

FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG UND
ZELLULÄRE INTERAKTIONEN DES PUTATIVEN
CULLIN3-E3 UBIQUITIN LIGASE SUBSTRATADAPTERS
KCTD5

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

EINGEREICHT IM FACHBEREICH BIOLOGIE, CHEMIE, PHARMAZIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON
NATALJA RUTZ
AUS OMSK

BERLIN 2014

Diese Doktorarbeit wurde im Zeitraum 07.2011-11.2014
unter der Leitung von Herrn PD Dr. S. Weger
in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. R. Heilbronn
am Institut für Virologie, Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin
angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Stefan Weger

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Datum der Disputation: 02.03.2015

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 KCTD5-ein Vertreter der KCTD-Familie	1
1.2 Ubiquitinierung	2
1.3 Cullin E3 RING Ubiquitin Ligasen.....	4
1.4 KCTD und weitere BTB-Domänenproteine als Substratadapter	6
1.5 KCTD5 und Cullin3	7
1.6 Potentielle KCTD5-Interaktionspartner	7
1.6.1 FAM193B.....	8
1.6.2 ZNF711	9
1.6.3 MCM7-ein Bestandteil der zellulären Replikationsmaschinerie.....	11
1.7 Interaktion von KCTD5 mit den großen Rep-Proteinen des AAV-2	13
1.8 Die Adeno-assoziierten Viren (AAV).....	14
1.9 Ziele der Doktorarbeit	15
2 Material	16
2.1 Geräte	16
2.2 Chemikalien	17
2.3 Medien, Lösungen, Puffer.....	18
2.3.1 Medien.....	18
2.3.2 Lösungen	18
2.3.3 Puffer.....	19
2.4 Fertiglösungen.....	22
2.5 Affinitätsmatrizen.....	22
2.6 Kits	22
2.7 Enzyme.....	22
2.8 Größenmarker	23
2.9 Antikörper	23
2.10 Oligonukleotide.....	24
2.11 Plasmide	25
2.12 DNA-Sonde für die Southern Blot Analyse	28
2.13 RNA und DNA für Klonierungen	28
2.14 Bakterienstämme und Zelllinien	28
2.14.1 Bakterienstämme.....	28
2.14.2 Zelllinien	29
2.15 Verbrauchsmaterial	29
2.16 Computersoftware	30

2.17	Datenbanken.....	30
3	Methoden.....	31
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	31
3.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Kulturzellen	31
3.1.2	Isolierung der Gesamt-RNA aus Kulturzellen	31
3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
3.1.4	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	33
3.1.5	DNA-Präzipitation mittels Ethanol oder Isopropanol	34
3.1.6	Phenol-Chloroform-Extraktion	34
3.1.7	Agarose-Gelelektrophorese	35
3.1.8	„Freeze-Squeeze“ Methode zur Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	36
3.1.9	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit Purification Kit	36
3.1.10	Restriktionsanalyse.....	36
3.1.11	Phosphorylierung und Ligation von Oligonukleotid-Paaren.....	37
3.1.12	Ligation	38
3.1.13	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen	38
3.1.14	Transformation kompetenter Bakterienzellen	38
3.1.15	Plasmid-Minipräparation.....	39
3.1.16	Plasmid-DNA-Midi- und -Maxipräparation.....	40
3.1.17	Sequenzierung	40
3.1.18	Hirt-Extraktion zur Isolierung von Virus-DNA aus Säugerzellen	41
3.1.19	Southern Blot Analyse	41
3.2	Zellbiologische Methoden.....	43
3.2.1	Zellkultur	43
3.2.2	Transfektion mittels $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation	43
3.2.3	Virusinfektion von Zellkulturen.....	43
3.2.4	Immunfluoreszenz-Analyse	44
3.2.5	Zellsynchronisation	45
3.2.6	FACS-Analyse der Zellsynchronisation.....	45
3.2.7	Luciferase-Reportergen-Assay	46
3.3	Proteinbiochemische Methoden	47
3.3.1	Proteinextraktion aus Kulturzellen	47
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	47
3.3.3	Western Blot Analyse.....	48
3.3.4	Stabilitätsassay	49
3.3.5	Ko-Immunpräzipitation	49

3.3.6	NiNTA-Aufreinigung.....	50
4	Ergebnisse.....	52
4.1	Charakterisierung von KCTD5	52
4.1.1	Einfluss des KCTD5 C-Terminus auf die Dimerisierung und die subzelluläre Lokalisation.....	52
4.1.2	KCTD5-Lokalisation im Verlauf des Zellzyklus	56
4.2	KCTD5 und der Replikationsfaktor MCM7	59
4.2.1	Charakterisierung der MCM7-Konstrukte	59
4.2.2	Charakterisierung der für die Interaktion von KCTD5 mit MCM7 notwendigen Proteindomänen.....	61
4.2.3	Bildung von trimeren Komplexen zwischen KCTD5, Cullin3 und MCM7.....	63
4.2.4	Nachweis der MCM7 Ubiquitinierung über denaturierende Reinigung an NiNTA-Agarose.....	67
4.2.5	Einfluss von KCTD5 und Cullin3 auf die MCM7-Ubiquitinierung	70
4.2.6	MCM7 Expression und Lokalisation in Abhängigkeit vom Zellzyklus.....	72
4.3	KCTD5 und MCM7 im AAV-2 Replikationszyklus	74
4.3.1	Interaktionen zwischen KCTD5, MCM7 und Rep78/Rep68	74
4.3.2	Einfluss der AAV-2 Proteine Rep78/Rep68 auf die MCM7-Ubiquitinierung	78
4.3.3	Einfluss von MCM7 auf die AAV-2-Genomreplikation.....	80
4.4	Funktionelle Charakterisierung des KCTD5-Interaktionspartners ZNF711	84
4.4.1	Untersuchung der für die Bindung an ZNF711 erforderlichen KCTD5-Proteindomänen.....	84
4.4.2	Bildung trimerer Komplexe zwischen KCTD5, ZNF711 und Cullin3	88
4.4.3	Stabilisierung des ZNF711-Proteins durch KCTD5 und Cullin3.....	90
4.4.4	Die Lokalisation und Expression von ZNF711 während der Zellteilung.....	95
4.4.5	ZNF711 als transkriptioneller Regulator.....	99
4.5	Charakterisierung des KCTD5 Interaktionspartners FAM193B	104
4.5.1	Subzelluläre Lokalisation von FAM193B und Interaktion mit KCTD5	104
4.5.2	Bildung trimerer Komplexe zwischen FAM193B, KCTD5 und Cullin3.....	107
4.5.3	FAM193B-Proteinexpression und Ubiquitinierung	109
5	Diskussion	111
5.1	Translokation von KCTD5 zwischen Zytoplasma und Nukleus.....	111
5.2	Wechselwirkung von KCTD5 mit dem Replikationsfaktor MCM7	114
5.2.1	Detaillierte Charakterisierung der Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7.....	114
5.2.2	MCM7 als putatives Substrat des KCTD5-Cullin3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes.....	115

5.2.3	Interaktion von MCM7 mit Rep78/Rep68 und seine Rolle bei der AAV-2-Replikation	117
5.3	Funktionelle Wechselwirkungen des KCTD5-Cullin3-Komplexes mit dem ZNF711-Transkriptionsfaktor	118
5.3.1	Bildung eines trimeren ZNF711-KCTD5-Cullin3-Komplexes und KCTD5-Cullin3-vermittelte ZNF711-Stabilisierung.....	118
5.3.2	Der Einfluss von KCTD5-Cullin3 auf ZNF711 im Verlauf des Zellzyklus.....	120
5.3.3	ZNF711 als Transkriptionsfaktor	121
5.4	Interaktion des KCTD5-Cullin3-Ligase-Komplexes mit FAM193B.....	123
5.5	Evidenzen für eine Funktion von KCTD5 als Substratadapter für Cullin3-Ubiquitin-Ligasen	125
5.6	Ausblick	128
6	Zusammenfassung	129
7	Abstract	131
8	Literaturverzeichnis	133
9	Publikationen.....	145
10	Danksagung.....	146
11	Selbstständigkeitserklärung.....	147

Abkürzungsverzeichnis

[v/v]	Volumen pro Volumen
[w/v]	Gewicht pro Volumen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AAV-2	Adeno-assoziiertes Virus Typ 2
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.H ₂ O	bidestilliertes H ₂ O
bp	Basenpaare
BTB/POZ	<i>bric-a-brac, tramtrack, broad complex/ poxvirus zink finger</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CHX	Cycloheximid
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
Cul3	Cullin3
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5´-triphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
fw	<i>forward</i> Primer, komplementär zum Gegenstrang der Gensequenz
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
His	Histidin
<i>H.sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobasen
KCTD5	<i>Potassium channel tetramerization domain containing protein 5</i>
kDa	kiloDalton
l	Liter
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie

Lys ⁴⁸	Aminosäure Lysin an der Position 48
<i>M.thermautotrophicus</i>	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MCM7	<i>minichromosome maintenance protein 7</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm/MM	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisationsignal
nm	Nanometer
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rv	<i>reverse</i> Primer, komplementär zur Gensequenz
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.pombe</i>	<i>Saccharomyces pombe</i>
<i>S.solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
SB	Southern Blot
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	NaCl/Natriumcitrat Puffer (<i>saline sodium citrate</i>)
s	Sekunde
U	Einheit (<i>unit</i>)
Ü/N	über Nacht
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)
z.B.	zum Beispiel
ZNF711	Zink-Finger Protein 711

1 Einleitung

1.1 KCTD5-ein Vertreter der KCTD-Familie

KCTD5, ein Vertreter der KCTD-Familie (*Potassium channel tetramerization domain containing proteins*), ist ein überwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes Protein mit einer Länge von 234 Aminosäuren und einer N-terminalen, zwischen den Aminosäuren 45 und 145 lokalisierten Region, die starke Homologien zur T1 Domäne der Kaliumkanal bildenden Proteine und zur BTB/POZ-Domäne aufweist. Diese BTB (*bric-a-brac, tramtrack, broad complex*)/POZ (*poxvirus zink finger*) Domäne ist ein evolutionär konserviertes Motiv, das zuerst bei *D.melanogaster* und später bei Pockenviren beschrieben wurde [1, 2]. Von *S.cerevisiae* über *A.thaliana* bis *H.sapiens* sind Proteine mit einer BTB-Domäne innerhalb der Eukaryoten reichlich vertreten und auch in Viren zu finden (Datenbanken in InterPro[3]). Diese allen KCTD-Proteinen gemeinsame N-terminale Domäne vermittelt Homo- und Heteromerisierung [4, 5], wobei sie neben der Bildung von homomeren Komplexen (Dimere und höhere Oligomere) [6, 7] auch die Heteromerbildung mit anderen BTB-haltigen Proteinen vermittelt [2]. Eine Vielzahl von Proteinen mit einer BTB-Domäne weisen zusätzliche funktionelle Motive und Domänen auf wie ZF, MATH, HECK oder Kelch [5].

Zusätzlich zur BTB-Domäne wurde bis jetzt kein weiteres gemeinsames Motiv oder eine konservierte Domäne für die 26 Vertreter der KCTD-Proteinfamilie beschrieben. Bei KCTD5 vermittelt die BTB/POZ-Domäne nicht eine Tetramerisierung, wie dies bei der T1-Domäne der Kaliumkanäle der Fall ist, sondern eine Pentamerisierung (Abb. 1.1): Das aufgereinigte Protein bildet sowohl unter Hochsalz- als auch unter Niedrigsalzbedingungen Pentamere [8]. Dabei scheint der N-Terminus für die Assemblierung unabdingbar zu sein [8].

KCTD5 ist ein überwiegend zytoplasmatisches Protein, das zum Teil stark im Perinukleärraum akkumuliert und dessen subzelluläre Lokalisation bereits in Studien von Weger *et al.* und im Rahmen meiner Diplomarbeit analysiert wurde [9-11]. Bei der Deletion des KCTD5 C-Terminus bis Aminosäure 203, die zu der KCTD5-Translokation in den Zellkern führt, ist das letzte strukturell charakterisierte β -Faltblatt betroffen. Die teilweise an der Ausbildung des β 5-Faltblatts beteiligten Aminosäuren 181-191 scheinen für die gegenüber dem Volllänge-Protein stark veränderte nukleäre Lokalisation des verkürzten KCTD5-Proteins von Bedeutung zu sein [8, 10, 11]. Die Lokalisation des Proteins im Zellkern korreliert mit der Ausbildung von stabilen höhermolekularen Formen

des Proteins im SDS-Polyacrylamidgel, bei denen es sich vermutlich um Dimere handelt [11].

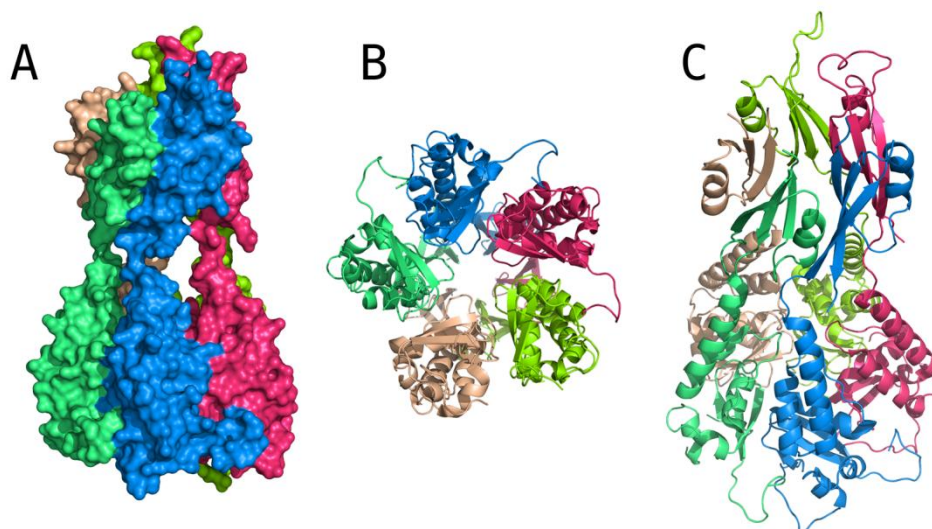


Abb. 1.1: Übersicht der pentameren KCTD5 Struktur. Für die Darstellung wurden das Programm Pymol und die Protein Datenbank Nummer 3DRY verwendet [8]. Dargestellt sind (A) Seitenansicht, (B) N-terminale Ansicht und (C) C-terminale Ansicht des KCTD5-Pentamers.

Die KCTD5-Dimerisierung wird von C-terminalen Strukturen beeinflusst, während die BTB-Domäne nicht nur die Pentamerisierung bei KCTD5 und die Oligomerisierung in der KCTD-Familie vermittelt, sondern auch die Interaktion mit den Ubiquitin-Ligase-Proteinen der Cullin-Familie, die selbst diese Domäne nicht besitzen [12, 13]. Mehrere Vertreter der KCTD-Familie interagieren mit Ubiquitin-Ligasen und bilden E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexe [14, 15]. Für diese wird vermutet, dass die KCTD-Proteine die Rolle der Substratadapter übernehmen [14, 16, 17]. Die Interaktion mit Cullin-Proteinen erfolgt dabei häufig durch die N-terminale BTB/POZ-Domäne der KCTD-Proteine, während an den C-terminalen Teil des KCTD-Proteins potentielle Ubiquitinierungssubstrate binden [17, 18].

Für KCTD5 wurde eine Interaktion mit Cullin3 sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen nachgewiesen und es wird vermutet, dass KCTD5 wie weitere Vertreter der KCTD-Familie als Substratadapter für Cullin3-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex fungieren und Ubiquitinierung vermitteln kann [9, 11].

1.2 Ubiquitinierung

Ubiquitin ist ein kleines Polypeptid, welches aus 76 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 8,5 kDa besitzt. Ubiquitin wird über eine Isopeptidbindung kovalent mit Lysin-Seitenketten von Zielproteinen verknüpft. Diese so genannte Ubiquitinierung wird durch das Ubiquitin-konjugierende System, bestehend aus E1-, E2- und E3-Enzymen, katalysiert [19-21]. Dabei wird das Ubiquitin zunächst vom

aktivierenden E1-Enzym unter ATP-Verbrauch in Form eines Thioesters zwischen einem Cysteinrest des E1-Enzyms und der C-terminalen Carboxygruppe des Ubiquitins gebunden. Im nächsten Schritt wird das Ubiquitin auf das E2-konjugierende Enzym übertragen, wiederum in Form eines Thioesters mit einem Cysteinrest des Enzyms. Die Übertragung des Ubiquitinrestes auf das endgültige Substrat kann entweder direkt durch das E2-Enzym oder in den meisten Fällen unter Beteiligung einer E3-Ubiquitin-Ligase, welche die Substratspezifität vermittelt, erfolgen. In beiden Fällen wird Ubiquitin kovalent mit der Aminogruppe eines Lysinrestes des jeweiligen Zielsubstrates verknüpft (Abb. 1.2).

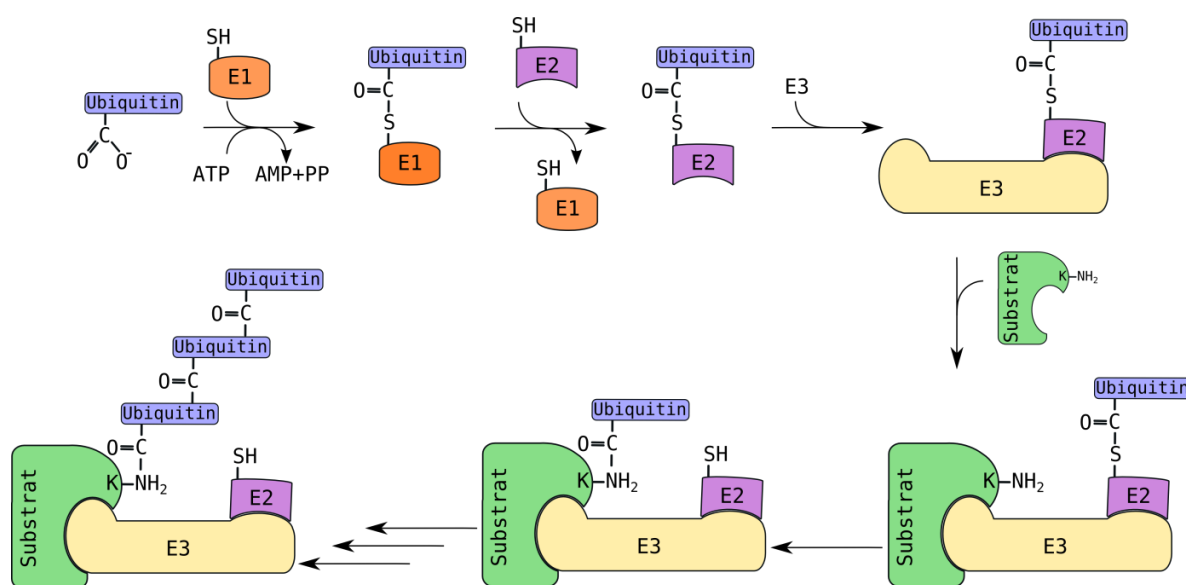


Abb. 1.2: Ubiquitinierungskaskade. Ubiquitin wird durch das Enzym E1 unter Verbrauch von ATP aktiviert und auf ein E2-Enzym übertragen. Zusammen mit einer E3-Ligase bildet das E2-Protein einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, der verschiedene Ubiquitinierungssubstrate rekrutiert. An diesen Komplexen werden Substrate durch Übertragung eines Ubiquitins an einen Lysinrest mono-ubiquitiniert oder durch die Konjugation weiterer Ubiquitinreste poly-ubiquitiniert.

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch Ubiquitinierung besitzt regulatorische Funktion und wurde erstmalig als spezifisches Signal für die Degradation der solchermaßen modifizierten Proteine beschrieben [22]. Diese selektive Degradation von Proteinen ist für viele zelluläre Prozesse wie beispielsweise die "Qualitätssicherung" der intrazellulär gebildeten Proteine durch die Entsorgung der fehlgefalteten Proteine, die Regulation des Zellzyklus und der Apoptose von entscheidender Bedeutung. Als Signal für die Degradation dient die Verknüpfung der Proteine mit mehreren Ubiquitinmolekülen, wobei man ab fünf Ubiquitinresten von einer so genannten Poly-Ubiquitinierung spricht. Diese Poly-Ubiquitinierung erfolgt ebenfalls über Isopeptidbindungen, die mit internen Lysinresten der bereits verknüpften Ubiquitinreste gebildet werden. Dabei spielt die Lysinposition eine wichtige Rolle für die Funktion der (Poly)-Ubiquitinierung. Sieben Lysinreste des Ubiquitins können potentiell ubiquitiniert werden: Lys⁶, Lys¹¹, Lys²⁷, Lys²⁹, Lys³³, Lys⁴⁸ und Lys⁶³ [23, 24]. Die Poly-

Ubiquitinierung am Lys⁴⁸ führt in der Regel zur Degradation der „markierten“ Proteine durch das 26S-Proteasom, wobei mindestens vier Ubiquitinreste für die proteasomale Erkennung notwendig sind [22, 25, 26]. Die Lys⁴⁸-Poly-Ubiquitinierung ist für die Regulation des Zellzyklus unabdingbar, wie durch Versuche mit Hefezellen gezeigt werden konnte [27, 28]. Die Verknüpfung der Ubiquitinreste über die Aminosäuren Lys⁶, Lys¹¹, Lys²⁷, Lys²⁹ und Lys³³ spielt hingegen bei der Proteindegradation nur eine untergeordnete Rolle [28].

Die Poly-Ubiquitinierung führt aber nicht automatisch zur Proteindegradation. Im Falle der Verknüpfung über Lys⁶³ kommt es überwiegend zu nicht-proteolytischen Funktionsänderungen von Substraten, die wichtig für zelluläre Prozesse sind: Diese Art der Poly-Ubiquitinierung aktiviert beispielsweise die IκB Kinase (IKK) und reguliert die ribosomale Funktion durch die Poly-Ubiquitinierung der großen ribosomalen Untereinheit L28 [29, 30]. Eine wichtige Rolle spielt die Lys⁶³-Poly-Ubiquitinierung bei der Regulation der NF-κB vermittelten Signaltransduktionswege [31].

Eine Reihe von zellulären Proteinen können auch mono-ubiquitiniert (Übertragung eines einzigen Ubiquitinmoleküls auf ein Substrat) oder multi-ubiquitiniert (Mono-Ubiquitinierung mehrerer Lysinreste eines Substrates) werden. Durch Multi-Ubiquitinierung kann z.B. die Effektivität der Endozytose reguliert werden [32]. Mono-Ubiquitinierung wurde bei der Regulation der Histonaktivität, der Genexpression, und der DNA-Reparatur sowie bei Endozytose und Proteinsortierung im Lysosom beschrieben [33-36]. So ist die Mono-Ubiquitinierung von Histon H2B für das Zellwachstum und die Meiose notwendig [33]; die Internalisierung und lysosomale Degradation von Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*) und PDGF (*epidermal growth factor receptor*) wird ebenfalls durch Mono-Ubiquitinierung vermittelt [37]. Ein Protein kann auch durch mehrere Ubiquitinierungsmodifikationen reguliert werden, wie PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*): Nach DNA-Schäden führt die PCNA-Mono-Ubiquitinierung zu einer fehlerhaften und die Poly-Ubiquitinierung zu einer fehlerfreien DNA-Reparatur [38, 39].

1.3 Cullin E3 RING Ubiquitin Ligasen

Die Vielfalt der einzelnen Komponenten des Ubiquitinsystems, des E1-aktivierenden Enzyms, des E2-konjugierenden Enzyms und der E3-Ligasen, weist in eukaryotischen Organismen sehr starke Unterschiede auf. Es gibt nur zwei E1-Enzyme, dafür aber 37-39 E2-Proteine und mehr als 600 bisher identifizierte E3-Ubiquitin-Ligasen, welche die eigentliche Substratspezifität vermitteln [40-43]. E3-Ligasen werden auf der Grundlage der am katalytischen Schritt beteiligten Proteine und charakteristischen Proteindomänen in zwei Klassen eingeteilt: Dabei unterscheidet man Enzyme mit einer HECT- oder einer

RING-Domäne [44, 45]. Das RING-Finger-Motiv (*really interesting new gene*) besteht aus einer charakteristischen Abfolge von Cysteinen und Histidinen und verdankt seinen Namen seiner initialen Identifizierung beim Protein Ring1 [46]. Später wurde gezeigt, dass viele Proteine mit einer RING-Domäne an Ubiquitinierungsprozessen beteiligt sind, wie Apc11p oder RAD18 [47-49]. RING-Finger-Proteine sind Bestandteil von größeren E3-RING-Ubiquitin-Ligase-Komplexen, wie beispielsweise das Rbx1/Roc1-Protein, das als katalytische Untereinheit zusammen mit Cullin-Proteinen den E3-Ligase-Komplex bildet [12, 50, 51]. Im Unterschied zu E3-HECT-Ligasen, die Ubiquitin direkt binden und auf ein Substrat übertragen, katalysieren E3-RING-Ligasen die Übertragung des Ubiquitinrestes vom E2-konjugierenden Enzym auf das Substrat, ohne intermediär eine Thioesterbindung auszubilden [52].

Zu den RING-Ligasen gehören die Cullin-E3-Ubiquitin-Ligasen. Die Cullin-Familie besteht aus sieben Proteinen: Cul1, Cul2, Cul3, Cul4A, Cul4B, Cul5 und Cul7. Die Proteine weisen eine hohe Homologie insbesondere zwischen bestimmten Aminosäuren am C-Terminus auf: Eine Domäne vermittelt die Interaktion mit Roc1, während zehn weitere hoch konservierte C-terminale Aminosäuren für die Bindung von NEDD8 erforderlich sind [51, 53]. Durch NEDD8 (*Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8*) werden alle Cullin-Proteine modifiziert und dies ist für ihre Ubiquitinierungsaktivität erforderlich [51, 54].

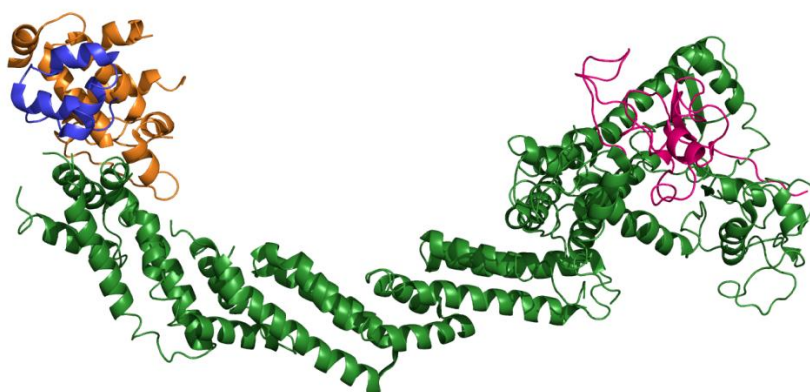


Abb. 1.3: Cullin1-Ubiquitin-Ligase-Komplex. Protein Datenbank Nummer 1LDK [55], dargestellt mit dem Programm Pymol. Cullin1 (grün) – Rbx1 (rot) – Skp2 like protein (blau) – CyclinA (orange).

Der N-terminale Anteil der Cullin-Proteine ist an Wechselwirkungen mit so genannten Substratadaptern beteiligt (Abb. 1.3, Substratadapter Skp2 like protein). Die große Substratvariabilität innerhalb der Cullin-Familie wird durch die Bindung unterschiedlicher Substratadapter gewährleistet, die ihrerseits an unterschiedliche Ubiquitinierungssubstrate binden. Seit der initialen Beschreibung von F-Box-haltigen Substratadaptern für einzelne Mitglieder der Cullin-Familie wurden für viele weitere Cullin-Proteine solche Adapter für

die Substratbindung identifiziert [56, 57]. Auch für Cullin3 sind mehrere Substratadapter bekannt [13, 58, 59]. Sie alle haben eine Gemeinsamkeit: Ihre Interaktion mit Cullin3 wird durch die BTB-Domäne vermittelt [12, 58, 59]. Auf der Seite des Cullin3 wird die Interaktion mit der BTB-Domäne durch konservierte Aminosäuresequenzen in zwei N-terminalen alpha-Helices vermittelt, sodass die Deletion der ersten 41 Aminosäuren in der Regel die Interaktion mit den Substratadaptern aufhebt [12, 13, 59].

1.4 KCTD und weitere BTB-Domänenproteine als Substratadapter

Cullin3(Cul3)-Ubiquitin-E3-Ligasen können mit Hilfe der BTB-haltigen Substratadapter vielfältige zelluläre Prozesse steuern. So wurde für Cul3 eine Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus und der Zytokinese durch die Ubiquitinierung von Aurora B und Cyclin E beschrieben [60, 61]. Ein Cul3-BACURD-Komplex steuert die Bildung von Aktin-Stressfasern und Zellmotilität durch die Ubiquitinierung und Degradation von RhoA [62]. Für Cul3-BTB-Substratadapter-Komplexe wurde ferner eine Beteiligung an der Regulation von Transkriptionsfaktoren beschrieben. Durch Interaktion mit Cullin3-Keap1(*Kelch-like ECH-associated protein 1*) wird Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*) im Zytoplasma zurück-gehalten und ubiquitiniert, was Nrf2-spezifische antioxidative Gene negativ reguliert [63, 64]. Außerdem wird IKK β , ein negativer Regulator des Transkriptionsaktivators NF- κ B, durch Cul3-Keap1 ubiquitiniert [65]. Auch die Cul3-Substratadapter selbst können in Anwesenheit von Cullin3 ubiquitiniert werden, wie dies am Beispiel von Keap1 und SPOP gezeigt werden konnte [66, 67]. Die Cullin3-vermittelte Ubiquitinierung führt bei Keap1 zu einer nicht-proteasomalen Degradation, auch der Cul3-Substratadapter MEL-26 akkumuliert in Zellen nach Cullin3-Hemmung [58, 66].

Beispiele für nicht-proteolytische Funktionen wurden für Cullin3 mit Roadkill (RDX) und KLHL22 als Substratadapter beschrieben. Cul3-RDX-Komplexe stabilisieren in *D.melanogaster* CAL1 (*chromosome alignment defect 1*), das bei der chromosomalen Segregation eine Rolle spielt und nach RDX-Hemmung proteasomal abgebaut wird [68]. Zusammen mit KLHL22 reguliert Cul3 die Lokalisation der Serin/Threonin-Protein-Kinase PLK1, die Prozesse der mitotischen Zellteilung reguliert und aufgrund der Cul3-KLHL22-Ubiquitinierung von Kinetochoren dissoziiert [69].

Funktionelle Beteiligungen von KCTD-Cullin3-Ubiquitin-Ligase-Komplexen sind z.B. für DNA-Transkription, DNA-Replikation und Zellmorphologie beschrieben. KCTD11/REN interagiert mit Cullin3 und vermittelt die HDAC1-Ubiquitinierung und Degradation, was die Inhibition von Gli-1- und Gli-2-abhängiger Gentranskription und damit verbunden die Hemmung des Zellwachstums zur Folge hat [17]. Zusammen mit Cullin3 wurde für das Protein KCTD13 eine Rolle bei der Ubiquitinierung und Degradation von RhoA

beschrieben, welches wiederum Prozesse wie Zellmorphologie, Bildung von Aktin-Stressfasern und die embryonale Gastrulation in *Xenopus* reguliert [62].

Obwohl für viele Proteine aus der KCTD-Familie eine prinzipielle Interaktion mit Cullin3 mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden konnte [14], ist bei den meisten die funktionelle Charakterisierung der Komplexe noch sehr lückenhaft. Insbesondere konnten die zellulären Substrate für viele der KCTD-Cullin3-Ubiquitin-E3-Komplexe noch nicht identifiziert werden.

1.5 KCTD5 und Cullin3

Die Interaktion zwischen Cullin3 und KCTD5 konnte bereits genauer charakterisiert werden [9]. Auch bei diesem Komplex wird vermutet, dass KCTD5 als ein Substratadapter für die Ubiquitinierung durch einen entsprechenden Cullin3-Ubiquitin-Ligase-Komplex fungiert [9].

Seitens des Cullin3-Proteins sind für die Interaktion die Aminosäuren 1 bis 75 am N-Terminus erforderlich, die auch an der Bindung bereits charakterisierter Substratadapter für Cullin3-E3-Ligase-Komplexe beteiligt sind [9, 59]. Auf Seiten des KCTD5 sind die BTB-Domäne und die zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren 40 bis 45 essentiell [9]. Die Struktur des KCTD5-Cullin3-Komplexes haben Balasco und seine Kollegen mittels 3D-Modellierung als einen Heterodecamer mit einem KCTD5-Pentamer und fünf Cullin3-Untereinheiten dargestellt, wobei jedes Cullin3-Molekül mit zwei KCTD5-Proteinen interagiert [70].

KCTD5 wird durch die Interaktion mit Cullin3 selbst nicht ubiquitiniert, sodass man annehmen kann, dass KCTD5 als Substratadapter für den Ubiquitinierungskomplex fungiert [9]. Der C-Terminus des KCTD5-Proteins ist demnach eine potentielle Bindestelle für Ubiquitinierungssubstrate.

1.6 Potentielle KCTD5-Interaktionspartner

Die KCTD5-mRNA konnte in vielen humanen Geweben und Zelllinien nachgewiesen werden. Eine starke mRNA-Expression wurde in Epithelzellen, im Dickdarm, in Zellen des Immunsystems und in vielen Tumorzellen gefunden (BioGPS.org [71], Proteinatlas.org [72, 73], RefExA Datenbank). Innerhalb der KCTD-Familie ist KCTD5 am engsten mit KCTD2 und KCTD17 verwandt, die nicht nur eine hohe Homologie im N-terminalen Teil, sondern auch homologe Sequenzen im C-Terminus aufweisen [8, 9, 15]. In der Studie des Cullin-RING Netzwerkes durch Bennett *et al.* wurden KCTD2 und KCTD17 ebenfalls als Interaktionspartner von Cullin3 identifiziert, sodass auch diese als Substratadapter fungieren könnten [14]. Ob diese drei Proteine bei ähnlichen zellulären

Prozessen eine Rolle spielen, wie für andere nah verwandte KCTD-Proteine vermutet wird [15], ist noch ungewiss. Für KCTD17 sind einige Interaktionspartner in Proteom-Studien identifiziert worden wie TNF2, ein Teil des Telosom/Shelterin-Komplexes, oder TUBGCP4, ein Teil des Gamma-Tubulin-Komplexes [74, 75], welche überwiegend zytoplasmatische Proteine sind, während die Interaktionspartner von KCTD5 auch im Zellkern vertreten sind.

Unter den mittels Yeast-two-hybrid-Screens identifizierten KCTD5-Interaktionspartnern befinden sich Kinasen wie ILK und NEK6, am Aufbau des Zytoskeletts beteiligte Proteine wie CKAP5 und GIT2, und Proteine, die zwischen Zytoplasma und Zellkern transportiert werden können wie der transkriptionelle Aktivator ELF3 aus der ETS Familie oder die Histonacetyltransferase EP300 (Datenbanken BioGRID [76], IntAct [77]). Diese Interaktionen sind jedoch noch nicht in Säugerzellen verifiziert worden.

Außer der Interaktion mit Cullin3 ist für KCTD5 nur die Interaktion mit GRASP55/GORASP2 in Säugerzellen beschrieben und näher charakterisiert worden [8, 9]. GRASP55/GORASP2 (*Golgi reassembly stacking protein of 55 kDa*) ist ein für den Aufbau der Golgi-Stapel verantwortlicher Faktor, der mit KCTD5 C-terminalen Aminosäuren 145-234 interagiert, wobei sich ein Komplex zwischen einem KCTD5-Pentamer und einem GRASP55-Monomer bildet [8, 78]. Die funktionelle Rolle dieser Interaktion wurde noch nicht analysiert.

Neben den bereits beschriebenen Proteinen konnte ich mit Hilfe des Yeast-two-hybrid-Systems im Rahmen meiner Diplomarbeit drei weitere Interaktionspartner für KCTD5 identifizierten, die damit mögliche Substrate Cullin3-basierter Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexe mit KCTD5 als Adapterprotein darstellen: MCM7, FAM193B und ZNF711 [11].

