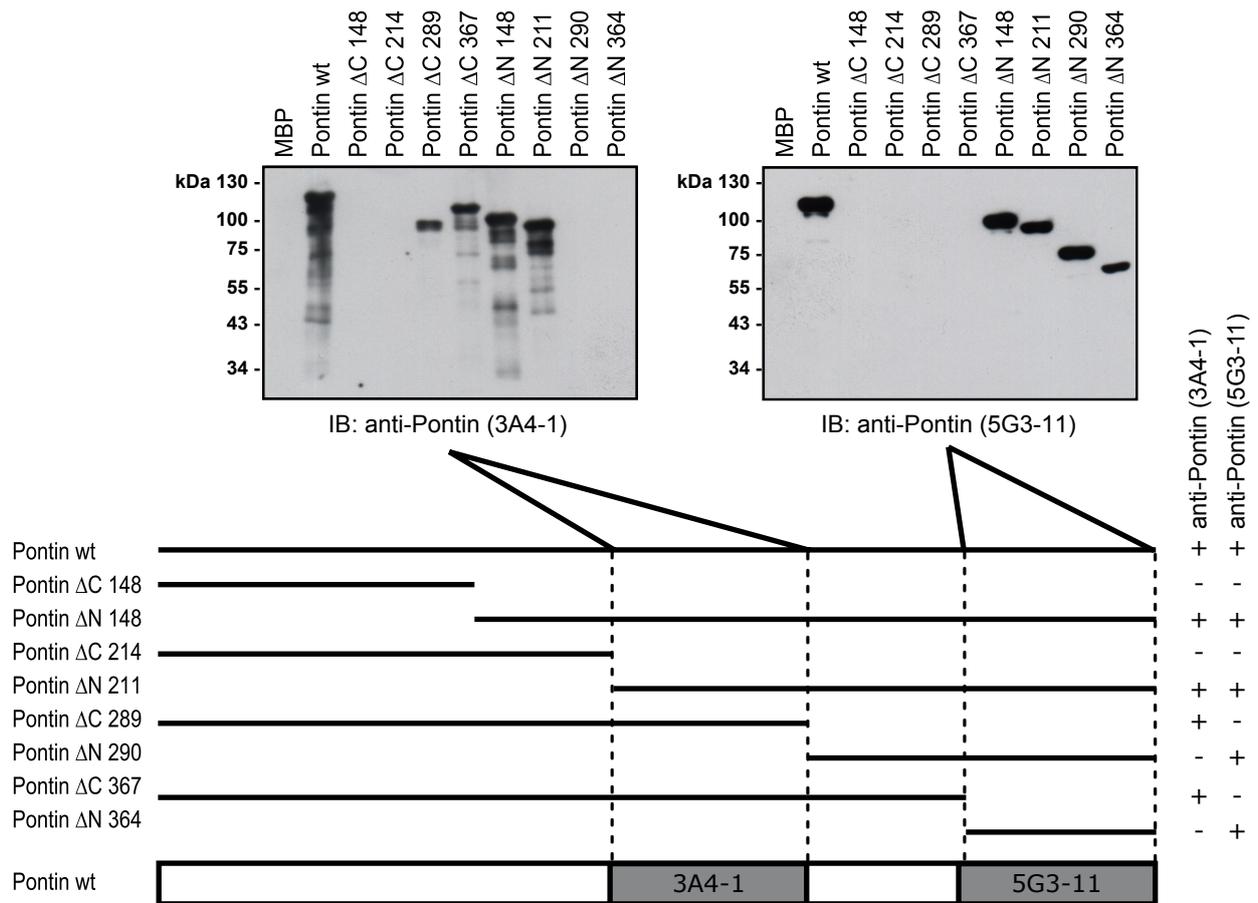
Nach Lyse mit SDS-Zellysepuffer wurden Vollzelllysate erzeugt und die chromosomale DNA durch Benzonase-Behandlung entfernt. Es wurden jeweils 75 µg durch SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend durch Tankblot auf PVDF Membranen transferiert und mit monoklonalem anti-Reptin (2E9-5) oder dem polyklonalem anti-Reptin (L12E) Antikörper und entsprechende Peroxidase-markierte Sekundäantikörper detektiert.

Da sich in den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit dem monoklonalen anti-Pontin (5G3-11) Antikörper neben der Färbung des gesamten Zellkerns eine starke punktuelle Färbung im Nukleolus zeigte, die in dieser Form in der veröffentlichten Literatur mit polyklonalen Antikörpern gegen Pontin nicht erkennbar war, sollte dieser Befund genauer untersucht werden. Um die Spezifität der Signale zu überprüfen, wurden die im Labor isolierten und bisher nur über ELISA untersuchten monoklonalen Antikörper anti-Pontin 3H3, 3A4-1 und 4E9-5, für Vergleichsuntersuchungen herangezogen. Die Hybridomaüberstände der Klone 3H3 und 4E9-5 zeigten zwar gute Resultate im Western-Blot, waren jedoch auf Grund fehlender oder unspezifischer Färbungen für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ungeeignet. Daher wurden die weiteren detaillierten Untersuchungen mit dem anti-Pontin (3A4-1) Antikörper durchgeführt. In Abb. 18 sind die Ergebnisse der Western-Blot Analyse verschiedener Zelllysate mit dem anti-Pontin (3A4-1) und (5G3-11) Antikörper gezeigt. Von beiden Antikörpern wurde nur eine dominante Bande mit einer molekularen Masse von 55 kDa erkannt. Um auszuschließen, dass beide anti-Pontin Klone dasselbe Epitop erkennen, wurde eine Kartierung der Bindungsepitope des anti-Pontin (5G3-11) und des anti-Pontin (3A4-1)

Antikörpers durchgeführt. Hierzu wurden in *E.coli* N- und C-terminale Deletionskonstrukte von Pontin als GST-Fusionsproteine exprimiert und durch Affinitätschromatographie über GSH-Agarose gereinigt. In der anschließenden Western-Blot Analyse zeigte sich, dass der anti-Pontin (3A4-1) Antikörper im Bereich der Aminosäuren 214-289 von Pontin bindet, wohingegen der anti-Pontin (5G3-11) Antikörper ein Epitop im Bereich der Aminosäuren 364-456 erkennt (Abb. 19). In anschließenden immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit beiden Antikörpern wurde ein vergleichbares Färbungsmuster beobachtet (Abb. 18). In einem Kontrollexperiment, bei dem beide Antikörper mit GST-Pontin vorinkubiert wurden, bevor sie für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet wurden, waren nukleoläre Signale nicht mehr nachweisbar. Bei Vorinkubation mit GST-Protein alleine waren die Signale jedoch noch vorhanden (Abb. 20 B). Die Beobachtung, dass beide Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie ein vergleichbares Fluoreszenzmuster zeigten, obwohl sie unterschiedliche Epitope in Pontin erkennen, spricht dafür, dass die nukleolären Signale für Pontin spezifisch sind.

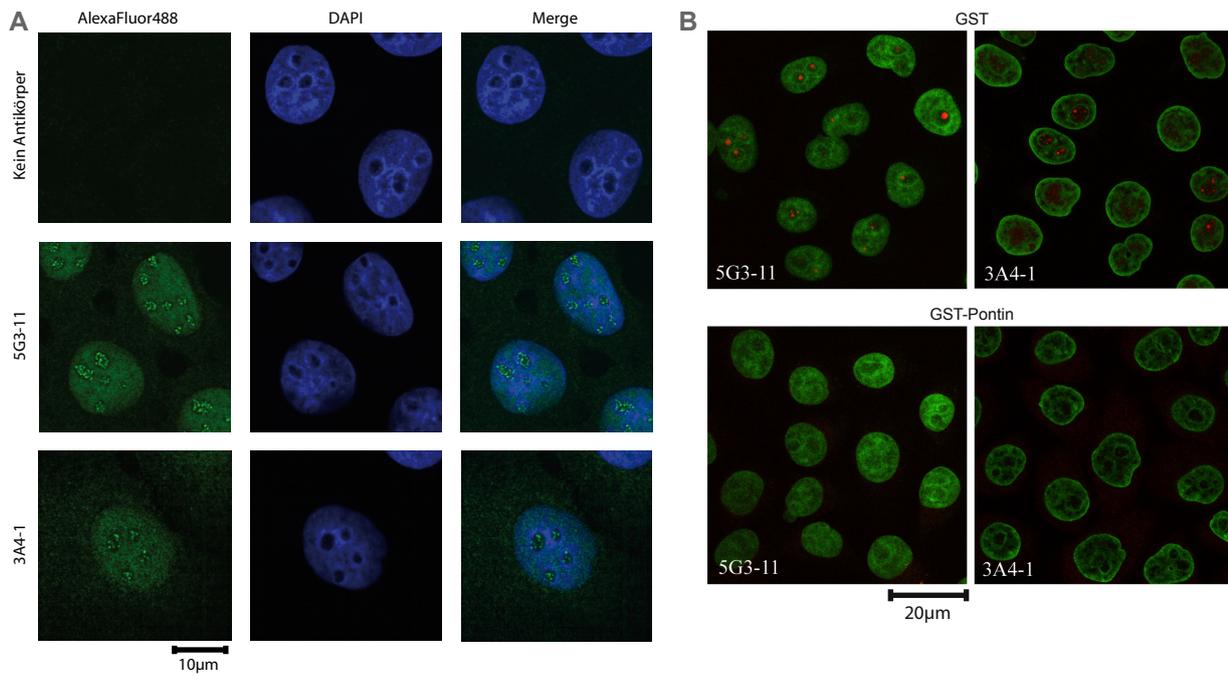


**Abb. 18:** Vergleich der monoklonalen Antikörper anti-Pontin (5G3-11) und anti-Pontin (3A4-1) Für die Untersuchungen wurden die angegebenen Zelllysate wie in Abb. 15 beschrieben verwendet. Es wurden jeweils die Affinitätsgereinigten anti-Pontin (5G3-11) (1:1000) und anti-Pontin (3A4-1) (1:1000) verwendet.



**Abb. 19:** Kartierung der Bindungsstellen des anti-Pontin (5G3-11) und des anti-Pontin (3A4-1) Antikörpers.

Nach SDS-PAGE von 2µg der angegebenen MBP-Fusionsproteine von Pontin wurden die Proteine durch Tankblot auf PVDF Membranen transferiert und mit anti-Pontin (5G3-11) oder anti-Pontin (3A4-1) Antikörper detektiert.



**Abb. 20:** Die intrazelluläre Lokalisation von endogenem Pontin in MCF-7 Zellen.

A) MCF-7-Zellen wurden mit dem monoklonalen anti-Pontin (5G3-11) und dem monoklonalen anti-Pontin (3A4-1) Antikörper gefärbt. Als Sekundär-Antikörper wurden anti-Maus AlexaFluor488-Antikörper verwendet, die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

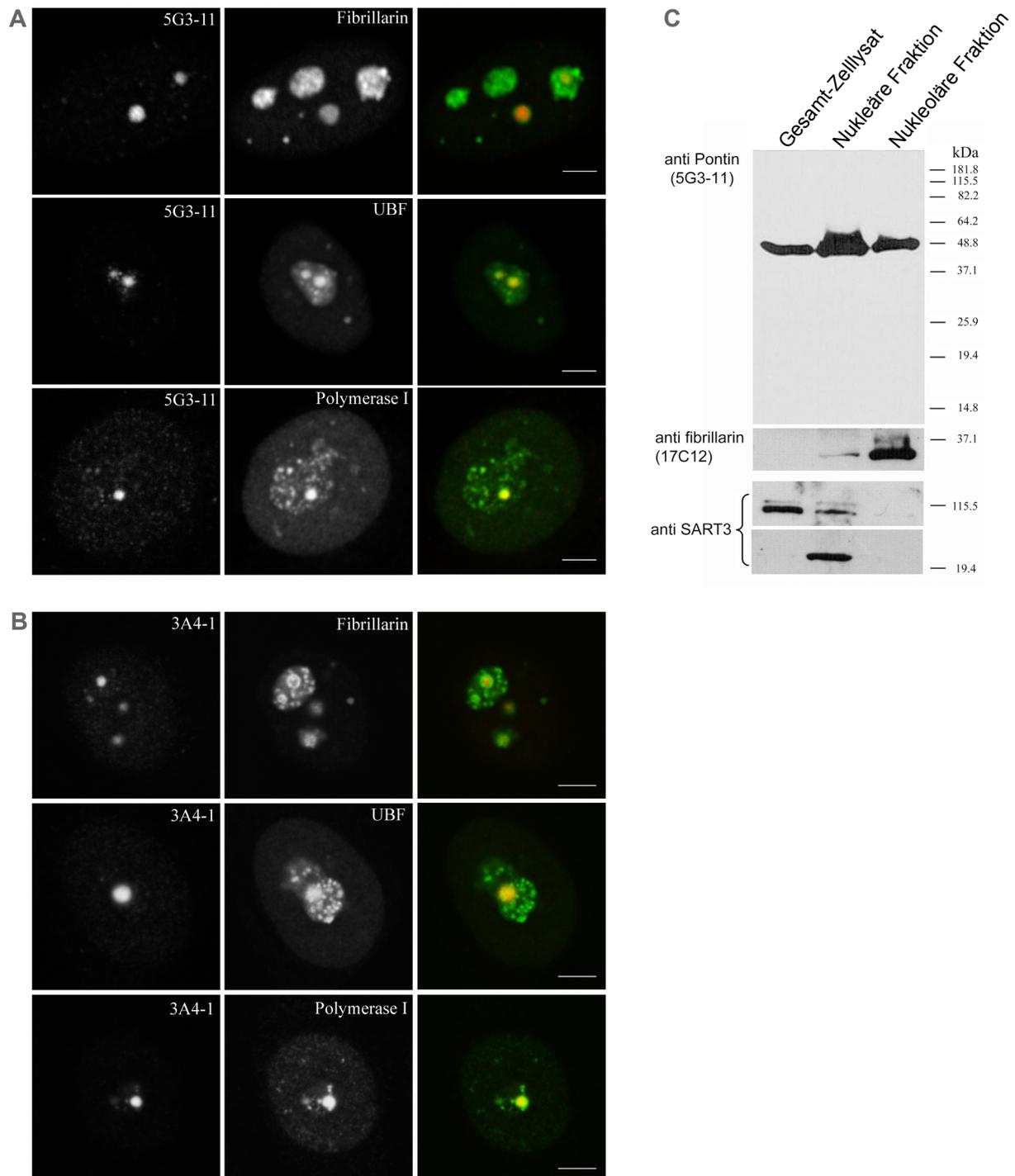
B) Nach Vorinkubation der anti-Pontin (5G3-11) und (3A4-1) Antikörper mit gereinigtem GST-Pontin verschwindet die punktförmige nukleoläre Färbung. Bei einer Vorinkubation mit GST ist dieser Effekt nicht zu beobachten.