1.6.1 FAM193B

FAM193B, auch LOC54540 oder IRIZIO genannt, wurde als cDNA zum ersten Mal von Nagase und Kollegen beschrieben [79]. Laut den Datenbasen Uniprot.org und Ensemble [80, 81] kodiert das menschliche Genom für mehrere mögliche FAM193B-Spleißvarianten, von denen vier bis fünf Proteinvarianten translatiert werden können. Die Proteinvariante, deren Transkript sowohl in Menschen als auch in Mäusen beschrieben wurde, wurde im Zytoplasma lokalisiert [82]. Nach Deletion des Exons 9 konnte das Protein mittels Immunfluoreszenz im Zellkern detektiert werden, während die Inhibition des zellulären nukleären Exportes zu der nukleären Lokalisation für alle drei verwendeten FAM193B-Spleißvarianten führte [82]. Das steht zwar im Einklang mit den Ergebnissen von Picchione und seinen Kollegen, die für FAM193B ein Kernwanderungssignal (NLS)

und ein Kernexportsignal (NES) beschreiben, jedoch hat die Zellfraktionierung die nukleäre FAM193B-Lokalisation nicht bestätigt [82].

Für das FAM193B-Protein ist eine Mitwirkung bei der Entstehung von Rhabdomyosarcomen beschrieben: Zusammen mit PAX3-FOXO1 (*Paired box protein Pax-3* und *Forkhead box protein O1*) spielt es wahrscheinlich eine Rolle bei der Tumorentstehung, aber nicht bei seiner Aufrechterhaltung [82]. Bei PAX3-FOXO1 handelt es sich um ein Hybridprotein: Die Nukleinsäuresequenz für die PAX3-DNA-Bindungsdomäne wird vom Chromosom 2 auf 13 transloziert, sodass ein in-frame Fusionstranskriptionsfaktor entsteht [83].

FAM193B wird mit FAM193A zu der FAM193-Familie gezählt. Über strukturelle Merkmale oder mögliche Interaktionspartner ist wenig bekannt: Es gibt Untersuchungen auf Protein-ebene, die unter anderem GSK3A und GSK3B Kinasen, Ataxin-1-like oder Ubiquitin-konjugierendes E2-Enzym J2 als Interaktionspartner von FAM193B identifizierten [42, 75, 84].

Die Aminosäuren 313 bis 555 des FAM193B-Proteins wurden mittels Yeast-two-hybrid-Systems im Rahmen meiner Diplomarbeit als ausreichend für eine Interaktion mit KCTD5 identifiziert, sodass FAM193B als KCTD5-Interaktionspartner auch ein potentielles Ubiquitinierungssubstrat des Cullin3-KCTD5-Ubiquitin-Komplexes sein könnte [11].

Laut Udeshi *et al.* wird beim Protein FAM193B der Lysinrest 567 ubiquitiniert, wobei diese Ubiquitinierung weder bei der Degradation des Proteins eine Rolle spielt noch das Deubiquitinierungssystem auf diese Ubiquitinierung einen Einfluss hat [85].

1.6.2 ZNF711

Der Transkriptionsfaktor ZNF711 gehört zur Krüppel C₂H₂-Typ Zink-Finger-Protein-Familie. Der C₂H₂-Typ ist ein klassisches Zink-Finger Motiv (ZF), bei dem zwei Cysteine und zwei Histidine durch ein Zink-Ion stabilisiert werden. Die typische Struktur des C₂H₂-Zink-Fingers besteht aus einer α -Helix, deren N-terminale Aminosäuren die Protein-DNA Wechselwirkung vermitteln, und zwei β -Faltblättern, wobei die Anzahl der Zink-Finger von Protein zu Protein stark variieren und zwischen 1 und 30 betragen kann. Diese Art von Protein-DNA-Bindung wurde zuerst für den Transkriptionsfaktor IIIA beschrieben und später im Detail durch Kristallstrukturen analysiert [86, 87]. Bei vielen Proteinen sind mehrere ZF gleichzeitig an der DNA-Bindung beteiligt [88, 89]. Bekannt sind auch reine Proteininteraktionen oder Protein-RNA-Wechselwirkungen, die durch Zink-Finger vermittelt werden [90-93]. Bei der großen Anzahl der Transkriptionsfaktoren ist es nicht verwunderlich, dass 3% des menschlichen Genoms allein für die C₂H₂-Typ ZF-Proteine kodieren und dass dieses klassische ZF-Motiv nicht nur bei Säugetieren, sondern auch bei anderen Eukaryoten zu finden ist [94].

Der Transkriptionsfaktor ZNF711 hat 12 C₂H₂-ZF am C-Terminus und wird auf dem Chromosom X kodiert, in der Region Xq21.1-q21.3 [95]. Die ZNF711-mRNA wurde in verschiedenen Gehirnarealen und verstärkt in der Retina nachgewiesen, in humanen Zelllinien wird ZNF711 in SHSY5Y, Astrocyten und besonders stark in 293-Zellen exprimiert [96]. Die Funktion des ZNF711 ist noch weitgehend ungeklärt, es scheint jedoch an der Regulation von Genexpression beteiligt zu sein [96]. Eine verkürzte Variante des Proteins mit nur 719 Aminosäuren wurde bei zwei Familien mit der X-verknüpften mentalen Retardierung (XLMR) gefunden [97]. Als Interaktionspartner wurde bislang nur PHF8 experimentell beschrieben, eine potentielle Histondemethylase, deren Mutation oder Deletion ebenfalls bei Probanden mit XLMR identifiziert wurden [96, 98, 99]. PHF8 wird ähnlich wie ZNF711 in neuronalen Zellen exprimiert, wobei die PHF8-Mutationen einen negativen Effekt auf Genexpression und neuronale Zelldifferenzierung zur Folge haben [100, 101]. Beide Proteine zeigten eine Kollokalisierung an gemeinsamen Bindesequenzen bei fast 900 Genen und die Inhibition der Expression eines Bindungspartners zeigte teilweise auch einen negativen Effekt auf die DNA-Bindung des anderen Bindungspartners [96]. Mit Hilfe der OPHID Text Mining und Yeast-two-hybrid-Pooluntersuchungen wurden weitere ZNF711-Interaktionspartner identifiziert, wobei viele im Zytoplasma oder in der Zellmembran lokalisiert sind, wie z.B. MAP3K5, SLC16A2 oder IL1RAPL2 (Datenbanken der PSICQUIC bei EMBL-EBI und GeneCards [102]). Diese Protein-Protein-Interaktionen sind noch nicht experimentell evaluiert und können zurzeit nur als eine Orientierung für weitere Untersuchungen und mögliche biologische Funktionen von ZNF711 dienen.

Abgesehen von einer potentiellen Rolle des ZNF711 bei der XLMR gibt es Hinweise auf eine regulatorische Rolle des ZNF711 bei der Zellteilung, denn eine Ausschaltung des ZNF711 Gens durch eine spezifische RNAi führte zu einem Zellteilungsdefekt [103]. In Anbetracht der 1875 potentiellen Bindungsstellen des ZNF711 im menschlichen Genom und der beschriebenen positiven Regulation von *JARIDIC* oder *CDCA7* [96], die eine potentielle Rolle bei Chromatin-Ummodellierung und Zellteilung spielen, ist es nicht überraschend, dass ZNF711 als Transkriptionsfaktor in die Zellteilung involviert sein könnte.

Viele Transkriptionsfaktoren werden durch Modifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung reguliert [104-107]. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass ZNF711 ebenfalls durch posttranslationale Modifikationen in seiner Funktion reguliert wird. Laut proteomischen Analysen werden der Lysinrest 187 sumoliert und die Lysine an den Positionen 224 und 289 ubiquitiniert [108, 109]. Auch zelluläre Prozesse im Zuge der DNA-Schädigung haben Einfluss auf ZNF711: Nach der Schädigung der DNA in

HEK293-Zellen durch ionisierende Strahlung erfolgt Phosphorylierung am Serinrest 230 [110].

ZNF711 wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit als KCTD5 Interaktionspartner im Yeast-two-hybrid-Screen identifiziert [11]. Für die Interaktion mit dem Volllänge-Konstrukt KCTD5 waren dabei die ZNF711-Aminosäuren 170 bis 399 ausreichend, eine Region des Transkriptionsfaktors, in der die Zink-Finger 3 bis 10 lokalisiert sind.

1.6.3 MCM 7-ein Bestandteil der zellulären Replikationsmaschinerie

MCM7(*minichromosome maintenance protein 7*) ist eine Untereinheit des hexameren MCM-Komplexes RLF-M (*replication licensing factor*). Der RLF-M Komplex ist für die Initiation der DNA-Replikation essentiell und besteht aus sechs MCM-Proteinen: MCM2, -3, -4, -5, -6 und -7 [111, 112].

Der MCM-Komplex bindet als Doppel-Hexamer an die DNA, sodass die Replikation in beide Richtungen gestartet werden kann [113]. Die Struktur des archaischen MCM-Hexamers wurde kristallisiert (Abb. 1.4) [114, 115].

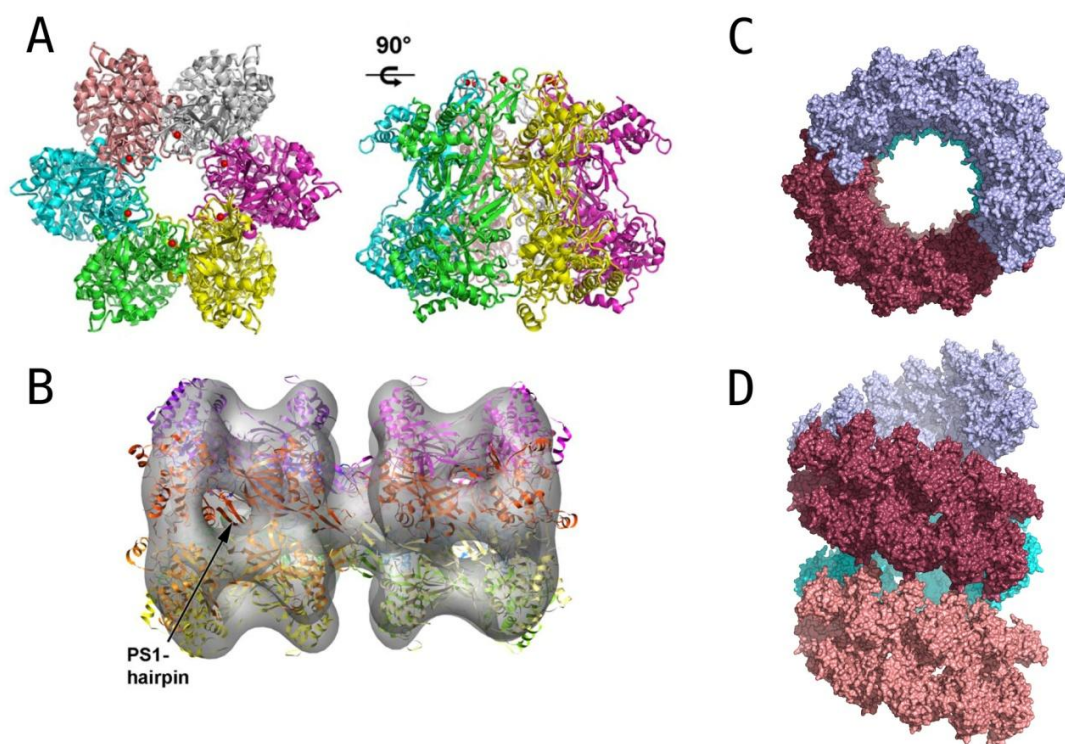


Abb. 1.4: Überblick über die kristallisierten Strukturen des archaischen MCM-Komplexes. (A) Kristallstruktur des *S.solfataricus* MCM (ssoMCM) homo-hexameren Komplexes, dargestellt von Brewster *et al.* [114]. (B) Die elektronenmikroskopische Karte des doppel-heterohexameren MCM-Komplexes von *M.thermoautotrophicus* mit dem ssoMCM-Hexamer, dargestellt von Brewster *et al.* [114]. (C-D) Protein Datenbank Nummer 4FDG [115], modelliert mit dem Programm Pymol. Ansicht des MCM-Ringfilaments frontal (C) und seitlich (D). Das Filament besteht aus Wiederholungen der 5 ssoMCM als die kleinste unsymmetrische Einheit. Diese Struktur spielt möglicherweise eine Rolle beim DNA-Metabolismus und weniger bei der DNA-Replikation [115].

Die Rekrutierung des MCM-Komplexes an DNA-Replikationsursprünge erfordert die Interaktion mit bestimmten zellulären Faktoren [116-118], während weitere MCM-Interaktionspartner wie GINS oder Cdt45 eine Rolle bei der Aktivierung der MCM-Helikase-Aktivität spielen [119, 120].

Die subzelluläre Lokalisation der MCM-Proteine unterliegt Veränderungen in Abhängigkeit von der Progression des Zellzyklus. Untersuchungen in *S.pombe* zeigten, dass der initiale Zusammenbau der MCM-Komplexe im Zytoplasma erfolgt und zunächst zur Bildung verschiedener Subkomplexe führt: MCM4/6/7 zusammen mit MCM2 und MCM3/5, welche anschließend in den Zellkern transloziert werden [121]. Die nukleäre Translokation erfolgt in *S.cerevisiae* in der G1-Phase, während die MCM-Proteine mit fortschreitender S-Phase wieder aus dem Zellkern exportiert werden [122]. In Pflanzen wurde für MCM-Proteine ebenfalls ein Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma beobachtet, in diesem Fall allerdings nur während der M-Phase [123].

Der nukleäre Export wird zum Teil durch die Phosphorylierung der MCM-Proteine reguliert [122]. Die MCM-Modifikation und die Interaktion mit verschiedenen zellulären Proteinen beeinflussen weiterhin die Funktion des RLF-M-Komplexes. MCM3 wird acetyliert, was mit einer Inhibition der DNA-Synthese korrelieren könnte [124, 125]. Die Phosphorylierung von MCM4 verhindert die Bindung des gesamten Komplexes an Chromatin [126]. Auch MCM7 wird im Verlauf des Zellzyklus modifiziert. Die Phosphorylierung am Serinrest 121 spielt vermutlich beim Übergang in die S-Phase eine Rolle [127], während die am Tyrosinrest 600 mit verstärkter Zellproliferation assoziiert wird [128]. Die Interaktion mit INT6/EIF3E, einem Translationsinitiationsfaktor, führt zu einer Ubiquitinierung und Stabilisierung des MCM7-Proteins und die Inhibition des 26S-Proteasoms vermindert die MCM7-Chromatindissoziation [129]. Auch die Interaktion mit dem zellulären Protein E6-AP, einer E3-HECT-Ubiquitin-Ligase, wurde beschrieben [130]. Vermutlich kann diese Ubiquitinierung zu einer Degradation von MCM7 führen. Beschrieben wurde auch die Beteiligung von USP7, einer Ubiquitin Carboxyl-terminalen Hydrolase 7, an der Dissoziation des MCM-Komplexes vom Chromatin. Ein USP7-Mangel bewirkt wie die Inhibition des 26S-Proteasoms eine verstärkte Bindung der MCM-Proteine an Chromatin und eine Verzögerung des Übergangs in die M-Phase [131]. MCM7 ist ein wichtiger Bestandteil des RLF-M, denn sein ATPase-Motiv ist essentiell für die Helikase-Aktivität des MCM4/6/7-Komplexes [132]. Eine Hemmung von MCM7 löst einen verstärkten Eintritt in die S-Phase aus [133]. Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch DNA-Viren in der Lage sind, die Funktion von MCM7 durch direkte Wechselwirkung oder indirekt zu beeinflussen. Das Humane Zytomegalievirus (HCMV) und das E4-Protein der Humanen Papillomaviren (HPV) vermindern die initiale Bindung der MCM-Proteine an Chromatin, während das Epstein-Barr Virus (EBV) die

chromosomale Replikation durch MCM4-Phosphorylierung hemmt [134-137]. Die großen regulatorischen Proteine des Adeno-assoziierten Virus 2 (AAV-2) Rep78/Rep68, die ebenfalls zur Hemmung der Zellproliferation führen, gehen eine direkte Interaktion mit MCM-Proteinen ein [138, 139]. Neben einer Interaktion zwischen Rep78/Rep68 und MCM7 wurde MCM7 als essentiell für die AAV2-Replikation beschrieben [140].

1.7 Interaktion von KCTD5 mit den großen Rep-Proteinen des AAV-2

Im Zusammenhang mit putativen Interaktionspartnern spielt die subzelluläre Lokalisation des KCTD5 naturgemäß eine entscheidende Rolle. Die Identifizierung der nukleär lokalisierten KCTD5-Interaktionspartner ZNF711 und MCM7 erfolgte im Yeast-two-hybrid-Screen jedoch durch die Bindung an das zytoplasmatische KCTD5-Wildtyp-Protein.

Eine Veränderung in der KCTD5 Lokalisation wurde nach Interaktion mit zwei weiteren KCTD5-Interaktionspartnern gezeigt: den großen regulatorischen Proteinen Rep78 und Rep68 von AAV-2, die für den Lebenszyklus des Adeno-assoziierten Virus essentiell sind [10, 141-143]. Die großen Rep-Proteine sind nukleär lokalisierte Proteine und interagieren mit dem C-Terminus des KCTD5. Diese Interaktion hat die Translokation des KCTD5 in den Zellkern zur Folge [10].

Trotz der Interaktion mit Cullin3 wurde für KCTD5 keine Ubiquitinierung nachgewiesen, sodass KCTD5 wahrscheinlich als Substratadapter für den Ubiquitinierungskomplex fungiert ohne selbst ubiquitiniert zu werden [9]. In diesem Fall ist der C-Terminus des KCTD5 Proteins eine potentielle Bindestelle für Ubiquitinierungssubstrate. GRASP55 wurde noch nicht als mögliches Substrat des Cullin3-KCTD5 Ligase-Komplexes untersucht, allerdings sollte für diese Interaktion ebenfalls der KCTD5 C-terminale Teil essentiell sein [8]. Auch für die Interaktion mit den großen Rep78/Rep68-Proteinen sind die letzten 33 C-terminalen Aminosäuren des KCTD5 notwendig [10], was die Rep-Proteine als potentielle Cullin3-KCTD5-Ubiquitinierungssubstrate erscheinen lässt. Neben der nukleären KCTD5-Translokation durch die Rep78/Rep68-Proteine wurde wie bereits erwähnt eine Interaktion zwischen den großen Rep-Proteinen und MCM7 gefunden [139], einem der von mir identifizierten KCTD5-Interaktionspartner. Diese gegenseitigen KCTD5-Rep, Rep-MCM7 und KCTD5-MCM7 Interaktionen, die Rep-abhängige nukleäre KCTD5-Translokation und die essentielle Rolle von MCM7 bei der AAV-2-DNA-Replikation weisen sehr stark auf eine funktionelle Beteiligung von KCTD5 an der Regulation der AAV-2-Replikation hin.

1.8 Die Adeno-assoziierten Viren (AAV)

Das Adeno-assoziierte Virus gehört zur Familie Parvoviridae und ist eines der kleinsten unbehüllten Viren mit einem einzelsträngigen DNA-Genom. AAV vom Subtyp 2 (AAV-2) hat ein 4,7 kb großes Genom, welches in seinem offenen Leserahmen für vier regulatorische Rep-Proteine und drei Cap-Strukturproteine unter der Kontrolle von insgesamt drei Promotoren kodiert [144-146]. Die AAV-2 endständigen Genomsequenzen, auch ITRs (*inverted terminal repeats*) genannt, sind für die Replikation, Transkription und Verpackung des AAV-Genoms im produktiven Infektionszyklus essentiell [147-149]. Für seinen produktiven Infektionszyklus ist AAV-2 auf die Ko- oder Superinfektion mit einem Helfervirus angewiesen, zu denen unter anderem das Adenovirus oder verschiedene Herpesviren gehören [150-152]. In Abwesenheit von Helfervirus kommt es in vielen Fällen zu einer Integration der AAV-2 DNA in das zelluläre Genom, die bevorzugt in Bereichen mit Bindungsstellen für die großen regulatorischen Rep-Proteine Rep78/Rep68 erfolgt [141, 153, 154].

Die großen regulatorischen Proteine Rep78/Rep68 sind virale Nichtstrukturproteine, die viele AAV-Funktionen regulieren. Neben der Beteiligung an der ortsspezifischen AAV-Integration durch homologe Rekombination [141] sind sie für die Induktion der AAV-2 DNA-Replikation und der Synthese der Strukturproteine während des produktiven Infektionszyklus essentiell [142, 143, 155, 156]. Für den AAV-Lebenszyklus und die verschiedenen Teilschritte der AAV-2-DNA-Replikation weisen sie die notwendigen ATPase-, Helikase- und sequenzspezifische Endonukleaseaktivitäten auf [157-160].

In vielen Fällen interagieren die großen Rep-Proteine mit zellulären Proteinen. Die Interaktion der großen Rep-Proteine mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 wurde bei der Aktivierung der Promotoren p19 und p40 beschrieben [161]. Eine Interaktion zwischen Topors und den großen Rep-Proteinen beeinflusst möglicherweise die AAV-Genexpression [162] und für die AAV-Replikation ist die Beteiligung des MCM-Komplexes erforderlich, wobei Rep78 mit MCM2, MCM5, MCM6 und MCM7 interagieren soll [139, 140].

Die Interaktionen zwischen Rep78/Rep68 und zellulären Proteinen können ferner bestimmte zelluläre Prozesse beeinflussen. Eine Inhibition der durch PKA regulierten Gene kann als Folge der Rep-Interaktion mit PrKX (*putative protein kinase X*) und PKA (*protein kinase A*) betrachtet werden [163]. Die Rep78-Interaktion mit CDC25 oder p53 führt zu einem Arrest der Zellen in der S-Phase, genauso wie die durch Rep78 vermittelte Rb Phosphorylierung [138, 164, 165].

KCTD5 wurde bisher als einziger zytoplasmatischer Interaktionspartner der Rep78/Rep68-Proteine charakterisiert [10].

1.9 Ziele der Doktorarbeit

Auf Grund charakteristischer Proteinmotive und der nachgewiesenen Interaktion mit Cullin3 ist KCTD5 als möglicher Substratadapter für Cullin3-basierte Ubiquitin-Ligase-Komplexe beschrieben worden. Cullin3-basierte E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexe vermitteln die Ubiquitinierung zellulärer Proteine, die als Konsequenz zu einer Degradation, Stabilisierung oder Funktionsänderung des modifizierten Proteins führen kann. Aufgrund der Tatsache, dass bisher noch keine möglichen Substrate für eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität des Cullin3-KCTD5-Proteinkomplexes nachgewiesen und charakterisiert werden konnten, ist die zelluläre Funktion dieses Komplexes und damit auch des KCTD5-Proteins weitgehend ungeklärt.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit habe ich mit Hilfe des Yeast-two-hybrid-Systems mit MCM7, ZNF711 und FAM193B drei potentielle KCTD5-Interaktionspartner identifiziert, die sowohl im Zellkern (ZNF711 und MCM7) als auch im Zytoplasma (FAM193B und MCM7) lokalisiert sind. Das Wildtyp-KCTD5 ist ein überwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes Protein, welches aber nach Deletion der Aminosäuren 203-234 unter Bildung stabiler Dimere beobachtet in den Kern transloziert wird. Eine solche nukleäre Translokation kann auch für das Volllänge-Protein nach Überexpression viraler KCTD5-Interaktionspartner, der großen regulatorischen Proteine Rep78/Rep68 des Adeno-assoziierten Virus (AAV-2), beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die im Yeast-two-hybrid-Screen identifizierten KCTD5-Interaktionen mit MCM7, ZNF711 und FAM193B in Säugerzellen verifiziert sowie die an der jeweiligen Wechselwirkung beteiligten Proteindomänen und die funktionelle Bedeutung dieser Wechselwirkung im Detail charakterisiert werden. Insbesondere sollten die drei KCTD5-Bindungspartner auf die Bildung trimerer Komplexe sowohl mit KCTD5 als auch mit Cullin3 und die Konsequenzen einer daraus möglicherweise resultierenden Mono- oder Poly-Ubiquitinierung untersucht werden.

Von besonderem Interesse für die Arbeit war die Fragestellung, ob Rep78/Rep68 und AAV-2 die MCM7-KCTD5-Interaktion und die dadurch vermittelte putative MCM7-Ubiquitinierung beeinflussen. Da eine Interaktion zwischen Rep78 und MCM7 beschrieben war, sollte die Rolle der KCTD5- und MCM7-Proteine bei der AAV-2-Replikation untersucht werden.

Ziel der Doktorarbeit war es, durch die oben genannten Untersuchungen die zelluläre Funktion des KCTD5 und des KCTD5-Cullin3-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes aufzuklären und die funktionellen Folgen dieser Interaktion für MCM7, ZNF711 und FAM193B zu zeigen.

2 Material

2.1 Geräte

Agarosegelelektrophorese-Apparatur	Biorad
Avanti J-25 Zentrifuge, Rotor JLA 16250	Beckmann
Dual Gel Caster mighty small SE246	Hoefer
Elektronische Präzisionswaage	Sartorius
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA
FACS-Gerät	BD FACSCalibur (E5985)
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus	Zeiss
Geldokumentationssystem UV-Systeme	Intas
Inkubationsschüttler AK 85	Infors (AG) HT
Inkubationsschüttler G25	New Brunswick Scientific
Inverses Fluoreszenzmikroskop DM IL	Leica
Inverses Lichtmikroskop CK2	Olympus
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, LSM510Meta
Lumimeter CentroLB 960	Bertold Technologies
Netzgerät Power Pac 300 und 3000	Bio-Rad
pH-Messgerät Delta 320	Mettler Toledo
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Apparatur	Biorad
Sonifikator Sonifier 450 / Multistar	Branson / Störk Tronic
Spektralphotometer DU 530	Beckman
Thermocycler GeneAmp [®] PCR System 2400&9700	Applied Biosystems
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph
UV-Transilluminator Chroma 48	Laborgeräte Vetter GmbH
Vakuumentrifuge DNA SpeedVac DNA 110	Savant
Western Blot Apparatur	Biorad
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich
Zentrifuge Omnifuge 2.0RS	Heraeus Sepatech

2.2 Chemikalien

Roth

2-Propanol
 Acrylamid Rotiphorese Gel 30
 Agarose NEEO Ultra-Qualität
 Bromphenolblau Na-Salz
 D(+)-Saccharose
 Dimethylsulfoxid
 Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat
 Essigsäure (Eisessig, 100 %)
 Ethanol
 Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)
 Formaldehyd (37 %)
 Glycerin (86 %)
 Glycin, 99 % zur Synthese
 Guanidin-Hydrochlorid
 Harnstoff
 Hepes
 Kaliumchlorid
 Magnesiumchlorid Hexahydrat
 Methanol
 Milchpulver
 Natriumchlorid
 Natriumdodecylsulfat (SDS), ultra pure
 Natriumhydrogenphosphat Monohydrat
 Natriumhydroxid
 β -Mercaptoethanol
 TEMED
 Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
 Tween 20

Biochrom

Penicillin/Streptomycin
 Trypsin/EDTA

Merk

Ammoniumchlorid
 Imidazol
 Kaliumdihydrogenphosphat
 Calciumchlorid Dihydrat
 Magnesiumsulfat Heptahydrat
 Natriumacetat
 Natriumchlorid
 Triton X-100

Sigma / Sigma-Aldrich

Ammoniumpersulfat
 Natriumacid
 Propidiumiodid

GIBCO

Dulbecco's Eagle Medium mit GlutaMAX
 Fötale Kälberserum (FCS)

Nippon Genetics

Midori Green

BioChemika

Nonidet[®]P40

Becton, Dickinson and Company

Agar
 Bacto[™] Peptone
 Bacto[™] Trypton

Southern Biotech

DAPI Fluoromount-G

Amresco

Cycloheximide Crystalline Ultra Pure

2.3 Medien, Lösungen, Puffer

2.3.1 Medien

DMEM (Vollmedium)	10 % 100 µg/ml 100 µg/ml	fötale Kälberserum Penicillin Streptomycin
LB-Medium	10 g/l 5 g/l 10 g/l	Bacto-Trypton Bacto BBL Yeast Extract NaCl
LB-Medium mit Ampicillin	100 µg/ml	Ampicillin in LB-Medium
LB-Medium mit Kanamycin	50 µg/ml	Kanamycin in LB-Medium
LB-Platten mit Ampicillin	1,5 % [w/v] 100 µg/ml	Agar in LB-Medium, autoklavieren Ampicillin

2.3.2 Lösungen

Agarosegel-Lösung	0,8-2 % [w/v]	Agarose in 1×TAE-Puffer
Ampicillin-Stocklösung	100 mg/ml	Ampicillin in bidest. H ₂ O
APS-Stocklösung	10 % [w/v]	APS in bidest. H ₂ O
Calciumchlorid	220-260 mM	CaCl ₂ in bidest. H ₂ O
Cycloheximid-Stammlösung	10 mg/ml	in DMSO
Fixierlösung für Immunfluoreszenz	3,7 %	Formaldehyd in PBS lösen
Hybridisierungslösung (Southern Blot)	125 mM 5 % 250 mM 1 mM 45 %	Phosphat-Puffer, pH 7,2 SDS NaCl EDTA Formamid
Kanamycin-Stocklösung	10 mg/ml	Kanamycin in bidest. H ₂ O
Lösung A (Southern Blot Detektion)	5 % 5 %	SDS Milchpulver in PBS

Lösung B (Southern Blot Detektion)	1 %	SDS in PBS
Lysozym	10 mg/ml	Lysozym in bidest. H ₂ O
Milchlösung (Blocklösung)	6 % [w/v]	Milchpulver in PBS
Milchlösung (Antikörperinkubation)	6 % [w/v] 0,3 % [w/v]	Milchpulver in PBS Tween 20
Natriumacetat	3M	Na-Acetat in bidest. H ₂ O pH 7,0 mit Eisessig einstellen
Permeabilisierungslösung	1 %	Triton X-100 in PBS lösen
1. Waschlösung (Southern Blot)	2× 0,1 %	SSC Puffer SDS
2. Waschlösung (Southern Blot)	0,1× 0,1 %	SSC Puffer SDS
2.3.3 Puffer		
2×BBS-Puffer (Transfektion)	50 mM 280 mM 1,5 mM	BES NaCl Na ₂ HPO ₄ pH 6,9 einstellen
10×DNA-Ladepuffer	0,25 % 25 % 100 mM	Bromphenolblau Ficoll Typ 400 EDTA
3×DNA-Lysepuffer	3 % 70 mM 25 mM	Sarkosyl Tris, pH 8,5 EDTA pH 8,0
FACS Flow	0,01 %	Natriumacid in PBS
Freeze-Squeeze-Puffer (DNA-Extraktion)	0,3 M 1 mM	Na-Acetat, pH 7,0 EDTA
Gel-Denaturierungspuffer (Southern Blot)	0,5 M 1,5 M	NaOH NaCl

Gel-Neutralisationspuffer (Southern Blot)	0,5 M	Tris-HCl, pH 7,0
	1,5 M	NaCl
Lysepuffer (Hirt-Extraktion)	10 mM	Tris, pH 8,0
	1 mM	EDTA
	1 %	SDS
	50 µg/µl	Proteinase K
NiNTA-Elutionspuffer	200 mM	Imidazol in 2×Proteinprobenpuffer
NiNTA-Lysepuffer	6 M	Guanidin-HCl
	0,1 M	Na ₂ HPO ₄
	0,01 M	Tris-HCl pH 8,0
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	10 mM	Imidazol
NiNTA-Puffer A	8 M	Harnstoff
	0,1 M	Na ₂ HPO ₄
	0,01 M	Tris-HCl pH 6,3
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	20 mM	Imidazol
NiNTA-Waschpuffer	8 M	Harnstoff
	0,1 M	Na ₂ HPO ₄
	0,01 M	Tris-HCl pH 8,0
	10 mM	β-Mercaptoethanol
	10 mM	Imidazol
PBS-T	0,1 % [w/v]	Tween 20 in PBS
PBS	8 mM	Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O
	2 mM	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O
	150 mM	NaCl
		pH 7,4 einstellen
Phosphat-Puffer	0,5 M	Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O, pH 7,2
2×Proteinprobenpuffer	2 mM	EDTA
	100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	4 % [w/v]	SDS
	20 % [v/v]	Glycerin
	10 % [w/v]	β-Mercaptoethanol
	0,02 % [w/v]	Bromphenolblau

10×Proteintransferpuffer (WB)	250 mM 1,92 M	Tris Glycin in bidest. H ₂ O
1×Proteintransferpuffer (WB)	1/10 20 %	10×Proteintransferpuffer in bidest.H ₂ O Methanol
RAF-Puffer	20 mM 300 mM 10 % [v/v] 1 % [v/v]	Tris-HCl, pH 8,0 NaCl Glycerin NP40
Sammelgelpuffer (SDS-PAA-Gele)	0,75 M 0,4 % [w/v]	Tris/HCl, pH 6,8 SDS
SDS-Laufpuffer	50 mM 380 mM 0,1 % [w/v]	Tris Glycin SDS
20×SSC	3 M 0,3 M	NaCl tri-Citrat-Dihydrat pH 7,0 einstellen
2×SSC	1/10	20×SSC in bidest.H ₂ O
STET-Puffer	80 g/l 5 % [v/v] 50 mM 10 mM	Saccharose Triton X-100 EDTA, pH 8,0 Tris/HCl, pH 8,0
1×TAE-Puffer	40 mM 1 mM 0,114 %	Tris EDTA Essigsäure 100 % pH 8,5 einstellen
1×TE	10 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 7,5 EDTA, pH 8,0
20×Transferpuffer (Southern Blot)	0,5 M 0,33 M 0,17 M	Phosphat-Puffer, pH 6,8 NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O
Trenngelpuffer (SDS-PAA-Gele)	1,5 M 0,4 % [w/v]	Tris/HCl, pH 8,8 SDS

Triton-Lyse-Puffer	1 %	Triton X-100
	25 mM	Glycylglycin pH 7,8
	15 mM	MgSO ₄
	4 mM	EGTA
	1 mM	DTT
	10 %	Glycerin

2.4 Fertiglösungen

Roti-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25/24/1)	Roth
SuperSignal West Pico Chemilumineszent Substrate	Pierce
ECL Solution (Stable Peroxide Solution)	PromoKine
pegGOLD RNAPure™	Peqlab

2.5 Affinitätsmatrizen

Anti-FLAG-M2 Affinitätsgel	Sigma
Protein A Sepharose CL-4B	GE Healthcare
NiNTA-Agarose	Qiagen

2.6 Kits

JetStar 2,0 Plasmid Midi-/Maxiprep Kit	Genomed
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Stratec
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Biotin Labeling Kit	ThermoScientific

2.7 Enzyme

Restriktionsendonukleasen: <i>Bam</i> HI, <i>Bg</i> III, <i>Bsr</i> GI, <i>Bst</i> BI, <i>Cla</i> I, <i>Dpn</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III, <i>Msc</i> I, <i>Nco</i> I, <i>Not</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Sal</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Sph</i> I, <i>Xba</i> I, <i>Xho</i> I	New England Biolabs
Restriktionspuffer: NEB2, NEB4, CutSmart	New England Biolabs
Alkalische Phosphatase (CIP), 10.000 U/ml	New England Biolabs
T4-DNA-Polymerase, 400.000 U/ml	New England Biolabs
T4-Ligase, 400.000 U/ml	New England Biolabs
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase, 2,5 U/μl	Stratagene
<i>Pfu</i> Ultra Polymerase, 2,5 U/μl	Stratagene
Phusion high-fidelity DNA Polymerase, 2,0 U/μl	Biolab

Reverse Transkriptase (RT) Polymerase	Applied Biosystems
T4 Polynukleotid Kinase, 10.000 U/ml	Biolab
10×Polynukleotid Kinase Puffer	Biolab
Lysozym	Sigma
RNase A	Genomed
Bright Glo Luciferase	Promega
Proteasom-Inhibitor MG132, 3mM in DMSO	Sigma
Aprotinin, 1,5 mg/ml in H ₂ O	Sigma
Pepstatin A, 1 mg/ml in Methanol	Sigma
Proteinase K	Roth

2.8 Größenmarker

DNA-Größenmarker

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
---------------------------	-----------

Proteingrößenmarker

Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas
--	-----------

2.9 Antikörper

Primärantikörper

anti-FLAG polyklonaler Antikörper (rabbit)	Sigma
anti-FLAG-M2 monoklonaler Antikörper (mouse)	Sigma
anti-Rep (303.9) monoklonaler Antikörper (mouse)	Labor AG Heilbronn [166]
anti-Myc (C-19) IgG polyklonaler Antikörper (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology
anti-Myc monoklonaler Antikörper (mouse)	Santa Cruz Biotechnology
anti-Tubulin monoklonaler Antikörper (mouse)	Calbiochem
anti-Histidin monoklonaler Antikörper (mouse)	Qiagen
anti-GFP polyklonaler Antikörper (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology
anti-MCM7 monoklonaler Antikörper (mouse)	Santa Cruz Biotechnology
Streptavidin-HRP, Pierce High Sensitivity	Thermo Scientific

Sekundärantikörper

goat anti-rabbit IgG Antikörper, Peroxidase konjugiert	Dianova
goat anti-mouse IgG Antikörper, Peroxidase konjugiert	Dianova
goat anti-mouse Antikörper FITC, Fluoreszenzfarbstoff konjugiert	Dianova
Absorptionsmaximum: 492 nm / Emissionsmaximum: 520 nm	
goat anti-rabbit Antikörper TRITC, Fluoreszenzfarbstoff konjugiert	Dianova
Absorptionsmaximum: 550 nm / Emissionsmaximum: 570 nm	

2.10 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon in lyophilisierter Form bezogen, in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l in TE-Puffer gelöst und anschließend auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/ μ l eingestellt.

Tabelle 2.1: Oligonukleotide, die in doppelsträngiger Form direkt in Vektoren ligiert wurden.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
CMV-miniPromotor	5'- AATTCGAGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGC→ AGAGCTCGTTTGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA -3'

Tabelle 2.2: Tabellarische Auflistung der Oligonukleotide, die als PCR-Primer für die Klonierung von Plasmidkonstrukten verwendet wurden. Erkennungsstellen für Enzyme sind rot markiert.

Konstrukt	Enzym	Sequenz (5'→3')
MCM7-1/650	EcoRI	fw: ATTTAAGAATTCATGGCACTGAAGGACTACGCG
	XbaI	rv: AATTAATCTAGATCACTGCCCTTGTCTCCTAGAAG
MCM7-1/590	EcoRI	fw: ATTTAAGAATTCATGGCACTGAAGGACTACGCG
	XbaI	rv: AATTAATCTAGATCACTCTCGCCTCATCTCCACGTA
MCM7-1/500	EcoRI	fw: ATTTAAGAATTCATGGCACTGAAGGACTACGCG
	XbaI	rv: AATTAATCTAGATCAGCTGCGGCGAGGGTTGTAGCG
KCTD5-1/160	EcoRI	fw: AATTAAGAATTCATGGCGGAGAATCACTGCGAG
	XbaI	rv: AATTAATCTAGATCACACACGGTACACATGCTTCAC
KCTD5-1/145	EcoRI	fw: AATTAAGAATTCATGGCGGAGAATCACTGCGAG
	XbaI	rv: AATTAATCTAGATCAGTCTCGTTCTCTAATTTTGTC
PCBP2	BamHI	fw: AATTAAGGATTCCTCCCGCCCGCTCCCCTTTTCCCC
	EcoRI	rv: AATTAAGAATTCGCGCTCACCCGCCCGGCCAG
C2orf34	BamHI	fw: AATTAAGGATTCAGCTCGAGATGAAGCACAGAA
	EcoRI	rv: AATTAAGAATTCCEAACCCACATGATTCCTCC
JARID1C	BamHI	fw: AATTAAGGATTC AAGGACAACCCCGCGGAAGGAT
	EcoRI	rv: AATTAAGAATTCATCGTCGGACCCCGGCTCCAT
pUC131-ZNF711	EcoRI	fw: TTAATTGAATTCATGGATTCAGGCGGTGGAAGTCTTGATTGCACACG
	PstI	rv: TTAACAGTCCTTGTTCTGCAGTTTCATAGTCACAGT
pBS-ZNF711	PstI	fw: TGCACACGTGCAAATACTGTGACTATGAAACTGCAG
	XbaI	rv: TTAATTCTAGATTACATAAGAGCCTCTTTGTGGTGCCTCATAATATG

2.11 Plasmide

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide für die Expression in eukaryotischen Zelllinien

Plasmid	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pEYFP-C1	kodiert <i>yellow fluorescent protein</i> unter Kontrolle des CMV-Promotors. Wurde als Transfektionskontrolle eingesetzt	Clontech
pKEX-Rep68	CMV-getriebenes Rep68-Protein	Labor AG Heilbronn [167]
pKEX-Rep68-NLS	CMV-getriebenes Rep68-Protein mit Mutation im Kernwanderungssignal	Labor AG Heilbronn [10, 168]
pKEX-Rep78	CMV getriebenes Rep78-Protein	Labor AG Heilbronn [167]
pKEX-Rep78-NLS	CMV-getriebenes Rep78-Protein mit Mutation im Kernwanderungssignal	Labor AG Heilbronn [10, 168]
pMyc-Cul3	CMV-getriebenes Myc-getaggttes Cullin3	Labor AG Heilbronn
pCATCH-His-Cullin3	His getaggttes Cullin3 unter Kontrolle des CMV-Promotors	Cullin3-ORF wurde aus pMyc-Cullin3 in den pCATCH-His-Vektor kloniert
pCATCH	kodiert hochimmunogenes FLAG-Epitop unter CMV-Promotor für die Generierung N-terminaler FLAG-Tag-Fusionsproteine	[169]
pCATCH- KCTD5	FLAG-getaggttes KCTD5 unter Kontrolle des CMV-Promotors	Labor AG Heilbronn [10]
pCATCH-KCTD5-47/234	CMV-getriebene KCTD5 N-terminale Deletionsmutante (AS 47-234)	Labor AG Heilbronn [10]
pCATCH-KCTD5-1/203 pCATCH-KCTD5-1/191 pCATCH-KCTD5-1/181 pCATCH-KCTD5-1/170	FLAG-getaggtte KCTD5 C-terminale Deletionsmutanten. Alle Konstrukte stehen unter Kontrolle des CMV-Promotors	Labor AG Heilbronn [11]
pCATCH-KCTD5-1/160	KCTD5 C-terminale Deletionsmutante bis AS 160 mit vorgeschaltetem CMV-Promotor	KCTD5-1/234 wurde für PCR als Matrize verwendet. Das PCR-Produkt wurde in den pCATCH-Vektor kloniert.
pCATCH-KCTD5-1/145	KCTD5 C-terminale Deletionsmutante bis AS 145 mit vorgeschaltetem CMV-Promotor	KCTD5-1/234 wurde für PCR als Matrize verwendet. Das PCR-Produkt wurde in den pCATCH-Vektor kloniert
pCATCH-MCM7	CMV-getriebenes MCM7 mit N-terminalem FLAG-Tag	Stefan Weger
pMyc-MCM7	CMV-getriebenes MCM7 mit N-terminalem Myc-Tag	Stefan Weger
pCATCH-His-MCM7	CMV-getriebenes, His-getaggttes MCM7	MCM7-ORF, umkloniert aus pCATCH-MCM7 in den pCATCH-His-Vektor

Plasmid	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pCATCH-MCM7-1/650	FLAG-getaggte MCM7 C-terminale Deletionsmutante bis AS 650 unter Kontrolle des CMV-Promotors	pCATCH-MCM7 wurde als Matrize für PCR verwendet. MCM7-PCR-Produkte wurden über EcoRI/XbaI in den pCATCH-Vektor kloniert.
pCATCH-MCM7-1/590	FLAG getaggte MCM7 C-terminale Deletionsmutante bis AS 590 unter Kontrolle des CMV-Promotors	
pCATCH-MCM7-1/500	FLAG getaggte MCM7 C-terminale Deletionsmutante bis AS 500 unter Kontrolle des CMV-Promotors	
pMyc-MCM7-1/650	CMV-getriebene Myc-getaggte C-terminale MCM7 Deletionsmutante bis AS 650	pCATCH-MCM7 wurde als Matrize für PCR verwendet. MCM7-PCR-Produkte wurden über EcoRI/XbaI in den pMyc-Vektor kloniert
pMyc-MCM7-1/590	CMV-getriebene Myc-getaggte C-terminale MCM7 Deletionsmutante bis AS 590	
pMyc-MCM7-1/500	CMV-getriebene Myc-getaggte C-terminale MCM7 Deletionsmutante bis AS 500	
pCATCH-His-MCM7-1/650	His getaggte MCM7 C-terminale Deletionsmutante mit AS 1-650 unter Kontrolle des CMV-Promotors	Die C-terminalen MCM7-Deletionsmutanten wurden aus den pCATCH-MCM7-Vektoren in den pCATCH-His-Vektor umklontiert
pCATCH-His-MCM7-1/590	His getaggte MCM7 C-terminale Deletionsmutante mit AS 1-590 unter Kontrolle des CMV-Promotors	
pCATCH-His-MCM7-1/500	His-getaggte MCM7 C-terminale Deletionsmutante mit AS 1-500 unter Kontrolle des CMV-Promotors	
pMYC-DelB26	Myc-Tag mit den Topors Aminosäuren 491 bis 576 und einem vorgeschalteten CMV Promotor	Stefan Weger
pTAV2.0	Sequenz des kompletten AAV-2 Wildtypgenoms	AG Heilbronn
pUC131	pUC13 abgeleitetes Plasmid mit erweiterter Multiple Cloning Site	AG Heilbronn
pUC131-ZNF711	ZNF711 Aminosäuren 1-484	PCR-Produkt aus der RT-PCR wurde in den pUC131-Vektor kloniert. Als Matrize für die PCR diente aufgereinigte RNA aus 293-Zellen.
pBS-ZNF711	ZNF711 Aminosäuren 485-719	PCR-Produkt aus der RT-PCR wurde in den pBS-Vektor kloniert. Als Matrize diente RNA aus 293-Zellen.
pCATCH-ZNF711	FLAG-getaggtes Volllänge-ZNF711-Protein unter Kontrolle des CMV Promotors	Drei-Komponenten-Ligation: ZNF711-1/484 aus pUC131-ZNF711 und ZNF711-485/719 aus pBS-ZNF711 wurden in den pCATCH-Vektor kloniert.
pMyc-ZNF711	Myc getaggtes ZNF711 mit vorgeschaltetem CMV-Promotor	ZNF711-ORF, umklontiert aus pCATCH-ZNF711 in den pMyc-DelB26 Vektor

Plasmid	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pCATCH-His-ZNF711	His-getaggttes ZNF711 mit vorgeschaltetem CMV-Promotor	ZNF711, umkloniert aus pCATCH-ZNF711 in den pCATCH-His-Vektor
pCATCH-FAM193B	FLAG-getaggttes FAM193B unter Kontrolle des CMV-Promotors	Stefan Weger
pMyc-FAM193B	Myc-getaggttes FAM193B unter Kontrolle des CMV-Promotors	Stefan Weger
pCATCH-His-FAM193B	His-getaggttes FAM193B mit vorgeschaltetem CMV-Promotor	FAM193B-ORF wurde aus pCATCH-FAM193B in den pCATCH-His-Vektor umkloniert
pMyc-Ubiquitin	MYC-getaggttes Ubiquitin mit vorgeschaltetem CMV-Promotor	Umklonierung des Ubiquitin-ORFs aus dem pCATCH-His-Vektor in den pMyc-Vektor
pCATCH-His-Ubiquitin	His-getaggttes Ubiquitin mit vorgeschaltetem CMV-Promotor	Labor AG Heilbronn; Stefan Weger
pHIV-Luci	Luciferase unter der Kontrolle des HIV-3'-Long terminal repeat (LTR)	Stefan Weger
pPCBP2-Luci	ZNF711-Bindesequenz mit nachgeschaltetem CMV-Minimal-Promotor und Luciferase	PCR-Amplifikation der ZNF711-Bindestellen an den Gensequenzen von <i>PCBP2</i> , <i>JARID1C</i> und <i>C2orf34</i> aus HeLa-Gesamt-DNA. Klonierung als 3-Komponenten-Ligation mit CMV-Minimal-Promotor, ZNF711-Bindesequenz und dem pLuci-Vektor
pJARID1C-Luci	ZNF711-Bindesequenz mit nachgeschaltetem CMV-Minimal-Promotor und Luciferase	
pC2orf34-Luci	ZNF711- Bindesequenz mit nachgeschaltetem CMV-Minimal-Promotor und Luciferase	
pDRIME-CMV-Red-shKCTD5 B	Gegen KCTD5 (Nukleotide 254-275) gerichtete shRNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Stefan Weger
pDRIME-CMV-Red-shKCTD5 D	Gegen KCTD5 (Nukleotide 324-345) gerichtete shRNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Stefan Weger
pDRIME-CMV-Red-shKCTD5 E	Gegen KCTD5 (Nukleotide 383-404) gerichtete shRNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Stefan Weger
pDRIME-CMV-Red-shKCTD5 F	Gegen KCTD5 (Nukleotide 506-527) gerichtete shRNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Stefan Weger
pSuper-shCullin3 A	Gegen Cullin3 Nukleotide 262-280 gerichtete shRNA unter Kontrolle des H1-Promotors	Stefan Weger
pSuper-shCullin3 B	Gegen Cullin3 Nukleotide 520-538 gerichtete shRNA unter Kontrolle des H1-Promotors	Stefan Weger
pSuper-shCullin3 C	Gegen Cullin3 Nukleotide 737-755 gerichtete shRNA unter Kontrolle des H1-Promotors	Stefan Weger
pDRIME-CMV-Red-siRep-1	Gegen Rep78 (Nukleotide 1776-1796) gerichtete siRNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Stefan Weger

Plasmid	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pSuper-MCM7-C	Gegen MCM7 gerichtete shRNA (Nukleotide 1781-1801) unter der Kontrolle des H1 Promotors	Stefan Weger
pSuper-MCM7-D	Gegen MCM7 gerichtete shRNA (Nukleotide 1859-1879) unter der Kontrolle des H1 Promotors	Stefan Weger
pSuper-MCM7-E	Gegen MCM7 gerichtete shRNA (Nukleotide 1962-1982) unter der Kontrolle des H1 Promotors	Stefan Weger
pSuper-MCM7-F	Gegen MCM7 (Nukleotide 769-789) gerichtete shRNA unter der Kontrolle des H1 Promotors	Stefan Weger

2.12 DNA-Sonde für die Southern Blot Analyse

Für Southern Blot Analysen wurde der pTAV2.0-Vektor einem analytischen Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Eco*RV unterzogen und die anschließend aufgereinigte komplette AAV-2 DNA-Sequenz als DNA-Sonde bei der Hybridisierung eingesetzt.

2.13 RNA und DNA für Klonierungen

Für RT-PCRs wurde RNA aus HEK293-Zellen isoliert (3.1.2). Für PCRs wurde genomische DNA aus HeLa-Zellen isoliert (3.1.1).

2.14 Bakterienstämme und Zelllinien

2.14.1 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> HB101	Hybrid der <i>E.coli</i> K12 und <i>E.coli</i> B Stämme Genotyp: <i>supE44 ara14 galK2 lacY1</i> <i>Δ(gpt-proA)62 rspL20 (Str^r) xyl-5 mtl-1</i> <i>recA13 Δ(mcrC-mar) HsdS⁻(r⁻m⁻)</i>	Herkunft: Labor AG Heilbronn Referenz: [170]
<i>E.coli</i> SURE	Genotyp: <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> <i>e14⁻(McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171</i> <i>lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r)</i> <i>uvrC [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Herkunft: Stratagene Referenz: [171]
XLI- Blue	Genotyp: <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac[F' proABlacIqZΔM15 Tn10</i> <i>(Tetr)]</i>	Herkunft: Stratagene

2.14.2 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HeLa-Zellen	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms Integriertes humanes Papilloma Virus Typ 18	[172],[173]
HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit dem Adenovirus Typ 5. Exprimieren E1A, E1B.	[174]

2.15 Verbrauchsmaterial

3-MM Papier	Whatman
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Erlenmeyerkolben (20 ml, 50 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml)	Shott
Faltenfilter	Macheray-Nagel
Filter (Rotilabo [®] -Spitzenfilter 0,22 µm)	Roth
Glaswolle	Merck
Medizinischer Röntgenfilm	Fuji
Nitrocellulose-Membran	Whatman
Nylonmembran	GE Healthcare
Objektträger	Brand
Parafilm „M“	Bemis
Pasteur-Pipetten	WU Mainz
PCR-Reaktionsgefäße	Applied Biosystems
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (75, 175 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturschalen (60 × 15 mm, 100×15 mm)	Sarstedt
Zellkulturwellplatten (6-well-Platte, 12-well-Platte)	Costar
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugenbecher	Beckman

2.16 Computersoftware

Adobe Photoshop

Adobe Photoshop Elements 5.0

BD CellQuest Pro™ Software

Flowing Software 2 (Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology, Finland)

Gene Construction Kit™ 3.0

ImageJ [175]

IPLab 3.5

LSM Image Browser

Microsoft Excel 2007

Microsoft Word 2007

MicroWin (Software für den Luciferase-Assay)

Pymol [176]

2.17 Datenbanken

APID [177]

BioGrid [76]

Chromosomsequenzen aus International Human Genome Project, hg18

cNLS mapper [178]

Ensemble [81]

ESLpred [179]

GeneCards [102]

Hum-mPloc 2.0 [180]

IntAct und MINT [77, 181]

iRefindex [182]

Mentha [183]

NCBI CDD [184]

NCBI Pubmed, NCBI BLAST

NetNES [185]

PredictProtein [186]

PSORT II Prediction [187]

Spike [188]

STRING [189]

Uniprot [80]

RSCB Protein Data Bank [190]

Yloc [191, 192]

The Human Protein Atlas [72, 73]

BAC and Cell line database (hymanlab.mpi-cbg.de/bac_viewer/project.action) [103, 193]

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Kulturzellen

Einer 10 cm Schale mit konfluenten untransfizierten HeLa- oder HEK293-Zellen wird das Medium abgenommen und in ein 15 ml Röhrchen übertragen. Die Zellen werden in 1 ml PBS mit einem Zellschaber abgeschabt, zu dem Medium überführt und für 5 min bei 1000 Upm in einer Ausschwingzentrifuge pelletiert. Das Pellet wird zum Waschen vorsichtig in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation bei 1000 Upm für 10 s werden die Zellen in 10 mM Tris, pH 8,5 resuspendiert. Anschließend wird die Zellyse durch Zugabe von 150 µl 3×DNA-Lysepuffer eingeleitet, welcher 5 µl Proteinase K (10 µg/µl) zum Deaktivieren von Nukleasen und Entfernen von DNA-gebundenen Proteinen und 5 µl RNase A (10 µg/µl) zum RNA-Verdau beinhaltet. Der Ansatz wird invertiert und für 2 h bei 56° inkubiert. Danach wird der Ansatz mit 500 µl Phenol/Chloroform versetzt, um DNA von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen, kurz gevortext und 5 min bei RT und 14000 Upm zentrifugiert. Die wässrige, DNA-haltige Oberphase wird zur DNA-Präzipitation durch Ethanol-Fällung mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wird 10 min bei 4°C und 14000 Upm abzentrifugiert und zum Entfernen von Salz- und Alkoholresten mit 3 ml 70 % Ethanol in einer Ausschwingzentrifuge gewaschen. Nach dem Trocknen wird das Pellet in 100 µl 1×TE-Puffer gelöst.

Die DNA wird zur Konzentrationsbestimmung 1:20 vorverdünnt und durch photometrische Messung bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen.

3.1.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus Kulturzellen

Die Isolierung der zellulären Gesamt-RNA erfolgt durch denaturierende Lyse mit Guanidinisothiocyanat und Phenol (RNA-Pure). Guanidinisothiocyanat lysiert nicht nur die Zellen, sondern inaktiviert gleichzeitig RNasen und verhindert die Aggregation der RNA.

Für die RNA-Isolierung wurden untransfizierte HEK293-Zellen verwendet. 2×10 cm Schalen mit Kulturzellen werden 2-mal mit PBS gewaschen und mit RNA-Pure in einem Gesamtvolumen von 1 ml für 15 min bei RT lysiert. Das Lysat wird mit einem Zellschaber abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,2 ml

Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, um RNA und DNA von den Proteinen und weiteren zellulären Bestandteilen zu trennen. Die Probe wird für 15 s gevortext und 5 min bei RT und 14000 Upm zentrifugiert. Die obere Phase mit Nukleinsäuren wird abgenommen und die RNA wird mit 0,8 ml Isopropanol für 20 min bei RT gefällt. Die Probe wird 10 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert und das RNA-Pellet wird 2-mal mit 70% Ethanol mit jeweils anschließender Zentrifugation gewaschen, um die restlichen Proteine zu entfernen. Die aufgereinigte RNA wird in der SpeedVac 10-15 min getrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zum Lösen des RNA-Pellets wird die Probe 10 min auf 70°C erhitzt.

Die RNA-Konzentration wird durch OD-Messung bei 260 nm bestimmt. Eine OD von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten, wobei die Spezifität durch die Bindung der verwendeten Oligonukleotide (Primer) an komplementäre Regionen auf der DNA-Matrize festgelegt wird. Bei der PCR werden sich wiederholende Zyklen von Auftrennung der beiden DNA-Stränge (Denaturierung), Anlagerung der Primer (Annealing) und Elongation durchlaufen. Die Denaturierung erfolgt bei hohen Temperaturen (93°C bis 98°C). Für das Annealing der Primer wird eine Temperatur verwendet, die aufgrund deren Länge und des GC-Gehalts die höchste Anlagerungsspezifität garantiert. Die Synthese des gewünschten DNA-Abschnittes übernimmt eine thermostabile DNA-Polymerase, die an das 3'-OH Ende beider Primer freie Nukleotide anfügt und dabei die DNA als Matrize verwendet. Mit jedem weiteren Zyklus erfolgt ein exponentieller Zuwachs des gewünschten, spezifischen PCR-Fragments.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen
DNA (1 ng/µl)	10 µl
10×Polymerase-Reaktionspuffer	5 µl
Primer fw (10 pmol/µl)	1,5 µl
Primer rv (10 pmol/µl)	1,5 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
DNA Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	30,5 µl

Zur Fragment-Größenanalyse werden PCR-Ansätze mit 10×DNA-Ladepuffer vermischt und mittels Agarosegelaufreinigung analysiert. Die genaue Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze in dieser Arbeit ist der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Das in Tabelle 3.2 angegebene PCR-Programm wurde zur Generierung folgender DNA-Fragmente verwendet:

- Generierung der MCM7- und KCTD5-Deletionsmutanten bei einer Annealing-Temperatur von 45°C
- Generierung der ZNF711-Bindestellen für die Klonierung der entsprechenden Reporterkonstrukte mit dem Luciferase-Gen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C

Tabelle 3.2: Beispiel eines verwendeten PCR-Programms

Zyklus	Schritt	Zeit	Temperatur
1×	Denaturierung	3 min	98°C
	Denaturierung	15 s	98°C
10×	Primer-Hybridisierung	30 s	60°C
	Verlängerung	1 min	72°C
	Denaturierung	15 s	98°C
20×	Primer-Hybridisierung	30 s	60°C
	Verlängerung	1 min + 5 s Verlängerung/Zyklus	72°C
	Auffüllen	7 min	72°C
	Abkühlen	∞	4°C

3.1.4 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei einer RT-PCR wird die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben, welche anschließend amplifiziert wird. Für eine Reaktion werden in der Arbeit pro RT-PCR-Ansatz 200 bis 300 ng RNA eingesetzt und der Reaktionsansatz mit spezifischen 3'-Primern wird für 45 min bei 42°C inkubiert (Tabelle 3.3). Die so durch die Reverse Transkription generierte cDNA diente dann als Matrize für die eigentliche PCR-Reaktion. Mit Hilfe der RT-PCR wurden kodierende Abschnitte aus dem *ZNF711* und dem *FAM193B* Genen für die Klonierung amplifiziert. Die genauen PCR-Bedingungen mit 2 µl (entspricht 200 ng Ausgangs-RNA) cDNA als Matrize sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung eines 20 µl RT-PCR-Ansatzes

Komponente	Menge
RNA (1 µg/µl)	2 µl
5x-Reaktionspuffer	4 µl
DTT, 100 mM	2 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	2 µl
dNTP's, 10 mM	2 µl
Reverse Transkriptase (Expand-RT Roche)	1 µl
H ₂ O	7 µl

3.1.5 DNA-Präzipitation mittels Ethanol oder Isopropanol

Mittels Ethanol- oder Isopropanol-Fällung kann DNA konzentriert und von Proteinresten, Puffern und Salzen befreit werden.

Für die DNA-Fällung mit Isopropanol wird der DNA-Ansatz mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzen, gevortext und für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierte DNA wird für 10 min bei 4°C und 10000 Upm abzentrifugiert und das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen (5 ml bei Midi- und 15 ml bei Maxi-Plasmid-Präparationen). Nach 10 min Zentrifugation bei 3500 Upm und RT in einer Ausschwingzentrifuge wird der Überstand entfernt. Das DNA-Pellet wird bei RT getrocknet und in 1×TE-Puffer aufgenommen.

Eine andere Möglichkeit DNA zu präzipitieren, ist die Ethanol-Fällung. Dafür wird der gewünschte Ansatz mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat mit pH 7,0 und 2,5-fachem Volumen absoluten Ethanol versetzt, gevortext und für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wird 10 min bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert und anschließend mit 70% Ethanol in einer Ausschwingzentrifuge gewaschen, um die Salz- und Alkoholreste zu entfernen. Nach dem Trocknen wird die DNA in 1×TE-Puffer aufgenommen.

Die DNA-Konzentration wird durch photometrische Messung bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt.

3.1.6 Phenol-Chloroform-Extraktion

Für die Aufreinigung der DNA nach einer Isolierung aus Bakterien (3.1.16) oder nach einem Restriktionsansatz (3.1.10) wird die Phenol-Chloroform-Extraktion verwendet. Das Ziel ist es, die DNA von Enzymen, weiteren Proteinen und anderen Störfaktoren wie überschüssigen Salzen oder EDTA zu trennen. Das Probevolumen wird zuerst mit H₂O

auf 100 µl aufgefüllt, zu dem 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben werden. Das Vermischen der Phasen erfolgt durch Vortexen, danach wird die Probe 1 min bei 14000 Upm abzentrifugiert. Die untere organische Phase mit dem Phenol-Chloroform enthält mögliche Verunreinigungen durch Fette und Lipide, in der Interphase sammeln sich Proteine und die obere wässrige Phase enthält die DNA. Die obere Phase wird abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgt nach Zugabe von 1/50 Volumen 5 M Natriumchlorid (Endkonzentration 0,1 M) eine Ethanol-Fällung mit 2,5 Volumina absolutem Ethanol (3.1.5), um verbleibende Phenolreste zu entfernen.

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe, beispielsweise nach einem Restriktionsverdau. Das Gel ist eine poröse Matrix aus Agarosepolymeren, wobei die Porengröße durch die Agarosekonzentration variiert werden kann. Je geringer die Agarosekonzentration, desto größer sind die Matrixporen und damit die Wanderungstrecke und Auftrennung von größeren DNA-Fragmenten, während höhere Agarosekonzentrationen eher eine optimale Auftrennung von kleineren DNA-Fragmenten erlauben (2%-ige bis 3%-ige Gele werden zur Auftrennung im Größenbereich von 100 bis 1000 bp verwendet).

Die abgewogene Menge an Agarose wird mit dem entsprechenden Volumen 1×TAE-Puffer aufgekocht, bis die Agarosefäden sich komplett lösen. Zu späteren Visualisierung von DNA-Fragmenten bei UV-Licht werden 40 ml Gellösung mit 1,5 µl Midori Green versetzt, welches später in die DNA interkaliert. Nach dem Aushärten wird das Gel mit TAE-Puffer überschichtet.

Jede DNA-Probe wird mit 1/9 Volumen 10×Ladepuffer vermischt. Die im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe ermöglichen zum einen eine Abschätzung der Auftrennung, zum anderen bewirkt die im Ladepuffer enthaltene Saccharose ein besseres Absinken der Proben in die Taschen des Agarosegels. Für die Größenbestimmung wird parallel ein kommerzieller DNA-Marker aufgetragen. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Spannung zwischen 60 und 80 V wandert die negativ geladene DNA im Gel zum Pluspol und wird dabei aufgetrennt. Die Agarosegele werden auf einem UV-Transilluminator ausgewertet und dokumentiert, wobei für präparative Gele die gewünschten DNA-Fragmente zunächst unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten werden.

3.1.8 „Freeze-Squeeze“ Methode zur Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die „Freeze-Squeeze“ Methode wird verwendet, um DNA-Fragmente aus einem Agarosegel zu isolieren.

Das ausgeschnittene Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wird zunächst für 30 min in 1 ml Freeze-Squeeze-Puffer äquilibriert. Danach wird es in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, welches ein kleines, mit einer Kanüle gestochenes Loch im Boden besitzt, welches wiederum mit einer kleinen Menge Glaswolle ausgestopft wurde. Das Reaktionsgefäß wird für mindestens 30 min bei -80°C eingefroren. Danach wird das kleine Reaktionsgefäß in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und 15 min bei 2000 Upm in einer Ausschwingzentrifuge abzentrifugiert. Durch diese Prozedur wird die Agarose-Matrix zerstört und deren Reste verbleiben in der Glaswolle, während die DNA durch die Öffnung in das neue 1,5 ml Reaktionsgefäß abfließt. Die DNA wird dann durch die Ethanolfällung aufgereinigt und in der Regel in 10 bis 20 μl $1\times\text{TE}$ aufgenommen.

3.1.9 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen mit Purification Kit

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten in dieser Arbeit erfolgt zum Teil durch das High Pure PCR Product Purification Kit. Die Aufreinigung basiert auf selektiver DNA-Bindung an die Glasfasern in Anwesenheit von Guanidiniumthiocyanat, eines chaotropen Salzes. Zuerst wird das Agarosegel durch Inkubation mit dem Bindungspuffer gelöst. Die Lösung wird auf eine Matrix-Säule gegeben, an die die freigesetzte DNA spezifisch bindet. Kontaminierende Proteine oder freie Nukleotide gehen mit den Glasfasern keine spezifische Bindung ein. Durch anschließende Waschschrte werden unspezifisch gebundene Moleküle entfernt, sodass die aufgereinigte DNA mit einer niedrig konzentrierten Salzlösung isoliert werden kann.

3.1.10 Restriktionsanalyse

Eine Restriktionsanalyse wurde in der Regel in einem Gesamtvolumenansatz von 10 μl durchgeführt. Der Ansatz beinhaltet 1 μg Plasmid-DNA, 5 bis 10 U Restriktionsenzym(e) und 1 μl des vom Hersteller empfohlenen $10\times$ Restriktionspuffers. Die Ansätze werden mit H_2O aufgefüllt und für 1 bis 2 h bei der Temperatur inkubiert, die für die Enzymaktivität optimal ist. Bei den meisten in dieser Arbeit verwendeten Enzymen entstehen im Zuge des Restriktionsverdaus 5'- oder 3'-Überhänge. Wird ein Plasmid bei der Generierung von Vektoren für Klonierungen nur mit einem Enzym geschnitten, können diese Überhänge zu einer Religation führen. Um das zu verhindern, werden solche Vektoransätze nach der Inkubation mit Restriktionsenzymen für weitere 20 min bei 37°C mit 5 U alkalischer

Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) inkubiert, um die Phosphatgruppen an den 5'-OH Enden zu entfernen. Im Anschluss an die Restriktion werden die entstandenen DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt (3.1.7) und bei Bedarf ausgeschnitten und aufgereinigt. Bei PCR-Fragmenten wurde im Anschluss an die Restriktion in der Regel zusätzlich eine DNA-Aufreinigung über eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (3.1.5).

3.1.11 Phosphorylierung und Ligation von Oligonukleotid-Paaren

Eine Methode, kurze zusätzliche Sequenzen wie ein Antikörper-Epitop in ein Plasmidkonstrukt einzufügen, ist die Einklonierung von synthetischen Oligonukleotiden. Dafür werden 2 Einzelstrang-Oligonukleotide verwendet, die im internen Bereich komplementär zueinander sind und nach dem Annealen über diese komplementären Bereiche hinaus an den Enden Überhänge aufweisen, die zu den im Vektor mit Restriktionsenzymen erzeugten Überhängen kompatibel sind.

Zunächst werden die 5'-OH Enden der Oligonukleotide phosphoryliert, um eine Ligation mit den 3'-OH Enden des Vektors zu ermöglichen. Dafür werden Einzelstrang-Oligonukleotide mit 10×Polynukleotid-Kinase-Puffer, 50 mM ATP und T4 Polynukleotid-Kinase vermischt. Der Ansatz wird mit 3 µl H₂O auf 5 µl aufgefüllt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Kinase wird anschließend für 10 min bei 68°C inaktiviert. Dabei können die beiden komplementären Oligonukleotide bereits für die Annealing-Reaktion gemischt werden und anschließend über 30 min auf RT abgekühlt werden, um stabile Doppelstrangbereiche auszubilden. Nach dem Abkühlen wird der Ansatz für den folgenden Ligationsansatz noch 1:100 in 1×TE Puffer verdünnt. 5 µl der verdünnten Annealing-Reaktionen werden dann mit ca. 100 ng eines mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen und über ein präparatives Agarosegel gereinigten Vektors ligiert (siehe Abschnitte 3.1.7, 3.1.10).

Tabelle 3.4: Ansatz zu Phosphorylierung der Oligonukleotiden

Komponente	Menge
Oligonukleotid (10 pmol/µl)	1 µl
10×Polynukleotid-Kinase-Puffer	0,5 µl
ATP (50 mM)	0,25 µl
T4 Polynukleotid-Kinase	0,25 µl
H ₂ O	3 µl

3.1.12 Ligation

Zur Generierung neuer Konstrukte werden Restriktionsfragmente aus anderen Plasmiden, mit Restriktionsenzymen geschnittene PCR-Produkte oder Oligonukleotidpaare (siehe Abschnitt 3.1.10) in Plasmide (Vektoren) durch Ligation kloniert.

Für eine Ligation werden Insert (außer bei Oligonukleotiden) und Vektor zuerst mit den gleichen oder kompatiblen Restriktionsenzymen geschnitten, damit die entstandenen Überhänge komplementär sind. Nach der Aufreinigung über präparative Agarosegele werden Insert(s) und Vektor in einem 10-15 µl Ansatz mit 1/10 Volumen 10×Ligationspuffer im Gesamtansatz und 3 U T4-Ligase gemischt. Insert(s) und Vektor sollten ungefähr in einem molaren Verhältnis von 3:1 bis 5:1 vorliegen. Nach 2 bis 4 h Inkubation bei RT wird der gesamte Ligationsansatz in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert und ausplattiert. Als Kontrolle wird ein Ansatz mitgeführt, in dem der verwendete Vektor mit H₂O statt mit einem Insert vermischt wird, um die Religationshäufigkeit des Vektors zu überprüfen.