## 4.5 Die nukleolären Funktionen von Pontin

Der Zellkern besitzt neben der Kernmembran, die ihn gegen das Zytoplasma abtrennt weitere Substrukturen, wie die Cajal-Körperchen und die Nukleoli. Diese Substrukturen des Zellkerns sind nicht durch Membranen innerhalb des Zellkerns abgetrennt, sondern zeichnen sich durch ihre besonderen Protein-, DNA- und RNA-Zusammensetzungen aus. Die am besten beschriebene Funktion des Nukleolus ist die Transkription und Reifung von ribosomaler RNA (rRNA), sowie die Assemblierung von snoRNPs (small nucleolar ribonucleoprotein particles) und ribosomalen Untereinheiten. Der Nukleolus lässt sich jedoch wiederum in weitere Bereiche unterteilen, die sich in Zusammensetzung und Funktion deutlich voneinander unterscheiden. Man unterscheidet das fibrilläre Zentrum, welches von den dichten fibrillären Komponenten und den granulären Komponenten umschlossen ist. In den fibrillären Zentren finden sich vor allem regulatorische RNPs, welche an der Regulation der Transkription beteiligt sind. Die dichten fibrillären Komponenten stellen den Ort der Synthese der rRNA dar und umschließen die fibrillären Zentren. Die granuläre Komponente umgibt andererseits die fibrilläre Komponente und besteht hauptsächlich aus fertig gereiften 28 S und 18 S rRNAs, teilweise prozessierten rRNAs und Zwischenstufen des Ribosomenaufbaus. Verschiedene an der Synthese und Reifung der rRNA beteiligten Enzyme können als Marker für verschiedene Regionen des Nukleolus dienen. So sind der UBF (upstream binding factor), welcher ein essentieller Bestandteil des Prä-Initiationskomplexes der RNA-Polymerase I ist und die RNA-Polymerase I selbst, zum Großteil in den fibrillären Zentren lokalisiert. Fibrillarin, welches durch die Katalyse der 2'-O-Methylierungen von rRNA an deren Reifung beteiligt ist, befindet sich hauptsächlich in den dichten fibrillären Komponenten.

### 4.5.1 Pontin kolokalisiert mit Fibrillarin, UBF und RNA-Polymerase I im Nukleolus

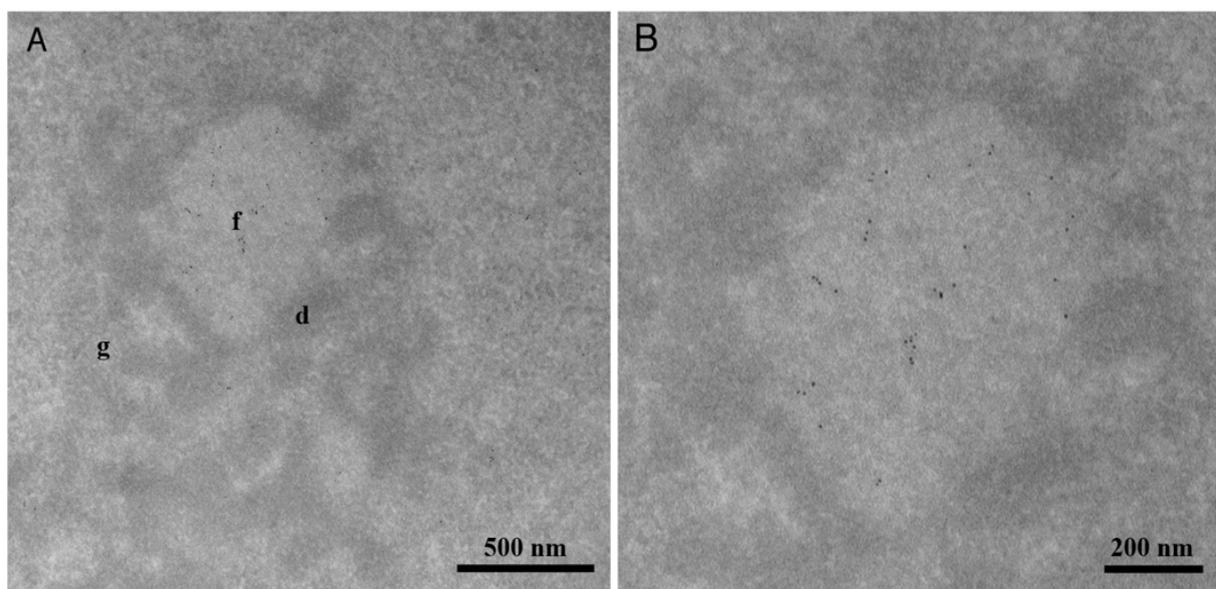
Die verschiedenen Regionen des Nukleolus sind jeweils mit deutlich unterschiedlichen Funktionen assoziiert. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von David Staněk [40] wurde die nukleoläre Lokalisation von Pontin detaillierter untersucht. Mit Hilfe der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie konnte in Doppelfärbungen mit beiden anti-Pontin Antikörpern und anti-Fibrillarin, anti-UBF oder anti-RNA-Polymerase I jeweils eine deutliche Kolokalisation von Pontin mit Fibrillarin, UBF und RNA-Polymerase I in HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21 A/B). Mit Fibrillarin überlappt die Lokalisation allerdings nur teilweise. In Zellfraktionierungsexperimenten mit HeLa-Zellen konnte Pontin im Einklang mit den als Kontrolle für eine erfolgreiche Fraktionierung untersuchten nukleolären Marker Fibrillarin und dem nukleoplasmatischen Marker SART3 im Zellkern sowie im Nukleolus nachgewiesen werden (Abb. 21 C).



**Abb. 21:** Pontin kolokalisiert mit Fibrillarin, UBF und RNA-Polymerase I im Nukleolus. Doppelfärbung von HeLa-Zellen mit den Antikörpern A) anti-Pontin (5G3-11) oder B) anti-Pontin (3A4-1) und jeweils mit anti-Fibrillarin, anti-UBF oder anti-RNA-Polymerase I. C) Western-Blot-Analyse nach Zellfraktionierung von HeLa-Zellen. Die gekennzeichneten Fraktionen wurden mit anti-Pontin (5G3-11), anti-Fibrillarin (17C12) und anti-SART3 Antikörpern gefärbt.

#### 4.5.2 Analyse der intranukleolären Lokalisation von Pontin durch Elektronenmikroskopie

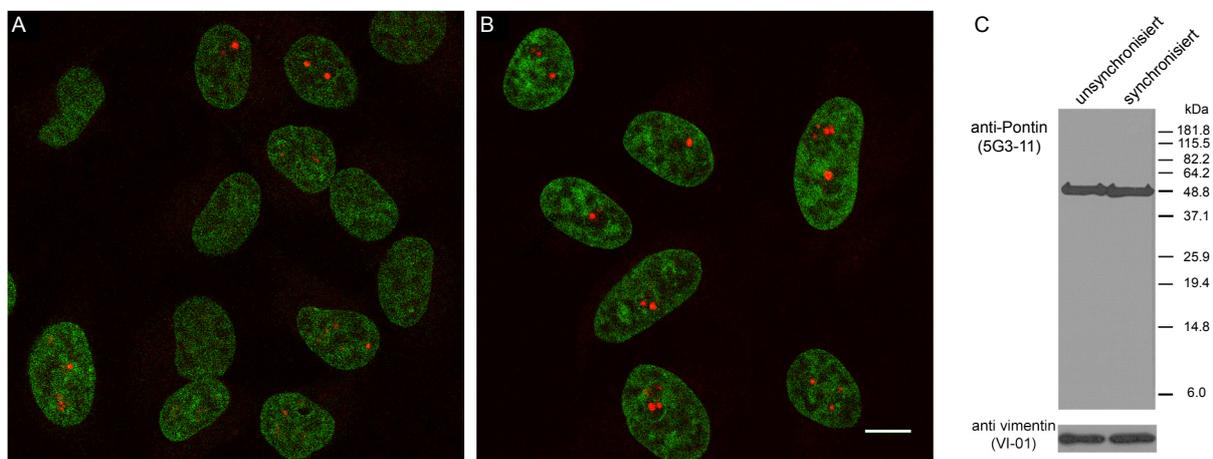
Die verschiedenen Bereiche des Nukleolus kennzeichnen sich nicht nur in ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung, sondern auch durch die Prozesse, die in ihnen ablaufen. Somit war es zur Aufklärung der Funktionen von Pontin im Nukleolus von entscheidender Bedeutung die intranukleoläre Lokalisation von Pontin aufzuklären. Auf Grund der geringen Größe des Nukleolus von nur 2 - 5  $\mu\text{m}$  war eine genauere Untersuchung der intranukleolären Lokalisation von Pontin mit den zu Verfügung stehenden lichtmikroskopischen Techniken nicht möglich, deshalb wurden hierfür elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei kamen Nano-Gold markierte Antikörper zum Einsatz, mit denen es möglich war Lokalisationen im Bereich unter 1  $\mu\text{m}$  zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen fixiert, Ultradünnschnittschnitte (5  $\mu\text{m}$ ) angefertigt und mit Nano-Gold-markiertem anti-Pontin (5G3-11) Antikörper inkubiert. Pontin lokalisiert vorwiegend in den fibrillären Zentren, jedoch kaum in den dichten fibrillären oder den granulären Komponenten des Nukleolus (Abb. 22 A/B).



**Abb. 22:** Elektronenmikroskopische Lokalisation von Pontin in den fibrillären Zentren des Nukleolus. A) Nano-Gold Markierung von Pontin in einem Nukleolus einer HeLa-Zelle. Pontin ist in den fibrillären Zentren deutlich angereichert. f: fibrilläres Zentrum; d: dichte fibrilläre Komponente; g: granuläre Komponente B) Detailbild.

### 4.5.3 Zellzyklus-abhängige Lokalisation von Pontin

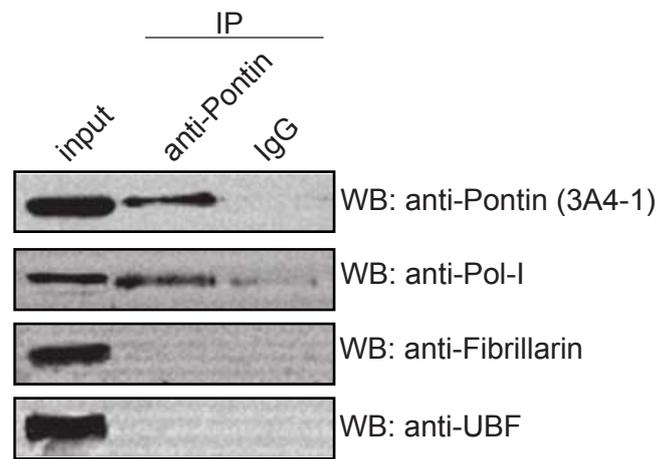
Um zu prüfen, ob die nukleoläre Lokalisation von Pontin vom Zellzyklus abhängig ist wurden HeLa-Zellen durch einen Thymidin-Block partiell synchronisiert. Eine Stunde nach der Entfernung des Thymidins befanden sich ca. 96% der Zellen in der S-Phase. Synchronisierte Zellen und nicht-synchronisierte Zellen wurden einer Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-Pontin (5G3-11) Antikörper unterzogen. Die Zahl der Zellen mit deutlicher Färbung im Nukleolus nimmt in den synchronisierten Zellen (Abb. 23 B) im Vergleich zu den nicht-synchronisierten Zellen (Abb. 23 A) deutlich zu, was auf eine nukleoläre Lokalisation von Pontin während der S-Phase schließen lässt. Im Western-Blot zeigte sich deutlich, dass sich die Menge an Pontin in der S-Phase im Vergleich zu nicht-synchronisierten Zellen nicht verändert.



**Abb. 23:** Zellzyklusabhängige Anreicherung von Pontin im Nukleolus. Immunfluoreszenzfärbung von A) nicht-synchronisierten HeLa-Zellen im Vergleich mit zu B) synchronisierten HeLa-Zellen. C) Western-Blot Analysen von Lysaten nicht-synchronisierter und synchronisierter HeLa-Zellen zeigten keine Unterschiede in der Pontin Proteinexpression. Vimentin wurde als Ladekontrolle verwendet.

### 4.5.4 Endogenes Pontin assoziiert mit RNA-Polymerase I

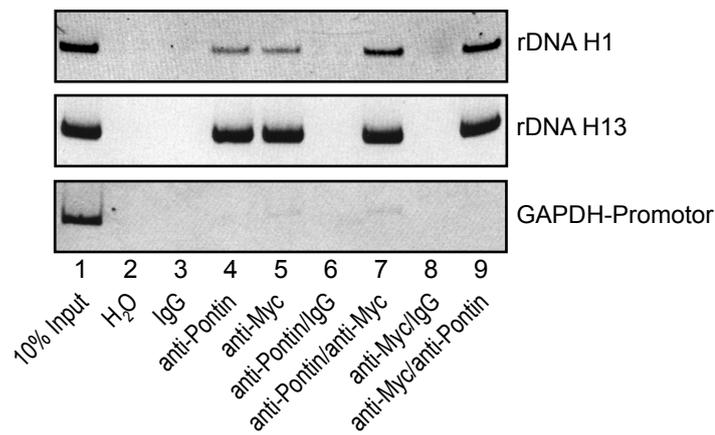
Auf Grund der Immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesenen Kolo-kalisation von Pontin mit RNA-Polymerase I, Fibrillarin und UBF in den fibrillären Zentren des Nukleolus sollte geprüft werden, ob diese Co-Lokalisation auf das Vorliegen gemeinsamer Proteinkomplexe zurückzuführen ist. Zur Analyse der Assoziation von Pontin mit Fibrillarin, UBF und RNA-Polymerase I wurden HeLa-Zellen lysiert und die endogenen Proteinkomplexe mit dem anti-Pontin (3A4-1) Antikörper oder IgG als Kontrolle präzipitiert. Nach Analyse der Präzipitate durch einen Western-Blot ließ sich nur RNA-Polymerase I in einem Komplex mit Pontin nachweisen. Für UBF und Fibrillarin dagegen konnte keine Komplexbildung mit Pontin gefunden werden (Abb.24).



**Abb. 24:** Nachweis eines endogenen Pontin RNA-Polymerase I-Komplexes in HeLa-Zelllysaten. Für die Co-Immünpräzipitation der endogenen Komplexe wurden HeLa-Zelllysate mit anti-Pontin (3A4-1) Antikörper oder Maus IgG inkubiert. Nach Präzipitation mit Protein A-Sepharose wurden die Präzipitate einem Western-Blot unterzogen und mit den gekennzeichneten Antikörpern analysiert.

#### 4.5.5 Chromatin-Immünpräzipitation zur Untersuchung der Assoziation von Pontin und c-Myc mit den rDNA-Clustern in HeLa-Zellen

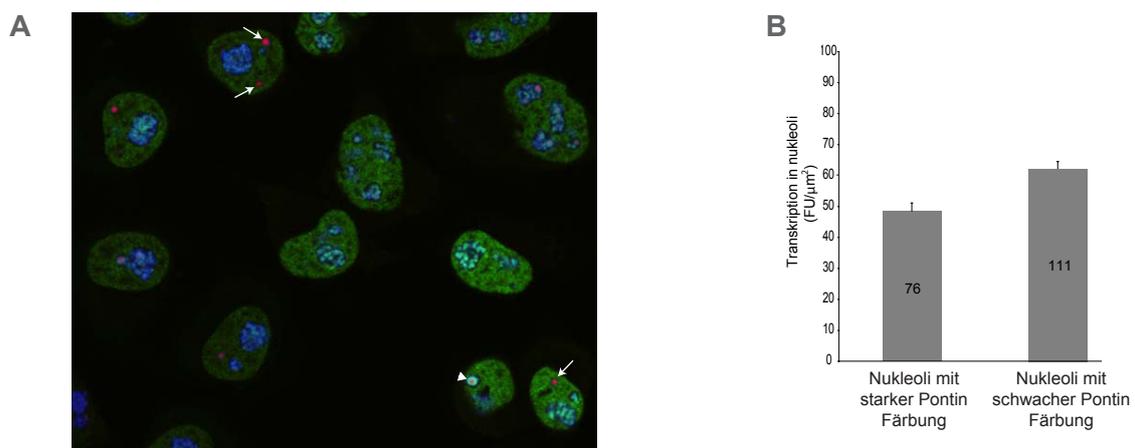
Um festzustellen, ob Pontin mit seinem bekannten Interaktionspartner c-Myc zusammen im Nukleolus an der Transkription von rRNA-Genen beteiligt ist, wurden Chromatin-Immünpräzipitationen durchgeführt. Hierfür wurden mit Antikörpern gegen Pontin und c-Myc ChIP- und Re-ChIP-Experimente durchgeführt. Die angereicherte DNA wurde anschließend durch PCR auf das Vorhandensein der H1 Initiator-, der H13 Terminator- sowie der GAPDH-Promotor-Region untersucht. Die PCR zum Nachweis der GAPDH-Promotor-Region diente dem Ausschluß einer generellen Assoziation von Pontin oder c-Myc mit Promotoren bzw. DNA. Sowohl Pontin, als auch c-Myc interagieren mit den H1 Initiator- und H13 Terminator-Bereichen der rDNA-Gene. Dabei liegen beide Proteine gleichzeitig in einem gemeinsamen Komplex vor.