3.1.13 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen werden 10 µl eines Glycerinstocks in 5 bis 10 ml antibiotikafreiem LB-Medium angeimpft und Ü/N bei 37°C und 110 Upm inkubiert. 2 ml der Ü/N-Kultur werden in einem 1 l Kolben auf 250 ml LB-Medium überimpft und bis zu einem OD_{595nm}-Wert von 0,5 bis 0,6 bei 37°C inkubiert. Die Kultur wird dann in vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt und für 10 min auf Eis gehalten. Danach erfolgt die Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 5000 Upm und das Zellpellet wird vorsichtig in 50 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert. Danach werden die Bakterienzellen 5 min bei 4°C und 3000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wird vorsichtig in 50 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis gehalten. Nach der erneuten Zentrifugation wird das Pellet durch vorsichtiges Resuspendieren in 5 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂/14% Glycerin Lösung aufgenommen und in 200 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

3.1.14 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Für die Transformation werden in dieser Arbeit kompetente Zellen der Stämme *E.coli* HB101 und *E.coli* Sure verwendet. Die Transformation dient der Aufnahme doppelsträngiger zirkulärer Plasmid-DNA, die in den Bakterienstämmen amplifiziert wird. Die Transformation wird durch die Behandlung der Zellen während der Herstellung (siehe Abschnitt 3.1.14) mit CaCl₂ und einen Hitzeschock bei 42°C ermöglicht. Wahrscheinlich vermindert die CaCl₂-Lösung die negative Zelloberflächenladung, während der

Hitzeschock für die Porenbildung in der Zellhülle notwendig ist, durch die die Plasmid-DNA aufgenommen wird.

Die kompetenten Zellen, die in einer 0,1 M CaCl_2 /14% Glycerin Lösung gelagert werden (siehe Abschnitt 3.1.13), tauen zunächst für 10 bis 15 min auf Eis auf. Zu 50 μl kompetenten Zellen werden entweder 1 ng bis 1 μg Plasmid-DNA oder ein kompletter 10 μl Ligationsansatz zugegeben, gemischt und für weitere 15-30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 90 s bei 42°C werden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt, anschließend mit 150 μl auf 37°C vorgewärmtem LB-Medium ohne Antibiotika versetzt und für 20-30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um die Expression der Antibiotika-Resistenzgene zu ermöglichen. Bei der Klonierung eines neuen Plasmids wird der gesamte Ansatz auf LB-Platten mit Selektions-Antibiotikum ausgestrichen. Für Flüssigkulturen für die Präparation von Plasmid-DNA im Midi- oder Maximaßstab wird der gesamte Transformationsansatz auf 100 bzw. 250 ml LB-Medium mit dem Selektions-Antibiotikum überimpft. Platten oder Suspensionen werden Ü/N bei 37°C im Brutschrank bzw. in einem Schüttler inkubiert.

3.1.15 Plasmid-Minipräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen zur Analyse von Klonierungsprodukten erfolgt durch das Aufschließen kleiner Mengen Zellsuspension durch die Lysozym-Methode.

Dafür werden zunächst eine Anzahl (abhängig vom Verhältnis der erhaltenen Kolonien bei der eigentlichen Ligation in Gegenwart des Inserts und bei der Kontroll-Vektor-Religation) von Einzelkolonien in 15 ml Reaktionsgefäßen auf 3 ml LB-Medium mit Antibiotika-Selektion angeimpft und für 12 bis 16 h bei 37°C geschüttelt. Eine jeweils 1 ml Kultur wird anschließend in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 14000 Upm und 4°C für 5 min abzentrifugiert und das Zellpellet wird in 150 μl STET-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 12 μl Lysozym wird die Probe gevortext und für 1 min bei 90°C inkubiert. Es erfolgt die Spaltung der Bakterienzellwand zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglukosamin und die Membranproteine werden herausgelöst, was die Lyse der Bakterienzellen zur Folge hat. Die Zelltrümmer werden anschließend für 10 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert und mit einer Pipettenspitze entfernt. Die sich im Überstand befindende Plasmid-DNA wird durch Ethanol-Fällung konzentriert. Das DNA-Pellet wird in der SpeedVac für 10 min getrocknet und in 50 μl 1×TE aufgenommen. Anschließend erfolgt der analytische Restriktionsverdau. Bei einem positiven Ergebnis werden 50 bis 100 μl der jeweiligen Ü/N-Kultur, die während der Minipräparation bei 4°C gelagert werden, auf 100 ml bzw. 250 ml Ü/N-Kulturen für eine Midi- bzw. Maxi-Plasmid-DNA-Präparation überimpft.

3.1.16 Plasmid-DNA-Midi- und -Maxipräparation

Zur Produktion von Plasmiden in größeren Mengen werden Midi- und Maxipräparationen verwendet. Die Methode basiert auf alkalischer/SDS-Lyse der Bakterienzellen und Bindung der negativ geladenen DNA an Ionenaustauschersäulen. Für die Lyse, Waschschritte und DNA-Isolierung wird der JetStar 2,0 Plasmid Midi-/Maxiprep Kit verwendet. Die Plasmid-Präparation erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers mit den mitgelieferten Puffern. Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die Maxi-Präparation.

100 (250) ml einer Ü/N-Kultur der *E.coli*-Zellen mit dem gewünschten Plasmid werden bei 5000 Upm und 4°C für 5 min abzentrifugiert und das Zellpellet nach dem Protokoll lysiert: Resuspension in 4 (10) ml Puffer E1 mit RNase A, Inkubation bei RT für 5 min nach Zugabe von 4 (10) ml Puffer E2 (Lysepuffer) und anschließend Neutralisation durch Zugabe von 4 (10) ml Puffer E3. Die lysierten Zellen werden bei 10000 Upm und 4°C für 10 min abzentrifugiert und das Lysat wird durch einen Papierfilter auf eine mit 5 (15) ml E4-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben. Die Säule wird mit 2×10 ml (2×30 ml) Puffer E5 zur Entfernung aller Nukleinsäuren mit Ausnahme der sehr festgebundenen Plasmid-“Supercoil“-DNA gewaschen und anschließend wird die Plasmid-DNA mit 5 (15) ml Puffer E6 von der Säule eluiert.

Danach wird die DNA durch Isopropanolfällung konzentriert, von restlichen Kontaminationen gereinigt und das getrocknete Pellet wird anschließend in 100 µl 1×TE aufgenommen. Für die Konzentrationsbestimmung wird die Probe 1:50 verdünnt und bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) photometrisch gemessen. Durch diese photometrische Messung wird sowohl die DNA-Menge als auch die Verunreinigung der Probe durch Proteine bestimmt. Anschließend werden ein analytischer Restriktionsverdau und die Auftrennung auf einem Agarosegel durchgeführt.

3.1.17 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben aus dieser Arbeit erfolgt durch die Firma Eurofins Genomics. Dafür wird 1 µg einer Plasmid-DNA in der SpeedVac Zentrifuge in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß eingetrocknet. Anschließend wird die DNA in 15 µl 5 mM Tris-HCl, pH 8,0 gelöst. Sequenzierungsergebnisse werden mittels BLAST-Analyse (NCBI) oder Gene Construction Kit analysiert.

3.1.18 Hirt-Extraktion zur Isolierung von Virus-DNA aus Säugerzellen

Die Hirt-Extraktionsmethode erlaubt es, virale DNA aus Kulturzellen aufzureinigen. Dafür werden die Zellen im Medium abgeschabt und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben werden 2-mal kurz mit 1×PBS gewaschen, in 2 ml Lysepuffer resuspendiert und für 2 h bei 4°C inkubiert, um eine vollständige Lyse zu erreichen. Danach werden zu jeder Probe bei langsamem Vortexen 500 µl NaCl (Anfangskonzentration 5 M) tropfenweise zugegeben und die Ansätze werden Ü/N bei 4°C inkubiert.

Die präzipitierte zelluläre DNA wird bei 10500 Upm und 4°C für 15 min pelletiert. Der Überstand wird abgenommen, in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2 ml Chloroform versetzt. Die Proben werden gevortext und für 5 min bei 3500 Upm abzentrifugiert, um eine klare Phasentrennung zu erreichen. Die 2 ml der Oberphase, die virale DNA und RNA enthält, werden mit 200 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt und gevortext. Anschließend wird jede Probe mit 5,5 ml absoluten Ethanol versetzt und mindestens für 30 min bei -20°C gefällt. Nach der Zentrifugation wird das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen (Abschnitt 3.1.5), getrocknet und in 50 µl 1×TE-Puffer aufgenommen. Für die photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung bei 260 nm wird die Probe 1:20 verdünnt.

Die mittels Hirt-Extraktionsmethode aufgereinigte virale DNA kann anschließend mit Hilfe des Southern Blots analysiert werden. Dafür werden 6 µg DNA mit 40 U *DpnI* für 2 h bei 37°C inkubiert, um die transfizierte, in *E.coli* methylierte virale DNA zu verdauen. Anschließende Inkubation mit 0,4 µg RNase A für 15 min bei RT entfernt die eventuell mitaufgereinigte RNA. Die Probe wird danach mit 10×Ladepuffer vermischt und in einem 0,8%-igen Agarosegel bei 36 V Ü/N aufgetrennt. Das Gel wird anschließend mit einem Lineal fotografiert.

3.1.19 Southern Blot Analyse

Die Southern Blot Analyse dient dem spezifischen Nachweis von DNA-Sequenzen nach dem Transfer aus einem Gel auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran durch Hybridisierung mit entsprechenden, zu der gesuchten DNA-Sequenz komplementären DNA-Sonden.

Ein Agarosegel mit aufgereinigter viraler DNA (Abschnitt 3.1.18) wird nach Gelelektrophorese zunächst mit 0,25 M HCl für 10 min depurinisiert, was zu einer DNA-Fragmentierung beim Übertragen auf die Membran und somit zu einer erhöhten Übertragungseffizienz führt. Nach 2 kurzen Waschschrritten mit H₂O wird das Agarosegel 3-mal für 30 min mit 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl denaturiert, um die Dissoziation der DNA-Doppelstränge zu erreichen. Anschließend erfolgt nach 2 Waschschrritten mit H₂O die

Neutralisation durch 3-mal Inkubation mit 0,5 M Tris-HCl, pH 7,0/1,5 M NaCl für je 30 min.

Die virale DNA wird für den spezifischen Nachweis durch den Kapillar-Transfer auf die Nylonmembran übertragen. Der Aufbau des Kapillarblots sieht wie folgt aus: 1×3-MM Papier, durchtränkt im Transferpuffer, dessen Enden in ein Reservoir mit dem Transferpuffer eingetaucht sind, 1×3-MM durchtränktes Papier, das Agarosegel, die durchtränkte Nylonmembran, 2×3-MM durchtränktes Papier, 2×3-MM trockenes Papier und anschließend ein Stapel trockener Papiertücher. Durch das Auflegen eines Gewichtes werden der Sog des Transferpuffers und die resultierenden Kapillarkräfte verstärkt. Der Kapillarblot wird Ü/N bei RT gelassen.

Die DNA-Detektion erfolgt durch die Hybridisierung einer Biotin-markierten DNA-Sonde mit der gesuchten DNA-Sequenz an die Membran. Für die Sonde werden 100 bis 200 ng des spezifischen DNA-Fragments mit H₂O auf 34 µl aufgefüllt und mit 10 µl 5×Reaktionspuffer versetzt. Die Probe wird für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend für 5 min bei 4°C inkubiert. Dann werden 1 µl Klenow-Fragment und 5 µl von dem Biotin Labeling Mix zum DNA-Fragment zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA stoppt die Reaktion. Die markierte DNA-Sonde kann sofort für die Hybridisierung verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

Vor der Hybridisierung wird die Membran für 10 min bei RT getrocknet und die DNA wird mit UV fixiert. Die Membran wird in einer Glasröhre in einem Hybridisierungsoffen zunächst 1 h bei 42°C in Hybridisierungslösung vor- und anschließend Ü/N mit der spezifischen DNA-Sonde bei 42°C hybridisiert. Die DNA-Sonde wird abgenommen und die Membran gewaschen: 4×10 min mit 2×SSC/0,1% SDS bei 42°C zum Ausverdünnen der Hybridisierungssonde und 2×30 min mit 0,1×SSC/0,1% SDS bei 55°C zum stringenten Waschen. Anschließend wird die Membran der Glasröhre entnommen, 2-mal mit 20 ml Lösung A für 20 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert und mit 20 ml in Lösung A 1:1000 verdünntem High Sensitivity Streptavidin-HRP für 20 min inkubiert. Die Membran wird jeweils für 15 bis 30 min mit der Lösung B (2×50-100 ml) und PBS-T (3×50-100 ml) gewaschen. Die Sonden-Detektion erfolgt mit einem Gemisch aus dem chemilumineszierenden Substrat (SuperSignal West Pico Chemilumineszent Substrate, Luminol) und einer stabilen Wasserstoffperoxid-Lösung, mit welchem die Membran für 1 min inkubiert wird. Die an Streptavidin gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation des Luminols durch Wasserstoffperoxid und die entstehende Lichtemission ist auf einem Röntgenfilm detektierbar.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

HeLa- und HEK293-Zellen werden in DMEM-Vollmedium mit 10% FCS, 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die Passagierung oder das Aussäen der Zellen für Versuche wird das Medium abgenommen und die Zellen werden einmal mit 1×PBS gewaschen. In 75 cm²-Flaschen werden dann 2 ml Trypsin (in 175 cm²-Flaschen 3 ml) zugegeben, über die Wachstumsfläche verteilt und wieder abpipettiert. Die Zellen werden für die Ablösung für 3 min mit dem Trypsinfilm bei 37°C inkubiert. Die abtrypsinieren Zellen werden im frischen Medium aufgenommen und in der gewünschten Dichte auf neue Kulturflaschen bzw. Kulturschalen ausgesät. Das Trypsin wird durch die Zugabe des Mediums inaktiviert.

3.2.2 Transfektion mittels Ca₃(PO₄)₂-Präzipitation

HeLa- und HEK293-Zellen werden in dieser Arbeit über die Calciumphosphat-Methode transfiziert. Dabei wird Plasmid-DNA mit Calciumchlorid und 2×BBS vermischt, was zur Ausbildung von Calciumphosphat-Kristallen führt, die sich an die DNA anlagern. Die Calciumphosphat-DNA Präzipitate werden während der Inkubation im Zellkultur-Medium von den Zellen über Endozytose aufgenommen und die DNA wird über einen bisher nicht bekannten Mechanismus im Zellkern freigesetzt.

Vor der Transfektion werden die Zellen ausgesät (siehe Abschnitt 3.2.1) und für 3 bis 4 h (HeLa-Zellen) bzw. 12 bis 24 h (HEK293-Zellen) bei 37°C/5% CO₂ inkubiert, bis sie wieder adhärent sind. Die Zellen sollten zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 40-50% aufweisen (ca. 5×10⁵ HeLa- bzw. 1×10⁶ HEK293-Zellen auf eine 6 cm-Schale, andere Kulturgefäße entsprechend der Oberfläche anpassen). Für 6 cm-Schalen wird eine Gesamtmenge von 4 µg DNA mit 150 µl CaCl₂-Lösung (220-240 mM für HeLa- und 240-260 mM für HEK293-Zellen) durch Vortexen gemischt und anschließend werden 150 µl 2×BBS-Puffer zugegeben und erneut gevortext. Nach einem kurzen Abzentrifugieren werden die Ansätze für 15 min bei RT inkubiert und die Transfektionsmischung wird tropfenweise auf die ausgesäten adhären Zellen pipettiert. Nach 12 bis 18 h Inkubation bei 37°C erfolgt ein Mediumwechsel. Die Zellen werden je nach Versuch 24 bis 44 h nach der Transfektion geerntet.

Die angegebenen Mengenangaben zu den transfizierten Plasmiden, die während der Arbeit verwendet werden, beziehen sich immer auf die Transfektion von 6 cm-Schalen.

3.2.3 Virusinfektion von Zellkulturen

Für eine virale Infektion werden HeLa- oder HEK293-Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät und für 3 bis 4 h bei 37°C/5% CO₂ inkubiert. Der bei -80°C gelagerte adenovirale Stock

des Adenovirus Typ 5 wird bei 37°C oder RT aufgetaut und mit dem 37°C warmen Medium zur Endkonzentration 5×10^7 Viruspartikel/ml verdünnt.

Das Medium wird von den adhären Zellen abgenommen und 400 µl des verdünnten adenoviralen Stocks (2×10^7 virale Partikel) werden vorsichtig auf die Zellen verteilt. Die Kulturschalen werden für 45 min bei 37°C/5% CO₂ inkubiert, wobei die Schalen alle 15 min geschwenkt werden, um die viralen Partikeln zu verteilen und die Austrocknung der Zellen zu verhindern. Anschließend werden 2,4 ml Medium auf die Zellen pipettiert. Die Zellen können direkt nach der Infektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation transfiziert werden.

Nach 12 bis 18 h Inkubation bei 37°C erfolgt ein Mediumwechsel. Die infizierten Zellen werden 40-42 h nach Infektion im Zellmedium abgeschabt und in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 900 Upm wird das Zellpellet 2-mal kurz mit 1×PBS gewaschen und anschließend aufgearbeitet.

3.2.4 Immunfluoreszenz-Analyse

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz (IF) können Makromoleküle in einer Zelle fluoreszenz-mikroskopisch visualisiert werden. Die Methode wird in dieser Arbeit zum Nachweis der Proteinlokalisierung und zur Untersuchung von Kolo-kalisation zweier Proteine verwendet.

Für die IF-Versuche werden Deckgläschen in Kulturschalen oder die Vertiefungen einer Multi-Well-Platte platziert. Die Zellen werden wie üblich ausgesät und mittels Calciumphosphat-Präzipitation transfiziert. Unsynchronisierte Zellen werden 40 bis 42 h nach der Transfektion prozessiert; wobei die Zeiten für die Bestimmung der Zellzyklus-abhängigen Lokalisation mit der Fragestellung variieren (3.2.5).

Die Deckgläschen werden in ein Trägernetz transferiert, kurz mit 1×PBS gewaschen und 30 min in 3,7% Formaldehyd/1×PBS bei RT inkubiert, um die zellulären Strukturen zu fixieren. Danach werden die Zellen kurz mit 1×PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellmembran für 10 min mit 1% Triton X-100/1×PBS inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift mit 1×PBS werden die Deckgläschen in eine mit feuchtem Whatman-Papier und Parafilm ausgelegte Kammer überführt. Alle verwendeten primären und sekundären Antikörper werden 1:1000 in 2% FCS/1×PBS verdünnt, wovon 150 µl auf ein Deckgläschen pipettiert werden. Unsynchronisierte Zellen werden für 2 h mit dem ersten Antikörper in einer geschlossenen Kammer inkubiert und anschließend unter Schütteln 3-mal für 5 min mit 1×PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper erfolgt ebenfalls für 2 h in 150 µl 2% FCS/1×PBS. Danach werden die Deckgläschen 3-mal mit 1×PBS für 2 bis 3 h im Dunkeln gewaschen. Deckgläschen mit synchronisierten Zellen werden für 2 h oder Ü/N für 10 bis 12 h mit dem ersten

Antikörper inkubiert. Die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper erfolgt für 2 h in 150 µl 2% FCS/1×PBS.

Für die IF werden die Objektträger mit 70% Ethanol gewaschen und jedes Deckgläschen wird mit einem Tropfen DAPI Fluoromount eingedeckelt, wobei DAPI durch das Interkalieren in die DNA die Visualisierung der Zellkerne bei einer Emission von 455 nm Wellenlänge ermöglicht. Die Präparate werden lichtgeschützt bei 4°C gelagert und werden nach 12 bis 24 h mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Analyse und Bearbeitung der IF-Proben erfolgte mittels IPLab, LSM Image Browser und ImageJ. Für die Erstellung der Abbildungen wurde Adobe Photoshop verwendet.

3.2.5 Zellsynchronisation

HeLa-Zellen werden mittels eines Doppelthymidinblocks synchronisiert [194, 195]. Der Thymidinblock verhindert die DNA-Synthese, sodass sich die Zellen in der späten G1-Phase ansammeln und erst nach einer Zugabe von frischem Medium synchron durch die S-, G2- und M-Phase voranschreiten.

Thymidin wird 1 h nach Transfektion in einer Endkonzentration von 2 mM zu den ausgesäten, adhärenen HeLa-Zellen zugegeben. Danach werden die Zellen für 18 h bei 37°C inkubiert: In dieser Zeit arretieren die Zellen zunehmend in der G1-Phase, unmittelbar vor dem Beginn der S-Phase. Danach werden die HeLa-Zellen 3-mal mit 1×PBS gewaschen und für die nächsten 9 h mit frischem Medium inkubiert: Dieser Schritt dient dem Abschließen der S-Phase. Nach 9 h erfolgt für weitere 17 h der zweite Thymidinblock, ebenfalls in einer Endkonzentration von 2 mM, um die Anzahl der synchronisierten Zellen noch zu steigern. Anschließend wird der Block aufgehoben, indem die Zellen 2-mal mit 1×PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt werden. Für eine Untersuchung während des voranschreitenden Zellzyklus werden HeLa-Zellen zu bestimmten, je nach Fragestellung festgelegten Zeitpunkten nach der Aufhebung des Blocks aufgearbeitet: 2-mal mit 1×PBS gewaschen und in 2×Proteinprobenpuffer, RAF- oder NiNTA-Lysepuffer aufgenommen oder für die IF aufgearbeitet. Die Kontrolle der Synchronisation erfolgt durch eine FACS-Analyse mit Propidiumiodid (3.2.6).

3.2.6 FACS-Analyse der Zellsynchronisation

Die FACS-Analyse wird in dieser Arbeit verwendet, um den Anteil der verschiedenen Zellzyklusphasen bei synchronisierten Zellen zu überprüfen. Für eine FACS Analyse werden die Zellen 2-mal mit 1×PBS gewaschen, in 1 ml 1×PBS abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 900 Upm wird das Zellpellet in 60 µl H₂O aufgenommen und 140 µl abs. Ethanol werden tropfenweise zu den Proben während des Vortexens pipettiert. Die Zellen werden für 12 bis 24 h bei 4°C in

70% Ethanol inkubiert, um die zellulären Strukturen zu fixieren, und anschließend 2-mal mit 1×PBS für 5 min bei 900 Upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 200 µl 1×PBS aufgenommen. Um die zelluläre RNA zu verdauen, die durch die Propidiumiodidfärbung die DNA-Messung beeinflussen kann, werden die Proben für 15 min mit RNase A (Endkonzentration 20 µg/ml) bei RT inkubiert. Anschließend wird zu jeder Probe Propidiumiodid in einer Endkonzentration von 40 µg/ml zugegeben. Propidiumiodid interkaliert in die zelluläre DNA und erlaubt so Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt der Zellen zu ziehen. Die FACS-Messung erfolgt mit Cell ProQuest mit BD FACSCalibur, wobei pro Probe 10.000 Zellen gemessen werden. Bei der gesamten durch FSC und SSC eingestellten Zellpopulation wird der individuelle DNA-Gehalt durch das interkalierende Propidiumiodid bei einer Absorptionswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 610 nm gemessen. Die Datenauswertung erfolgt durch CellQuest und Flowing Software 2 Programme.

3.2.7 Luciferase-Reportergen-Assay

Der Luciferase-Assay basiert auf einer Messung des Emissionslichtes, das im Zuge einer Oxidierung des Substrates Luciferin durch das zytoplasmatische Enzym Luciferase freigesetzt wird. In dieser Arbeit wird der Luciferase-Assay verwendet, um den Einfluss eines Transkriptionsfaktors durch Bindung an eine spezifische, dem Luciferasegen vorgeschaltete DNA-Sequenz zu untersuchen (Reportergen-Assay). Aufgrund der Stärke des gemessenen Emissionslichtes ist eine quantitative Auswertung der Luciferase-Expression und dementsprechend der Transkriptionsrate des Reportergens möglich.

HeLa- und HEK293-Zellen in 6 cm-Schalen werden 24 oder 42 h nach Transfektion 2-mal mit 1×PBS gewaschen und in 400 µl Triton-Lyse-Puffer 10 min bei RT lysiert. Die lysierten Zellen werden mit Hilfe von Zellschabern abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zelltrümer werden dann für 5 min bei 14000 Upm und 4°C pelletiert und der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Messung und das Vorbereiten der Proben erfolgt bei RT in einer 96-Well-Platte. Für eine Messung werden 5 µl des Substrates Bright Glo vorgelegt und 100 µl des Zelllysats zugegeben. Die Messung wird mit Hilfe des Berthold Lumimeters LB960 innerhalb von 5 bis 8 min nach der Lysatzugabe durchgeführt und die Auswertung erfolgt mittels Microsoft Excel 2007.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinextraktion aus Kulturzellen

Die Gesamtproteinextraktion erfolgt 24 h oder 40-42 h nach einer Transfektion (Abschnitt 3.2.2). Nach der Mediumabnahme werden die Zellen 2-mal mit 1×PBS gewaschen und direkt in 2×Proteinprobenpuffer lysiert. Für die Vergleichbarkeit verschiedener Proben hängt die Menge an 2×Proteinprobenpuffer von der Anzahl der transfizierten Zellen bzw. von der Fläche der Kulturschalen/Wells ab: Eine initial ausgesäte Zellzahl von 5×10^5 HeLa- bzw. 1×10^6 HEK293-Zellen wird in 200 µl 2×Proteinprobenpuffer lysiert.

Die Ansätze werden für 10 min bei RT geschwenkt, die Lysate mit einem Zellschaber abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinextrakte werden für 5 min bei 95°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und auf SDS-PAA-Gele aufgetragen. Im Falle einer hohen Viskosität aufgrund eines erhöhten DNA-Gehaltes werden die Ansätze für 25 s sonifiziert.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Über die SDS-Page können Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamid-gel aufgetrennt werden. Dafür wird ein SDS-haltiges, diskontinuierliches Puffersystem verwendet [196]. Bei der Zellyse mittels 2×Proteinprobenpuffer und anschließendem Erhitzen für 5 min bei 95°C interagiert das negativ geladene SDS mit den Proteinen, sodass ihre Strukturen zerstört werden und die Eigenladung überdeckt wird. Die Ladung der Proteine ist damit proportional zu ihrem Molekulargewicht und die Proteine werden durch die Gelporen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Für das Gießen der Gele werden zwei Platten nach Einlegen eines Abstandhalters (Spacers) in eine Gießapparatur eingespannt und die Dichtigkeit des Aufbaus mit H₂O überprüft. Dann wird zunächst die Trenngellösung zwischen die Platten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet, um eine scharfe Trenngelkante zu erhalten. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert ist, wird das Isopropanol abgegossen und die Sammelgellösung wird auf das Trenngel pipettiert. Durch einen Kamm werden die Taschen für die Proben im Sammelgel ausgespart. Nach der vollständigen Polymerisation des Sammelgels können die Gele direkt verwendet oder in feuchten Tüchern für mehrere Tage bei 4°C gelagert werden.

Tab. 3.5: Ansätze für SDS-Polyacrylamidgele

Reagenz	15 % Trenngel	8 % Trenngel	4,5 % Sammelgel
bidest. H ₂ O	7,3 ml	14,3 ml	11,8 ml
Acrylamid/Bisacrylamid-Mix	15 ml	8 ml	3 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	5,0 ml
APS	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	40 µl	40 µl	40 µl

Für die eigentliche Elektrophorese wird das Gel in eine Gelkammer eingespannt, die Puffertanks werden mit 1×SDS-Laufpuffer gefüllt und die Taschen werden mit den Proteinextrakten beladen. Zur Größenbestimmung wird zusätzlich ein Proteinmarker aufgetragen, der aus einem Gemisch von Proteinen bekannter Größen besteht, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, sodass die Auftrennung bereits während des Gellaufs verfolgt werden kann. Pro Gel wird eine Stromstärke von 12 mA angelegt.

Die Proteine bilden aufgrund des diskontinuierlichen Puffersystems und des niederprozentigen Sammelgels eine scharfe Bande im Sammelgel, die bis zur Grenze zum Trenngel erhalten bleibt. Aufgrund des veränderten pH-Wertes wandern die Proteine im Trenngel nicht mehr als eine einheitliche Bande, sondern werden nach ihrer Größe aufgetrennt. Die kleinsten Proteine wandern dabei schneller durch die Gelporen. Erreicht die Lauffront den unteren Rand des Gels, wird die Gelelektrophorese beendet und die Gele werden anschließend für die Western Blot Analyse verwendet (Abschnitt 3.3.3).

3.3.3 Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran durch die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern.

Für das SemiDry-Blotverfahren werden insgesamt 6×3-MM Papiere und eine Nitrocellulosemembran der Größe 5×9 cm pro Gel verwendet. Der Aufbau sieht wie folgt aus: 3×3-MM Papiere auf der unteren Elektrode der Blotapparatur (Anode), die Nitrocellulosemembran, das zu blottende Gel ohne den Sammelgelanteil und anschließend wieder 3×3-MM Papiere. Alle Komponenten werden vor dem Zusammenbau in 1×Proteintransferpuffer getränkt. Überschüssiger Puffer wird von der Anode entfernt, die Apparatur zusammengesetzt und die Proteine für 1 h 40 min bei einer Stromstärke von 50 mA pro Gel auf die Membran geblottet. Um anschließend die unspezifischen Protein-Bindestellen auf der Membran zu blockieren, wird die Membran über Nacht bei 4°C in einer 6% Milchlösung inkubiert.

Die Inkubation mit einem Primärantikörper erfolgt für 1,5 bis 2 h. Anschließend wird der unspezifisch gebundene Primärantikörper durch das 3-malige Waschen der Membran für 5 min mit 1×PBS-T entfernt. Danach wird die Membran für 1,5 h mit einem Peroxidase-markierten Sekundärantikörper inkubiert und danach für 1,5 bis 3 h mit 1×PBS-T gewaschen.

Der Nachweis der Peroxidase erfolgt mit einem Gemisch aus dem chemilumineszierenden Substrat (SuperSignal West Pico Chemilumineszent Substrate, Luminol) und einer stabilen Wasserstoffperoxid-Lösung, mit welchem die Membran für 1 min inkubiert wird. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation des Luminols durch Wasserstoffperoxid. Die dabei entstehende Lichtemission wird auf einem Röntgenfilm detektiert.

3.3.4 Stabilitätsassay

Bei dem hier durchgeführten Stabilitätsassay wird die zelluläre, eukaryotische Proteintranslation durch Zugabe von Cycloheximid gehemmt, was die Untersuchung der Halbwertszeit zellulärer Proteine erlaubt [197]. Die Quantifizierung der Proteinmenge kann durch einen Vergleich mit Tubulin erreicht werden, welches in Anwesenheit des Cycloheximids für lange Zeit stabil bleibt.

Für einen Stabilitätsassay wird Cycloheximid nach der Transfektion in einer Endkonzentration von 10 µM/ml (1:100 aus einer 10 mM Stocklösung) auf HeLa- oder HEK293-Zellen gegeben. Cycloheximid wird in DMSO gelöst und gelagert, sodass DMSO in einer 1:100 Verdünnung als Kontrolle zur Zellkultur zugegeben wird. Der Zeitpunkt der Zugabe wird als 0 h-Wert definiert und die Proben werden zu verschiedenen Zeitpunkten einer Gesamtproteinextraktion unterzogen.

3.3.5 Ko-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der gezielten Anreicherung eines Proteins und eventuell an dieses Protein gebundener weiterer Proteine aus einem Gemisch. Die Isolierung des gewünschten Proteins erfolgt durch einen spezifischen Antikörper, der entweder das gewünschte Protein selbst oder einen Epitop-Tag an dem Protein erkennt. Die Isolierung erfolgt im Idealfall unter nativen Bedingungen, sodass die zellulären Komplexe, die das gewünschte Protein in der Zelle bildet, intakt bleiben. Diese Methode ermöglicht einen Nachweis zellulärer Interaktionspartner des isolierten Proteins.

Die Ko-Immunpräzipitationen werden entweder mit einer anti-FLAG-M2 Agarose-Matrix oder mit einem spezifischen Antikörper und einer Protein A Sepharose Matrix durchgeführt. Alle Waschschritte erfolgen im eiskalten RAF-Puffer und die Zentrifugation erfolgt bei 2000 Upm, damit die FLAG-M2 Agarose oder Protein A Sepharose nicht durch

zu starke Zentrifugation zerstört wird. Die Überstände werden bei allen Waschschrritten vorsichtig durch eine Pasteur-Pipette abgesaugt. Mehrere Waschschrritte dienen der Entfernung unspezifisch gebundener Proteine.

HeLa- und HEK293-Zellen werden 42 h nach der Transfektion 2-mal mit je 2 ml 1×PBS gewaschen und mit 1 ml eiskaltem RAF-Auflschlusspuffer für 10 min bei 4°C unter Schwenken aufgeschossen. Danach werden die Lysate abgeschabt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für die Abtrennung der Zelltrümmer 10 min bei 14000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände werden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gestellt.

Für eine Präzipitation mit der anti-FLAG-M2 Agarose werden 12 µl der Matrix pro Probe verwendet. Die Gesamtmenge an Agarose für die gewünschte Anzahl von Ansätzen wird zunächst 3-mal mit RAF-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µl RAF-Puffer pro Ansatz resuspendiert. Jeweils 100 µl dieser Suspension werden zu einem Zellextrakt pipettiert und für 2 h bei 4°C über Kopf geschwenkt. Anschließend wird die Probe 4-mal mit je 1 ml RAF-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine werden durch Inkubation mit 35 µl 2×Proteinprobenpuffer eluiert und denaturiert.

Bei der Präzipitation mit einem spezifischen Antikörper und Protein A Sepharose wird der Ansatz zunächst mit 2 µl des spezifischen Antikörpers für 1 h bei 4°C über Kopf geschwenkt. Die Protein A Sepharose wird als Suspension in RAF-Puffer eingewogen und 3-mal nach der Zentrifugation mit je 1 ml RAF-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschrschritt wird sie in einer Endkonzentration von 2% im RAF-Puffer resuspendiert und jeweils 150 µl dieser Suspension werden zu den Ansätzen mit den spezifischen Antikörpern pipettiert, die dann für 1 h unter Schwenken inkubiert werden. Anschließend werden die Proben 4-mal mit je 1 ml RAF-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine durch Inkubation mit 35 µl 2×Proteinprobenpuffer eluiert und denaturiert. Nach 5 min bei 95°C werden die präzipitierten Proteine mittels SDS-Page (Abschnitt 3.3.1) aufgetrennt und mit Hilfe des Western Blots (Abschnitt 3.3.3) analysiert.

3.3.6 NiNTA-Aufreinigung

Die NiNTA-Methode erlaubt es, Proteine unter denaturierenden Bedingungen aus Zellen zu isolieren und ist für Untersuchung von Proteinmodifikationen wie Ubiquitinierung geeignet. Das Prinzip basiert auf einer Bindung des His-Tags an NiNTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen, sodass z.B. Zielproteine mit einem His-Tag gezielt aus Zelllysaten isoliert werden. Durch exzessive Waschschrritte mit niedrigen Imidazolkonzentrationen werden unspezifisch gebundene Proteine ausgewaschen und die Zielproteine können durch Einsatz hoher Imidazolkonzentration von der NiNTA verdrängt werden. Imidazol wird unmittelbar vor der Anwendung zugegeben.

Die transfizierten Zellen einer 6 cm-Schale werden in 1 ml NiNTA-Lysepuffer aufgenommen und für 10 min bei 4°C lysiert. Die Lysate werden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 2×30 s auf der Stufe 6 sonifiziert, um die zelluläre DNA zu zerkleinern. Die Zellreste werden für 10 min bei 14000 Upm abzentrifugiert und die Lysate in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Inzwischen wird die NiNTA vorbereitet: Pro Ansatz werden 20 µl NiNTA-Agarose 2-mal mit NiNTA-Lysepuffer bei 2000 Upm Zentrifugation gewaschen, um die Agarose nicht zu zerstören. Danach wird die NiNTA-Agarose in 50 µl NiNTA-Lysepuffer pro Ansatz resuspendiert und zu den Zelllysaten gegeben. Die Ansätze werden 1 h bei RT unter Drehen inkubiert und dann stringent gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen: 1 ml NiNTA-Lysepuffer mit 20 mM Imidazol; 1 ml NiNTA-Waschpuffer; 1 ml NiNTA-Puffer A mit 0,2% Triton X-100; 1 ml NiNTA-Puffer A; 1 ml NiNTA-Puffer A mit 0,1 % Triton X-100. Bei allen Waschschritten werden die Ansätze nach Pufferzugabe invertiert und für 2 min bei 2000 Upm pelletiert. Das Protein-Agarose Pellet wird in 50 µl 2×Proteinprobenpuffer mit 200 mM Imidazol aufgenommen, wodurch die gereinigten His-getagten Proteine eluiert und denaturiert werden. Nach einer kurzen Zentrifugation werden die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 5 min bei 95°C erhitzt und mittels SDS-Page und Western Blot analysiert (Abschnitte 3.3.1, 3.3.3).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von KCTD5

4.1.1 Einfluss des KCTD5 C-Terminus auf die Dimerisierung und die subzelluläre Lokalisation

Zur grundlegenden Charakterisierung des KCTD5-Proteins wurden Plasmidkonstrukte mit unterschiedlich großen Deletionen im C-terminalen Bereich verwendet. Die entsprechenden Abschnitte der KCTD5-Sequenz wurden mit einem N-terminalen FLAG-Tag-Epitop versehen und standen nach Transfektion in Säugerzellen unter der Kontrolle des frühen Promotors/Enhancers des Humanen Cytomegalovirus (CMV).

Die Untersuchung der zellulären Lokalisation erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Wie von Bayón *et al.* und Weger *et al.* beschrieben [9, 10], war das Volllänge-Wildtyp-Protein hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert, hier jedoch verstärkt im perinukleären Bereich anzutreffen (Abb. 4.1, A). Da bei einer RNA-Interferenz-Studie KCTD5 als essentiell für die Zellteilung identifiziert wurde [103], wurde eine mögliche Kollokalisierung des Wildtyp-KCTD5 mit zellulären zytoplasmatischen Strukturen wie Tubulin untersucht. Dafür wurde eine Doppelfärbung für Tubulin und das transfizierte KCTD5-1/234 in HeLa-Zellen durchgeführt (Abb. 4.1, B). Tubulin und KCTD5-1/234 konnten beide gemeinsam im Zytoplasma und insbesondere im perinukleären Bereich detektiert werden. Die Verteilung der Proteine war jedoch augenscheinlich nicht absolut identisch, weil KCTD5 im Vergleich zu Tubulin weitgehend homogener im Zytoplasma verteilt vorlag. Diese visuelle Schlussfolgerung wurde durch Quantifizierung bestätigt: Laut Confoc2, ImageJ, beträgt der Pearson Korrelationskoeffizient für KCTD5 und Tubulin $0,53 \pm 0,07$. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie konnte daher eine partielle Kollokalisierung von KCTD5 und Tubulin gezeigt werden.

Mit verschiedenen Deletionen im C-terminalen Bereich von KCTD5 geht teilweise eine veränderte zelluläre Lokalisation einher. Die KCTD5-1/203 und KCTD5-1/191 Mutanten, die eine Deletion der 31 bzw. 43 C-terminalen Aminosäuren aufweisen, sind im Unterschied zum Wildtyp-Protein ganz überwiegend im Zellkern zu finden [10, 11]. Hingegen sind bei der Deletion zusätzlicher Aminosäuren im C-terminalen Bereich die entsprechenden Mutanten KCTD5-1/181 und 1/170 wieder im Zytoplasma anzutreffen [9, 11]. Um den Zusammenhang zwischen den im KCTD5 C-Terminus vorhandenen Aminosäureabschnitten und der Lokalisation des Proteins näher charakterisieren zu können, wurden zusätzlich zu den im Rahmen der Diplomarbeit bereits generierten Konstrukten [11] weitere KCTD5-Mutanten hergestellt: KCTD5-1/160 und KCTD5-1/145 (Abb. 4.1, C).

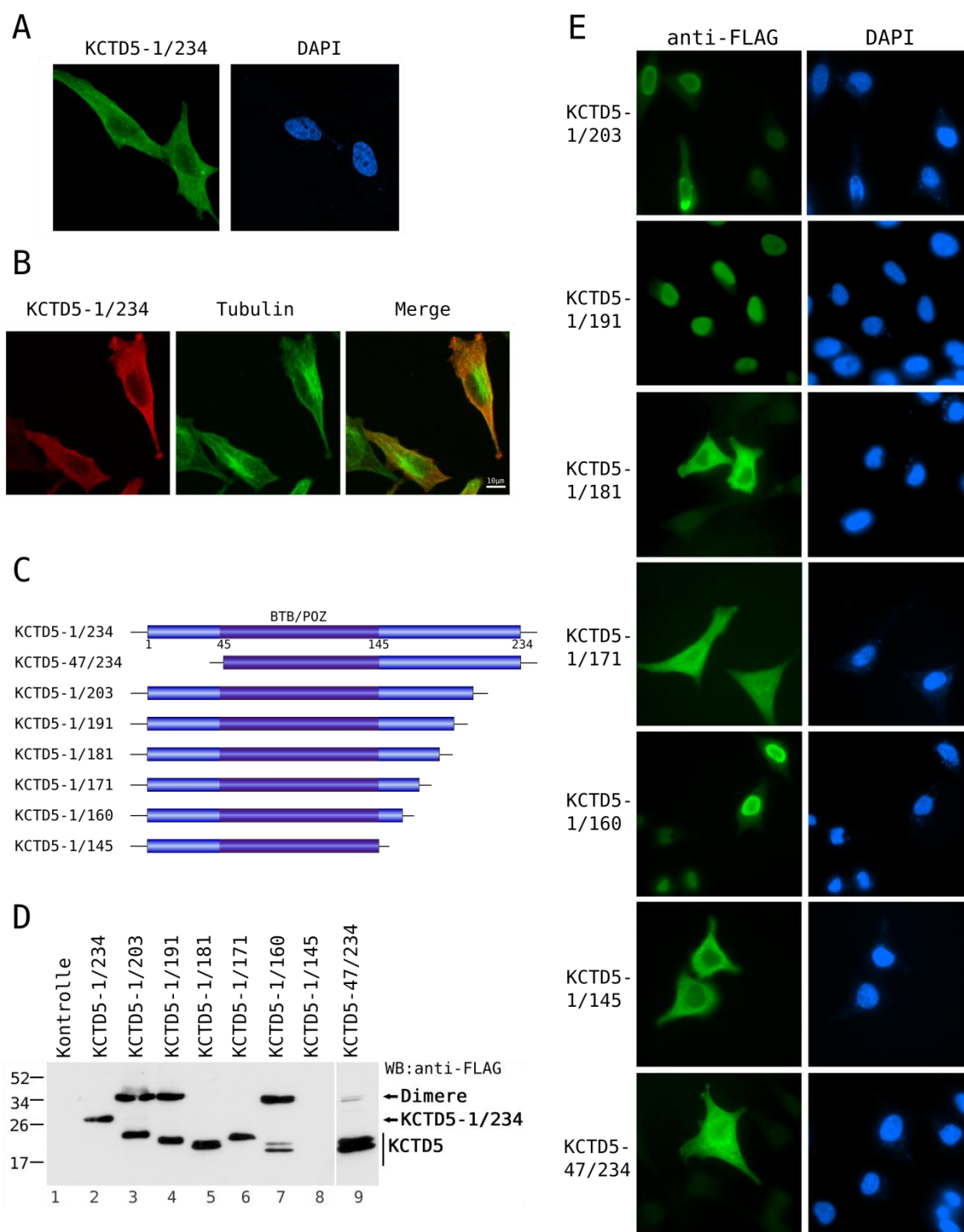


Abb. 4.1: Der KCTD5 C-Terminus beeinflusst die Dimerisierungseigenschaften und die subzelluläre Lokalisation. (A-B) Immunfluoreszenz in HeLa-Zellen. Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop Zeiss LSM 510. (A) HeLa-Zellen wurden mit 4 μ g pCATCH-FLAG-KCTD5 transfiziert und nach 42 h für die Immunfluoreszenz aufgearbeitet. Die immunologische Färbung erfolgte durch anti-FLAG-M2 (mouse) Primär- und FITC-markiertem Sekundärantikörper. (B) Immunfluoreszenz in HeLa-Zellen nach Transfektion von 4 μ g pMyc-KCTD5. Zellen wurden mit anti-Tubulin Primär- und FITC-markiertem Sekundärantikörper und zusätzlich mit anti-Myc (rabbit) Primär- und TRITC-markiertem Sekundärantikörper gefärbt. (C) Schematische Darstellung der verwendeten pCATCH-FLAG-KCTD5-Konstrukte. (D) HEK293-Zellen wurden mit 4 μ g von pCATCH-FLAG-KCTD5-Konstrukten transfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden auf die Expression der KCTD5-Proteine mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper mittels Western Blot untersucht. (E) HeLa-Zellen wurden mit pCATCH-FLAG-KCTD5-Konstrukten transfiziert. Die Untersuchung erfolgte mit anti-FLAG-M2 (mouse) Primär- und FITC-markiertem Sekundärantikörper. Die Bilder wurden mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Bei der Untersuchung aller generierten KCTD5-Mutanten mittels Immunfluoreszenz wurden KCTD5-1/203 und KCTD5-1/191 in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Studien fast ausschließlich im Zellkern detektiert, während KCTD5-1/181 und KCTD5-1/170 Mutanten im Zytoplasma lokalisiert waren (Abb. 4.1, E). Die weitere Verkürzung des C-Terminus bis zur Aminosäure 160 hatte zur Folge, dass KCTD5-1/160 verstärkt im Zellkern und nur teilweise im Zytoplasma detektiert werden konnte. Nach der C-terminalen Deletion bis zur BTB-Domäne wurde KCTD5-1/145 im Zytoplasma nachgewiesen. Die Deletion des N-Terminus bis Aminosäure 47 translozierte das Protein KCTD5-47/234 zu einem geringen Teil in den Zellkern.

Die Proteinexpression der verwendeten KCTD5-Konstrukte wurde zusätzlich mittels Western Blot untersucht. Für alle Konstrukte konnte eine Expression von FLAG-reaktiven Proteinbanden nachgewiesen werden (Abb. 4.1, D). Das KCTD5-1/145-Konstrukt wies die schwächste Proteinexpression auf, sodass die Proteinbande bei einer kurzen Expositionszeit nicht detektierbar war (Abb. 4.1, D, Spur 8). Bei den Konstrukten KCTD5-1/203, KCTD5-1/191, KCTD5-1/160 und KCTD5-47/234 wurde im Western Blot jeweils eine zusätzliche Bande im höhermolekularen Bereich detektiert, die mit Ausnahme von KCTD5-47/234 auch eine stärkere Intensität besaß als die auf der Höhe des putativen Monomers (Abb. 4.1, D, Spuren 3, 4, 7, 9). Aufgrund des anscheinenden Molekulargewichts dieser Banden kann angenommen werden, dass es sich um KCTD5-Homodimere handelt. Interessanterweise wurden diese Banden ausschließlich bei den KCTD5-Konstrukten beobachtet, für die eine nukleäre Lokalisation gezeigt werden konnte, sodass von einem funktionellen Zusammenhang zwischen Dimerisierung und nukleärer Lokalisation ausgegangen werden kann (Abb. 4.1, D-E) [11].

Einige der KCTD5-Konstrukte zeigten eine zusätzliche reaktive Bande unmittelbar über der erwarteten hauptsächlichen Bande (Abb. 4.1, D, Spuren 7, 9). In diesem Fall handelt es sich wahrscheinlich um eine zelluläre posttranslationale Modifikation.

Die Korrelation von nukleärer Lokalisation der KCTD5-1/203, -1/191 und -1/160 Mutanten mit der Ausbildung vermeintlicher Homodimere, die auch unter den Bedingungen der SDS-PAA-Gelelektrophorese stabil waren, warf die Frage auf, ob die Veränderung der zellulären Lokalisation eine direkte Folge von Homodimerisierung oder Homooligomerisierung/Penta-merisierung war.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden das im Zytoplasma lokalisierte KCTD5-Volllänge-Konstrukt und das überwiegend im Zellkern lokalisierte KCTD5-1/191 nach gemeinsamer Expression auf ihre subzelluläre Lokalisation und mögliche Interaktion untersucht.

Nach getrennter Transfektion wurden wie in den vorangegangenen Experimenten das Myc-getaggte KCTD5-Volllänge-Protein im Zytoplasma und das FLAG-getaggte KCTD5-1/191-Protein im Zellkern nachgewiesen. (Abb. 4.2, A). Nach der Kotransfektion

beider Konstrukte erfolgte jedoch beim überwiegenden Teil der untersuchten Zellen eine Translokation des Myc-getaggten KCTD5-1/234-Volllänge-Proteins in den Zellkern.

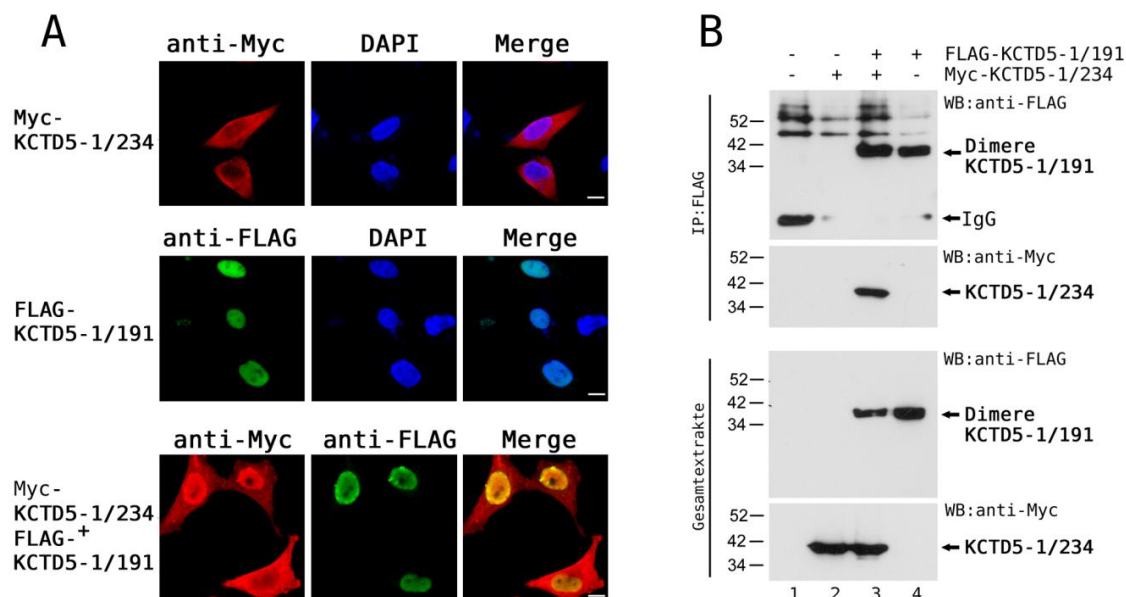


Abb. 4.2: Veränderte Lokalisation des Volllänge-KCTD5-1/234 Proteins nach Interaktion mit der KCTD5-1/191 Mutante. (A) HeLa-Zellen wurden einzeln oder in Kombination mit je 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5-1/191 und pMyc-KCTD5-1/234 in 4 µg Ansätzen transfiziert. Die untersuchten Proteine wurden für die Immunfluoreszenz mit folgenden Antikörpern inkubiert: anti-FLAG-M2 (mouse) Primär- und FITC-markiertem Sekundärantikörper; anti-Myc (rabbit) Primär- und TRITC-markiertem Sekundärantikörper. Die Bilder wurden mit dem Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. (B) Ko-Immunpräzipitation von Myc-getaggtm KCTD5-1/234 mit FLAG-getaggtm KCTD5-1/191. HeLa-Zellen wurden in einem 4 µg Ansatz mit 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5-1/191 und 2 µg pMyc-KCTD5-1/234 kotransfiziert. Die eine Hälfte wurde im RAF-Puffer lysiert und mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert. Die zweite Hälfte wurde direkt in Proteinprobenpuffer lysiert. Die Präzipitate und die Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot untersucht. Die Detektion erfolgte durch anti-Myc (rabbit) und anti-FLAG-M2 (mouse) Primärantikörper und entsprechende Sekundärantikörper.

Um zu überprüfen, ob die beiden Proteine in den Zellen als Komplex vorliegen, wurde FLAG-KCTD5-1/191 präzipitiert und das KCTD5-1/234-Protein über den Myc-Tag in der Western Blot Analyse nachgewiesen. Es konnte eine spezifische Interaktion zwischen den beiden KCTD5-Proteinen gezeigt werden (Abb. 4.2, B, IP: Spur 3). Während jedoch sowohl in den Präzipitaten als auch in den Gesamtzellextrakten putative dimerische FLAG-KCTD5-1/191-Banden nachgewiesen werden konnten (Abb. 4.1.2, B), wurden im Myc-Western keine unter den Bedingungen der SDS-PAGE stabilen KCTD5-1/234 putativen Heterodimere oder höhere Oligomere nachgewiesen (Abb. 4.2, B, Spuren 3-4). Die Kopräzipitation der beiden KCTD5-Proteine zeigte jedoch, dass es durch die Interaktion wahrscheinlich zur Ausbildung von Trimeren oder höheren Oligomeren kommt.

Die Untersuchung der generierten KCTD5-Konstrukte bestätigte die Rolle der C-terminalen Aminosäuren bei der nukleären Translokation von KCTD5. Eine starke Korrelation wurde zwischen Kernlokalisation und Dimerausbildung beobachtet, wie dies

ansatzweise in früheren Experimenten beobachtet worden war [10, 11]. Das Wildtyp-KCTD5 wird durch Ausbildung starker Dimere oder Oligomere mit einer nukleären Deletionsmutante in den Zellkern transloziert.

4.1.2 KCTD5-Lokalisation im Verlauf des Zellzyklus

Das Volllänge-KCTD5-1/234-Konstrukt ist ein überwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes Protein. In einem vorangegangenen Yeast-two-hybrid-Screen wurden mit MCM7 und ZNF711 als KCTD5 Interaktionspartner zwei Faktoren identifiziert, die ihre biologische Aktivität überwiegend im Zellkern entfalten [11, 96]. Daher wurde untersucht, ob KCTD5-1/234 möglicherweise seine Lokalisation im Lauf des Zellzyklus ändert und in räumliche Nähe zu diesen Interaktionspartnern kommt. Für diese Untersuchungen wurde zunächst die Methodik der Synchronisation von HeLa-Zellen durch einen doppelten Thymidinblock etabliert und mittels FACS-Analyse in Gegenwart von Propidiumiodid validiert.

Die Analyse der Zellen erfolgte mit FACS CellQuest ProTM, die Auswertung mit Flowing Software 2. Untersucht wurden die ersten 11 Stunden nach der Aufhebung des Blocks durch das Waschen der Zellen und die Zugabe des frischen Mediums (Abb. 4.3).

Eine exemplarische Auswertung der FACS-Analyse ist in Abb. 4.3, A für die Zeitpunkte 0 h und 11 h dargestellt. Unmittelbar nach der Aufhebung des Blocks konnten bereits viele Zellen am Anfang der S-Phase detektiert werden, wobei die DNA-Synthese zu dem Zeitpunkt noch nicht fortgeschritten war (Abb. 4.3, B, vgl. 0 h und 3,5 h). Nach 3,5 h befanden sich 49% der Zellen noch in der S-Phase und 45% bereits in der G2-Phase, während die Anzahl der Zellen mit einem einfachen DNA-Satz nur bei 6% lag (Abb. 4.3, B, C, D). Nach 7 h war der Großteil der Zellen bereits in der G2-Phase und die Zellzahl in der S-Phase ging von 49% auf 19% zurück. Die Zellteilung setzte zwischen 8 und 9 h nach dem Eintritt in die S-Phase ein (Abb. 4.3, C und D). 11 h nach dem Aufheben des Blocks hatten 78% der Zellen die S-, die G2-Phase und die Zytokinese durchlaufen.

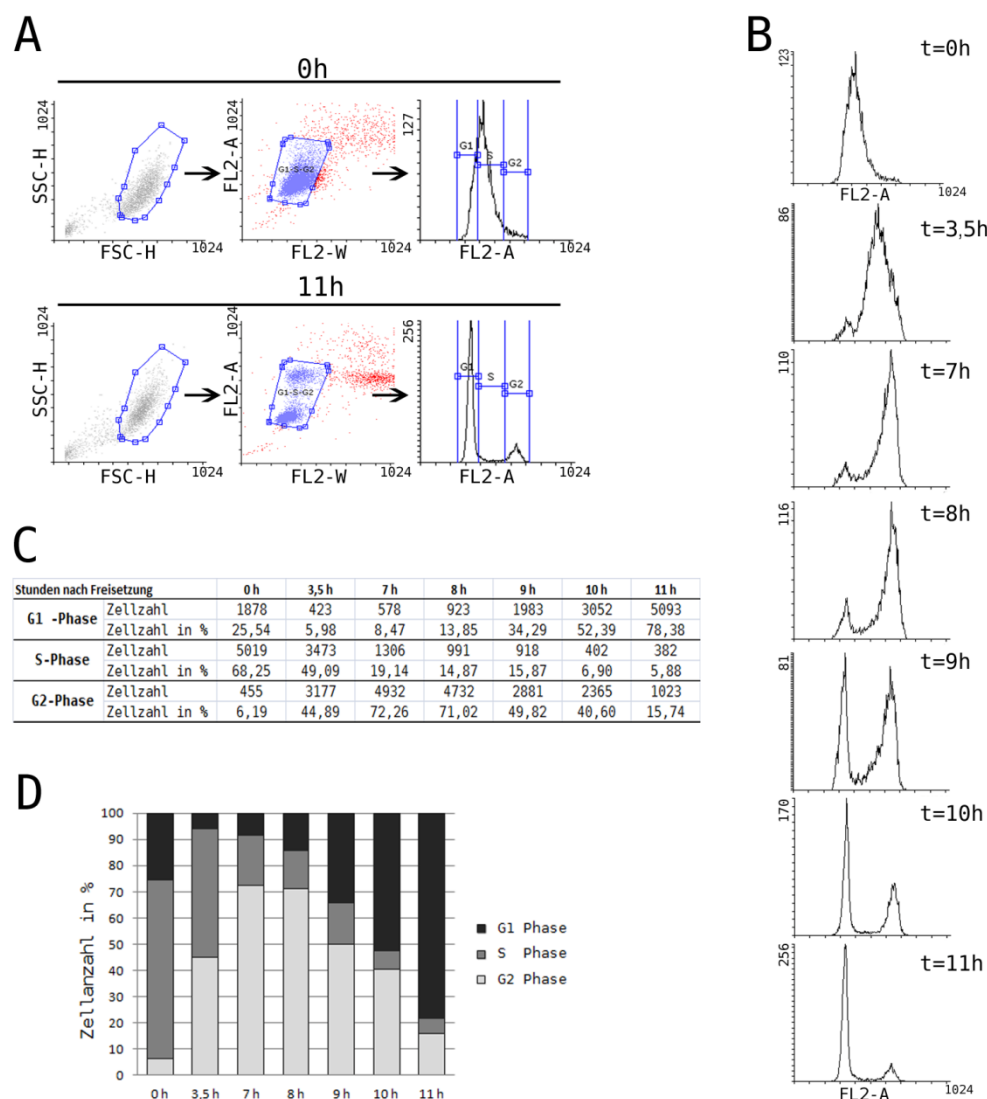


Abb. 4.3: Synchronisierung von HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mittels des Doppelthymidinblocks synchronisiert. 1 h vor dem ersten Thymidinblock wurden die Zellen mit der pCATCH-Plasmid-DNA transfiziert. Die Aufnahme der 10000 Zellen erfolgte mittels CellQuest Pro™. Für die Auswertung wurde Flowing Software 2 benutzt. Dargestellt ist eins von zwei durchgeführten Experimenten (A) Beispiel der Auswertung mit Hilfe der Flowing Software2 zu den Zeitpunkten 0 h und 11 h nach Freisetzung in das frische Medium. (B) Darstellung der Gesamtpopulationen in einem Histogramm. Dargestellt ist die Zellzahl gegen die Propidiumiodidfärbung zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Eintritt in die S-Phase. (C) Tabellarische Darstellung der Populationenverteilung in den G1/S/G2-Phasen zu verschiedenen Zeitpunkten. (D) Graphische Darstellung der in G1/S/G2-gemessenen Populationen in Prozent.

Mit dem doppelten Thymidinblock wurden die Synchronisierungsraten von 60-70% erreicht [195, 198]. Diese Synchronisierungsmethode konnte daher in den weiteren Untersuchungen eingesetzt werden, um die Lokalisation und die Expression von KCTD5 und seinen Interaktionspartnern in Abhängigkeit vom Zellzyklus zu untersuchen. Die Untersuchung der KCTD5-Lokalisation erfolgte wie oben dargestellt in synchronisierten HeLa-Zellen. In einem Vorversuch wurde die Lokalisation von KCTD5 zwar während des gesamten Zellzyklus untersucht, die nachfolgenden Versuche konzentrierten sich jedoch auf die ersten 12 h nach dem Eintritt in die S-Phase.

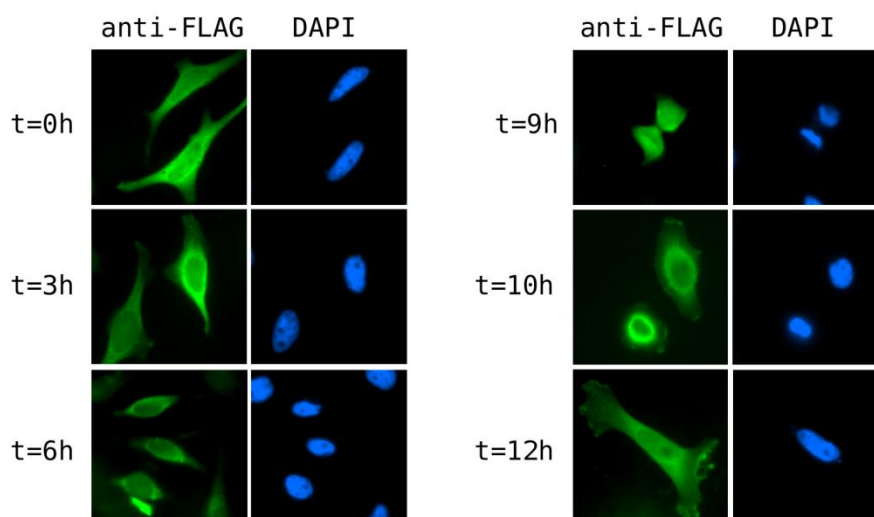


Abb. 4.4: Lokalisation von KCTD5 in Abhängigkeit vom Zellzyklus. HeLa-Zellen wurden in einem 4 µg Ansatz mit 4 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 Plasmid-DNA transfiziert, einem doppelten Thymidinblock zur Synchronisierung der Zellen unterzogen und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aufhebung des Blocks mittels Immunfluoreszenz mit anti-FLAG-M2 (mouse) Primärantikörper und FITC-markierten Sekundärantikörper analysiert.

Das Volllänge-KCTD5-Protein wurde vor und unmittelbar nach Beginn der S-Phase ganz überwiegend im Zytoplasma nachgewiesen. Eine Änderung der Lokalisation mit einer Abschwächung des zytoplasmatischen Anteils und einer verstärkten perinukleären Fluoreszenz wurde erstmalig 6 bis 9 h nach Aufhebung des Blocks beobachtet (Abb. 4.4). Ein Vergleich mit Abb. 4.3 lässt vermuten, dass es sich dabei überwiegend um Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus handelt, während es in der S-Phase zu keiner Veränderung der zytoplasmatischen Lokalisation kommt. Zum Zeitpunkt der Zytokinese konzentrierte sich KCTD5 um die chromosomale DNA herum (9 h) und bildete dann bei Zellausbreitung einen starken perinukleären Ring mit Ausläufern in Richtung Zellmembran aus (10 h). Nach der Adhäsion und Zellausbreitung konnte KCTD5 dann wieder überwiegend im Zytoplasma nachgewiesen werden (12 h). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine nukleäre Funktion von KCTD5 bei der eigentlichen Zytokinese eine Rolle spielt.

4.2 KCTD5 und der Replikationsfaktor MCM7

4.2.1 Charakterisierung der MCM7-Konstrukte

Da das MCM7-Protein in der vorangegangenen Diplomarbeit im Yeast-two-hybrid-Screen als putativer Interaktionspartner von KCTD5 und damit auch als potentielles Substrat für eine KCTD5-Cullin3-vermittelte Ubiquitinierung identifiziert werden konnte [11], wurde die Interaktion der beiden Proteine in Säugerzellen untersucht. Dafür wurde zunächst der offene Leserahmen von MCM7 in Vektoren mit verschiedenen Tags am N-Terminus des MCM7-ORF kloniert und die MCM7-Proteinexpression in HeLa- und in HEK293-Zellen mittels Western Blot analysiert (Abb. 4.5, A).

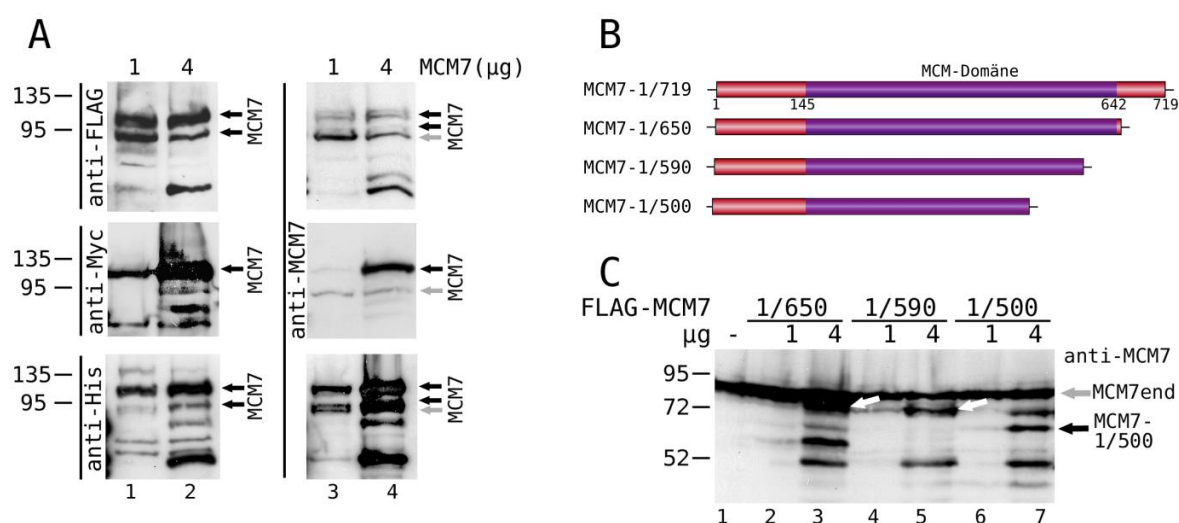


Abb. 4.5: Untersuchung der Proteinexpression der getaggen MCM7-Konstrukte. (A) Proteinexpression der MCM7-Volllänge-Konstrukte mit FLAG-, Myc- und His-Tags, jeweils fusioniert an den N-Terminus des MCM7-ORF. Kulturzellen einer 6 cm-Schale wurden mit 4 µg pCATCH-FLAG-MCM7-1/719 (HeLa-Zellen), pMyc-MCM7-1/719 (HeLa-Zellen) oder pCATCH-His-MCM7-1/719 (HEK293-Zellen) transfiziert. Nach 42 h wurden die Gesamtzellextrakte im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse), anti-Myc (rabbit), anti-His und anti-MCM7 Primärantikörpern und entsprechenden Sekundärantikörpern analysiert. (B) Schematische Darstellung der in der Arbeit verwendeten FLAG-getaggen MCM7-Konstrukte mit unterschiedlichen Deletionen des C-Terminus. (C) Die Proteinexpression der FLAG-getaggen MCM7-Mutanten wurde in HEK293-Zellen getestet. Die Zellen wurden mit pCATCH-FLAG-MCM7-1/650, MCM7-1/590 oder MCM7-1/500 Plasmid-DNA transfiziert und die Gesamtzellextrakte wurden 42 h später im Western Blot mit anti-MCM7 Antikörper analysiert. (A und C) Die exogenen MCM7-Proteinbanden sind durch schwarze Pfeile, die endogenen MCM7-Banden durch graue Pfeile markiert.

Die Expression aller generierten MCM7-1/719-Konstrukte konnte im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 4.5, A). Das rechnerische Molekulargewicht des endogenen MCM7 beträgt 81,3 kDa, die durch anti-MCM7 Antikörper detektierte Bande zeigte jedoch ein tatsächliches Laufverhalten von 95 kDa (Abb. 4.5, A, Spuren 3-4, grauer Pfeil). Aufgrund der geringen Größe des FLAG- und des His-Tags liefen die entsprechenden überexprimierten exogenen MCM7-Proteine direkt über dem endogenen MCM7-Protein. Die MCM7-Banden waren ab einer Konzentration von 1 µg DNA in einem 4 µg Ansatz für alle drei Tags detektierbar. Bei Überexpression des Myc-getaggen MCM7-Proteins

wurde mit dem anti-Myc Antikörper nur eine einzige Bande detektiert (Abb. 4.1, A: anti-Myc, Spuren 1-2), während sowohl beim FLAG- als auch beim His-getaggen Expressionskonstrukten eine zweite Bande mit einem höheren Molekulargewicht auftrat. Die zusätzliche Bande wurde mit anti-MCM7 Antikörper ebenfalls nachgewiesen, sodass es sich hier möglicherweise um eine Modifikation handelt, die beim Myc-getaggen MCM7-Protein nicht auftritt. Bei allen Konstrukten wurden eine bis zwei prominente niedermolekulare Banden detektiert (Abb. 4.5, A). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um Degradationsprodukte der überexprimierten MCM7-Proteine.

Zur genauen Charakterisierung der Interaktion zwischen MCM7 und KCTD5 und zur Eingrenzung potentiell mit Ubiquitin modifizierter Lysin-Reste im MCM7-Leserahmen wurden mittels PCR-Klonierung zusätzlich drei C-terminale MCM7-Deletionsmutanten generiert (Abb. 4.5, B). Mittels Yeast-two-hybrid-Screens wurde die MCM7-Region mit den Aminosäuren 591-719 als ausreichend für die Interaktion mit KCTD5 identifiziert [11], während an der Interaktion mit E6-AP die Aminosäuren 633-654 beteiligt sind [130]. Bei der C-terminalen Mutante MCM7-1/650 fehlt ein Teil der Aminosäuren, die möglicherweise die Interaktion mit KCTD5 vermitteln. Diese KCTD5-Interaktionsdomäne ist beim Konstrukt MCM7-1/590 vollständig deletiert, ebenso wie die 52 C-terminalen Aminosäuren der so genannten MCM-Domäne. Außerdem fehlt dem MCM7-1/590-Konstrukt die beschriebene Interaktionsdomäne für die Bindung an E6-AP.

Die Proteinexpression der generierten FLAG-getaggen MCM7-Deletionskonstrukten wurde in HEK293-Zellen untersucht (Abb. 4.5, C). Unter den beschriebenen Transfektionsbedingungen lag die Nachweisgrenze für MCM7-1/590 und MCM7-1/500 oberhalb von 1 µg transfiziertem MCM7-Expressionskonstrukt, während für MCM7-1/650 eine schwache Bande bei 1 µg des Konstruktes detektiert werden konnte. Nach der Transfektion von 4 µg Plasmid-DNA wurde für alle Deletionsmutanten eine deutliche Expression detektiert (Abb. 4.5, C, Spuren 3, 5 und 7). Beim MCM7-1/500-Konstrukt wurde eine zweite Bande mit einem höheren Molekulargewicht nachgewiesen, wobei es sich möglicherweise um die gleiche Modifikation handelt, die bei den FLAG- und His-getaggen MCM7-1/719-Volllänge-Proteinen auftritt (Abb. 4.5, A und C, Spur 7). Eine zusätzliche, unterhalb der 52 kDa laufende Bande wurde bei allen Deletionsmutanten detektiert, wobei es sich wahrscheinlich wie bei MCM7-1/719 um Abbauprodukte der überexprimierten Proteine handelt, denn eine alternative, verkürzte Variante des MCM7-Proteins wird bei den verwendeten Vektoren nicht gebildet.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass alle unterschiedlich getaggen MCM7-Volllänge-Konstrukte und Deletionsmutanten zur Expression von Proteinen der erwarteten Größe führten und die Konstrukte damit für die Folgeexperimente eingesetzt werden konnten.