**Abb. 25:** Pontin bindet zusammen mit c-Myc an cis-regulatorische Elemente der rRNA-Gene. Die ChIP und Re-ChIP-Experimente mit den anti-Pontin (5G3-11) und anti-Myc Antikörpern zeigten, dass Pontin und c-Myc sowohl an die H1 Initiator-, als auch die H13 Terminator-Regionen binden (Spur 4/5). Dabei liegen beide Proteine in einem gemeinsamen Komplex vor (Spur 7/9). In Kontrollexperimenten zeigten sich keine Bindung von Pontin und c-Myc am den Promotorbereich des GAPDH-Gens.

#### 4.5.6 Effekt von Pontin auf die nukleoläre Transkription

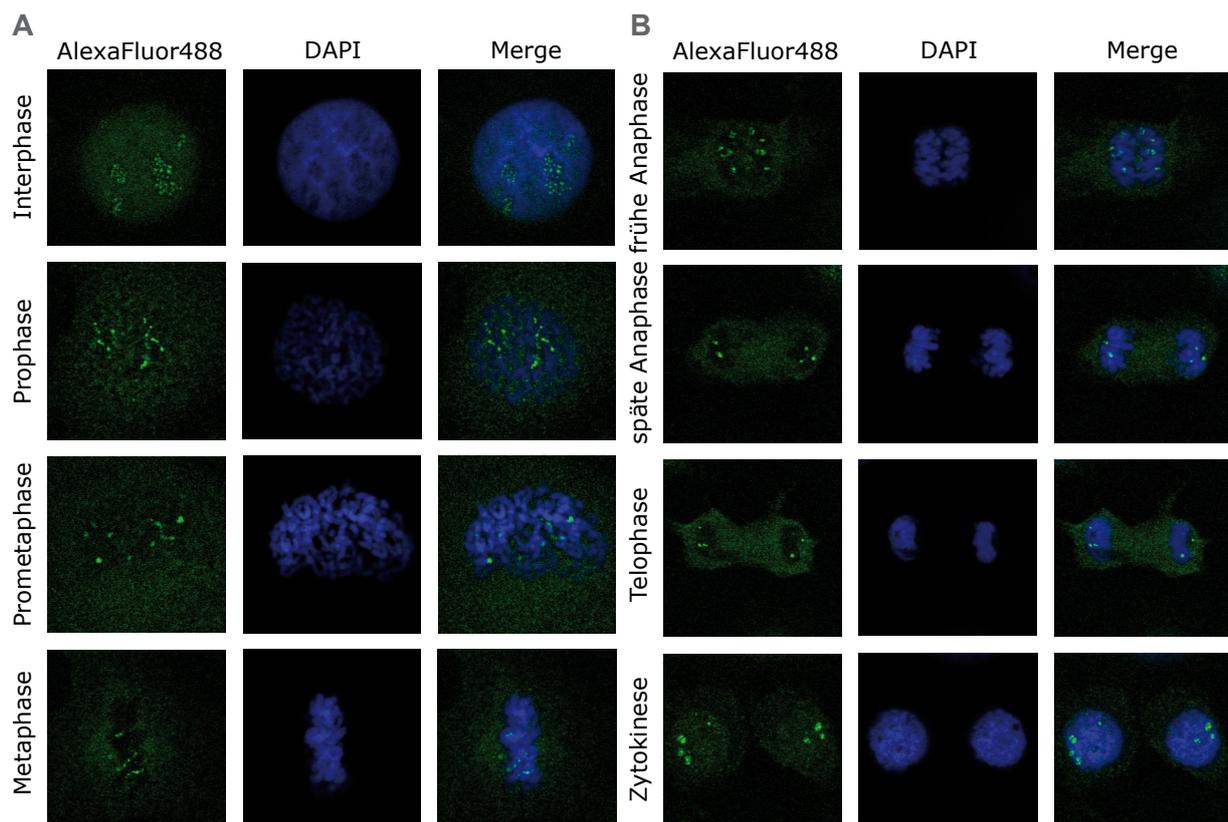
Da Pontin und c-Myc beide mit RNA-Polymerase I interagieren, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt, bei der neu synthetisierte RNA mit 5-Fluorouridine, sowie Pontin und Fibrillarin nachgewiesen wurden. Die Menge an neu gebildeter RNA in den nukleolären Bereichen mit starker Pontin Färbung war im Vergleich zu Nucleoli mit schwächerer Färbung leicht verringert (Abb. 26 A), war allerdings von einem Bereich mit neu-synthetisierter RNA umgeben. Ein Quantifizierung der Transkription (Abb. 26 B) ergab für nukleoläre Bereiche mit starkem Pontin Signal im Vergleich mit nukleolären Bereichen mit schwachem Signal eine Verringerung der Transkriptionsaktivität um etwa 20% (Abb. 26 B).



**Abb. 26:** Pontin ist an der Regulation der Transkription von rRNA-Genen beteiligt. Synchronisiert HeLa-Zellen wurden für 10 Minuten mit 5-Fluorouridin behandelt, fixiert und anschließend mit anti-BrdU Antikörper (kreuzreaktiv mit 5-Fluoruridin), anti-Pontin (5G3-11) und anti-Fibrillarin (17C12) gefärbt. In den Bereichen mit starker Pontin Färbung ist die 5-Fluoruridin Färbung im Vergleich zu schwächer gefärbten Bereichen verringert (Pfeile). Umgebende Bereiche wiesen verstärkte Signale für neu synthetisierte RNA auf (Pfeilkopf).

#### 4.5.7 Untersuchung der Lokalisation von Pontin während der Mitose

Zur Untersuchung der Lokalisation von Pontin während der Mitose wurden nicht-synchronisierte MCF-7 Zellen verwendet. Die verschiedenen Stadien der Mitose wurden anhand der allgemeinen Klassifizierung eingeordnet. Es zeigte sich bei der Färbung mit dem anti-Pontin (5G3-11) Antikörper, dass Pontin während der Mitose mit einigen räumlich begrenzten Bereichen der kondensierten Chromosomen assoziiert bleibt. Diese Lokalisation scheint jedoch nicht alle Chromosomen/Chromatiden zu betreffen, da die Zahl dieser punktuell gefärbten Bereiche bei ca. 10 lag. Beim Übergang aus der Interphase in die Prophase lösen sich der Zellkern und die Nukleoli auf, die punktuelle Färbung der Chromosomen blieb jedoch mit beginnender Kondensierung erhalten. Die Signale an einigen Chromosomen sind in der Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase weiter erkennbar. Mit der Bildung von neuen Nukleoli während der Zytokinese treten wieder die punktförmigen Signale in den Nukleoli auf. Anschließend nahm diese Lokalisation bis zu erneuten Steigerung in der S-Phase wieder ab (Abb. 27).



**Abb. 27:** Lokalisation von Pontin während der Mitose.

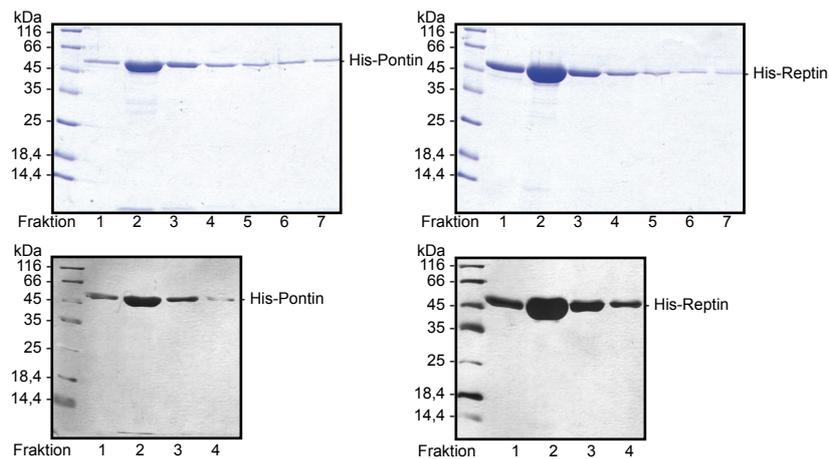
MCF-7 Zellen wurden mit dem monoklonalen anti-Pontin (5G3-11) Antikörper gefärbt. Als Sekundär-Antikörper wurden anti-Maus AlexaFluor488 verwendet, die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Die Aufnahmen wurden an einem konfokalen Laserscanningmikroskop LSM510 bei den Wellenlängen 488nm und 405nm aufgenommen. Die optische Schichtdicke betrug 80µm. A: Aufnahmen der Stadien: Interphase, Prophase, Prometaphase und Metaphase. B: Aufnahme der Stadien: frühe Anaphase, späte Anaphase, Telophase und Zytokinese

## 4.6 Analyse der Struktur von Pontin/Reptin Komplexen

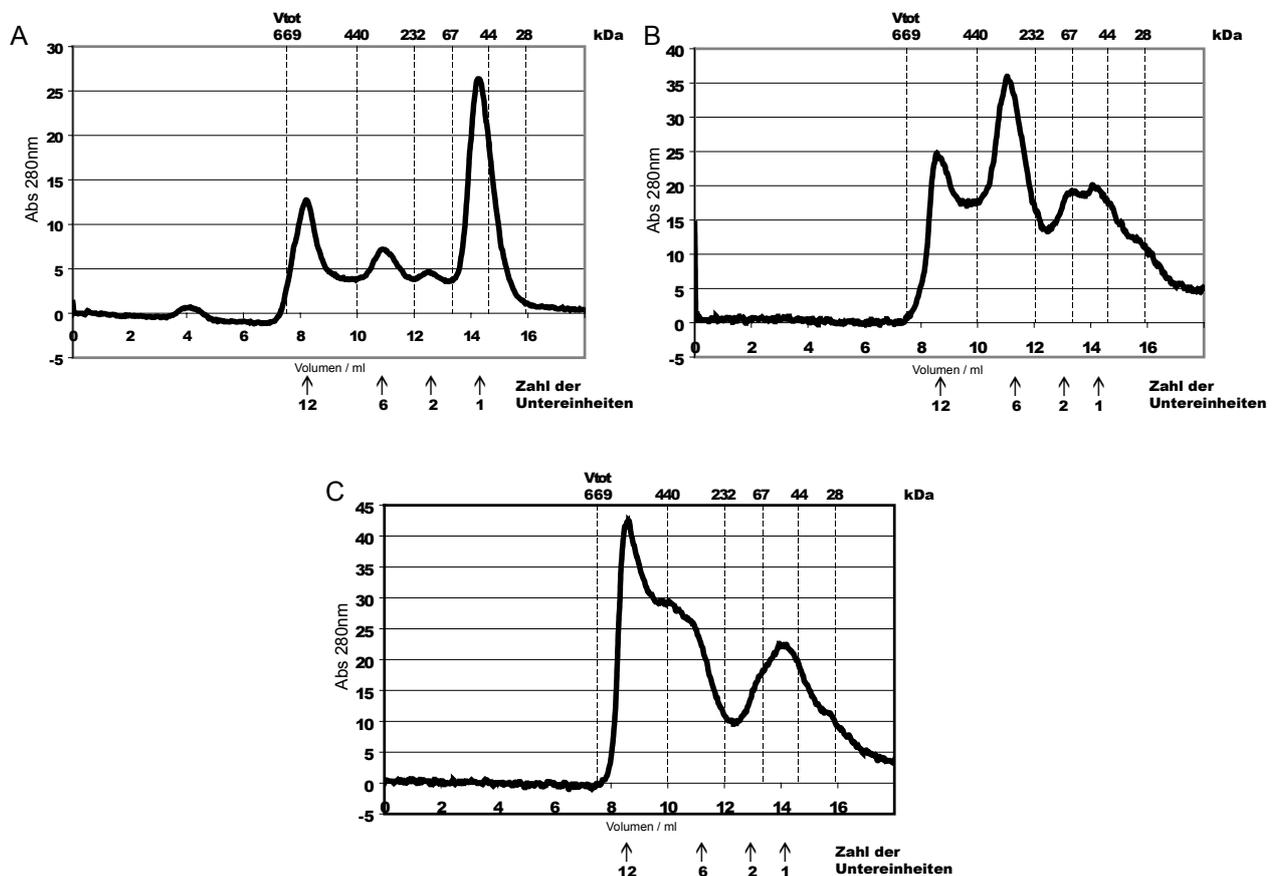
Die Untersuchung der Primärstruktur von Pontin und Reptin zeigte auf Grund der Ähnlichkeiten zu bakterieller RuvB, dass es sich bei beiden Proteinen ebenfalls um AAA<sup>+</sup>-ATPasen handelt. Für RuvB konnte bereits gezeigt werden, dass es sich in seiner aktiven Form zu hexameren Ringen assoziiert. Für Pontin und Reptin waren derartige Informationen zu Beginn der Arbeiten jedoch weitgehend unbekannt. Deshalb sollten Pontin und Reptin in *E. coli* exprimiert, affinitätsgereinigt, zu Komplexen assembliert und anschließend sollte durch Kryoelektronenmikroskopie und Kristallographie die Struktur aufgeklärt werden. Im Folgenden werden auszugsweise die Arbeiten beschrieben, die zu dieser Fragestellung durchgeführt wurden.

### 4.6.1 Expression und Reinigung von His<sub>6</sub>-Pontin und His<sub>6</sub>-Reptin

Um Pontin und Reptin mit guter Ausbeute und Reinheit zu erhalten wurden ihre cDNAs in das pQE40 Plasmid kloniert, wodurch die Proteine N-terminal mit einer Sequenz aus 6 Histidin-Resten versehen wurden. Beide Proteine wurden in *E. coli* M15 [pRep4] exprimiert. Nach Ultraschalllyse wurden die gewonnenen Lysate einer Affinitätschromatographie über Nickel-NTA-Agarose (Nickel nitrilotriacetic acid) unterzogen. Auf diese Weise konnten beide Proteine mit einem hohen Reinheitsgrad erhalten werden (Abb. 28). Um die molekulare Masse der Proteine bzw. der Proteinkomplexe und damit deren Stoichiometrie zu ermitteln, wurden die so gereinigten Proteine einer Gelfiltration auf einer Superdex 200 Säule unterzogen. Sowohl für Pontin, also auch für Reptin konnten hochmolekulare Komplexe nachgewiesen werden, die einem Dodecamer und einem Hexamer entsprachen. In beiden Proben fanden sich jedoch auch immer tri-, di- und monomere Formen der Proteine. Bei Pontin war das Signal für das Monomer stets größer als bei Reptin (Abb. 29 A/B). Durch Mischung von Pontin und Reptin direkt nach der Reinigung ergab sich ein ähnliches Bild, wobei im Bereich von Dodecamer zu Hexamer eine Vielzahl von Zwischenstufen auftrat (Abb. 29 C). Es zeigte sich jedoch, dass Reptin während der anschließenden Dialyse nicht in Lösung blieb, sondern präzipitierte. Alle Versuche, gegen andere Puffer zu dialysieren, unterschiedliche Konzentrationen von ATP oder ADP zuzugeben, oder das Protein über PD10 Säule sofort umzupuffern, führten jedoch nicht zu einer längerfristigen Stabilisierung von Reptin.



**Abb. 28:** Fraktionen von His<sub>6</sub>-Pontin und His<sub>6</sub>-Reptin nach Nickel-Affinitätschromatographie. SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen von His<sub>6</sub>-Pontin und His<sub>6</sub>-Reptin A) nach Färbung mit Coomassie Blue R250 und B) nach Silberfärbung.

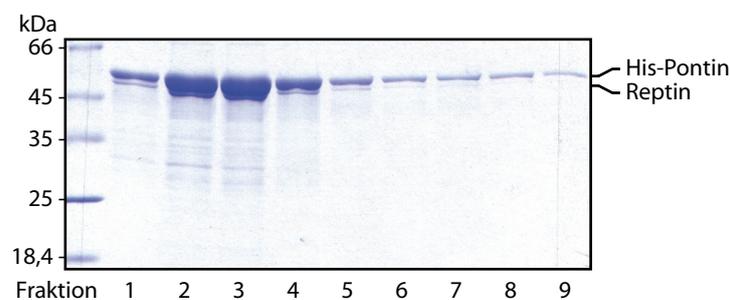


**Abb 29:** Gelfiltration von His<sub>6</sub>-Pontin und His<sub>6</sub>-Reptin.

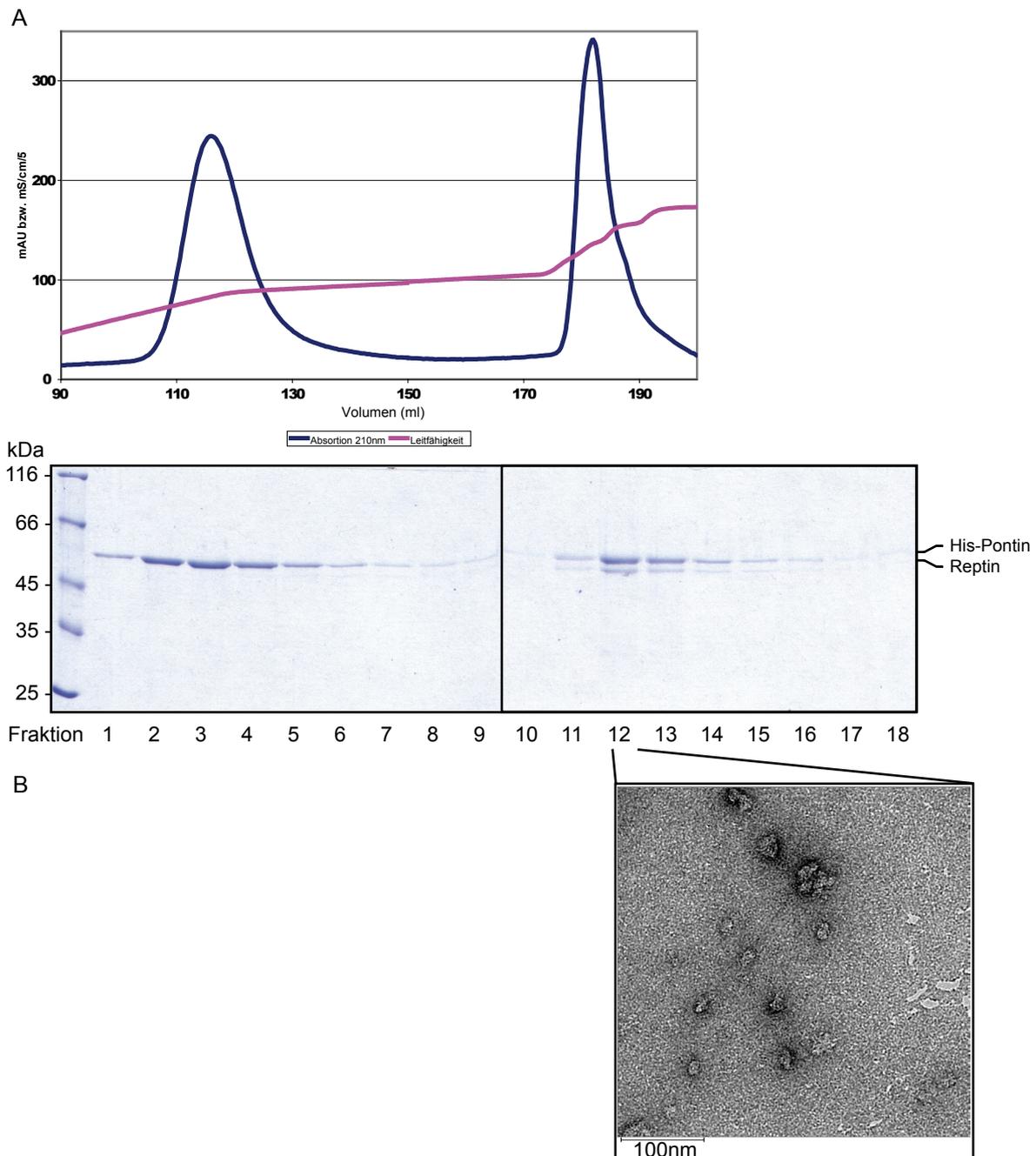
Elutionsprofile von (A) His<sub>6</sub>-Pontin, (B) His<sub>6</sub>-Reptin und (C) einem 1:1 Gemisch von His<sub>6</sub>-Pontin und His<sub>6</sub>-Reptin nach Gelfiltration auf einer Superdex 200 Säule mit einem ÄKTA-Explorer FPLC System. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde die Protein Thyreoglobulin (669 kDa), Ferretin (440 kDa), Catalase (232 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Carboanhydrase (28 kDa) verwendet.

#### 4.6.2 Co-Expression von Pontin und Reptin mit dem pET-Duet-1 System

Da die getrennte Expression von Pontin und Reptin nicht zur Ausbildung von stabilen Proteinkomplexen geführt hatte, die für nachfolgende Analysen notwendig gewesen wären, wurden die cDNAs von Pontin und Reptin in das pET-Duet-1 Plasmid kloniert. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression von zwei Proteinen aus einer polycistronischen mRNA. Hierdurch sollte eine Stabilisierung und bessere Ausbildung der gewünschten Pontin/Reptin Komplexe begünstigt werden. Die Expression der Proteine wurde in *E.coli* M15 [pRep4] durchgeführt, diese mittels French-Press aufgeschlossen und die erhaltenen Lysate einer Affinitätschromatographie auf einer Nickel-NTA-Agarose Säule (Nickel nitrilotriacetic acid) unterzogen. Bei der Affinitätschromatographie von His<sub>6</sub>-Pontin/Reptin (Reptin ohne His<sub>6</sub>-Tag) wurden beide Proteine in einem Verhältnis von ca. 6:1 erhalten und waren über längere Zeit in Lösung stabil (Abb. 30). Bei einer nachfolgenden Anionenaustauschchromatographie über Q-Sepharose konnte His<sub>6</sub>-Pontin vom His<sub>6</sub>-Pontin/Reptin Komplex abgetrennt werden und Komplexe mit einer Stoichiometrie von ca. 3:1 erhalten werden, welcher ebenfalls für längere Zeit stabil in Lösung blieb (Abb. 31 A). Im Anschluss wurden in Zusammenarbeit mit Thorsten Mielke (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen der Pontin/Reptin-Komplexe angefertigt. Die His<sub>6</sub>-Pontin/Reptin-Komplexe wurden mittels Uranylacetat Negativ-Färbung mit TEM (Transmissionselektronenmikroskopie) untersucht. Hierbei ergab sich jedoch eine relativ unregelmäßige Verteilung der Partikel mit einem großen Anteil an Aggregaten (Abb. 31 B).



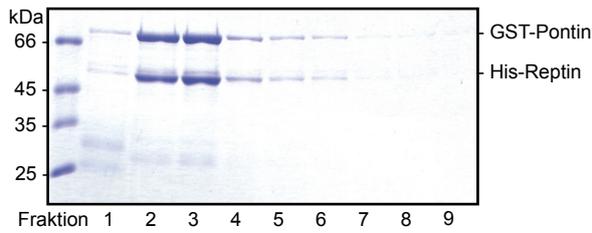
**Abb. 30:** Expression von His<sub>6</sub>-Pontin/Reptin mit dem pET-Duet-1 Plasmid. SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen von His<sub>6</sub>-Pontin/Reptin nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Färbung mit Coomassie Blue R250



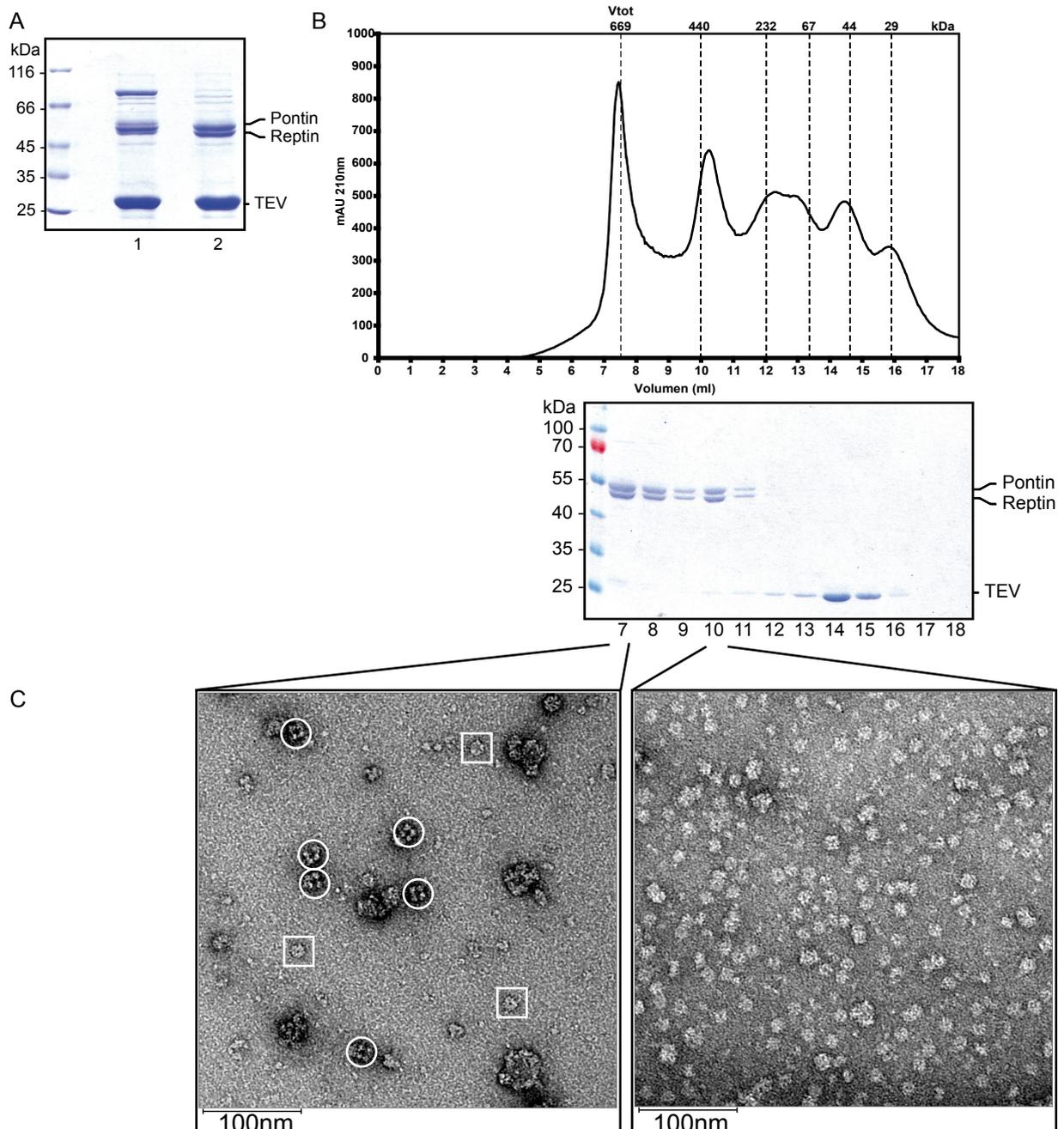
**Abb. 31:** A) Anionen-Austauschchromatographie von His<sub>6</sub>-Pontin/Reptin-Komplexen mit Q-Sepharose. Fraktionen 1-5 von Abb. 28 wurden gepoolt und auf eine Q-Sepharose-Säule geladen. Die gesammelten Fraktionen wurden einer SDS-PAGE unterzogen und die Gele anschließend mit Coomassie-Blue R250 gefärbt. B) Ergebnis einer TEM Negativ-Färbung der erhaltenen Protein-Komplexe. Fraktion 12 (Abb. 30 A) wurde auf einer Kohlenstoffträgerschicht mit Uranylacetat negativ Färbung analysiert. Gezeigt ist eine Aufnahme dieser Präparation mit 28.500 facher Vergrößerung.