4.2.2 Charakterisierung der für die Interaktion von KCTD5 mit MCM7 notwendigen Proteindomänen

Zunächst sollte die im Yeast-two-hybrid-Screen bereits nachgewiesene Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7 in Säugerzellen verifiziert werden. Dafür wurden unterschiedlich getaggte KCTD5 und MCM7-Volllänge-Konstrukte in HEK293-Zellen transfiziert und das jeweils FLAG-getaggte Protein über FLAG-M2 Agarose präzipitiert (Abb. 4.6, A und B).

Nach der Präzipitation von FLAG-getaggttem MCM7 konnten im anschließenden Western Blot zwei Banden detektiert werden, die im Laufverhalten der unmodifizierten und einer wahrscheinlich modifizierten Form des MCM7-Proteins entsprachen (Abb. 4.6, A, IP: Spur 3). Das kotransfizierte Myc-getaggte KCTD5-1/234 konnte in den MCM7-Präzipitaten deutlich nachgewiesen werden, allerdings wurde auch bei der Kontrolle in Abwesenheit von FLAG-getaggttem MCM7 eine Myc-KCTD5-Bande detektiert, die jedoch sehr schwach war (Abb. 4.6, A, IP: Spuren 2, 3). Die vergleichsweise wesentlich stärkere KCTD5-Bande in der Spur 3 (in Anwesenheit von FLAG-MCM7) weist jedoch darauf hin, dass es neben einer schwachen unspezifischen Bindung von Myc-KCTD5 an die FLAG-M2 Agarose auch zu einer spezifischen Komplexbildung mit MCM7 kam. Das putative KCTD5-Homodimer konnte ebenfalls in den MCM7-Immunpräzipitaten nachgewiesen werden, allerdings ist die Bindungsspezifität aufgrund der sehr schwachen Bande nicht eindeutig (Abb. 4.6, A, IP: Spuren 2, 3). Die Kotransfektion mit MCM7 hatte keine Veränderung im KCTD5-Expressionsmuster in den Gesamtzellextrakten zur Folge (Abb. 4.6, A, Gesamtextrakte: Spuren 2-3).

Als zusätzliche Kontrolle wurden in einem komplementären Ansatz FLAG-KCTD5-Präzipitate auf die Präsenz des kotransfizierten Myc-MCM7 mittels Western Blot untersucht. FLAG-KCTD5 konnte mit Hilfe der FLAG-M2 Agarose spezifisch präzipitiert werden, wobei auch das putative KCTD5-Homodimer gut zu erkennen war (Abb. 4.6, B, IP: Spur 2). Das Myc-getaggte MCM7 konnte nur im Ansatz mit dem kotransfizierten FLAG-KCTD5 nachgewiesen werden, sodass es sich um eine spezifische Interaktion zwischen den beiden Proteinen handelte (Abb. 4.6, B, IP: Spuren 1 und 2). Das MCM7-Expressionsmuster wurde durch die Kotransfektion von KCTD5 nicht beeinflusst (Abb. 4.6, B, Gesamtextrakte).

KCTD5 interagiert über seinen N-terminalen Anteil mit Cullin3, sodass eine Interaktion mit potentiellen Substraten des gebildeten Cullin3-KCTD5-Komplexes sehr wahrscheinlich über den C-terminalen Teil des KCTD5 vermittelt werden müsste [9, 11]. Um zu untersuchen, welche Aminosäuren am KCTD5 C-Terminus für die Interaktion mit MCM7 notwendig sind, wurde die Bindung des Myc-getaggtten Volllänge-MCM7-1/719 an die C-terminalen KCTD5-Deletionsmutanten in Form der FLAG-getaggtten Fusionsproteine analysiert.

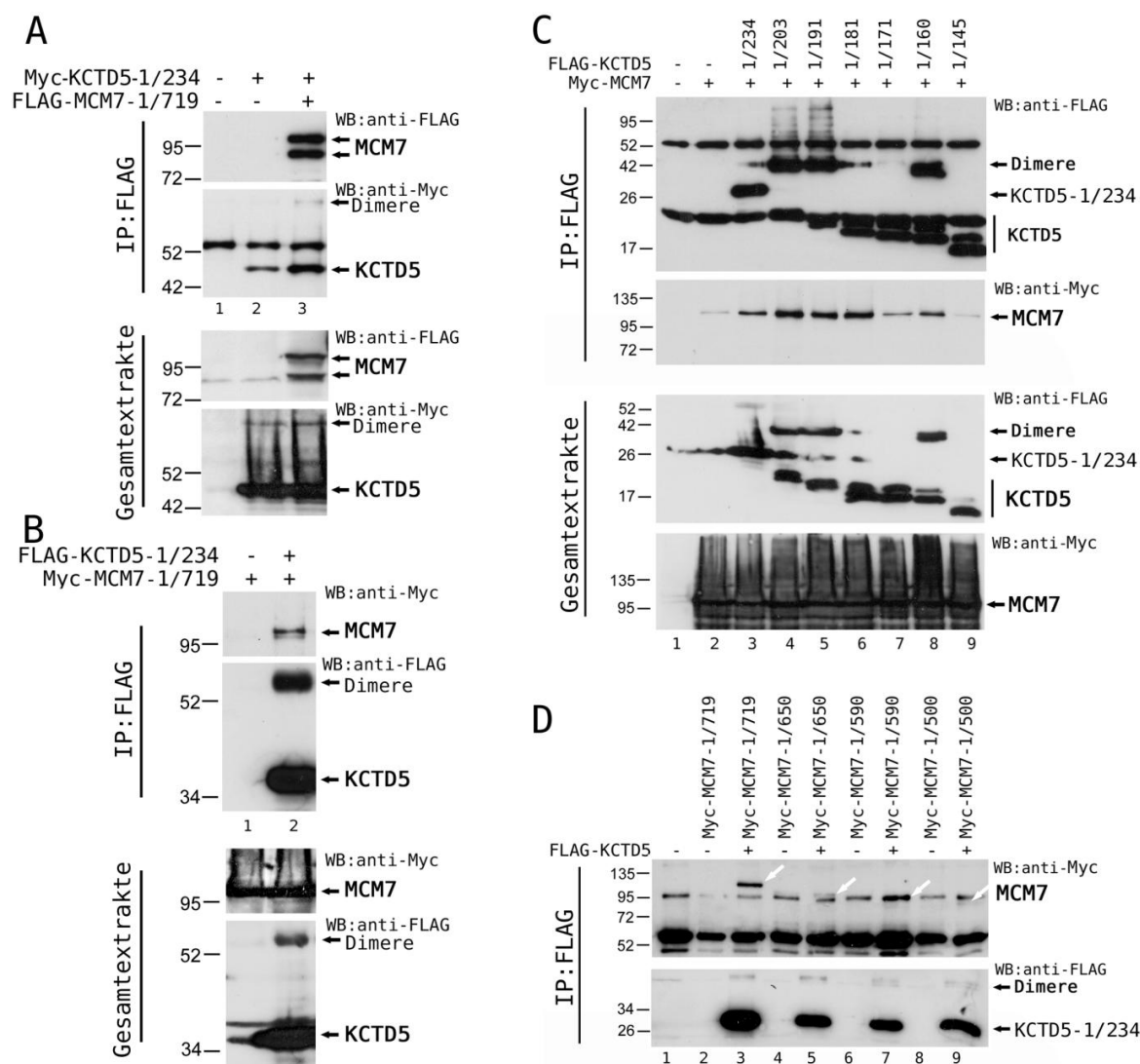


Abb. 4.6: KCTD5 interagiert spezifisch mit MCM7. (A, B) Ko-Immünpräzipitation zwischen KCTD5 und MCM7 in Säugerzellen. Für die Transfektion der HEK293-Zellen einer 6 cm-Schale mit einem 4 µg DNA-Ansatz wurden (A) 2 µg pCATCH-FLAG-MCM7-1/719 und 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5-1/234 (B) 2 µg pMyc-MCM7-1/719 und 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5-1/234 Plasmid-DNA verwendet. Die RAF-Zelllysate wurden für 2 h mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert. Die Präzipitate und die Gesamtzellextrakte aus HEK293-Zellen wurden im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse) und anti-Myc (mouse) Primärantikörpern und entsprechenden Sekundärantikörpern analysiert. (C) Untersuchung der Interaktion zwischen Myc-getaggttem MCM7-Volllänge-Protein und FLAG-KCTD5-Mutanten mittels Kopräzipitation an FLAG-M2 Agarose. HEK293-Zellen wurden mit 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 und 2 µg pMyc-MCM7-Konstrukten in einem 4 µg Ansatz kotransfiziert. Die Aufarbeitung der Präzipitate erfolgte nach Protokoll. Die präzipitierten Proteine wurden im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse) und anti-Myc (rabbit) Primärantikörpern und entsprechenden Sekundärantikörpern nachgewiesen. Die Gesamtzellextrakte wurden parallel zur Immunpräzipitation aufgearbeitet und mittels Western Blot untersucht. (D) Ko-Immünpräzipitation mittels FLAG-M2 Agarose zur Untersuchung der Interaktion zwischen Myc-getaggtten MCM7-Deletionsmutanten und FLAG-KCTD5-Volllänge-Konstrukt in HEK293-Zellen. Die Kotransfektion der HEK293-Zellen erfolgte mit 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 und 2 µg pMyc-MCM7-Mutanten in einem 4 µg Ansatz. Die durch KCTD5 kopräzipitierten MCM7-Proteine sind durch weiße Pfeile markiert. Für den Nachweis der präzipitierten Proteine wurden anti-Myc (mouse) und anti-FLAG-M2 (mouse) Primärantikörper und entsprechende Sekundärantikörper verwendet.

Alle untersuchten FLAG-getaggtten KCTD5-Deletionsmutanten wurden mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert (Abb. 4.6, C, IP). Die unspezifische MCM7-Bindung an FLAG-M2 Agarose war sehr schwach und konnte daher vernachlässigt werden (Abb. 4.6, C, IP: Spur 2). Zwischen Myc-MCM7 und den FLAG-getaggtten C-terminalen KCTD5-Mutanten

KCTD5-1/203, 1/191 und 1/181 wurde die stärkste Bindung beobachtet (Abb. 4.6, C, IP: Spuren 4-6), die bei weiterer Deletion des KCTD5 C-Terminus wieder schwächer wurde. In Präzipitaten mit KCTD5-1/171 und 1/160 konnte nur noch eine schwache MCM7-Bande nachgewiesen werden (Abb. 4.6, C, Spuren 7-8). Im Vergleich zur Negativkontrolle wurde zwischen MCM7 und KCTD5-1/145 keine spezifische Interaktion detektiert (Abb. 4.6, C, Spur 9). Nach Kotransfektion der KCTD5-Deletionsmutanten wurde keine Änderung im MCM7-Expressionsmuster beobachtet (Abb. 4.6, C, Gesamtextrakte). Insgesamt zeigte die Stärke der Interaktion eine weitgehende, wenn auch keine vollständige Korrelation mit der nukleären Lokalisation der jeweiligen KCTD5-Deletionsmutanten (vgl. Abb. 4.1).

Als Nächstes wurde die Rolle des MCM7 C-Terminus bei der Interaktion mit dem Volllänge-Protein KCTD5 untersucht. FLAG-getaggtetes KCTD5-1/234 wurde über FLAG-M2 Agarose präzipitiert und die kotransfizierten MCM7-1/500, -1/590 und -1/650 Proteinformen wurden im Western Blot über ihren Myc-Tag nachgewiesen (Abb. 4.6, D). Generell wurde weniger FLAG-KCTD5 nach Kotransfektion mit MCM7-Deletionsmutanten präzipitiert (Abb. 4.6, D, Spuren 3, 5, 7 und 9). Bei allen drei MCM7 C-terminalen Deletionsmutanten war eine schwache Proteinbande zu erkennen, die auf eine Interaktion mit KCTD5 hinwies (Abb. 4.6, D, Spuren 5, 7 und 9). Die Myc-MCM7-1/590 und -1/500 Proteinbanden sind allerdings sehr schwach, sodass im Vergleich zum Wildtyp von einer stark verminderten Interaktion ausgegangen werden muss. Bei Myc-MCM7-1/650 wurde zum Teil eine unspezifische Bindung an FLAG-M2 Agarose beobachtet (Abb. 4.6, D; Spuren 4 und 5).

Schlussfolgernd sind für die Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7 auf Seiten von KCTD5 eine zumindest partielle Lokalisation im Zellkern und die Aminosäuren 171-181 von entscheidender Bedeutung. Seitens MCM7 sind die Aminosäuren im Bereich zwischen 650 und 719 maßgeblich bei der Interaktion mit KCTD5 beteiligt, obwohl die für die Interaktion notwendige Region nicht mit letzter Eindeutigkeit identifiziert werden konnte.

4.2.3 Bildung von trimeren Komplexen zwischen KCTD5, Cullin3 und MCM7

In den bisher dargestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass KCTD5 in Säugerzellen mit MCM7 einen Komplex bilden kann, wodurch die im Yeast-two-hybrid-Screen erhobenen Daten bestätigt werden konnten. Die weiterführenden Untersuchungen sollten einer möglichen Beteiligung von KCTD5 an der MCM7-Ubiquitinierung über eine Funktion als Substratadapter für Cullin3-E3-Ligase-Komplexe nachgehen. Voraussetzung für eine solche Funktion wäre die Bildung von Proteinkomplexen, welche alle drei

Komponenten, Cullin3, KCTD5 und das potentielle Substrat MCM7, enthalten. Die Bildung solcher Komplexe war daher Gegenstand der weiteren Experimente.

Für die Untersuchung einer gemeinsamen Rolle von KCTD5- und Cullin3-Proteinen bei der Komplexbildung mit MCM7 wurden zunächst gegen KCTD5 und Cullin3 gerichtete *small hairpin* (sh)-RNA-Expressionskonstrukte generiert. Die unter der Kontrolle des H1 RNA-Polymerase III Promotors gebildeten shRNA's werden durch das Enzym Dicer im Zytoplasma der transfizierten Zelle zu den siRNA's als den eigentlichen Effektormolekülen prozessiert.

Die gegen KCTD5 gerichteten shRNA-Konstrukte (insgesamt vier verschiedene shRNA's, als B, D, E und F bezeichnet) wurden in HEK293-Zellen durch Kotransfektion mit dem FLAG-getaggten KCTD5-Expressionskonstrukt getestet (Abb. 4.7, A). Das shRNA-Konstrukt B zeigte keinen hemmenden Effekt, während das Konstrukt D zu einer deutlichen Hemmung der exogenen FLAG-KCTD5-Expression führte (Abb. 4.7, A, Spuren 2, 4). Am effektivsten konnte die KCTD5-Expression durch die gemeinsame Transfektion von zwei shRNA's inhibiert werden, entweder die Kombination von D und E oder die Kombination von D und F. (Abb. 4.7, A, Spuren 2 und 8-9). Diese shRNA's sind zu verschiedenen Zielregionen komplementär. Für die weiteren Versuche wurde daher die Kombination der shRNA-Konstrukte D und E verwendet.

Die Funktionalität der generierten shRNA-Konstrukte gegen Cullin3 in HeLa- und HEK293-Zellen ist der Abb. 4.7, B, zu entnehmen. Sowohl in HeLa- als auch in HEK293-Zellen wurde die durch anti-Myc Antikörper detektierte exogene Cullin3-Proteinexpression am stärksten durch die Transfektion von 1 µg shRNA-Konstrukt A gehemmt (Abb. 4.7, B: Spuren 1-4). Die shRNA-Konstrukte B und C schienen in HeLa-Zellen weniger effektiv zu sein, während es in HEK293-Zellen zu einer schwachen Hemmung der Cullin3-Expression durch Kotransfektion der shRNA C kam (B, Spuren 2 und 8-10). Mit Ausnahme der shRNA C in HEK293-Zellen nahm bei allen Konstrukten der Hemmeffekt unerwarteterweise mit steigenden Konzentrationen ab (Abb. 4.7, B). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche 1 µg des shRNA-Konstruktes A gegen Cullin3 in einem 4 µg DNA-Transfektionsansatz verwendet.

Für den Nachweis der Bildung eines trimeren MCM7-KCTD5-Cullin3-Komplexes wurden HEK293-Zellen mit FLAG-MCM7, Myc-KCTD5 und Myc-Cullin3 Konstrukten ko-transfiziert. Das FLAG-getaggte MCM7 wurde bei allen Ansätzen erfolgreich mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert und kopräzipitierte KCTD5- und Cullin3-Proteine wurden über ihren Myc-Tag in der Western Blot Analyse nachgewiesen (Abb. 4.7, C). Eine spezifische Wechselwirkung zwischen MCM7 und KCTD5 konnte ebenso detektiert werden wie die zwischen Cullin3 und MCM7 (Abb. 4.7, C, IP: Spuren 3 und 4), die möglicherweise über endogenes KCTD5 vermittelt wird. Nach Kotransfektion aller drei

Proteine wurden KCTD5 und Cullin3 zusammen als MCM7-Interaktionspartner detektiert, was für die Bildung eines trimeren Komplexes spricht (Abb. 4.7, C, IP: Spur 5).

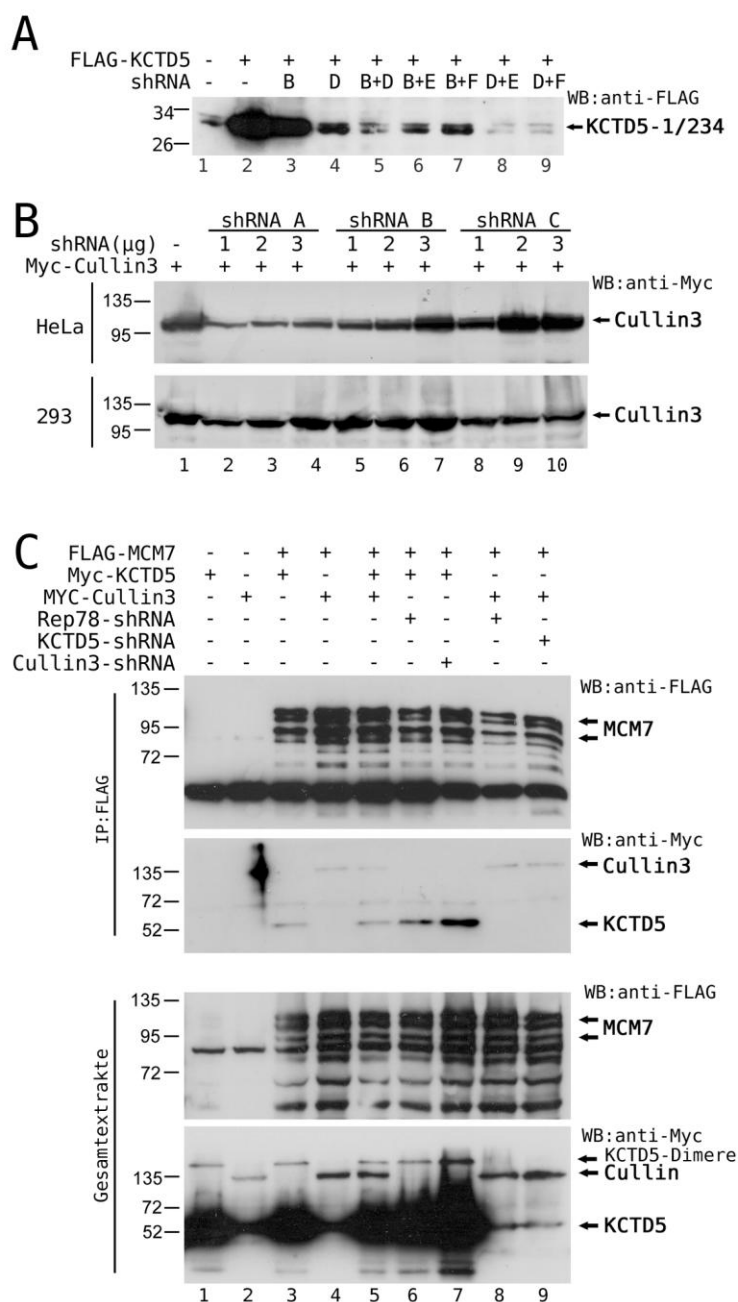


Abb. 4.7: Komplexbildung zwischen KCTD5, Cullin3 und MCM7. (A) Austestung der inhibitorischen Aktivität der generierten shRNA-Konstrukte gegen KCTD5 in HEK293-Zellen (4 µg Ansätze für 6 cm-Schalen). Je 1 µg der shRNA-Konstrukte wurde mit 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 kotransfiziert. Die KCTD5-Expression wurde in den Gesamtzellextrakten mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper nachgewiesen. (B) Austestung der Hemmaktivität der generierten shRNA-Konstrukte gegen Cullin3. HeLa- und HEK293-Zellen wurden mit 1 µg pMyc-Cullin3 und steigenden Konzentrationen der shRNA gegen Cullin3 kotransfiziert. Die Proteinexpression wurde im Western Blot 42 h nach der Transfektion mit anti-Myc (mouse) Antikörper untersucht. (C) Co-Immunpräzipitation von MCM7, Cullin3 und KCTD5. HEK293-Zellen wurden mit 1 µg pMyc-Cullin3, 1 µg pMyc-KCTD5 und 2 µg pCATCH-FLAG-MCM7 Plasmid-DNA in einem 4 µg Ansatz kotransfiziert. Als shRNA-Konstrukte wurden 1 µg shRNA gegen Rep, 1 µg Cullin3-shRNA A und je 1 µg KCTD5-shRNA's D und E wie angegeben kotransfiziert. Die Zellysate wurden für die Immunpräzipitation mit FLAG-M2 Agarose für 2 h inkubiert und die Präzipitate wurden zusammen mit den Gesamtzellextrakten mittels Western Blot mit anti-Myc (rabbit) Antikörper auf KCTD5 und Cullin3 und mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper auf MCM7 untersucht.

Die Menge des an MCM7 gebundenen KCTD5 nahm nach Kotransfektion der Kontroll-shRNA gegen Rep78 leicht und nach Kotransfektion der Cullin3-shRNA deutlich zu, während die Hemmung der KCTD5-Expression durch die KCTD5-shRNA's D und E keinen Effekt auf die Bindungsstärke zwischen MCM7 und Cullin3 ausübte (Abb. 4.7, C, IP: Spuren 6-9). Eine unspezifische Cullin3- oder KCTD5-Bindung an FLAG-M2 Agarose wurde nicht beobachtet (Abb. 4.7, C, IP: Spuren 1-2). In der MCM7-Proteinexpression gab es keine großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen (Abb. 4.7, C, Gesamtextrakte). Eine leichte Zunahme der KCTD5-Proteinmenge wurde nach Kotransfektion mit Cullin3-shRNA beobachtet (Abb. 4.7, C, Gesamtextrakte: Spur 7).

Die vorangegangenen Ergebnisse deuteten auf die Bildung eines trimeren Komplexes zwischen MCM7, KCTD5 und Cullin3 in Säugerzellen hin. In weiteren Experimenten wurde daher überprüft, ob die MCM7-Proteinexpression durch steigende Mengen an kotransfizierter KCTD5 oder Cullin3 Plasmid-DNA beeinflusst wird (Abb. 4.8).

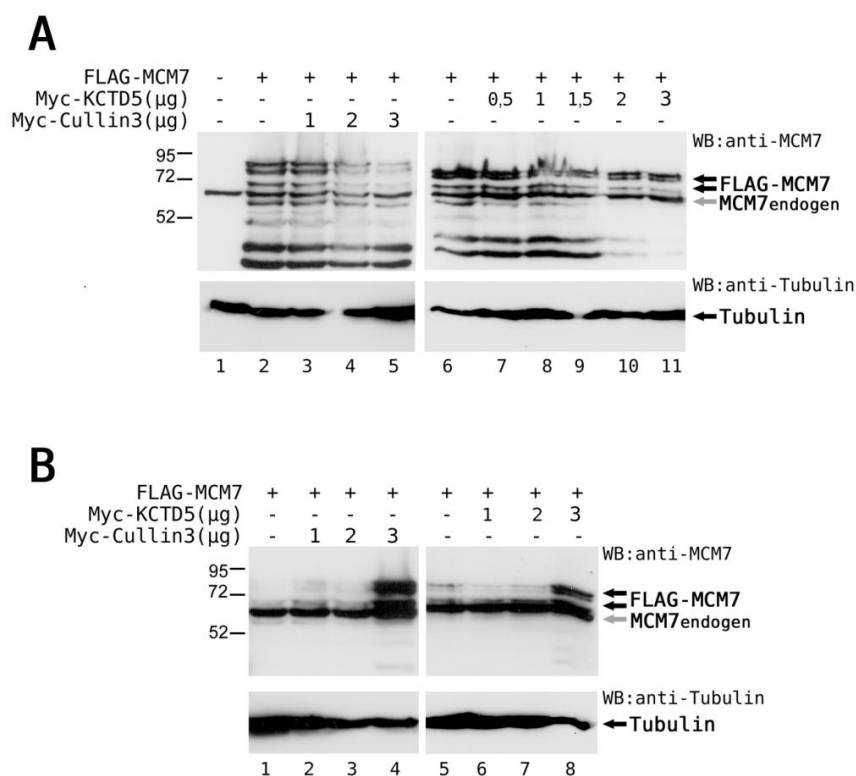


Abb. 4.8: Steigende Konzentrationen von exogenen KCTD5 und Cullin3 führen zu keinen einheitlichen Veränderungen im MCM7-Expressionsmuster. HEK293-Zellen wurden mit 1 µg pCATCH-FLAG-MCM7 und zusätzlich mit steigenden Mengen von pMyc-KCTD5- oder pMyc-Cullin3-Plasmidkonzentrationen zwischen 1 µg und 3 µg DNA in einem 4 µg Transfektionsansatz kotransfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden im Western Blot mit anti-MCM7 Antikörper auf MCM7-Expression und mit anti-Tubulin zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge untersucht.

Die Analyse des ersten Versuches im Western Blot ergab keine KCTD5- oder Cullin3-konzentrationsabhängige Veränderungen in der MCM7-Proteinmenge: Sowohl die Expression des FLAG-getaggten exogenen MCM7-Konstruktes als auch des endogenen

MCM7-Proteins wurde dadurch nicht beeinflusst (Abb. 4.8, A). Bei einem wiederholten Experiment wurde jedoch eine deutliche Zunahme insbesondere des exogenen FLAG-getaggten MCM7-Proteins nach Kotransfektion von 3 μ g KCTD5 oder 3 μ g Cullin3 Plasmid-DNA beobachtet (Abb. 4.8, B). In Anbetracht der identischen Versuchsdurchführung und widersprüchlichen Ergebnisse konnte kein eindeutiger konzentrationsabhängiger Einfluss von KCTD5 oder Cullin3 auf die MCM7-Proteinmenge festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigten die für die funktionellen Untersuchungen generierten shRNA's gegen Cullin3 und KCTD5 nur eine partielle Inhibition der Expression ihrer Zielproteine, wobei für KCTD5 fast eine vollständige Hemmung durch den gleichzeitigen Einsatz der shRNA-Konstrukte D und E erreicht werden konnte. Obwohl der trimere Komplex aus MCM7, KCTD5 und Cullin3 gebildet wird, kam es nach Hemmung der Cullin3-Expression zu einer deutlichen Zunahme der Menge an KCTD5, welches an MCM7 gebunden war. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass das freie, nicht in Cullin3-Komplexen gebundene KCTD5 eine stärkere Affinität zu MCM7 besitzt. Möglicherweise bilden sich zunächst KCTD5-MCM7 Komplexe, die dann über KCTD5 an Cullin3 rekrutiert werden. Eine Änderung in der MCM7-Proteinmenge nach Kotransfektion von KCTD5 und Cullin3 konnte nicht eindeutig gezeigt werden.

4.2.4 Nachweis der MCM7 Ubiquitinierung über denaturierende Reinigung an NiNTA-Agarose

Für MCM7 wurde beschrieben, dass das Protein in Säugerzellen durch die E6-assoziiertes Protein (E6-AP) E3-Ubiquitin-Ligase modifiziert wird, die jedoch nur für einen Teil der gefundenen Ubiquitinierung verantwortlich ist [130]. Zur Untersuchungen der Ubiquitinierung von His-getaggttem MCM7-Protein unter stark denaturierenden Bedingungen wurde zunächst das Protokoll von Rodrigues *et al.* gewählt [199]. Dieses führte jedoch in der Originalfassung nicht zur erhofften selektiven Aufreinigung des His-getaggtten MCM7-Proteins. Das ursprüngliche Protokoll wurde daher modifiziert, um die Bindungsspezifität des His-getaggtten MCM7-Proteins zu erhöhen und die unspezifische Bindung von Myc-ubiquitinierten Proteinen an die NiNTA-Matrix zu vermindern. Die Modifikationen betrafen vor allem verschiedene Variationen der Imidazol-Konzentrationen während der Aufschluss- und Waschschrte und die Mengen an eingesetzter NiNTA-Agarose.

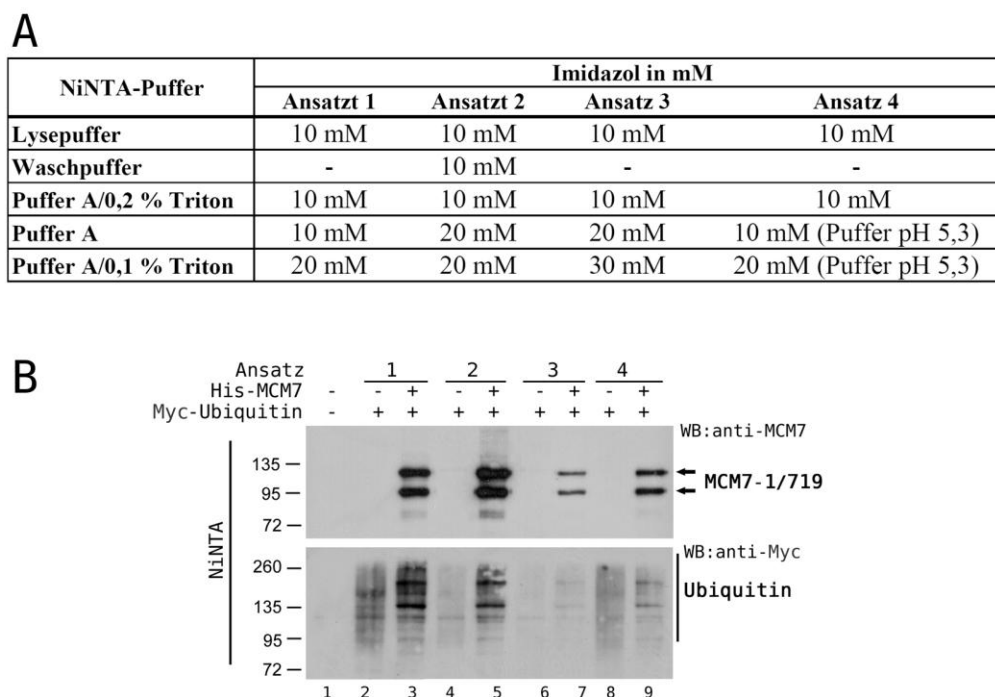


Abb. 4.9: Optimierung der Methode zur Aufreinigung His-getaggtter Proteine mittels NiNTA-Agarose. (A) Tabellarische Darstellung der verschiedenen Imidazol-Konzentrationen in den Aufschluss- und Waschpuffern, die für die Reinigung von His-getaggttem MCM7 aus HEK293-Zellen getestet wurden. (B) NiNTA-Aufreinigung des His-getaggtten MCM7 unter den verschiedenen Bedingungen. HeLa-Zellen wurden mit 1 µg pCATCH-His-MCM7 und 1 µg pMyc-Ubiquitin in einem 4 µg Ansatz kotransfiziert. Nach 42 h wurden die Zelllysate unter denaturierenden Bedingungen für 1 h mit 20 µl NiNTA-Agarose inkubiert. Die MCM7-Proteine wurden mit einem anti-MCM7 Antikörper und die Myc-ubiquitinierten Formen des Proteins mit einem anti-Myc (rabbit) Antikörper im Western Blot detektiert.

Der Abb. 4.9 (A) sind die getesteten Imidazol-Konzentrationen zu entnehmen. Bei diesen Ansätzen wurden jeweils 20 µl statt ursprünglich 50 µl NiNTA-Agarose für das Lysat einer 6 cm-Kulturschale (4×10^6 HEK293-Zellen) eingesetzt. Endogenes MCM7 wurde bei einer NiNTA-Aufreinigung nicht präzipitiert, sodass bei allen Versuchen nur die Expression und Ubiquitinierung des His-getaggtten, überexprimierten MCM7 detektiert wurde. His-getaggttes MCM7-Protein konnte unter allen getesteten Bedingungen aufgereinigt werden, wobei die höchste His-MCM7-Proteinmenge unter den Bedingungen des Ansatzes 2 präzipitiert werden konnte (Abb. 4.9, B, oberer Teil, vgl. Spuren 3, 5, 7, 9). Gleichzeitig wurde in diesem Ansatz nur sehr wenig unspezifisches, d.h. in Abwesenheit von His-MCM7 an die NiNTA-Matrix gebundenes Myc-Ubiquitin präzipitiert (Abb. 4.9, B, unterer Teil, Spur 4). Das Verhältnis von spezifischen, durch die Myc-Ubiquitinierung von MCM7 verursachten Myc-reaktiven Banden (B, Spuren 3, 5, 7 und 9) zu den Banden, die durch die unspezifische Präzipitation von Myc-Ubiquitin an NiNTA-Agarose verursacht wurden (B, Spuren 2, 4, 6 und 8), war daher bei diesem Ansatz im Vergleich zu den übrigen Ansätzen am besten. Aufgrund dessen wurden für weitere Versuche zur denaturierenden Reinigung an NiNTA-Agarose die Bedingungen des Ansatzes 2 verwendet.

In einem Folgeversuch wurde zunächst die Ubiquitinierung des His-getaggten MCM7-1/719 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion analysiert; als Zeitpunkte wurden dabei 24, 30 und 42 h verwendet. Die stärkste MCM7-Ubiquitinierung konnte 42 h nach Transfektion detektiert werden (Abb. 4.10, A, Spuren 3, 5 und 7). Die Menge des präzipitierten MCM7-Proteins schien zwischen 30 und 42 h relativ konstant zu bleiben, während beim 42 h-Wert die vermeintlichen MCM7-Abbauprodukte zunahmen (Abb. 4.10, A, Spuren 3, 5 und 7, mit grauen Pfeilen markiert). Die unspezifische Präzipitation von Myc-Ubiquitin in Abwesenheit des His-getaggten MCM7 war in diesem Versuch sehr gering, sodass der überwiegende Teil der mit dem Myc-Antikörper detektierten Banden ubiquitiniertem MCM7 entspricht.