#### 4.6.3 Co-Expression von Pontin und Reptin mit dem pQLink-System

Da die Koexpression von His<sub>6</sub>-Pontin und Reptin nicht zur Ausbildung von einheitlichen Proteinkomplexen geführt hatte, wurden Pontin und Reptin in verschiedene pQLink Plasmide kloniert. Diese Plasmide ermöglichen die Erzeugung von Plasmiden mit mehreren Expressionskassetten von verschiedenen Proteinen, von denen jeweils eine eigene mRNA transkribiert werden. Durch LIC (ligation independent cloning) können im pQLink-System Expressionkassetten mit His<sub>6</sub>-Tag (pQLinkH), GST-Tag (pQLinkG) und ohne Tag (pQLinkN) kombiniert werden. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist die Tatsache, dass sowohl der His<sub>6</sub>-, als auch der GST-Tag einen Linker mit TEV-Protease-Schnittstelle enthalten (tobacco etch virus), welche sich nach der Reinigung mit der TEV-Protease abspalten lassen. Die Co-Expression von His<sub>6</sub>-Reptin und GST-Pontin wurde in *E.coli* M15 [pRep4] durchgeführt. Nach Lyse der Bakterien mit einer French-Press und einer Affinitätschromatographie der zentrifugierten Lysate mit einer Nickel-NTA-Superflow-Sepharose (Nickel nitrilotriacetic acid) wurden His<sub>6</sub>-Reptin und GST-Pontin in einem Verhältnis von ca. 1:1 erhalten und waren über lange Zeit in Lösung stabil (Abb. 32). Die nachfolgende Abspaltung der His<sub>6</sub>- und GST-Tags mit TEV-Protease erfolgte annähernd vollständig (Abb. 33 A). Die TEV-Protease, die His<sub>6</sub>- und GST-Spaltprodukte konnten von den Pontin/Reptin Komplexen in einer Superdex 200 Säule abgetrennt werden und Komplexe mit einer 1:1 Stoichiometrie erhalten werden, welche ebenfalls für lange Zeit stabil in Lösung blieben (Abb. 33 B). Bei der Gelfiltration mit der Superdex 200 Säule ergaben sich Komplexe mit Molekulargewichten korrespondierend mit Dodecamer- (Fraktion 7) und Hexamer- (Fraktion 10) Konfiguration mit einem Verhältnis von 1:1 von Pontin zu Reptin (Abb. 33 B). Die Pontin/Reptin-Komplexe wurden mittels Uranylacetat negativ-Färbung mit TEM untersucht (Abb. 33 C). In Fraktion 7 mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 660 kDa wurden hauptsächlich zwei verschiedene Formen von Proteinpartikeln beobachtet (Kreise oder Viereck). In Fraktion 10 wurden mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 310 kD fast nur eine Form von Proteinpartikeln beobachtet. Beide analysierten Fraktionen hatten eine Population immer gleich strukturierter Partikel. Hierbei ergab sich eine sehr regelmäßige Verteilung der Partikel mit geringem Anteil an Aggregaten (Abb. 33 C). Von diesen Fraktionen wurden Proben für die Verarbeitung in der Kryo-Elektronenmikroskopie erzeugt. Es kam jedoch auf Grund der Publikation der kryo-elektronenmikroskopischen Struktur des Pontin/Reptin Dodecamers aus der Hefe durch Torreira et al [18] nicht zu einer weiteren Bearbeitung dieser Proben, da die menschlichen Proteine eine sehr starke Ähnlichkeit zu den Proteinen der Hefe aufweisen.



**Abb. 32:** Expression von His<sub>6</sub>-Reptin/GST-Pontin mit einem pQLink Plasmid. SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen von His<sub>6</sub>-Pontin/Reptin nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Färbung mit Coomassie Blue R250.



**Abb. 33:** Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie  
 A) Kontrolle der Abspaltung der GST- und His<sub>6</sub>-Tags von Pontin und Reptin durch die TEV-Protease. SDS-PAGE von Proben des Verdau zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Blue R250. Spur 1 Zeitpunkt t = 0 h, Spur 2 Zeitpunkt t = 24 h. B) Gelfiltration der Pontin/Reptin-Komplexe. Nach dem TEV-Verdau wurden 150 µl Reaktionsansatzes auf eine Superdex 200 Säule aufgetragen und 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen 7-18 wurden in einer SDS-PAGE analysiert. D) TEM Bilder von Uranylacetat Negativ-Färbung der Fraktionen 7 und 10.

## 5. Diskussion

Pontin und Reptin sind als Vertreter der Tip49-Familie der AAA+-ATPasen an der Modulation einer erstaunlichen Vielzahl von Prozessen in der Zelle beteiligt. In welcher Art und Weise sie ihre Wirkungen ausüben ist bisher weitgehend unklar. Neben einer Funktion bei der Reparatur von DNA-Schädigungen [84,85] sind beide Proteine am korrekten Aufbau des Spindelapparates beteiligt [24,26]. Des Weiteren sind Pontin und Reptin essentiell für die Reifung und Assemblierung verschiedener kleiner nukleolärer Ribonukleoproteinpartikel (snoRNPs) wie Box H/ACA snoRNPs, Box C/D snoRNPs [28,30,86,87] und des enzymatisch aktiven Telomerase RNP Komplexes [34]. Außerdem sind sie essentielle Komponenten der Tip60, hINO80, SRCAP und Uri1/Prefoldin Chromatin-Remodelling-Komplexe und steuern so die Transkription verschiedenster Zielgene [7]. Wichtig ist zudem, dass Pontin und Reptin mit einer Reihe onkogener Faktoren interagieren und deren Aktivität modulieren [45]. Zu nennen sind hier der bedeutende onkogene Faktor  $\beta$ -Catenin, der bei 95% aller Kolonkarzinome ursächlich an der Kanzerogenese beteiligt ist und dessen Aktivität durch Pontin potenziert und durch Reptin reprimiert wird [45]. Ein weiterer Anhaltspunkt für eine direkte Beteiligung bei der Transformation von Zellen ergibt sich aus der Interaktion von Pontin und Reptin mit c-Myc [88] und TBP [10], welche an der Hochregulation der Transkription von rRNA und tRNA durch die RNA-Polymerasen I und III in Tumoren beteiligt sind [89]. Interessanter Weise ist c-Myc entscheidend an der Regulation der Expression von Pontin und Reptin durch RNA-Polymerase II beteiligt [38]. In verschiedenen Tumorgeweben wurden für Pontin und Reptin erhöhte Expressionsraten nachgewiesen, was eine Beteiligung beider Proteine an onkogenen Prozessen unterstreicht [90,91]. Auf Grund der Funktionen von Pontin und Reptin bei Assemblierung von Protein/DNA und Protein/RNA-Komplexen gibt es vermutlich noch eine Vielzahl bisher nicht identifizierter Interaktionspartner. Des Weiteren ist bisher nicht sicher geklärt, welche Rolle die ATPase-Aktivität dieser außergewöhnlichen Proteinfamilie tatsächlich innehat. So ist die in der Literatur beschriebene Helikase-Aktivität [12,13] beider Proteine umstritten, da die publizierten Ergebnisse von keiner anderen Arbeitsgruppe reproduziert werden konnten [11,21,45]. Dass die ATPase-Aktivität essentiell ist, konnte durch Arbeiten mit enzymatisch inaktiven Varianten von Pontin und Reptin gezeigt werden, die Aminosäureaustausche in den Walker A und B Motiven aufwiesen. Diese Varianten verloren ihre Funktionen in verschiedenen zellulären Zusammenhängen, wie Apoptose oder Verankerungs-unabhängiges Wachstum [39,44].

## 5.1 Das Tumorsuppressorprotein Fhit als neuer Interaktionspartner von Pontin und Reptin

In dieser Arbeit konnte erstmals eine direkte Interaktion von Fhit mit Pontin und Reptin nachgewiesen werden. Für die Proteine LEF-1,  $\alpha$ -Catenin, Plakoglobin und dem zytoplasmatischen Teil von E-Cadherin konnte dagegen keine direkte Interaktion mit Fhit nachgewiesen werden. Da Pontin und Reptin mit jeweils verschiedenen Aminosäurebereichen bzw. Domänen an ihre bekannten Interaktionspartner wie Hint1 [46],  $\beta$ -Catenin [10,22], c-Myc [38], TERT und Dyskerin [34] binden, wurden die Bindungsstellen von Fhit in Pontin und Reptin ermittelt. Dies war in sofern von Bedeutung, da verschiedene Interaktionspartner von Pontin und Reptin, wie Hint1, um die Interaktion mit bestimmten Aminosäurebereichen konkurrieren und dies zur Regulation der biologischen Eigenschaften von Pontin und Reptin beitragen könnte. Bei der Kartierung der Bindungsstellen von Fhit in Pontin und in Reptin zeigte sich, dass diese Interaktionen im Bereich der Aminosäuren 67-148 in Pontin und 1-147 in Reptin erfolgt. Für diese Bereiche von Pontin und Reptin sind jedoch keine Bindungen der bisher bekannten Interaktionspartner beschrieben. Die von Fhit gebundenen Bereiche enthalten jedoch die für die ATPase-Aktivität notwendigen Walker A Motive sowohl bei Pontin, als auch bei Reptin. Des Weiteren enthält der von Fhit gebundene Bereich Teile der Domäne II, welche bei Pontin für die Bindung von dsDNA und dsRNA sowie ssDNA und ssRNA notwendig sind [11,14]. Im Fall von Reptin ist die Funktion des von Fhit gebundenen Bereichs nicht abschließend geklärt, da bei Untersuchungen der Domäne II von Reptin keine Interaktionen mit Nukleinsäuren nachgewiesen werden konnten [14]. Da der Bindungsbereich von Reptin und Pontin Teile der Domäne II enthält, erscheint es denkbar, dass Fhit die Multimerisierung von Pontin und Reptin beeinflusst. Bei der Strukturaufklärung mittels Kryo-Elektronenmikroskopie durch Torreira et al. [18] zeigte sich, dass die Domäne II sich im Widerspruch zur Kristallstruktur von Matias et al. [11] auf die Basis des benachbarten Rings im Dodecamer „umklappt“ und somit entscheidend an der Multimerisierung von Pontin und Reptin beteiligt sein könnte. Somit ist es durchaus vorstellbar, dass Fhit durch eine Modulation der Multimerisierung von Pontin und Reptin einen Einfluss auf deren Funktionen bzw. Aktivitäten ausüben könnte.

Um zu untersuchen, ob Pontin und Reptin und Fhit in gemeinsamen zellulären Komplexen vorliegen, wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei konnten Komplexe von Fhit mit Pontin und Reptin nachgewiesen werden. Die Interaktionen von Fhit mit Pontin und Reptin sind deshalb von besonderem Interesse, da Pontin und Reptin mit  $\beta$ -Catenin interagieren und an der Regulation der  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4 vermittelten Transkription beteiligt sind [10,22,42,44]. Fhit bindet ebenfalls an  $\beta$ -Catenin und ist als Repressor der  $\beta$ -Catenin Transkriptionsaktivität beschrieben [60]. Neben der Repression der  $\beta$ -Catenin Transkriptionsaktivität konnte zudem gezeigt werden, dass Fhit im Zusammenspiel mit  $\beta$ -Catenin das Verankerungs-unabhängige

Wachstum (Anchorage-independence) von Zellen hemmt [60]. Das Verankerungs-unabhängige Wachstum ist ein klarer Marker für transformierte Zellen, da „normale“ Zellen sich nicht mehr teilen, wenn sie vereinzelt in Agar-Medium kultiviert werden, Tumorzellen hingegen wachsen zu Kolonien heran [92].

## **5.2 Fhit moduliert die Wirkung von Pontin und Reptin auf die $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-vermittelte Transkription**

Da die in dieser Arbeit zunächst beschriebenen Interaktionen von Fhit mit Pontin und Reptin bisher noch keinen Aufschluss über die Wirkung von Fhit auf die Funktionen von Pontin und Reptin ermöglichten, wurden mögliche Effekte von Fhit und Pontin oder Reptin auf die  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-vermittelte Transkription untersucht. Ausgehend von früheren Befunden unserer Arbeitsgruppe, die für Fhit und Reptin eine hemmende und für Pontin eine aktivierende Wirkung auf der  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4 vermittelte Transkription zeigten [10,60], wurden Reporteranalysen mit Reporterkonstrukten von  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-Zielgenen durchgeführt. Hierfür wurden das Topflash/Fopflash und das Siamois S5/S0 Reportersystem verwendet. Es zeigte sich, dass Fhit der aktivierenden Wirkung von Pontin auf die  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-vermittelte Transkription entgegenwirkt. Selbst größere Mengen von Fhit waren nicht in der Lage, die starke, aktivierende Wirkung von Pontin zu vollständig zu unterdrücken. Durch Reptin kam es durch die Kombination mit Fhit zu einer wesentlich stärkeren Hemmung der  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-vermittelten Transkription, als durch Reptin oder Fhit alleine. Durch die Transfektion größerer Mengen beider Proteine kam es zu einer fast vollständigen Repression der  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-vermittelten Transkription. Da Pontin und Reptin durch die direkte Interaktion mit dem basalen Transkriptionsfaktor TBP eng mit der Transkription verbunden sind [10,22] und außerdem essentielle Komponenten des Tip60 Histon-Acetyltransferase Komplexes sind [21] ist es möglich, dass Fhit seine hemmenden Effekte auf die  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-vermittelte Transkription durch die Modulationen derartiger Komplexe ausübt.

## **5.3 Pontin, Reptin und Fhit liegen im Nukleus vor und binden an die Promotor-Regionen von Wnt-Zielgenen**

Durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie an verschiedenen Zelllinien wurde die intrazelluläre Lokalisation von Pontin, Reptin und Fhit mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Bei gleichzeitiger Detektion von Pontin und Fhit zeigte sich für diese Proteine eine Co-Lokalisation im Zellkern. Fhit war im Gegensatz zu Pontin sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern detektierbar. Innerhalb des Zellkerns zeigte sich für Pontin jedoch zusätzlich eine weitere, bisher nicht beschriebene, starke punktuelle Färbung in den Nukleoli. Bei der

Untersuchung der Lokalisation von Reptin und Fhit zeigte sich in verschiedenen Zelllinien eine nukleäre Co-Lokalisation im Zellkern. Reptin zeigte hierbei neben der nukleären Lokalisation eine schwache zytoplasmatische Färbung. Alle Färbungen wurden in MCF-7-, HEK293- und COS-7-Zellen durchgeführt und ergaben vergleichbare Resultate.

Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Fhit zusammen mit  $\beta$ -Catenin an cis-Elemente in Promotorbereichen von Wnt-Zielgenen gebunden ist [60]. Durch ChIP und Re-ChIP Experimente konnte durch die hier vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass Fhit zusammen mit Pontin, Reptin und  $\beta$ -Catenin an die Promotorbereiche der Wnt-Zielgene CyclinD1 und MMP-14 in MCF-7 Zellen binden kann.

#### **5.4 Das Tumorsuppressorprotein Fhit interagiert mit dem Chromatin-Remodelling-Faktor Tip60**

Auf Grund der in dieser Arbeit nachgewiesenen Interaktionen von Fhit mit Pontin und Reptin wurden weitere Versuche unternommen die Bedeutung dieser Interaktionen aufzuklären. In diesem Zusammenhang war von Interesse, ob Fhit mit Pontin und Reptin möglicherweise an Chromatin-Remodelling-Prozessen beteiligt ist. Wegen der früher beschriebenen Assoziation von Pontin und Reptin mit dem Tip60 Histon-Acetyltransferase-Komplex [21] wurde untersucht, ob es einen gemeinsamen Komplex von Fhit und Tip60 gibt. In Co-Immunpräzipitationen zeigte sich, dass Fhit in Hek293 Zellen in einem Komplex mit Tip60 vorliegt. Dabei stellte sich heraus, dass Fhit im Komplex mit Pontin, Reptin und Tip60 vorliegt. Dies ergab sich aus der Beobachtung, dass bei gleichzeitiger Überexpression von Pontin oder Reptin, Fhit und Tip60 in einer nachfolgenden Immunpräzipitation von Tip60 Pontin oder Reptin und Fhit co-präzipitiert werden konnten. Da Fhit jedoch auch über Pontin und Reptin in diese Komplexe rekrutiert werden könnte, war es zusätzlich wichtig zu untersuchen, ob es auch eine direkte Interaktion zwischen Fhit und Tip60 gibt. In *in vitro*-Assoziationsassays mit GST- und MBP-Fusionsproteinen von Tip60 und Fhit konnte dies bestätigt werden. Diese Befunde deuten auf einen möglichen regulatorischen Mechanismus hin, der in ähnlicher Form für Pontin, Reptin, Tip60 und  $\beta$ -Catenin auch schon im Kontext der Regulation des Metastasierungssuppressorgens KAI-1 (CD82 bzw. KAI-1: Kangai 1) gefunden wurde [42,93,94]. Dort kommt es durch einen Komplex aus Pontin und Tip60 zur Aktivierung der Transkription von KAI-1, wohingegen ein Komplex aus Reptin und  $\beta$ -Catenin dessen Transkription hemmt.

Möglicherweise verhält es sich im Kontext der  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-vermittelten Transkription ganz ähnlich. Hinweise hierfür ergeben sich aus der direkten Interaktion von Fhit mit Pontin, Reptin, Tip60 und  $\beta$ -Catenin. Allerdings kann aus den bisher gewonnenen Ergebnissen noch kein Mechanismus der Regulation abgeleitet werden. Es erscheint jedoch wahrscheinlich, dass Fhit die Zusammensetzung und Anordnung seiner Interaktionspartner in der Art moduliert,

dass es zu einer Hemmung  $\beta$ -Catenin/LEF-1/TCF4-vermittelten Transkription kommt. Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse erweitern die Zahl der bekannten Interaktionspartner von Fhit um Pontin, Reptin und Tip60 und tragen somit neue Aspekte zur Entschlüsselung der Rolle von Fhit als Tumorsuppressorprotein bei. Die bereits als Tumorsuppressor beschriebene Histon-Acetyltransferase Tip60 [95] ist zusammen mit Pontin und Reptin an der Regulation einer Vielzahl von Zielgenen beteiligt. Durch die direkte Assoziation kann Fhit somit an der Regulation der Aktivität des Tip60-Komplexes beteiligt sein. Da sowohl Tip60, als auch Pontin mit c-Myc interagieren [40,88,96] muss auch eine Beteiligung von Fhit an der Regulation der Aktivität dieses Proto-Onkogens in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden.

### 5.5 Pontin lokalisiert in den fibrillären Zentren des Nukleolus

In den vorangegangenen Arbeiten zu Fhit wurde bei der Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Pontin mit dem monoklonalen Maus anti-Pontin (5G3-11) Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie eine punktförmige Färbung der Nukleoli detektiert. Eine derartige Färbung wurde für Pontin in bisherigen Veröffentlichungen, die die intrazelluläre Lokalisationen von Pontin untersucht hatten, nicht nachgewiesen [22-24,26,34,97]. Dies ist vermutlich auf die Verwendung anderer Antikörper, Fixierungs- und Permeabilisierungsbedingungen zurückzuführen.

Da die Färbung des Nukleolus zuerst nur mit dem monoklonalen anti-Pontin (5G3-11) Antikörper gezeigt werden konnte, musste sichergestellt werden, dass es sich dabei nicht um eine unspezifische Färbung handelte. Deshalb wurden 4 verschiedene bisher nicht weiter charakterisierte Hybridomaüberstände getestet. Alle getesteten Antikörper zeigten spezifische Färbungen von Pontin im Western-Blot von Zelllysaten, es war jedoch nur der anti-Pontin (3A4-1) Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie geeignet. Der Anti-Pontin (3A4-1) Antikörper zeigte in verschiedenen Zelllinien ein vergleichbares Färbungsmuster wie der anti-Pontin (5G3-11) Antikörper. Um sicherzustellen, dass die anti-Pontin (5G3-11) und anti-Pontin (3A4-1) Antikörper unterschiedliche Epitope in Pontin erkennen, wurden die Bindungsstellen dieser Antikörper mit Hilfe von rekombinant exprimierten Pontin Deletionskonstrukten kartiert. Hierbei zeigte sich, dass der anti-Pontin (5G3-11) Antikörper im Bereich der Aminosäuren 364-456 und der anti-Pontin (3A4-1) Antikörper im Bereich der Aminosäuren 214-289 bindet. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass beide Antikörper unterschiedliche Epitope in Pontin erkennen. Dies bestätigte die Spezifität der beobachteten Färbemuster.

Als zusätzliche Kontrolle wurden HeLa Zellen nach Vorinkubation beider Antikörper mit GST oder GST-Pontin einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Hierbei zeigte sich, dass die mit GST-Pontin inkubierten Antikörper keine nukleoläre Färbung mehr aufwiesen, was ein weiterer Beleg für die Spezifität dieser Färbung ist. In Zellfraktionierungsexperimenten konnte

Pontin zudem in isolierten Nukleoli nachgewiesen werden.

Ein weiterer Befund der sich bei den Untersuchungen der intrazellulären Lokalisation von Pontin ergab, war, dass sich bei der Immunfluoreszenzmikroskopie nur in einem Teil der Zellen eine starke nukleoläre Färbung für Pontin nachweisen ließ. Durch vorausgegangene Thymidin Behandlung wurden HeLa-Zellen partiell synchronisiert. Bei den Untersuchungen mit den partiell synchronisierten Zellen konnte gezeigt werden, dass die nukleoläre Färbung von Pontin während der S-Phase in allen Zellen ihr Maximum erreichte. Für diese unterschiedliche nukleoläre Lokalisation von Pontin im Nukleolus konnte eine Änderung der Proteinmenge durch Analyse des Gehalts an Pontin in Zelllysaten von synchronisierten und nicht synchronisierten Zellen ausgeschlossen werden.

Da sich die Nukleoli in drei funktionell und strukturell unterschiedliche Regionen einteilen lassen, war es zur Klärung der Funktion von Pontin von großer Bedeutung die intra-nukleoläre Lokalisation von Pontin aufzuklären. Deshalb wurden zur genaueren nukleolären Lokalisation Doppelfärbungen mit den nukleolären Markerproteinen Fibrillarin, UBF (Upstream-binding factor) und RNA-Poylmerase I zusammen mit den anti-Pontin (5G3-11) oder anti-Pontin (3A4-1) Antikörpern durchgeführt. Hierbei dienten UBF und RNA-Polymerase I als Markerproteine für die fibrillären Zentren und Fibrillarin als Marker für die dichten fibrillären Komponenten. Hierbei zeigte sich, dass Pontin einerseits mit UBF und RNA-Polymerase I, andererseits aber nur sehr schwach mit Fibrillarin co-lokalisierte. Dies war ein erster Hinweis auf die spezifische Lokalisation von Pontin innerhalb des Nukleolus, da UBF und RNA-Polymerase I hauptsächlich in dessen fibrillären Zentren lokalisiert sind. Allerdings ist die Auflösung der Lichtmikroskopie nicht vollständig ausreichend, um die intranukleoläre Lokalisation sicher aufzuklären [98,99]. Deshalb wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Nano-Gold markiertem anti-Pontin (5G3-11) Antikörper durchgeführt. Hierbei bestätigte sich, dass Pontin fast ausschließlich in den fibrillären Zentren der Nukleoli, jedoch nicht in den dichten fibrillären Komponenten oder den granulären Komponenten nachweisbar war.

Dies war ein wichtiger Hinweis auf die Prozesse, an denen Pontin im Nukleolus beteiligt sein könnte. So konnte für die fibrillären Zentren gezeigt werden, dass hier vorwiegend die rRNA Gen-Cluster, die RNA-Polymerase I, der Klasse I Transkriptionsfaktor UBF und die Topoisomerase I lokalisiert sind [27,100,101]. Diese Proteine sind dort entscheidend an der Ausbildung der Prä-Initiationskomplexe für die Transkription der rRNA Gene beteiligt. Die Transkription der rRNA wiederum läuft im Grenzbereich zwischen den fibrillären Zentren und den dichten fibrillären Komponenten bzw. in den fibrillären Komponenten selber ab [102]. Somit ist die Lokalisation von Pontin in den fibrillären Zentren ein Indiz dafür, dass Pontin an der Ausbildung von Prä-Initiationskomplexen an den Promotoren der rRNA-Gene beteiligt sein könnte. Diese Annahme wurde zusätzlich durch den Nachweis der Assoziation von Pontin mit RNA-Polymerase I, durch Co-Immunpräzipitationen aus HeLa-Zelllysaten unterstützt. Zusätzliche

ChIP und Re-ChIP Experimente zeigten, dass Pontin in einem gemeinsamen Komplex mit c-Myc sowohl an Initiator-, als auch an Terminator-Bereiche der rRNA-Gen-Cluster gebunden war. Für eine regulatorische Rolle Pontins bei der Transkription der rRNA sprechen außerdem die Befunde, dass Pontin ein direkter Interaktionspartner und Co-Aktivatoren sowohl von c-Myc als auch dem RNA-Polymerase I assoziierten Protein Rpb5 ist, welche beide als Regulatoren der RNA-Polymerase I Aktivität beschrieben wurden [38,88,103,104].

Die fibrillären Zentren sind zwar als Ort der Initiation der Transkription beschrieben, die Synthese der RNA läuft allerdings hauptsächlich in den dichten fibrillären Komponenten ab. Diese Beobachtung bestätigte sich auch durch Färbung von 5-Fluoruracil markierten HeLa-Zellen mit anti-BrdU, anti-Pontin und anti-Fibrillarin Antikörpern. Einerseits konnte in den Bereichen mit starker Pontin-Färbung eine deutlich reduzierte Menge an neu synthetisierter RNA nachgewiesen werden, andererseits waren diese Regionen von neu synthetisierter RNA umgeben. Diese Beobachtung deutet auf eine Zellzyklus-abhängigen Rolle von Pontin bei der Ausbildung von Prä-Initiationskomplexen in den transkriptionell inaktiven fibrillären Zentren hin. Die vermutete Beteiligung von Pontin an nukleolären Prozessen wurde von intensiven Analysen des nukleolären Proteoms abgeleitet und konnten in dieser Arbeit somit bestätigt werden [105].

Neben der stärksten Akkumulation von Pontin in den Nukleoli während der S-Phase konnte über Immunfluoreszenzmikroskopie eine Assoziation von Pontin mit Abschnitten der chromosomalen DNA während der gesamten Zellteilung beobachtet werden. Diese Färbung von punktuellen Bereichen der chromosomalen DNA lag während allen Phasen der Mitose vor. So konnte diese Färbung während der Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase bis hin zu Telophase beobachtet werden und mündete schließlich in einer diffusen Färbung der während der Zytokinese neu entstehenden Nukleoli. Diese Beobachtungen zeigen erstmals eine Assoziation von Pontin mit den kondensierten Chromosomen während der Mitose. Die von Pontin gebundenen Bereiche könnten den NORs (nucleolar organizer regions) entsprechen, was wiederum einer Funktion von Pontin bei der Ausbildung neuer Nukleoli nach der Zellteilung nahe legt. In Experimenten, in denen eine sehr starke Verminderung von Pontin durch siRNA ausgelöst wurde, zeigte sich jedoch keine fehlerhafte Ausbildung von Nukleoli, da sich bereits in der Prophase polyzentrische Mitose-Spindeln ausbildeten und somit keine erfolgreiche Zellteilung mehr möglich war, wodurch es zu einem Absterben der Zellen kam [26]. Mit den von uns entwickelten Antikörpern war es nun erstmals möglich, eine Assoziation von Pontin mit den kondensierten Chromosomen während der Mitose zu detektieren.

## 5.6 Pontin und Reptin bilden hetero-hexamere und hetero-dodecamere Komplexe

Die Aufklärung der Struktur und Stoichiometrie der hochmolekularen Komplexe von Pontin und Reptin ist trotz einer Reihe von Publikationen nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt bzw. umstritten [11,14-18,106]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, aufzuklären, ob Pontin und Reptin hetero- oder homohexamere Komplexe ausbilden und ob diese sich zu Dodecameren zusammenlagern. Hierfür wurden Pontin und Reptin in *E.coli* exprimiert, mit dem Ziel beide Proteine im Anschluss an die Reinigung *in vitro* zu Komplexen zu assemblieren. Dieser Versuch war jedoch nicht erfolgreich, da Reptin im Gegensatz zu Pontin in gereinigter Form in sehr kurzer Zeit präzipitierte. Um eine bessere Stabilisierung von Reptin zu erreichen, wurden Pontin und Reptin in *E.coli* mit Hilfe des pET-Duet-1 Plasmids exprimiert, welches für eine polycistronische mRNA codiert. Auf diese Weise ließen sich sehr stabile Proteinkomplexe reinigen, welche bei der Analyse mittels Größenausschluss-Chromatographie eine Größe von ca. 660 kDa aufwiesen. Diese Komplexe hatten jedoch eine Stoichiometrie von ca. 1:6 und nicht wie erwartet 1:1. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung dieser Proben zeigte sich zudem, dass die Proteinkomplexe sehr uneinheitlich und somit für eine weitere Verwendung in der Kryo-Elektronenmikroskopie ungeeignet waren. Eine weitere Reinigung der Proteinkomplexe über Ionenaustausch-Chromatographie ergab, dass das Proteingemisch neben Pontin/Reptin-Heteromeren noch Pontin-Homomere enthielt. Dies war ein weiterer Grund, weshalb diese Proteinkomplexe nicht für den Einsatz in der Kryo-Elektronenmikroskopie geeignet waren. Der Versuch diese Pontin/Reptin-Gemische zu kristallisieren führte ebenfalls zu keinem brauchbaren Ergebnis. Deshalb wurde als ein weiteres Expressionssystem das pQLink-System verwendet [107]. Mit diesen Plasmiden war es möglich, über Ligation-independent-Cloning verschiedene Expressionskassetten in einem Plasmid zusammenzuführen und eine Co-Expression in *E.coli* durchzuführen. Hierbei wurden verschiedene Kombinationen von His<sub>6</sub>- und GST-Fusionproteinen getestet, wobei sich die Kombination His<sub>6</sub>-Reptin/GST-Pontin als am besten geeignet herausstellte, da sich große Mengen eines Proteinkomplexes von hoher Reinheit mit einer proportionskonstanten Stoichiometrie von 1:1 exprimieren ließ, der eine langfristige Stabilität zeigt. Durch den Verdau mit der TEV-Protease konnten die Fusionspartner vollständig abgespalten werden, ohne die Stabilität oder Stoichiometrie der Proteinkomplexe negativ zu beeinflussen. Bei der Analyse mittels Größenausschluss-Chromatographie zeigte sich, dass in den Proteingemischen sowohl Hexamere, wie auch Dodecamere enthalten waren, welche sich jedoch sehr gut trennen ließen. In der anschließenden elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigte sich ein sehr einheitliches Muster der Partikel. Diese Proben sollten im Anschluss nun einer Kryo-Elektronenmikroskopie unterzogen werden. Das Projekt wurde allerdings frühzeitig beendet, da es zwischenzeitlich zur Veröffentlichung der Kryo-Elektronenmikroskopischen Struktur

durch Torreira et al [18] gekommen war. In dieser Veröffentlichung wurden zwar die homologen Proteine aus der Hefe verwendet, doch auf Grund der starken evolutionären Konservierung sind zwischen dem humanen Pontin bzw. Reptin und den Hefeproteinen Rvb1 bzw. Rvb2 sehr große Ähnlichkeiten zu vermuten. In der Arbeit von Torreira et al. konnten jedoch die Fragen nach der Zusammensetzung der einzelnen Ringe im Dodecamer nicht mit abschließender Sicherheit geklärt werden, da die Auflösung der Kryo-Elektronenmikroskopie offenbar nicht der Klärung dieser Fragestellung gereicht wird. Auch weitere Versuche mit diesen Pontin/Reptin Komplexen Kristalle zu erzeugen blieben bisher ohne Erfolg.