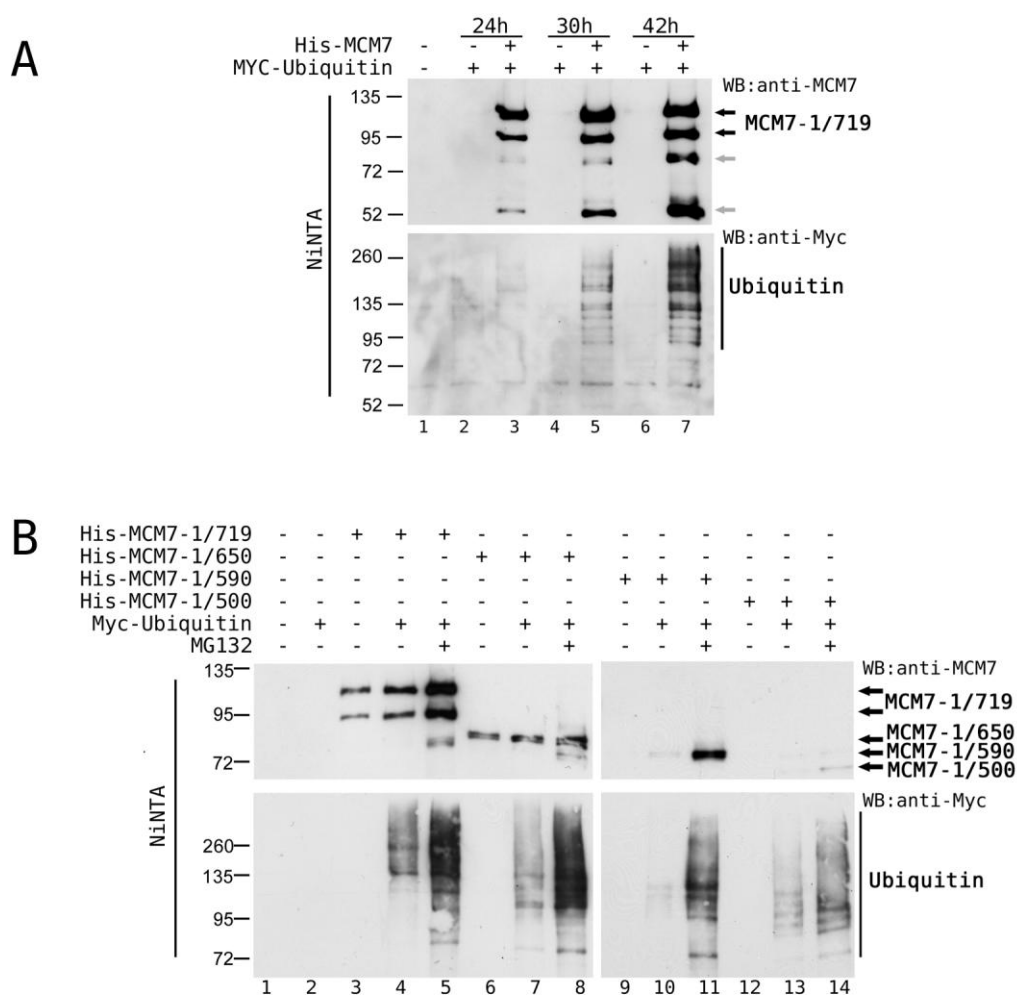


Abb. 4.10: Zelluläre Ubiquitinierung des MCM7-Proteins und seiner Deletionsmutanten. (A) MCM7-Ubiquitinierung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion. HEK293-Zellen wurden in einem 4 µg DNA-Transfektionsansatz mit 1 µg pCATCH-His-MCM7-1/719 und 1 µg pMyc-Ubiquitin kotransfiziert. Die Eluate der denaturierenden NiNTA-Agarose-Reinigung wurden mit anti-MCM7 und anti-Myc (rabbit) als Primärantikörpern und entsprechenden Sekundärantikörpern analysiert. (B) HEK293-Zellen wurden in einem 4 µg DNA-Transfektionsansatz mit 1 µg pCATCH-His-MCM7-1/719, -1/650, -1/590 oder -1/500 transfiziert und zum Teil mit 1 µg pMyc-Ubiquitin kotransfiziert. Die Inkubation mit MG132 erfolgte für die letzten 16 h vor der Aufarbeitung. Die His-getaggten MCM7-Proteine wurden über NiNTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und die Eluate wurden im Western Blot mit anti-MCM7 und anti-Myc (rabbit) Antikörpern analysiert.

In Gegenwart des Proteasom-Inhibitors MG132 kam es zu einer stärkeren Akkumulation der Myc-Ubiquitin-modifizierten Banden und auch zu einer vergleichbaren Zunahme der Menge an präzipitiertem MCM7 (Abb. 4.10, B; vgl. auch Abb. 4.10 mit Abb. 4.9). Der Proteasom-Inhibitor wurde dabei für 16 h zugegeben. Eine deutliche Zunahme der Proteinmenge in Gegenwart des Proteasom-Inhibitors weist darauf hin, dass die Ubiquitinierung zumindest teilweise an der Degradation von MCM7 beteiligt ist.

Des Weiteren wurde die Ubiquitinierung der generierten C-terminalen MCM7-Deletionsmutanten überprüft. Die Konstrukte His-MCM7-1/719 und His-MCM7-1/650 konnten gut präzipitiert werden, während die Menge an präzipitierten MCM7-1/590 und MCM7-1/500 Proteinen nur nach Inkubation mit MG132 für einen Nachweis mit dem MCM7-Antikörper ausreichend war (Abb. 4.10, B). Für alle MCM7-Deletionskonstrukte konnte eine Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Abb. 4.10, B, Spuren 4-5, 7-8, 10-11, 13-14). Der Größenbereich der ubiquitinierten Banden korrelierte dabei mit der jeweiligen Größe des nicht-modifizierten Proteins: Stark ubiquitiniertes MCM7-1/719 lief in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 130 bis 300 kDa und dieser Bereich verschob sich bei den C-terminalen Mutanten entsprechend der Größe der Deletion in einen etwas kleineren Größenbereich (Abb. 4.10, B, Spuren 5, 8, 11 und 14). Dies spricht für eine Poly-Ubiquitinierung bestimmter Lysinreste, die sich in der nicht deletierten Region zwischen Aminosäuren 1-500 befinden. Trotz der relativ hohen Menge an NiNTA-gebundenem Protein wurde bei MCM7-1/590 im Vergleich zur MCM7-1/650 Mutante ein deutlicher Verlust an ubiquitinierten Formen beobachtet (Abb. 4.10, B, unterer Teil, Spuren 8 und 11). Daher scheint auch die Region zwischen den MCM7 Aminosäuren 590 und 650 eine oder mehrere Modifikationsstellen aufzuweisen.

4.2.5 Einfluss von KCTD5 und Cullin3 auf die MCM7-Ubiquitinierung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass MCM7 einen Komplex mit KCTD5 und Cullin3 bildet (Abschnitt 4.2.3). Ferner konnte gezeigt werden, dass MCM7 nach Überexpression von Ubiquitin einer deutlichen Ubiquitinierung unterworfen wird (Abschnitt 4.2.4). Um zu entscheiden, ob MCM7 ein mögliches Substrat für einen KCTD5-Cullin3-Ubiquitin-Ligase-Komplex darstellt, wurde daher der Einfluss einer Überexpression von exogenen KCTD5 und Cullin3 auf die MCM7-Ubiquitinierung untersucht.

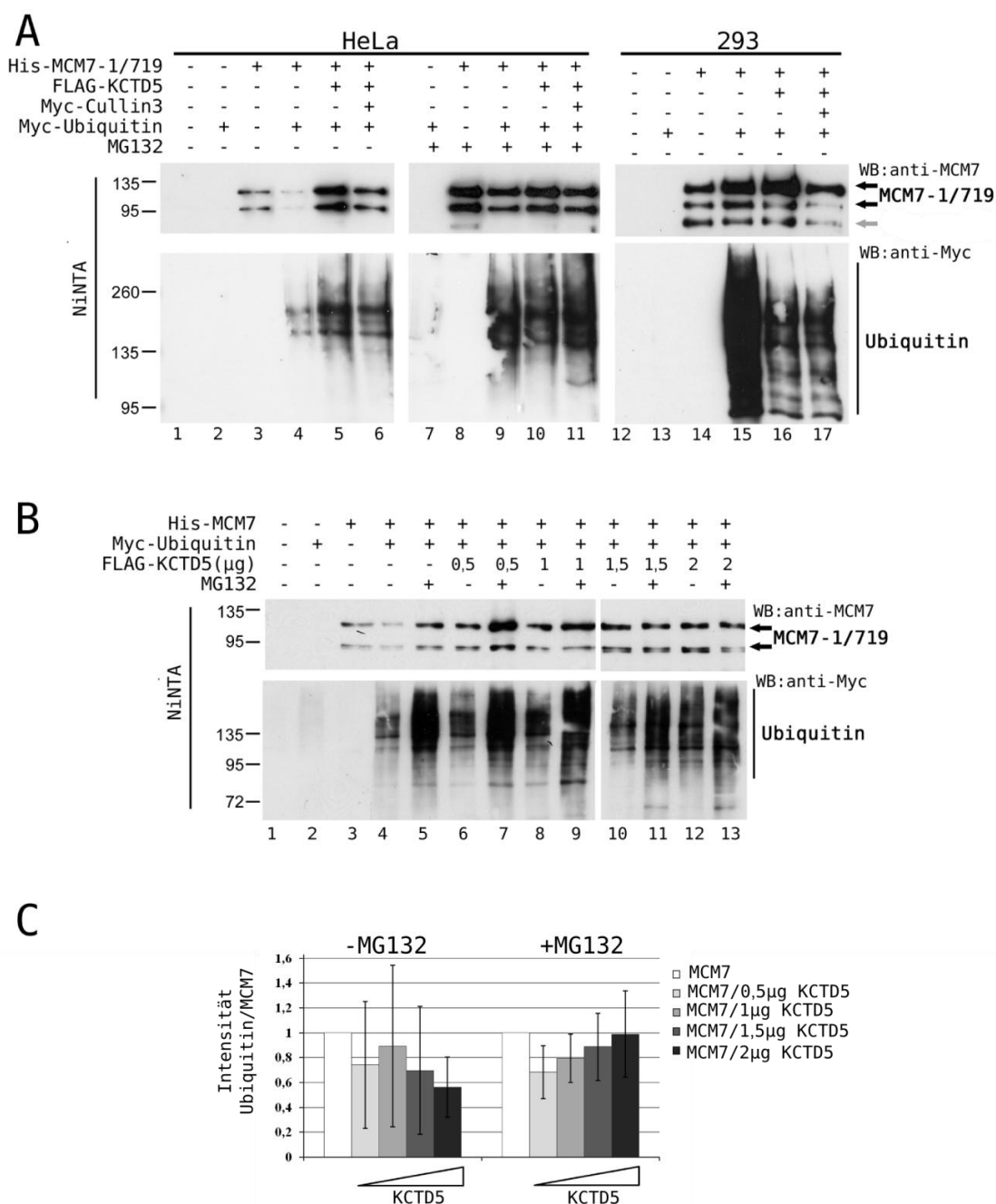


Abb. 4.11: MCM7-Ubiquitinierung wird durch KCTD5 und Cullin3 kaum beeinflusst. (A) Ubiquitinierung des MCM7-Proteins in HeLa- und HEK293-Zellen nach Kotransfektion von 4 µg pCATCH-His-MCM7 und 2 µg pMyc-Ubiquitin in einem 8 µg Transfektionsansatz pro 6 cm-Zellkulturschale. In ausgewählten Ansätzen wurden zusätzlich 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 oder 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 und 1 µg pMyc-Cullin3 Plasmid-DNA kotransfiziert. Eine Hälfte der Ansätze wurde vor der Aufarbeitung für 14 h mit 3 µM MG132 inkubiert. Die Eluate der NiNTA-Agarose-Aufreinigung wurden im Western Blot mit anti-MCM7 und anti-Myc (mouse) Antikörpern analysiert. Grauer Pfeil markiert mögliche His-MCM7-Abbauprodukte. (B) Ubiquitinierung von His-getagtem MCM7 in Gegenwart steigender Mengen von exogenem KCTD5. HEK293-Zellen wurden mit 1 µg pCATCH-His-MCM7 und 1 µg pMyc-Ubiquitin in Gegenwart steigender Mengen des pCATCH-FLAG-KCTD5 DNA-Vektors kotransfiziert. Es wurden Parallelansätze mit (Inkubation für 14 h) und ohne Proteasom-Inhibitor MG132 durchgeführt. Die Eluate der NiNTA-Agarose-Aufreinigung wurden im Western Blot mit anti-MCM7 und anti-Myc (rabbit) Antikörpern analysiert. (C) Quantifizierung der MCM7-Ubiquitinierung bei steigenden Konzentrationen des KCTD5-Expressionskonstruktes. Das Verhältnis der Intensitäten von präzipitiertem Myc-Ubiquitin zu MCM7 wurde aus 3 unabhängigen Versuchen mittels ImageJ ermittelt und für die Kontrollen in Abwesenheit von exogenem KCTD5 (mit und ohne MG132) jeweils auf 1 gesetzt. Dargestellt sind alle Intensitäten bezogen auf diese Kontrollen.

Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen konnten His-getaggtetes MCM7 und seine Myc-getaggteten Ubiquitinierungsprodukte aus den HeLa- und in HEK293-Zellen spezifisch über NiNTA-Agarose aufgereinigt werden (Abb. 4.11, A). Nach alleiniger Kotransfektion von KCTD5 oder kombinierter Expression von exogenen KCTD5 und Cullin3 zeigte sich jedoch gegenüber der Kontrolle ohne KCTD5 und Cullin3 keine eindeutige Veränderung im Ausmaß der MCM7-Ubiquitinierungsstärke, weder in der Absolutstärke (Abb. 4.11, A, unterer Teil, Spuren 4-6) noch in Relation zu eluierter MCM7-Proteinmenge (A, vgl. unteren mit oberem Teil, Spuren 4-6). Nach der Hemmung des Proteasoms durch MG132 wurden ebenfalls keine Unterschiede in der MCM7-Ubiquitinierung detektiert (Abb. 4.11, A, Spuren 9-11). In HEK293-Zellen ging die MCM7-Ubiquitinierung nach der Überexpression von KCTD5 sogar zurück, wobei dieser Effekt nach Überexpression von KCTD5-Cullin3 aufgehoben wurde und das Verhältnis MCM7-Ubiquitinierung/MCM7-Gesamtmenge wieder im Bereich des Kontrollansatzes ohne KCTD5 lag (Abb. 4.11, A, Spuren 15-17). Zusätzlich wurden in HEK293-Zellen Banden präzipitiert, bei denen es sich vermutlich um MCM7-Abbauprodukte handelt (Abb. 4.11, A, 14-17).

Als Nächstes wurde die MCM7-Ubiquitinierung nach Kotransfektion steigender KCTD5-Plasmidkonzentrationen untersucht. (Abb. 4.11, B). Es konnten keine eindeutigen Veränderungen in der MCM7-Ubiquitinierung mit steigenden Mengen an KCTD5-Plasmid-DNA nachgewiesen werden (Abb. 4.11, B, Spuren 4-13). Bei allen Ansätzen wurde nach Inhibition des Proteasoms eine Zunahme des MCM7-Ubiquitinierungsschmiere beobachtet (Abb. 4.11, B, Spuren 4-13). Daher wurde das Intensitätsverhältnis zwischen der Ubiquitinierung und der Gesamtproteinmenge an MCM7 überprüft. Tendenziell konnte mit zunehmenden KCTD5-Konzentrationen in Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors eine Abnahme, in Gegenwart des Inhibitors jedoch eine Zunahme des Intensitätsverhältnisses beobachtet werden, was für eine Beteiligung von KCTD5 an der MCM7-Ubiquitinierung und -Degradation spricht (Abb. 4.11, C). Dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant: Die Schwankungen zwischen den Versuchen waren so groß, dass keine statistisch signifikanten Effekte zu beobachten waren.

4.2.6 MCM7 Expression und Lokalisation in Abhängigkeit vom Zellzyklus

In vorangegangenen Studien anderer Arbeitsgruppen war gezeigt worden, dass MCM7 für die DNA-Replikation essentiell ist und einer Zellzyklus-abhängigen Regulation unterworfen ist [111, 112, 122]. Daher war es von besonderem Interesse zu untersuchen, ob die Überexpression oder Inhibition seiner Komplexpartner KCTD5 und Cullin3 die

Expression des endogenen MCM7 in den ersten 12 h nach Eintritt der HeLa-Zellen in die S-Phase beeinflusst.

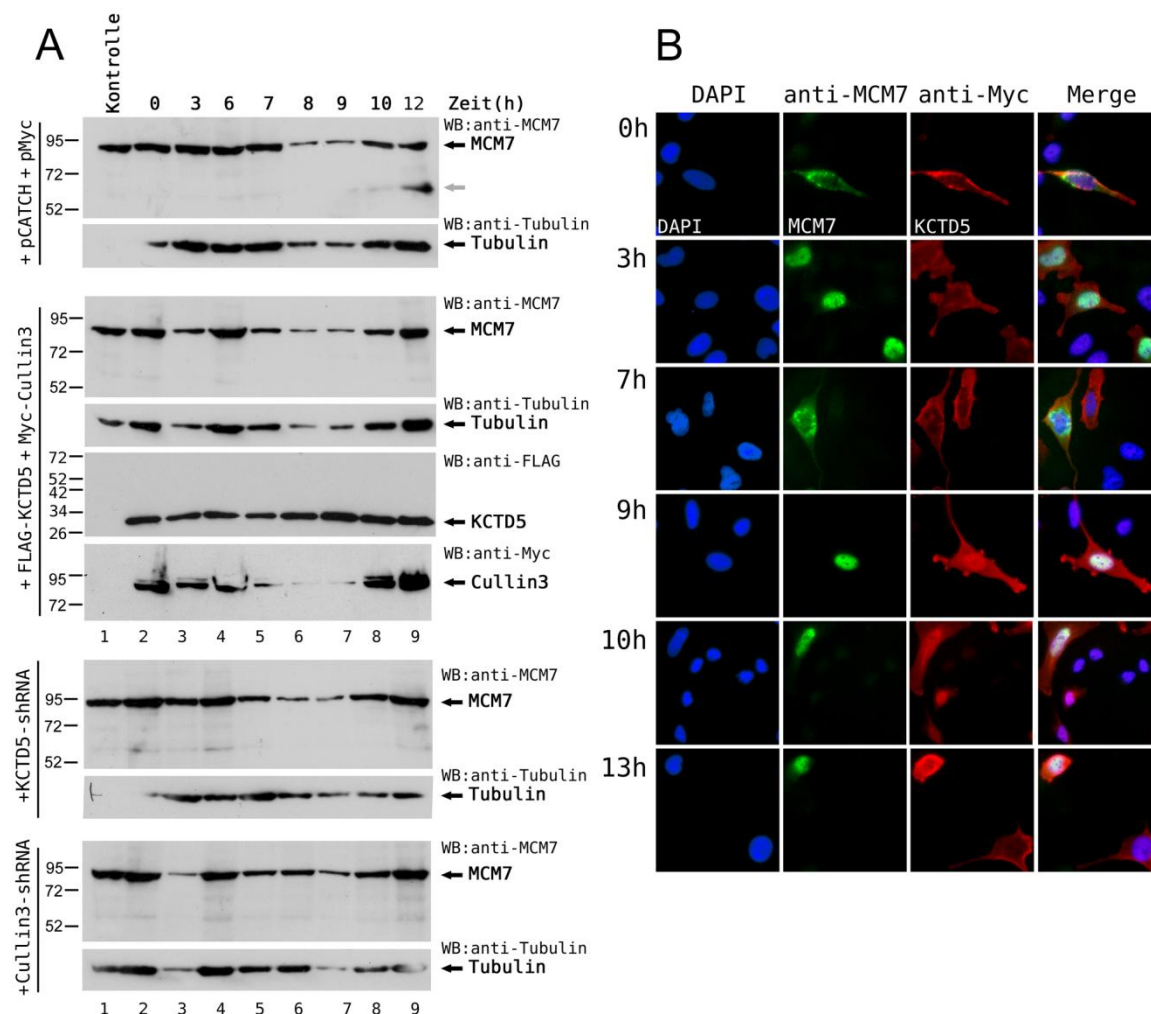


Abb. 4.12: MCM7-Expression und Lokalisation im Verlauf des Zellzyklus. (A) Untersuchung der Expression des endogenen MCM7-Proteins in Abhängigkeit vom Zellzyklus. Die Synchronisation erfolgte durch den Doppelthymidinblock. Die Gesamtzellextrakte wurden zu verschiedenen Zeiten nach Freisetzung geerntet. Als Kontrolle dienten untransfizierte synchronisierte HeLa-Zellen zum Zeitpunkt 0. HeLa-Zellen wurden mit je 1 µg der Leervektor-DNA pCATCH und 1 µg pMyc oder zur Untersuchung des Einflusses von KCTD5 und Cullin3 mit je 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 und 1 µg pMyc-Cullin3 in einem 4 µg Transfektionsansatz kotransfiziert. Bei zwei Ansätzen wurden HeLa-Zellen mit je 1 µg shRNA D und shRNA E gegen KCTD5 und 1 µg shRNA A gegen Cullin3 transfiziert. Die Expression des endogenen MCM7 wurde mittels des anti-MCM7 Antikörpers, die Expression der exogenen FLAG-KCTD5 und Myc-Cullin3 mit anti-FLAG-M2 (mouse) und anti-Myc (rabbit) detektiert. Die Analyse mit anti-Tubulin Antikörper kontrollierte die aufgetragene Gesamtproteinmenge. Grauer Pfeil deutet auf mögliche kreuzreagierende Proteine. (B) Zelluläre Lokalisation von MCM7 und KCTD5 in Abhängigkeit vom Zellzyklus. HeLa-Zellen wurden mit 2 µg pCATCH-MCM7 und 1 µg pMyc-KCTD5 in einem 4 µg DNA Transfektionsansatz kotransfiziert. Die Immunfluoreszenzdetektion erfolgte mit anti-MCM7 Primär- und FITC-markiertem Sekundärantikörper für MCM7 sowie mit anti-Myc (rabbit) Primär- und TRITC-markiertem Sekundärantikörper für KCTD5.

Innerhalb des untersuchten Zeitrahmens konnte keine Veränderung in der Expression des endogenen MCM7 nachgewiesen werden (Abb. 4.12, A). Der scheinbare Abfall der MCM7-Expression 8 bis 9 h nach der Aufhebung des Blocks ist auch beim als Kontrolle eingesetzten Nachweis von Tubulin zu beobachten und daher wahrscheinlich auf ungleichmäßig aufgetragene Mengen der Gesamtzellextrakte zurückzuführen. Nach

Überexpression von KCTD5 und Cullin3 konnten ebenfalls keine deutlichen Unterschiede im zeitlichen Verlauf des MCM7-Proteinspiegels im Vergleich zum Ansatz mit den leeren Vektoren detektiert werden (Abb. 4.12, A).

Die Hemmung der endogenen Cullin3- und KCTD5-Proteine durch den Einsatz von shRNA's hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die MCM7-Expression im Vergleich zum Kontrollansatz (Abb. 4.12, A). Auch hier korrelierten die Schwankungen der detektierten MCM7-Mengen mit denen des Tubulins und sind daher auf ungleiche Mengen an aufgetragenen Gesamtzellextrakten zurückzuführen. Bei der Bewertung dieser Versuche zu einem möglichen Einfluss von KCTD5 und Cullin3 auf MCM7 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus muss jedoch berücksichtigt werden, dass durch die limitierte Effizienz der Transfektion der Überexpressions- bzw. der RNA-Interferenz-Konstrukte nicht alle Zellen erreicht wurden, die endogenes MCM7 exprimieren.

Es konnte in den vorangegangenen Versuchen zu KCTD5-Lokalisation gezeigt werden, dass KCTD5 zu bestimmten Phasen des Zellzyklus verstärkt perinukleär und zum Teil auch nukleär lokalisiert vorliegt (Abb. 4.4). Mittels Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurde nun die jeweilige Lokalisation von Myc-KCTD5 und FLAG-MCM7 nach Kotransfektion der beiden Proteine in HeLa-Zellen untersucht. Die Translokation von KCTD5 in den Zellkern 9 bis 10 h nach der Aufhebung des Blocks an der Grenze zur S-Phase führte zu einem Zusammentreffen der beiden Proteine im Zeitfenster unmittelbar vor der Zytokinese (Abb. 4.12, B). MCM7 konnte nur im untergeordneten Maße im Zytoplasma detektiert werden, z.B. 7 h nach der Blockaufhebung.

Das überexprimierte FLAG-KCTD5 zeigte keine Schwankungen der Proteinexpression während der untersuchten 12 h. Eine dimerische Proteinform konnte bei diesem Versuch im Zeitfenster von 8 bis 10 h nach Aufhebung des Blocks, welches mit einer verstärkten nukleären Lokalisation korreliert hätte, nicht detektiert werden (Abb. 4.12, A, Spuren 6-8). Die Untersuchung der Proteinexpression und -lokalisierung in den synchronisierten HeLa-Zellen zeigte, dass KCTD5 und MCM7 vor der Zytokinese im Zellkern aufeinander treffen können, so dass es insbesondere in diesem Zeitfenster zu möglichen funktionellen Auswirkungen kommen kann.

4.3 KCTD5 und MCM7 im AAV-2 Replikationszyklus

4.3.1 Interaktionen zwischen KCTD5, MCM7 und Rep78/Rep68

Zu den bereits beschriebenen KCTD5-Interaktionspartnern gehören die großen AAV-2 Rep78/Rep68-Proteine, deren Überexpression eine Translokation des KCTD5-Proteins in den Zellkern bewirkt [10]. Da für MCM7 ebenfalls eine Interaktion mit den großen Rep-Proteinen beschrieben worden war [139], wurden mögliche Wechselwirkungen zwischen

KCTD5, MCM7 und den Rep78/Rep68-Proteinen untersucht, die Auswirkungen auf den AAV-Replikationszyklus haben könnten.

Mittels Immunpräzipitation nach Expression aller drei Proteine in HEK293-Zellen wurde zunächst untersucht, ob die Rep78/Rep68-Proteine die Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7 beeinflussen können: Für die Interaktion mit MCM7 sind die C-terminalen KCTD5-Aminosäuren 171-181 entscheidend (Abb. 4.6, C), während die Interaktion mit den Rep-Proteinen durch die Aminosäuren 203-234 vermittelt wird [10, 11]

Für diesen Versuch wurde FLAG-getaggtetes KCTD5 aus Zelllysaten mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert und die kotransfizierten MCM7- und Rep68-Proteine wurden mittels Western Blot detektiert. Trotz der FLAG-KCTD5-Präzipitation in großen Mengen war das Myc-getaggte MCM7-Protein im Gegensatz zu den in Abschnitt 4.2.2 dargestellten, in HEK293-Zellen durchgeführten Versuchen nicht detektierbar, unabhängig von der Rep68-Koexpression (vgl. Abb. 4.6, C und Abb. 4.13, A). Rep68 konnte nur in den KCTD5-Immunpräzipitaten, nicht aber in den Kontrollpräzipitaten in Abwesenheit von KCTD5 nachgewiesen werden, was die spezifische Wechselwirkung zwischen KCTD5 und Rep68 bestätigt (Abb. 4.13, A, IP: Spuren 3, 4, 7 und 8). Diese Interaktion wurde durch die MCM7-Kotransfektion nicht beeinflusst. Sowohl das Rep68-Protein als auch KCTD5 wurden deutlich exprimiert, wobei Rep68 keinen Einfluss auf die KCTD5-Expression ausübte (Abb. 4.13, A, Spuren 2, 4, 6, 8). Die exogene MCM7-Expression ging nach der Koexpression mit Rep68 zurück, die Mengen des endogenen MCM7-Proteins waren jedoch nur leicht rückläufig (Abb. 4.13, A, Gesamtextrakte: Spuren 5-8).

Die Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7 konnte in den Versuchen in Gegenwart von Rep68 nicht detektiert werden, sodass die nächsten Versuche mit dem AAV-2-Protein Rep78 durchgeführt wurden. Zusätzlich zu dem KCTD5-Volllänge-Protein wurde die C-terminale Deletionsmutante KCTD5-1/181 auf die Komplexbildung mit MCM7 nach Koexpression von Rep78 überprüft: Der KCTD5-1/181-Mutante fehlen die für die Interaktion mit Rep78 notwendigen C-terminalen Aminosäuren, jedoch zeigt sie eine stärkere Interaktion mit MCM7 als das Volllänge-KCTD5-1/234 (Abb. 4.6, C). Sowohl KCTD5-1/234 als auch KCTD5-1/181 konnten über die FLAG-M2 Agarose gut aufgereinigt werden (Abb. 4.13, B, Spuren 2 und 4-10). In den FLAG-KCTD5-Präzipitaten wurde mittels anti-Rep Antikörper eine Proteinbande detektiert, die im Laufverhalten der Molekulargröße des Rep78-Proteins entsprach (Abb. 4.13, B). Da diese Bande jedoch in abgeschwächter Form auch bei der Negativkontrolle und in KCTD5-1/181 Präzipitaten detektiert wurde, obwohl Rep78 nachweislich keine Interaktion mit KCTD5-1/181 eingeht, handelte es sich hierbei wahrscheinlich um eine unspezifische Proteinbande der Molekulargröße 72 kDa, die bereits in den Versuchen mit Rep68 zu beobachten war (vgl. Abb. 4.13, A und B, IP: anti-Rep).

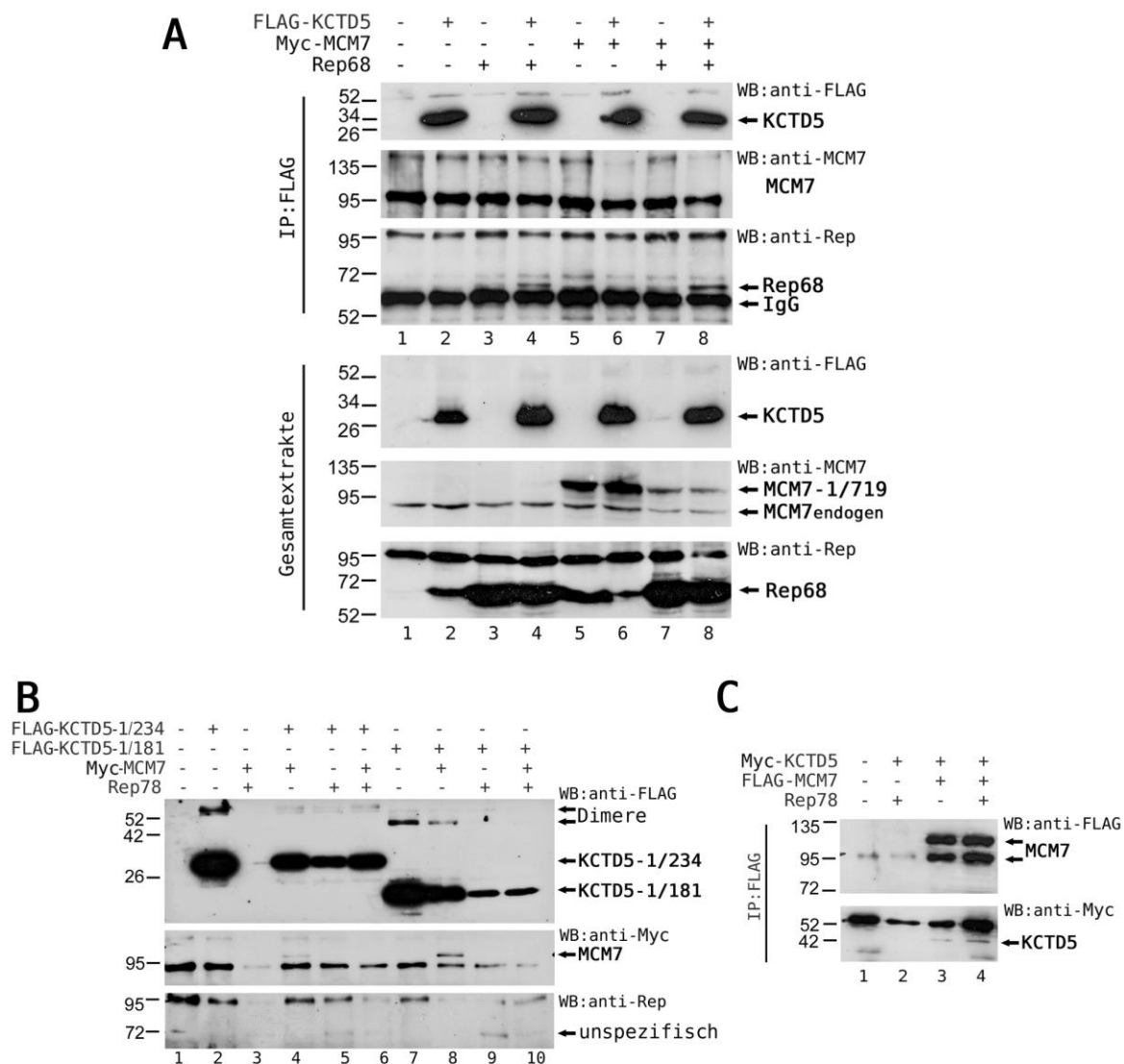


Abb. 4.13: Einfluss der großen AAV-2 Rep-Proteine Rep78 und Rep68 auf die Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7. (A) FLAG-M2 Agarose Ko-Immünpräzipitation von Rep68 und MCM7 mit FLAG-getaggttem KCTD5 in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden mit 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5, 1 µg pMyc-MCM7 und 1 µg pKEX-Rep68 in einem 4 µg DNA-Transfektionsansatz kotransfiziert. Die Hälfte der Proben wurde lysiert und das FLAG-getaggte KCTD5 mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert. Von der anderen Hälfte wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Präzipitate und die Proteinextrakte wurden im Western Blot mit anti-MCM7, anti-Myc (mouse) und anti-Rep Primär- und entsprechenden Sekundärantikörpern analysiert. (B) Immunpräzipitation von Rep78 und MCM7 mit FLAG-getaggtten KCTD5-Proteinen in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden mit 1 µg pCATCH-KCTD5-1/234 oder 1 µg pCATCH-KCTD5-1/181, 2 µg pMyc-MCM7 und 1 µg pKEX-Rep78 in einem 4 µg Transfektionsansatz kotransfiziert. Die Lysate wurden mit FLAG-M2 Agarose inkubiert und die Präzipitate wurden im Western Blot mit anti-MCM7, anti-Myc (mouse) und anti-Rep Antikörpern analysiert. Die Aufarbeitung und Detektion erfolgte analog zu (A). (C) Co-Immünpräzipitation von KCTD5 mit FLAG-getaggttem MCM7 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit 2 µg pCATCH-FLAG-MCM7, 1 µg pMyc-KCTD5 und 0,2 µg pKEX-Rep78 kotransfiziert. Die Zellysate wurden mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert und im Western Blot mit anti-FLAG und anti-Myc Antikörpern analysiert.

MCM7 zeigte eine spezifische Interaktion mit beiden untersuchten KCTD5-Proteinen, wobei die Bindung an KCTD5-1/181, wie schon in den früheren Versuchen, stärker ausgeprägt war (Abb. 4.13, B, Spuren 4 und 8). In Gegenwart von Rep78 war jedoch keine MCM7-KCTD5-Interaktion mehr nachweisbar (Abb. 4.13, B, Spuren 6, 10). Bei

den KCTD5-1/234-Präzipitaten könnte die Komplexbildung zwischen MCM7 und KCTD5 aufgrund einer sterischen Hinderung durch Rep78 inhibiert worden sein. Bei dem KCTD5-1/181 sollte eine solche sterische Hinderung aufgrund der fehlenden Interaktion von Rep78 mit dem verkürzten KCTD5-Protein nicht vorliegen, aber die Expression und damit die Präzipitation von KCTD5 scheint hier durch die Kotransfektion von Rep78 reduziert worden zu sein

Um zu überprüfen, ob die Komplexbildung zwischen MCM7 und KCTD5 in Gegenwart von Rep68 möglicherweise nur aufgrund der geringen präzipitierten KCTD5-Menge nicht nachweisbar war, wurde eine Immunpräzipitation mit den FLAG-getaggtten MCM7 und Myc-getaggtten KCTD5 in Anwesenheit von Rep78 durchgeführt. Nach Überexpression von Rep78 wurde kein Unterschied in der präzipitierten MCM7-Menge detektiert (Abb. 4.13, C, Spuren 3 und 4). Das KCTD5-Protein konnte in geringen Mengen kopräzipitiert werden (Abb. 4.13, C, Spuren 2- 4). Der Intensitätsvergleich der IgG-Banden mit dem in den Präzipitaten enthaltenen KCTD5-Protein deutet darauf hin, dass in Gegenwart von Rep78 möglicherweise weniger KCTD5 mit MCM7 komplexiert wird.

Insgesamt scheint die Wechselwirkung zwischen KCTD5 und Rep68 durch die Kotransfektion von exogenem MCM7 nicht beeinflusst zu werden, während die MCM7-KCTD5-Interaktion nach Koexpression von Rep78/Rep68 leicht geschwächt wird, möglicherweise durch sterische Hinderung.