**Zusammenfassung:**

Pontin und Reptin sind die beiden einzigen Vertreter der hochkonservierten Tip49-Subfamilie der AAA<sup>+</sup>-ATPasen in Eukaryoten. Sie zeichnen sich durch ihre besondere Domänenstruktur und ihre essentielle Beteiligung an einer Vielzahl biologischer Prozesse aus. So sind Pontin und Reptin an der Assemblierung von snoRNPs und der Telomerase beteiligt. Zusätzlich sind beide Proteine essentielle Bestandteile verschiedener Chromatin-Remodelling-Komplexe. Durch die Regulation der Transkription verschiedener potentiell onkogener Faktoren, wie  $\beta$ -Catenin und c-Myc, sind Pontin und Reptin entscheidend an Prozessen der humanen Kanzerogenese beteiligt.

In dieser Arbeit wurde das Tumorsuppressorprotein Fhit als neuer direkter Interaktionspartner von Pontin und Reptin identifiziert. Dabei konnte die Bindung von Fhit im Bereich der Aminosäuren 67-148 von Pontin und 1-147 von Reptin kartiert werden. Diese Bereiche binden keine bisher bekannten direkten Interaktionspartner von Pontin und Reptin, wie zum Beispiel  $\beta$ -Catenin, Hint1 oder c-Myc. Die Analysen der Effekte von Pontin oder Reptin und Fhit auf  $\beta$ -Catenin-aktivierbare Reportergene zeigten, dass Pontin die reprimierende Wirkung von Fhit einschränkte, Reptin diese jedoch verstärkte. Durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie konnte eine Co-Lokalisation von Pontin, Reptin und Fhit im Nukleus verschiedener Zelllinien nachgewiesen werden. Durch ChIP und Re-ChIP Analysen konnte die Bildung gemeinsamer Komplexe von Pontin, Reptin oder  $\beta$ -Catenin und Fhit an Promotorbereiche der Wnt-Zielgene CyclinD1 und MMP-14 nachgewiesen werden.

Da diese Befunde eine Beteiligung von Fhit an Prozessen des Chromatin-Remodelling nahe legten, wurde mit Hilfe von Immunpräzipitationen nachgewiesen, dass Fhit, Pontin und Reptin in gemeinsamen Komplexen mit der Histon-Acetyltransferase Tip60 vorliegen. Weitere Interaktionsassays mit gereinigten, rekombinanten Proteinen zeigten, dass Fhit und Tip60 direkt miteinander interagieren. Diese Befunde deuten auf eine neue Funktion von Fhit im Tip60-Chromatin-Remodelling-Komplex hin.

Bei den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Pontin konnte neben der nukleären auch eine punktuelle Färbung im Nukleolus nachgewiesen werden. Bei der weiteren Untersuchung dieser Befunde konnte für Pontin gezeigt werden, dass es Zellzyklus-abhängig im Nukleolus akkumuliert, dort in gemeinsamen Komplexen mit RNA-Polymerase I in den fibrillären Zentren vorliegt und zusammen mit c-Myc an regulatorische Elemente der chromosomalen DNA in den rRNA-Gen-Clustern bindet. Die Befunde deuten darauf hin, dass Pontin als wichtiger Co-Aktivator von c-Myc und RNA-Polymerase I an der Regulation der rRNA-Synthese beteiligt ist.

## Summary

Pontin and Reptin are the two only representatives of the Tip49 subfamily of AAA<sup>+</sup>-ATPases in eukaryotes. They are characterized by their unique domain structure and by their essential participation in a multitude of biological processes. Pontin and Reptin participate in the assembly of snoRNPs and telomerase. In addition, they are both essential components of several chromatin-remodelling-complexes. Through their regulation of different oncogenic factors like  $\beta$ -Catenin und c-Myc, Pontin and Reptin are critically involved in processes of human cancerogenesis.

In this thesis the tumour suppressor protein Fhit was identified as a novel direct interaction partner of Pontin and Reptin. The binding site of Fhit in Pontin and Reptin was mapped to amino acids 67-148 and 1-147, respectively. These sequences are not bound by any known interaction partner like  $\beta$ -Catenin, Hint1 or c-Myc. Pontin or Reptin and Fhit affect  $\beta$ -catenin/LEF-1/TCF4-mediated- reporter gene activity. Pontin reduced the repressive effects of Fhit, whereas Reptin potentiated them. Imaging with confocal-immunofluorescence microscopy revealed a co-localisation of Pontin or Reptin and Fhit in the nucleus of different cell lines. ChIP and Re-ChIP experiments revealed common complexes of Fhit and Pontin, Reptin or  $\beta$ -Catenin bound to promoter elements of the known Wnt target genes Cyclin D1 and MMP-14.

Since these findings pointed to an involvement of Fhit in chromatin-remodelling processes, co-immunoprecipitation experiments were performed showing that Fhit, Pontin and Reptin form a complex with the histone-acetyltransferase Tip60. In pull-down experiments with recombinant proteins a direct interaction between Fhit and Tip60 was detected. These discoveries suggest a new function of Fhit in chromatin-remodelling complexes.

Using monoclonal antibodies developed in our laboratory, Pontin was detected in dot like structures in the nucleolus in immunofluorescence microscopy. More detailed investigations revealed that Pontin accumulates in a cell-cycle dependent manner in the nucleolus, where it forms complexes with RNA-Polymerase I in the fibrillar centers and binds to regulatory elements in the chromosomal DNA of rRNA-gene clusters in combination with c-Myc. Since nucleoli with strong Pontin staining showed a clear reduction of newly synthesized RNA it is reasonable to assume that Pontin is a positive regulator of rRNA transcription and that sequestration of Pontin to transcriptionally inactive fibrillar centers might represent a regulatory mechanism of rRNA transcription during the cell cycle.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, & Koonin EV (1999) AAA+: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. *Genome Research* 9:27-43.
2. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, & Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1:945-951.
3. Putnam CD, Clancy SB, Tsuruta H, Gonzalez S, Wetmur JG, & Tainer JA (2001) Structure and mechanism of the RuvB Holliday junction branch migration motor. *J Mol Biol* 311(2):297-310.
4. Martin A, Baker TA, & Sauer ST (2005) Rebuilt AAA+ motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* 437:1115-1120.
5. Hishida T, Han YW, Fujimoto S, Iwasaki H, & Shinagawa H (2004) Direct evidence that a conserved arginine in RuvB AAA+ ATPase acts as an allosteric effector for the ATPase activity of the adjacent subunit in a hexamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(26):9573-9577.
6. Patel S & Latterich M (1998) The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol* 8:65-71.
7. Gallant P (2007) Control of transcription by Pontin and Reptin. *Trends Cell Biol* 17(4):187-192.
8. Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV, & Aravind L (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology* 146:11–31.
9. Qiu XB, Lin YL, Thome KC, Pian P, Schlegel BP, Weremowicz S, Parvin JD, & Dutta A (1998) An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. *J Biol Chem* 273(43):27786-27793.
10. Bauer A, Chauvet S, Huber O, Usseglio F, Rothbacher U, Aragnol D, Kemler R, & Pradel J (2000) Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. *EMBO J* 19(22):6121-6130.
11. Matias PM, Gorynia S, Donner P, & Carrondo MA (2006) Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J Biol Chem* 281(50):38918-38929.
12. Kanemaki M, Kurokawa Y, Matsu-ura T, Makino Y, Masani A, Okazaki K, Morishita T, & Tamura TA (1999) TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuvB-like DNA helicase, TIP49a. *J Biol Chem* 274(32):22437-22444.

13. Makino Y, Kanemaki M, Kurokawa Y, Koji T, & Tamura T (1999) A rat RuvB-like protein, TIP49a, is a germ cell-enriched novel DNA helicase. *J Biol Chem* 274(22):15329-15335.
14. Gorynia S (2007) Structure and Function of the human AAA+ proteins RuvBL1 and RuvBL2. Doktorarbeit, FB Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin.
15. Gibrun A, Cheung KL, Huen J, Ortega J, & Houry WA (2008) Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-Dependent DNA Helicases that Form a Heterohexameric Complex. *J Mol Biol* 376:1320-1333.
16. Gorynia S, Matias PM, Goncalves S, Coelho R, Lopes G, Thomaz M, Huber M, Haendler B, Donner P, & Carrondo MA (2006) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the human RuvB-like protein RuvBL1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62(Pt 1):61-66.
17. Puri T, Wendler P, Sigala B, Saibil H, & Tsaneva IR (2007) Dodecameric structure and ATPase activity of the human TIP48/TIP49 complex. *J Mol Biol* 366(1):179-192.
18. Torreira E, Jha S, Lopez-Blanco JR, Arias-Palomo E, Chacon P, Canas C, Ayora S, Dutta A, & Llorca O (2008) Architecture of the pontin/reptin complex, essential in the assembly of several macromolecular complexes. *Structure* 16(10):1511-1520.
19. Gohshi T, Shimada M, Kawahire S, Imai N, Ichimura T, Omata S, & Horigome T (1999) Molecular cloning of mouse p47, a second group mammalian RuvB DNA helicase-like protein: homology with those from human and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* 125(5):939-946.
20. Kanemaki M, Makino Y, Yoshida T, Kishimoto T, Koga A, Yamamoto K, Yamamoto M, Moncollin V, Egly JM, Muramatsu M, & Tamura T (1997) Molecular cloning of a rat 49-kDa TB P-interacting protein (TIP49) that is highly homologous to the bacterial RuvB. *Biochem Biophys Res Commun* 235(1):64-68.
21. Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, Scully R, Qin J, & Nakatani Y (2000) Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102(4):463-473.
22. Bauer A, Huber O, & Kemler R (1998) Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25):14787-14792.
23. Holzmann K, Gerner C, Korosec T, Poltl A, Grimm R, & Sauermann G (1998) Identification and characterization of the ubiquitously occurring nuclear matrix protein NMP 238. *Biochem Biophys Res Commun* 252(1):39-45.
24. Sigala B, Edwards M, Puri T, & Tsaneva IR (2005) Relocalization of human chromatin remodeling cofactor TIP48 in mitosis. *Exp Cell Res* 310(2):357-369.

25. Ducat D, Kawaguchi S, Liu H, Yates JR, 3rd, & Zheng Y (2008) Regulation of microtubule assembly and organization in mitosis by the AAA+ ATPase Pontin. *Mol Biol Cell* 19(7):3097-3110.
26. Fielding AB, Dobрева I, McDonald PC, Foster LJ, & Dedhar S (2008) Integrin-linked kinase localizes to the centrosome and regulates mitotic spindle organization. *J Cell Biol* 180(4):681-689.
27. Raska I, Shaw PJ, & Cmarko D (2006) New Insights into Nucleolar Architecture and Activity. *International Review of Cytology* 225:177-235.
28. Newman DR, Kuhn JF, Shanab GM, & Maxwell ES (2000) Box C/D snoRNA-associated proteins: two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription. *RNA* 6(6):861-879.
29. McKeegan KS, Debieux CM, Boulon S, Bertrand E, & Watkins NJ (2007) A dynamic scaffold of pre-snoRNP factors facilitates human box C/D snoRNP assembly. *Mol Cell Biol* 27(19):6782-6793.
30. King TH, Decatur WA, Bertrand E, Maxwell ES, & Fournier MJ (2001) A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins. *Mol Cell Biol* 21(22):7731-7746.
31. Reichow LR, Hamma T, Ferré-D'Amaré AR, & Varani G (2007) The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res* 35(5):1452-1464.
32. Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, Harley CB, & Weissman IL (2003) Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* 102(2):517-520.
33. Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, II, Greider CW, & DePinho RA (1998) Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Cell* 92:569-574.
34. Venteicher AS, Meng Z, Mason PJ, Veenstra TD, & Artandi SE (2008) Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell* 132(6):945-957.
35. Zundorf I & Dingermann T (2008) [New impetus for telomerase research]. *Pharm Unserer Zeit* 37(4):276.
36. Shen X, Mizuguchi G, Hamiche A, & Wu C (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406(6795):541-544.
37. Jonsson ZO, Dhar SK, Narlikar GJ, Auty R, Wagle N, Pellman D, Pratt RE, Kingston R, & Dutta A (2001) Rvb1p and Rvb2p are essential components of a chromatin remodeling complex that regulates transcription of over 5% of yeast genes. *J Biol Chem* 276(19):16279-16288.

38. Wood MA, McMahon SB, & Cole MD (2000) An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell* 5(2):321-330.
39. Cho SG, Bhoumik A, Broday L, Ivanov V, Rosenstein B, & Ronai Z (2001) TIP49b, a regulator of activating transcription factor 2 response to stress and DNA damage. *Mol Cell Biol* 21(24):8398-8413.
40. Cvackova Z, Albring KF, Koberna K, Ligasova A, Huber O, Raska I, & Stanek D (2008) Pontin is localized in nucleolar fibrillar centers. *Chromosoma*.
41. Dugan KA, Wood MA, & Cole MD (2002) TIP49, but not TRRAP, modulates c-Myc and E2F1 dependent apoptosis. *Oncogene* 21(38):5835-5843.
42. Kim JH, Kim B, Cai L, Choi HJ, Ohgi KA, Tran C, Chen C, Chung CH, Huber O, Rose DW, Sawyers CL, Rosenfeld MG, & Baek SH (2006) Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and b-catenin complexes. *Nature* 434:921-926.
43. Tsukiyama T (2002) The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(6):422-429.
44. Feng Y, Lee N, & Fearon ER (2003) TIP49 regulates beta-catenin-mediated neoplastic transformation and T-cell factor target gene induction via effects on chromatin remodeling. *Cancer Res* 63(24):8726-8734.
45. Huber O, Menard L, Haurie V, Nicou A, Taras D, & Rosenbaum J (2008) Pontin and Reptin, Two Related ATPases with Multiple Roles in Cancer. *Cancer Res* 68(17):6873-6876.
46. Weiske J & Huber O (2005) The histidine triad protein Hint1 interacts with Pontin and Reptin and inhibits TCF-beta-catenin-mediated transcription. *J Cell Sci* 118(Pt 14):3117-3129.
47. Lima CD, Klein MG, & Hendrickson WA (1997) Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. *Science* 278(5336):286-290.
48. Brenner C (2002) Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry* 41(29):9003-9014.
49. Barnes LD, Garrison PN, Saprashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M, & Huebner K (1996) Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5''-P1,P3-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 35(36):11529-11535.
50. Kisselev LL, Justesen J, Wolfson AD, & Frolova LY (1998) Diadenosine oligophosphates (Ap(n)A), a novel class of signalling molecules? *FEBS Lett* 427(2):157-163.
51. Schluter H, Tepel M, & Zidek W (1996) Vascular actions of diadenosine phosphates. *J Auton Pharmacol* 16(6):357-362.

52. Vartanian A, Prudovsky I, Suzuki H, Dal Pra I, & Kisselev L (1997) Opposite effects of cell differentiation and apoptosis on Ap3A/Ap4A ratio in human cell cultures. *FEBS Lett* 415(2):160-162.
53. Bieganowski P, Garrison PN, Hodawadekar SC, Faye G, Barnes LD, & Brenner C (2002) Adenosine monophosphoramidase activity of Hint and Hnt1 supports function of Kin28, Ccl1, and Tfb3. *J Biol Chem* 277(13):10852-10860.
54. Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, & Huebner K (1996) The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* 84(4):587-597.
55. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Torielli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, & Croce CM (1996) The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 85(1):17-26.
56. Huebner K & Croce CM (2001) FRA3B and other common fragile sites: the weakest links. *Nat Rev Cancer* 1(3):214-221.
57. Huebner K & Croce CM (2003) Cancer and the FRA3B/FHIT fragile locus: it's a HIT. *Br J Cancer* 88(10):1501-1506.
58. Ishii H, Zanesi N, Vecchione A, Trapasso F, Yendamuri S, Sarti M, Baffa R, During MJ, Huebner K, Fong LY, & Croce CM (2003) Regression of upper gastric cancer in mice by FHIT gene delivery. *FASEB J* 17(12):1768-1770.
59. Huebner K, Garrison PN, Barnes LD, & Croce CM (1998) The role of the FHIT/FRA3B locus in cancer. *Annu Rev Genet* 32:7-31.
60. Weiske J, Albring KF, & Huber O (2007) The tumor suppressor Fhit acts as a repressor of b-catenin transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51):20344-20349.
61. Nakagawa Y & Akao Y (2006) Fhit protein inhibits cell growth by attenuating the signaling mediated by nuclear factor-kappaB in colon cancer cell lines. *Exp Cell Res* 312(13):2433-2442.
62. Jayachandran G, Sazaki J, Nishizaki M, Xu K, Girard L, Minna JD, Roth JA, & Ji L (2007) Fragile histidine triad-mediated tumor suppression of lung cancer by targeting multiple components of the Ras/Rho GTPase molecular switch. *Cancer Res* 67(21):10379-10388.
63. Pichiorri F, Ishii H, Okumura H, Trapasso F, Wang Y, & Huebner K (2008) Molecular Parameters of Genome Instability: Roles of Fragile Genes at Common Fragile Sites. *J Cell Biochem* 104:1525-1533.
64. Smith DI, McAvoy S, Zhu Y, & Perez DS (2007) Large common fragile site genes and cancer. *Semin Cancer Biol* 17(1):31-41.

65. Pekarsky Y, Zanesi N, Palamarchuk A, Huebner K, & Croce CM (2002) FHIT: from gene discovery to cancer treatment and prevention. *Lancet Oncol* 3(12):748-754.
66. Wodarz A & Nusse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:59-88.
67. Bienz M & Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103:311-320.
68. Giles RH, von Es JH, & Clevers H (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1653:1-24.
69. Morin PJ (1999) b-Catenin signaling and cancer. *Bioessays* 21(1837-1851):1851.
70. Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14:1837-1851.
71. Luo J, Chen J, Deng ZL, Luo X, Song WX, Sharff KA, Tang N, Haydon RC, Luu HH, & He TC (2007) Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? *Lab Invest* 87(2):97-103.
72. Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, & Kemler R (2000) The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of b-catenin in vertebrates. *EMBO J* 19(9):1839-1850.
73. Mosimann C, Hausmann G, & Basler K (2006) Parafibromin/Hyrax Activates Wnt/Wg Target Gene Transcription by Direct Association with b-catenin/Armadillo. *Cell* 125:327-341.
74. Siprashvili Z, Sozzi G, Barnes LD, McCue P, Robinson AK, Eryomin V, Sard L, Tagliabue E, Greco A, Fusetti L, Schwartz G, Pierotti MA, Croce CM, & Huebner K (1997) Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25):13771-13776.
75. Kuroki T, Tajima Y, Furui J, & Kanematsu T (2006) Common fragile genes and digestive tract cancers. *Surg Today* 36(1):1-5.
76. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, & Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185:60-89.
77. Zamenhof PJ & Villarejo M (1972) Construction and properties of Escherichia coli strains exhibiting  $\lambda$ -complementation of  $\lambda$ -galactosidase fragments in vivo. *J Bacteriol* 110(1):171-178.
78. Boyer HW & Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J Mol Biol* 41(3):459-472.
79. Sambrook JF, Fritsch EF, & Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2.
80. Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166(4):557-580.

81. Bullock WO, Fernandex JM, & Short JM (1987) XI1-Blue: A High Efficiency Plasmid Transforming *recA* Escherichia coli Strain With Beta-Galactosidase Selection. *Biotechniques* 5(4):376-379.
82. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
83. Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, & White RJ (2005) c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase. *Nat Cell Biol* 7(3):311-318.
84. Gospodinov A, Tsaneva I, & Anachkova B (2009) RAD51 foci formation in response to DNA damage is modulated by TIP49. *Int J Biochem Cell Biol* 41(4):925-933.
85. Parusel CT, Kritikou EA, Hengartner MO, Krek W, & Gotta M (2006) URI-1 is required for DNA stability in *C. elegans*. *Development* 133(4):621-629.
86. Watkins NJ, Dickmanns A, & Luhrmann R (2002) Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol Cell Biol* 22(23):8342-8352.
87. Watkins NJ, Lemm I, Ingelfinger D, Schneider C, Hossbach M, Urlaub H, & Luhrmann R (2004) Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol Cell* 16(5):789-798.
88. Bellosta P, Hulf T, Balla Diop S, Usseglio F, Pradel J, Aragnol D, & Gallant P (2005) Myc interacts genetically with Tip48/Reptin and Tip49/Pontin to control growth and proliferation during *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(33):11799-11804.
89. White RJ (2008) RNA polymerases I and III, non-coding RNAs and cancer. *Trends Genet* 24(12):622-629.
90. Lauscher JC, Loddenkemper C, Kosel L, Grone J, Buhr HJ, & Huber O (2007) Increased pontin expression in human colorectal cancer tissue. *Hum Pathol* 38(7):978-985.
91. Rousseau B, Menard L, Haurie V, Taras D, Blanc JF, Moreau-Gaudry F, Metzler P, Hugues M, Boyault S, Lemiere S, Canron X, Costet P, Cole M, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J, & Rosenbaum J (2007) Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 46(4):1108-1118.
92. Shin SI, Freedman VH, Risser R, & Pollack R (1975) Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(11):4435-4439.

93. Kim JH, Choi HJ, Kim B, Kim MH, Lee JM, Kim IS, Lee MH, Choi SJ, Kim KI, Kim SI, Chung CH, & Baek SH (2006) Roles of sumoylation of a reptin chromatin-remodelling complex in cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 8(6):631-639.
94. Kim KI & Baek SH (2006) SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol Cells* 22(3):247-253.
95. Gorrini C, Squatrito M, Luise C, Syed N, Perna D, Wark L, Martinato F, Sardella D, Verrecchia A, Bennett S, Confalonieri S, Cesaroni M, Marchesi F, Gasco M, Scanziani E, Capra M, Mai S, Nuciforo P, Crook T, Lough J, & Amati B (2007) Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature* 448(7157):1063-1067.
96. Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, & Amati B (2003) MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* 4(6):575-580.
97. Makino Y, Mimori T, Koike C, Kanemaki M, Kurokawa Y, Inoue S, Kishimoto T, & Tamura T (1998) TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human. *Biochem Biophys Res Commun* 245(3):819-823.
98. Koberna K, Malinsky J, Pliss A, Masata M, Vecerova J, Fialova M, Bednar J, & Raska I (2002) Ribosomal genes in focus: new transcripts label the dense fibrillar components and form clusters indicative of „Christmas trees“ in situ. *J Cell Biol* 157(5):743-748.
99. Malinsky J, Koberna K, Bednar J, Stulik J, & Raska I (2002) Searching for active ribosomal genes in situ: light microscopy in light of the electron beam. *J Struct Biol* 140(1-3):227-231.
100. Raska I (2003) Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol* 13(10):517-525.
101. Raska I, Shaw PJ, & Cmarko D (2006) Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* 18(3):325-334.
102. Strouboulis J & Wolffe AP (1996) Functional compartmentalization of the nucleus. *J Cell Sci* 109 (Pt 8):1991-2000.
103. Zaros C, Briand JF, Boulard Y, Labarre-Mariotte S, Garcia-Lopez MC, Thuriaux P, & Navarro F (2007) Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 35(2):634-647.
104. Etard C, Gradl D, Kunz M, Eilers M, & Wedlich D (2005) Pontin and Reptin regulate cell proliferation in early *Xenopus* embryos in collaboration with c-Myc and Miz-1. *Mech Dev* 122(4):545-556.

105. Leung AK, Trinkle-Mulcahy L, Lam YW, Andersen JS, Mann M, & Lamond AI (2006) NOPdb: Nucleolar Proteome Database. *Nucleic Acids Res* 34(Database issue):D218-220.
106. Gorynia S, Matias PM, Bandejas TM, Donner P, & Carrondo MA (2008) Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the human RuvBL1-RuvBL2 complex. *Acta Crystallographica Section F* 64(9):840-846.
107. Scheich C, Kummel D, Soumailakakis D, Heinemann U, & Bussow K (2007) Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins. *Nucleic Acids Res* 35(6):e43.

**8 Anhang**

(v/v)	Volumenanteil im Verhältnis zum Volumen
(w/v)	Gewichtsanteil im Verhältnis zum Volumen
15.5K	15.5kDa protein (NHP2L1 in Säugetieren)
AAA+	ATPases associated with various cellular activities
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMP-NH <sub>2</sub>	Adenosin 5'-monophospho-5'-amidat
Ap3A	Adenosin 5'-triphospho-5'-adenosin
Ap4A	Adenosin 5'-tetraphospho-5'-adenosin
APA	advanced protein assay
APC	adenomatosis polyposis coli protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF2	Activating transcription factor 2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAF53a	BRG1/brm-associated factor 53A
BCA	bicinchoninic acid
BCD1	Box C/D snoRNA accumulation
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CamKII	Calmodulin-abhängige Kinase II
Cbf-5	centromer binding factor 5 (Dyskerin in Säugetieren)
CBP	CREB binding protein
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (copy DNA)
CFS	common fragile sites
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal phosphatase)
CK I	Casein Kinase I

---

c-Myc	cellular myelocytomatosis-oncogene
CTP	Cytosin5'-triphosphat
D	Einbuchstaben Code für Aspartat
DcpS	scavenger decapping enzyme
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA (double stranded DNA)
DTT	Dithiothreitol
E2F1	E2F transcription factor 1
ECT	E-Cadherin cytoplasmatischer Teil
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fhit	fragile histidine triad
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GalT	galacose-1-phosphate-uridyl-transferase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GSK3 $\beta$	Glycogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$
GST	Gluthathion-S-Transferase
h	Stunde
H	Einbuchstaben Code für Histidin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
Hint1	histidine triad nucleotide-binding protein 1
Hint2	histidine triad nucleotide-binding protein 2
Hint3	histidine triad nucleotide-binding protein 3
His	Histidin
HIT	histidine triad

---

HRPO	Merretich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IB	Immonoblot
IgG	Immunglobulin G
ILK	Integrin-linked kinase
Ino80	Inositol-requiring protein 80
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
ITF-2	immunoglobulin transcription factor-2
JNK	Jun-N-terminale Kinase
K	Einbuchstaben Code für Lysin
KAI1	Kangai 1
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LEF-1	Lymphoid Enhancer Factor-1
LRP-5/6	lipoprotein-receptor-related-proteins 5/6
M	Mol pro Liter
MBP	maltose-binding protein
min	Minute(n)
MMP-14	matrix metalloproteinase 14
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MW	Molekulargewicht (molecular weigth)
N	Einbuchstaben Code für Asparagin
NFκB	nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells
NOP17	Nucleolar protein 17
NOR	nucleolar organizer regions
NTA	Nickel nitrilotriacetic acid
p.A.	pro Analysis (Angabe zum Reinheitsgrad)
p300	transcriptional adapter protein (300 kDa)

---

PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Pol-I	RNA-Polymerase I
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Einbuchstaben Code für Arginin
Ras	rat sarcoma
rDNA	DNA die rRNA Gene enthält
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RPA	replication protein A
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	Einbuchstaben Code für Serin
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SART3	squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
siRNA	Kurze interferierende RNA (short interfering RNA)
snoRNA	small nucleolar RNA
snoRNP	small nucleolar riboprotein particel
SRCAP	Snf2-related CREBBP activator protein
ssDNA	Einzelsträngige DNA (single stranded DNA)
ssRNA	Einzelsträngige RNA (single stranded RNA)
Swr1	Swi2/Snf2-related 1
T	Einbuchstaben Code für Threonin
TAE	Tris Acetat EDTA

---

TAF9	TATA-binding-polypeptide-associated factor 9
TBE	Tris Borat EDTA
TBP	Tata-Box bindendes Protein
TCF4	T-Cell Factor 4
TE	Tris EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TERC	telomerase RNA component
TERT	telomerase reverse-transcriptase
TEV	tobacco etch virus
TIP60	human immunodeficiency virus-1 Tat interacting Protein 60
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Triton X-100	t-Oktylphenoxypolyethoxyethanol
TRRAP	Transformation/transcription domain-associated protein
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Einheiten(en) (units)
UBF	upstream binding factor
UV	Ultraviolett
WB	Western-Blot
Wnt	Wingless: Segmentpolaritätsgen aus Drosophila + Int-1: Protoonkogen aus der Maus

**9 Publikationsverzeichnis****Originalarbeiten:**

**Weiske J, Albring KF, & Huber O** (2007) The tumor suppressor Fhit acts as a repressor of  $\beta$ -catenin transcriptional activity. Proc Natl Acad Sci U S A 104(51):20344-20349.

**Cvackova Z\*, Albring KF\*, Koberna K, Ligasova A, Huber O, Raska I, & Stanek D** (2008) Pontin is localized in nucleolar fibrillar centers. Chromosoma. (\*authors contributed equally to this work)

**Lassowski B\*, Albring KF\*, Weiske J., Lehmann S., Schönfelder G., Petersen I., Kubick S., Kazmierczak D., Regitz-Zagrosek V., and Huber O.** (2009) Pontin and Reptin act as estrogen receptor co-factors and antagonistically modulate its transcriptional activity (\*authors contributed equally to this work); Manuscript in preparation

**Albring KF, Weiske J., Lehmann S., Petzold I. & Huber O.** (2009) Fhit modulates Pontin, Reptin activity; Manuscript in preparation

**Vorträge:**

„The tumor suppressor Fhit modulates Lef-1/TCF- $\beta$ -catenin mediated transcription“  
1<sup>st</sup> Postgraduate-Symposium on Cancer Research, Altes Schloss Dornburg, Germany

## 10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Otmar Huber sehr herzlich für die Möglichkeit an diesen interessanten Projekten arbeiten zu können, für die exzellenten wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge, die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für die Sicherstellung meiner Finanzierung auch in schweren Zeiten.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Rudolf Tauber, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seinem Institut anzufertigen und für seine stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Gerd Multhaupt danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jörg Weiske, dessen unermüdlicher Einsatz sowie umfangreiches fachliches Wissen und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft das Gelingen dieser Arbeit wesentlich unterstützt haben.

Für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Zentralinstituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie bedanken. Damit ich hier niemanden vergesse halte ich es allgemein. Ihr wisst schon wer gemeint ist.

Bei Dr. Jens Dervedde und PD Dr. Hendrik Fuchs möchte ich mich für ihre große Hilfsbereitschaft sowie die stete Diskussions- und Kooperationsbereitschaft bedanken.

Luise Kosel danke ich für die gute Bench-Nachbarschaft, die fleißigen Hilfestellungen, die kleinen „Schwanensee Auftritte“ und die gemütlichen Kaffeerunden am frühen Morgen.

Großer Dank gilt auch meinen Eltern, für ihre verlässliche Unterstützung, die diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Meiner Freundin Anne Grunenberg danke ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung an arbeitsreichen Wochenenden, insbesondere aber für die wunderbare Zeit die ich mit ihr und Joris verbringen darf.

## 11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel:

„Strukturelle und Funktionelle Charakterisierung der AAA<sup>+</sup>-ATPasen Pontin und Reptin“  
selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher noch nicht  
anderweitig als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in Chromosoma (Cvačková et al., 2008) veröffentlicht.

Berlin, den 05.01.2010