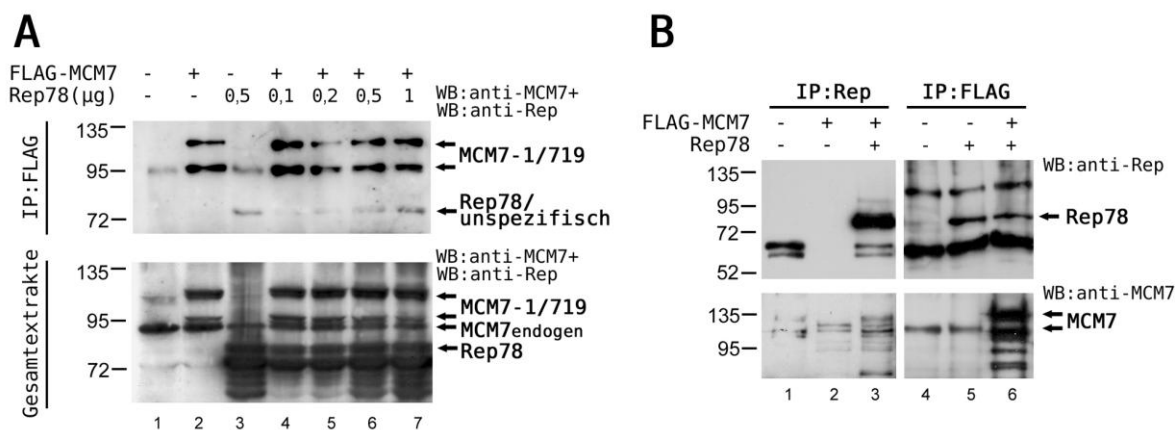


Abb. 4.14: Interaktion zwischen MCM7 und Rep78. (A) Ko-Immunpräzipitation: HEK293-Zellen wurden mit 3 µg pCATCH-FLAG-MCM7 und pKEX-Rep78 in steigenden Plasmidmengen zwischen 0,1 und 1 µg in einem 4 µg DNA-Transfektionsansatz kotransfiziert. FLAG-M2 Agarose-Immunpräzipitate wurden mittels Western Blot mit anti-Rep und anti-MCM7 Primärantikörpern und entsprechenden Sekundärantikörpern analysiert. Die Gesamtzellextrakte wurden aus parallel zur Immunpräzipitation mit den gleichen Mengen an Plasmid-DNA transfizierten HEK293-Zellen hergestellt. Der Nachweis der MCM7- und Rep78-Expression erfolgte mit anti-MCM7 und anti-Rep als Primärantikörpern und entsprechenden Sekundärantikörpern. (B) HEK293-Zellen wurden mit 2 µg pCATCH-FLAG-MCM7 und 0,2 µg pKEX-Rep78 in einem 4 µg Transfektionsansatz kotransfiziert. Die eine Hälfte der Proben wurde mit anti-Rep Antikörper und Sepharose A präzipitiert. Die zweite Hälfte der Proben wurde mit anti-FLAG-M2 Agarose präzipitiert. Rep78 und MCM7 wurden im Western Blot mit anti-MCM7 und anti-Rep Antikörpern nachgewiesen.

Für die Rep78/Rep68-Proteine wurde die Interaktion mit MCM7 und eine zumindest partielle Kolokalisation in subnukleären Strukturen beschrieben [139]. Rep78 könnte also

über die Interaktion mit MCM7 die Komplexbildung zwischen MCM7 und KCTD5 reduzieren. Eine Kotransfektion mit Rep78, dessen Expression schon bei kleinen transfizierten Plasmidmengen den Sättigungsbereich erreichte, hatte in HeLa-Zellen keinen inhibierenden Effekt auf die Expression des exogenen FLAG-getaggten oder endogenen MCM7-Proteins (Abb. 4.14, A, Gesamtextrakte). In den FLAG-M2 Agarose-Präzipitaten wurden beide FLAG-getaggten MCM7-Proteinmodifikationen mit anti-MCM7 Antikörper nachgewiesen (Abb. 4.14, A). Auch der anti-Rep Antikörper detektierte eine Bande mit einem Molekulargewicht auf der Höhe des Rep78 bei 72-80 kDa (Abb. 4.14, A, IP: Spuren 4-7). Diese Rep78-Bande wurde jedoch auch im Präzipitat in Abwesenheit des FLAG-getaggten MCM7 detektiert (Abb. 4.14, A, IP: Spur 3) und ist daher eher auf eine unspezifische Präzipitation von Rep78 als auf eine Bindung an MCM7 zurückzuführen.

Parallel zu einem analogen Kopräzipitationsversuch mit FLAG-M2 Agarose in HEK293-Zellen wurde in diesen Zellen zusätzlich eine Präzipitation mit dem anti-Rep Antikörper durchgeführt, um die mögliche Interaktion zwischen MCM7 und Rep78 im komplementären Ansatz nachweisen zu können. Rep78 konnte durch den Rep-Antikörper sehr gut präzipitiert werden (Abb. 4.14, B, Spur 3), aber MCM7 wurde nicht nur im Rep78-Präzipitat, sondern auch in den Kontrollansätzen detektiert (Abb. 4.14, B, Spuren 1 und 2). Bei der Präzipitation über den FLAG-Tag des MCM7-Proteins wurde Rep78 auch in Abwesenheit von MCM7 unspezifisch präzipitiert (Abb. 4.14, B, Spuren 5 und 6).

Zusammenfassend ist daher festzustellen, dass eine spezifische Interaktion zwischen den AAV-2 Rep78/Rep68-Proteinen und dem Replikationsfaktor MCM7 in dieser Arbeit nicht verifiziert werden konnte.

4.3.2 Einfluss der AAV-2 Proteine Rep78/Rep68 auf die MCM7-Ubiquitinierung

Die Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7 scheint in Anwesenheit der großen Rep-Proteine beeinträchtigt zu sein (Abschnitt 4.3.1). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Rep-Überexpression die MCM7-Ubiquitinierung durch mögliche Wechselwirkungen mit dem KCTD5-Cullin3-MCM7-Komplex beeinflussen könnte.

Die Expression der verwendeten Rep68-Proteine erreichte schon bei einer transfizierten Plasmid-DNA-Menge von 0,6 µg einen Sättigungsbereich (Abb. 4.15, A und B, anti-Rep). Nach der Kotransfektion von Rep68 oder der Kernwanderungsmutante Rep68-NLS konnten keine deutlichen Veränderungen in der MCM7-Expression nachgewiesen werden. Ein geringer Anstieg in der Proteinmenge des endogenen, aber nicht exogenen FLAG-getaggten MCM7-Proteins konnte nach Kotransfektion von mehr als 1 µg Rep68/Rep68-NLS-Plasmid-DNA beobachtet werden (Abb. 4.15, A und B, Spuren 7-9).

Nach der Überexpression von Rep68 kam es tendenziell zu einer leicht verminderten MCM7-Ubiquitinierung ohne eine Reduktion in der Menge an präzipitiertem Protein (Abb. 4.15, C, vgl. Spuren 4-5 und 7-8). Nach der Kotransfektion mit Rep68-NLS wurden geringere Mengen des His-MCM7-Proteins präzipitiert; die durch Ubiquitin modifizierten Banden nahmen aber teilweise sogar zu (Abb. 4.15, C, Spuren 4 und 10).

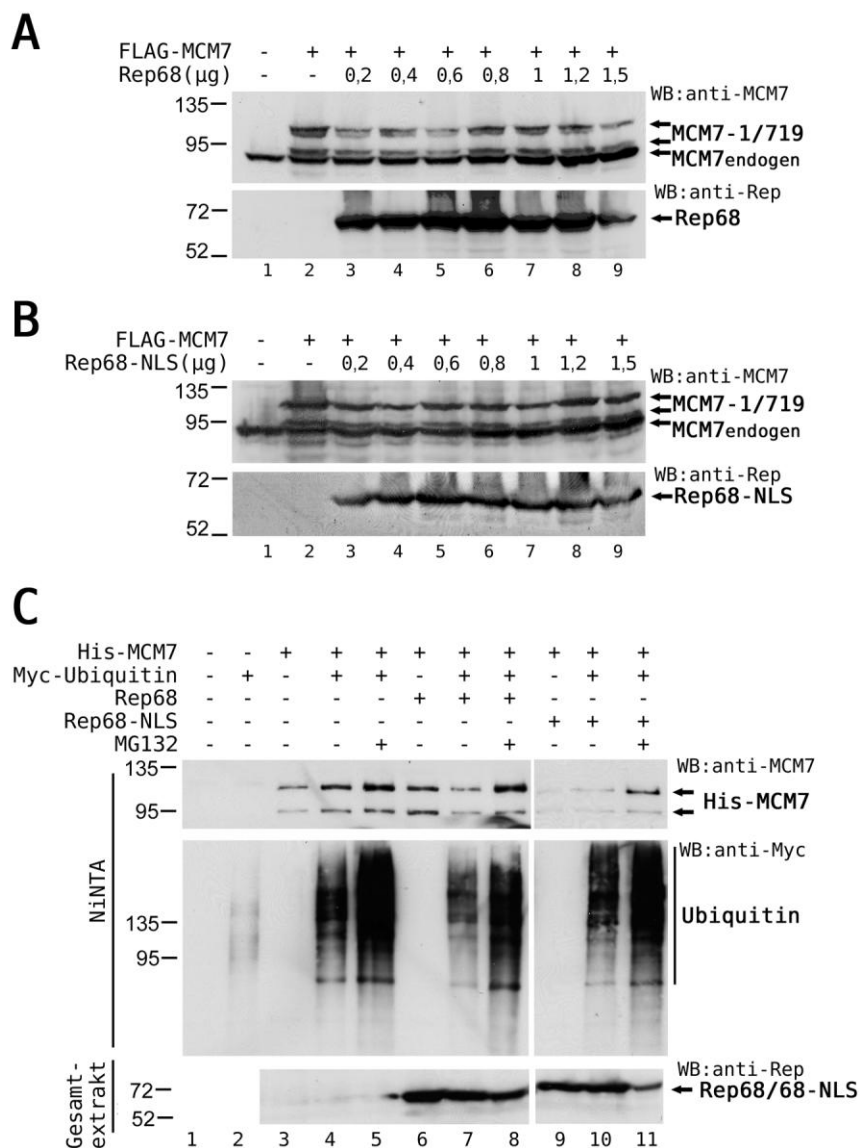


Abb. 4.15: Einfluss von Rep68 und der Kernwanderungsmutante Rep68-NLS auf die MCM7-Expression und -Ubiquitinierung. (A, B) HEK293-Zellen wurden mit 1 µg pCATCH-FLAG-MCM7 und steigenden Konzentrationen von pKEX-Rep68 oder pKEX-Rep68-NLS in einem 4 µg Transfektionsansatz kotransfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden im Western Blot mit anti-MCM7 und anti-Rep Antikörpern analysiert. (C) NiNTA-Aufreinigung des His-getaggten MCM7 und Nachweis der MCM7-Ubiquitinierung. HEK293-Zellen wurden mit 1 µg pCATCH-His-MCM7, 1 µg pMyc-Ubiquitin und teilweise mit 0,2 µg pKEX-Rep68 oder pKEX-Rep68-NLS in einem 4 µg Transfektionsansatz kotransfiziert. Die Zellysate wurden an NiNTA-Agarose aufgereinigt und die NiNTA-Eluate im Western Blot mit anti-MCM7 und anti-Myc (rabbit) analysiert. Die Gesamtextrakte wurden parallel zu NiNTA-Aufreinigung hergestellt und mit anti-Rep Antikörper mittels Western Blot auf Rep68-/Rep68-NLS-Expression untersucht.

Insgesamt kommt es also durch das überwiegend im Kern lokalisierte Rep68-Wildtyp-Protein zu einer leicht verminderten, durch die zytoplasmatisch lokalisierte Rep68-NLS-Mutante jedoch eher zu einer verstärkten MCM7-Ubiquitinierung.

4.3.3 Einfluss von MCM7 auf die AAV-2-Genomreplikation

Die initiale Bindung des MCM-Komplexes kann durch das Humane Cytomegalovirus oder das E4-Protein der Humanen Papillomaviren (HPV) vermindert werden, während MCM4 durch das Epstein-Barr Virus (EBV) phosphoryliert wird [135-137]. MCM7 wurde als ein für die produktive AAV-2-DNA-Replikation essentieller Faktor beschrieben [140]. Eine produktive AAV-2-Replikation erfordert eine Koinfektion mit einem Helfervirus wie beispielsweise Adenovirus, welches ein für die AAV-DNA-Replikation und Induktion der Genexpression geeignetes zelluläres Milieu induzieren kann [152]. Auch für den Adenovirus wurde eine Beteiligung an der Modifikation zellulärer Proteine beschrieben [200, 201]. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Aktivität des MCM-Komplexes durch die AAV-Helferviren posttranslational reguliert wird. Ausgehend von dieser Überlegung wurde daher untersucht, ob sich das Ausmaß der MCM7-Ubiquitinierung nach einer Infektion mit Adenovirus entscheidend verändert.

Die MCM7-Ubiquitinierung wurde in HEK293-Zellen nach einer Infektion mit Adenoviren von Subtyp 2 untersucht. Zusätzlich wurde dabei die MCM7-Ubiquitinierung nach der Hemmung von KCTD5 durch Verwendung der spezifischen KCTD5-RNA-Interferenz-Konstrukte shRNA's D und E überprüft. Die Adenovirus-Infektion schien keinen Einfluss auf die MCM7-Ubiquitinierung zu haben, denn die MCM7-Ubiquitinierungsintensität änderte sich nach der Infektion nicht (Abb. 4.16, A, Spuren 3 und 4). Die zusätzliche Kotransfektion der KCTD5-shRNA's hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die MCM7-Ubiquitinierung (Abb. 4.16, A, Spuren 3 und 5). Das parallel für die Effizienzkontrolle der shRNA-Konstrukte eingesetzte FLAG-KCTD5-Protein wurde jedoch nach Kotransfektion der Konstrukte auch nur partiell gehemmt (Abb. 4.16, B), sodass ein eventueller Effekt der Inhibition von KCTD5 auf die MCM7-Ubiquitinierung nicht abschließend beurteilt werden kann.

Zusätzlich zur Ubiquitinierung wurde auch die MCM7-Expression 24 und 40 h nach der Infektion mit Adenovirus überprüft. In der Proteinexpression sowohl des exogenen als auch des endogenen MCM7-Proteins gab es nach der Infektion mit Adenovirus kaum Veränderungen (Abb. 4.16, C, vgl. Spuren 4 und 6). Zwar wurde eine leichte Zunahme der MCM7-Proteinmenge 24 h nach der Infektion beobachtet, nach der Auswertung von Wiederholungsversuchen handelte es sich hier aber um experimentell bedingte Schwankungen der Proteinmenge (Abb. 4.16, C, 24 h: Spur 6). Auch der Rückgang der MCM7-Bandenstärke nach der Kotransfektion mit Ubiquitin war nicht repräsentativ für

alle Versuche, sodass man daraus nicht zwangsläufig eine verstärkte MCM7-Degradation nach Überexpression von Ubiquitin ableiten kann (Abb. 4.16, C, 24h: Spur 4). Erst nach der Inkubation mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 konnte ein kleiner Rückgang der MCM7-Proteinmenge nach Adenovirus-Infektion beobachtet werden (Abb. 4.16, C, vgl. Spuren 5 und 7), was auf eine schwächere MCM7 Proteinexpression in Gegenwart von Adenovirus hindeutet.

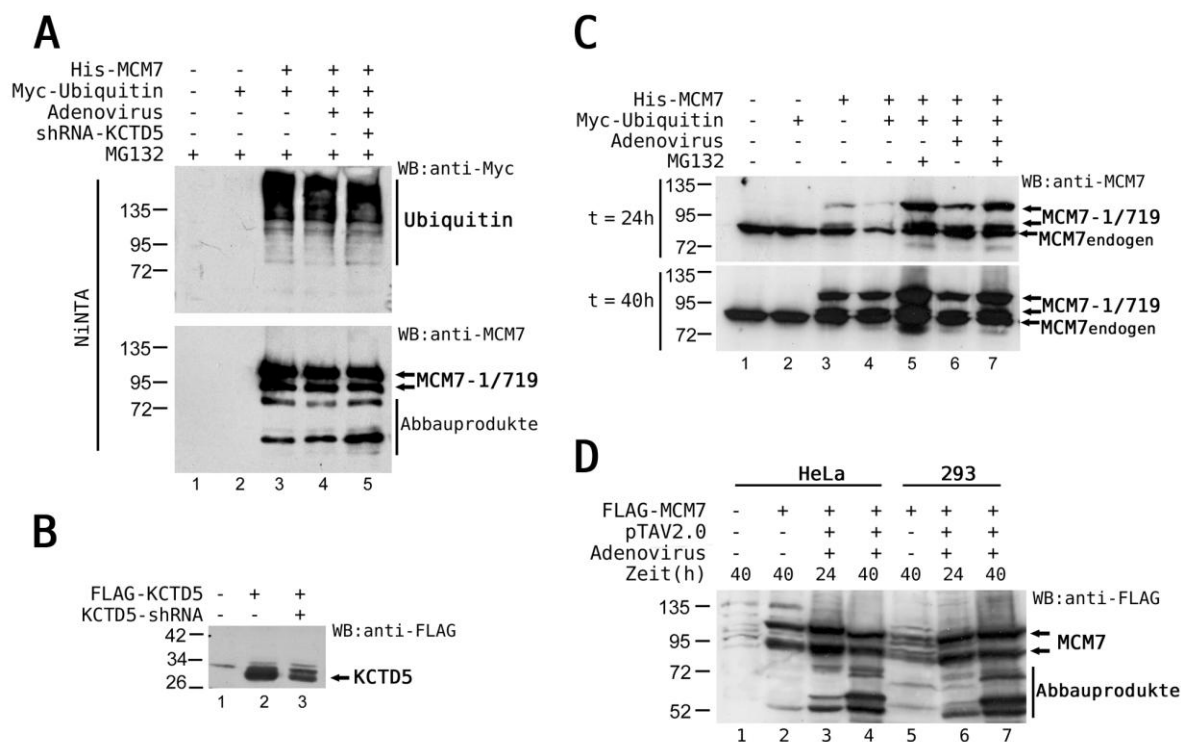


Abb. 4.16: Einfluss des Adenovirus auf die MCM7-Ubiquitinierung und -Expression. (A) Präzipitation von His-getagtem MCM7 mit NiNTA-Agarose aus HEK293-Zellysaten. Die Zellen wurden zunächst mit Adenovirus infiziert und anschließend mit 1 µg pCATCH-His-MCM7, 1 µg pMyc-Ubiquitin und für den Ansatz 5 zusätzlich mit je 1 µg KCTD5-shRNA's D und E transfiziert. Die Angaben beziehen sich auf einen 4 µg Transfektionsansatz. Die Ansätze wurden vor der Aufarbeitung für 16 h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 inkubiert. Die eluierten Proteine wurden mittels Western Blot mit anti-Myc (rabbit) und anti-MCM7 Antikörpern detektiert. (B) Parallel zu A durchgeführter Versuch zum Einfluss der KCTD5-shRNA's D und E auf die FLAG-KCTD5-Expression in HEK293-Zellen. Die Zellen wurden mit 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 und je 1 µg KCTD5-shRNA's D und E in einem 4 µg Transfektionsansatz transfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse) Primärantikörper und entsprechendem Sekundärantikörper untersucht. (C) HEK293-Zellen wurden mit 1 µg pCATCH-His-MCM7 und 1 µg pMyc-Ubiquitin in einem 4 µg Transfektionsansatz transfiziert. Eine Hälfte der Ansätze wurde unmittelbar vor der Transfektion mit Adenovirus infiziert (40 h), während die zweite Hälfte erst 16 h nach der Transfektion mit Adenovirus infiziert wurde (24 h). Alle Ansätze wurden 40 h nach der Plasmidtransfektion aufgearbeitet. 16 h vor der Aufarbeitung wurde ein Teil der Ansätze mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 inkubiert. Die His-MCM7-Expression wurde in den Gesamtzellextrakten mit anti-MCM7 Antikörper untersucht. (D) Die Gesamtzellextrakte aus HeLa- und HEK293-Zellen nach Infektion mit Adenovirus und Transfektion von 2 µg pCATCH-FLAG-MCM7 und 1 µg pTAV2.0 in einem 4 µg Ansatz. Die Gesamtzellextrakte wurden 40 h nach Transfektion und 24 oder 40 h nach Infektion mit Adenovirus gesammelt. Die MCM7-Detektion erfolgte mit anti-FLAG-M2 (mouse) Primär- und entsprechendem Sekundärantikörper.

Die MCM7-Expression wurde auch nach Kotransfektion mit einem AAV-2-Wildtyp-Plasmid untersucht, um Aussagen in Gegenwart eines replikationsfähigen AAV-Genoms treffen zu können. In der Proteinmenge des exogenen FLAG-getagten MCM7 konnten

keine Veränderungen detektiert werden, die auf eine mögliche AAV-2-Rolle hinweisen, unabhängig vom Zelltyp oder der zeitlichen Dauer der AAV-2-Genomreplikation (Abb. 4.16, D). Allein die niedermolekularen Banden, die durch den anti-FLAG Antikörper zusätzlich detektiert und den möglichen MCM7-Abbauprodukten zugeordnet wurden, nahmen nur in Anwesenheit des replikationsfähigen AAV-Genoms und nach Adenovirus-Infektion zu (Abb. 4.16, D, Spuren 2-4 und 5-7).

Die durchgeführten Experimente lieferten keinen Nachweis einer Veränderung in der MCM7-Proteinexpression oder der MCM7-Ubiquitinierung unter einem Einfluss von Adenovirus oder AAV-2.

Ungeachtet der Ergebnisse von Nash *et al.*, die MCM7 als Rep78/Rep68-Interaktionspartner identifizierten [139], konnte die MCM7-Rep78/Rep68-Interaktion in dieser Arbeit nicht verifiziert werden. Es stellte sich die Frage, ob MCM7 wirklich eine Schlüsselrolle bei der AAV-2-Replikation spielt, wie in der vorausgegangenen Arbeit von Nash *et al.* beschreiben [140]. Für die Bearbeitung dieser Fragestellung wurden shRNA's gegen MCM7 generiert und Veränderungen in der AAV-2-Replikation nach deren Einsatz untersucht.

Die Wirkung der generierten shRNA's variierte zwischen den Konstrukten kaum (Abb. 4.17, A). Die shRNA's E und F waren in HeLa-Zellen sehr effektiv und führten zur vollständigen Expressionshemmung der exogenen, FLAG- und His-getaggten MCM7 und zur Reduktion des endogenen MCM7-Proteins auf 10 bis 20% des zellulären Niveaus (Abb. 4.17, A). Unter Einsatz der shRNA-Konstrukte wurde in HeLa-Zellen ein möglicher Effekt der Inhibition von MCM7 auf die produktive AAV-2-Replikation untersucht. Nach der Kotransfektion von steigenden Mengen an MCM7-shRNA F mit einem infektiösen AAV-Genom in Gegenwart von Adenovirus konnten in der Southern Blot Analyse keine Veränderungen in der Abundanz der AAV-2-Replikationsintermediate gegenüber dem Kontrollansatz gefunden werden (Abb. 4.17, B). Ein leichter Rückgang der replikativen DNA-Formen konnte im Ansatz mit 0,5 µg kotransfiziertem shRNA-Konstrukt beobachtet werden (Abb. 4.17, B, Spuren 2-6). Bei dieser Konzentration war auch der stärkste Effekt auf die exogene und endogene MCM7-Expression zu verzeichnen (Abb. 4.17, C, Spuren 2-6). Unter Einbeziehen der Folgeexperimente muss dieser Rückgang jedoch als experimentelle Schwankung interpretiert werden.

Da der Ansatz mit dem shRNA-Konstrukt F die endogene MCM7-Expression nicht vollständig hemmte, wurde eine Kombination aus 2 shRNA-Konstrukten bezüglich ihres Einflusses auf die AAV-2-Replikation untersucht. Das Niveau der AAV-2-Replikationsintermediaten blieb trotz der gemeinsamen Kotransfektion beider shRNA-Konstrukte unverändert (Abb. 4.17, D, Spuren 3-6). Es erfolgte eine starke Expressionshemmung des His-getaggten MCM7-Proteins, das Proteinniveau des endogenen MCM7 ging jedoch nur geringfügig zurück (Abb. 4.17, E). Hierbei ist zu

berücksichtigen, dass für die Hemmung des endogenen MCM7 die Transfektionseffizienz eine entscheidende Rolle spielt, während das exogene Protein ausschließlich in den Zellen exprimiert werden kann, die auch die shRNA-Konstrukte aufnehmen.

Eine geringe Abschwächung der dimerischen und vor allem monomerischen replikativen DNA-Form zeigte sich unter dem Einsatz der KCTD5-shRNA's, die jedoch in Folgeexperimenten ebenfalls als Schwankung interpretiert werden musste (Abb. 4.17, D, Spur 6).

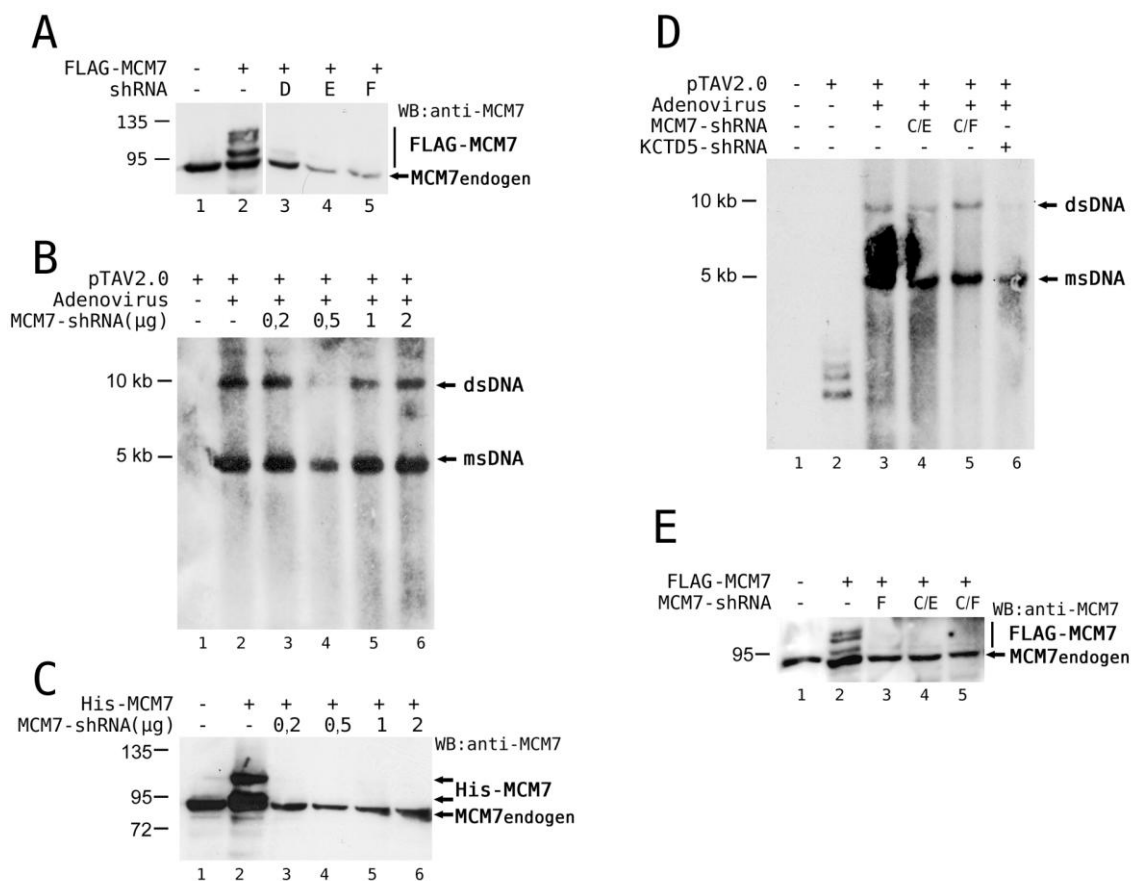


Abb. 4.17: Die AAV2-Replikation wird durch eine Hemmung der MCM7 Expression nicht beeinflusst

(A) Untersuchung der Wirkung von MCM7-shRNA-Konstrukten auf die MCM7-Expression. HeLa-Zellen wurden mit 1 µg pMyc-MCM7 und 0,5 µg shRNA's gegen MCM7 D, E oder F in einem 4 µg Ansatz kotransfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden mit anti-MCM7 Antikörper im Western Blot untersucht. (B) Wirkung der MCM7-shRNA F auf die AAV-2-DNA-Replikation. HeLa-Zellen wurden mit 2 µg pTAV2.0 und steigenden Konzentrationen der MCM7-shRNA F in einem 4 µg Ansatz kotransfiziert. Vor der Transfektion wurden alle Ansätze außer der Negativkontrolle mit Adenovirus infiziert. Die monomerische und die dimerische AAV-2 DNA-Replikationsformen wurden mittels Southern Blot Analyse nachgewiesen. (C) HeLa-Zellen wurden in einem Parallelansatz zu (B) mit steigenden Konzentrationen von MCM7-shRNA F und 1 µg pCATCH-His-MCM7 kotransfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden mit anti-MCM7 Antikörper im Western Blot analysiert. (D) Wirkung der MCM7-shRNA's oder KCTD5-shRNA's auf die AAV-2-Replikation. HeLa-Zellen wurden mit 2 µg pTAV2.0 und je 1 µg KCTD5-shRNA's D und F oder je 1 µg MCM7-shRNA's C und E oder C und F kotransfiziert. Alle Ansätze außer den Negativkontrollen wurden mit Adenovirus infiziert. Die monomerische und die dimerische DNA-Replikationsformen wurden in Southern Blot analysiert. (E) HeLa-Zellen wurden in einem Parallelansatz zu (D) mit 1 µg pCATCH-FLAG-MCM7 und je 1 µg MCM7-shRNA's oder 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 und je 1 µg von KCTD5-shRNA's D und F kotransfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden mit anti-MCM7 Antikörper in Western Blot analysiert.

Eine Beteiligung von MCM7 an der produktiven AAV-2-Replikation konnte in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die Hemmung der MCM7-Proteinexpression mit Hilfe von spezifischen shRNA's führte zu keinen nennenswerten Veränderungen in der AAV-2-DNA-Replikation. Die Effektivität der eingesetzten shRNA-Konstrukte für das endogene Protein kann allerdings nur anhand parallel durchgeführter Versuche mit getaggtten exogenen Proteinkonstrukten bewertet werden. Umgekehrt konnte weder für AAV-2 noch für Adenovirus als eines seiner bevorzugten Helferviren ein Einfluss auf die MCM7-Ubiquitinierung oder den MCM7-Proteinspiegel nachgewiesen werden.

4.4 Funktionelle Charakterisierung des KCTD5-Interaktionspartners ZNF711

4.4.1 Untersuchung der für die Bindung an ZNF711 erforderlichen KCTD5-Proteindomänen

Im Yeast-two-hybrid-Screen wurde ein C-terminaler, zwischen den Aminosäuren 476 und 733 lokalisierter Abschnitt des ZNF711-Proteins als mit KCTD5-interagierende Proteindomäne identifiziert (Abb. 4.18, A) [11]. Um diese Interaktion in Säugerzellen zu verifizieren, wurden Expressionsvektoren mit dem kompletten ZNF711-Leserahmen generiert. Dabei wurden an den N-Terminus des ZNF711-Proteins in Vektoren eins der FLAG, YFP, His oder Myc-Tag-Epitope fusioniert. Aufgrund der relativ großen Länge des offenen Leserahmens wurden mit Hilfe von spezifischen Primern und HEK293-mRNA als Template die N- und C-terminalen Anteile des Leserahmens getrennt mittels RT-PCR amplifiziert und in einer 3-Komponenten-Ligation in die entsprechenden Vektoren kloniert. Die ZNF711-Proteinexpression wurde nach einer Überexpression in Säugerzellen mittels Western Blot untersucht (Abb. 4.18, B-D).

Für alle generierten Konstrukte außer dem His-getaggtten ZNF711 konnte die Expression eines entsprechenden Fusionsproteins gezeigt werden (Abb. 4.18, B-D). Für eine deutliche Expression war die Transfektion von 1 µg Plasmidkonstrukt bezogen auf einen 4 µg Gesamtansatz für eine 6 cm-Schale nur für Myc-getaggttes ZNF711 ausreichend (Abb. 4.18, C). Beim FLAG-getaggtten ZNF711-Protein war die Expression auch nach Transfektion von 4 µg Plasmid-DNA immer noch relativ schwach (Abb. 4.18, D).

Die subzelluläre Lokalisation des ZNF711 wurde in HeLa-Zellen mit Hilfe des YFP-getaggtten Proteins durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 4.18, E). Nach Transfektion des YFP-ZNF711 war dieses überwiegend im Zellkern lokalisiert, wobei die Nukleoli ausgespart blieben.

Da alle Konstrukte zu reaktiven Banden der erwarteten Größe im Western Blot führten, wurden sie für die weiteren Experimente eingesetzt.

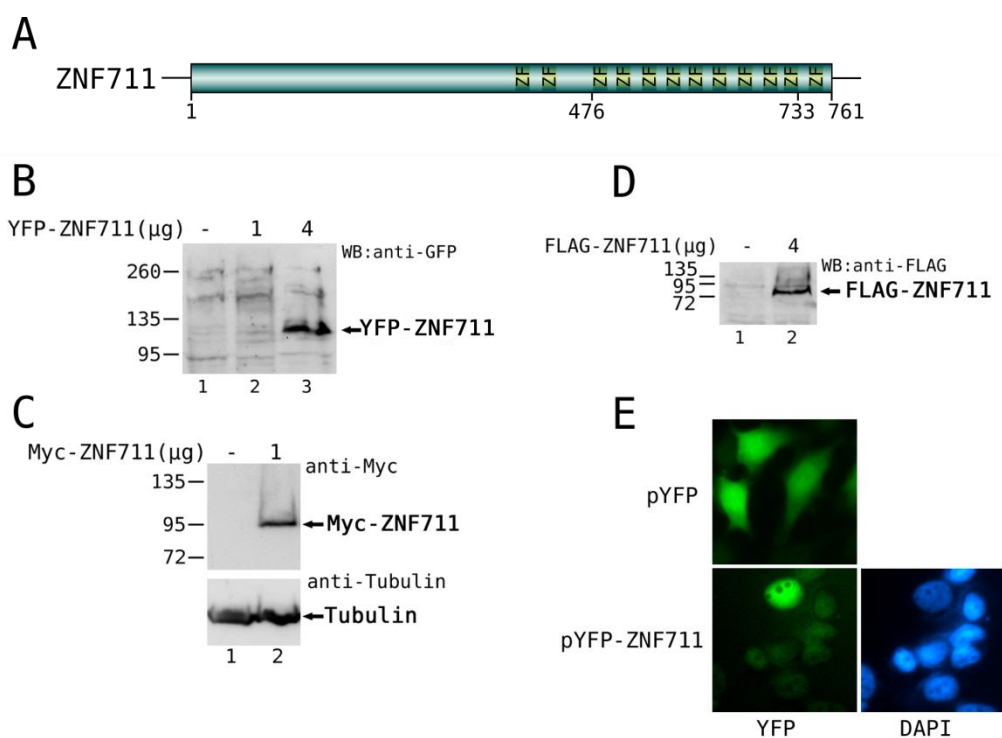


Abb. 4.18: Expressionsanalyse von exogenem ZNF711 in Säugerzellen. (A) Schematische Darstellung des ZNF711-Proteins. ZF: Zink-Finger Domäne. (B) HeLa-Zellen wurden mit 1 oder 4 µg pYFP-ZNF711 in 4 µg Ansätzen transfiziert und die Proteinexpression wurde in den Gesamtzellextrakten mit einem anti-GFP Antikörper im Western Blot nachgewiesen. (C) HEK293-Zellen wurden mit 1 µg pMyc-ZNF711 transfiziert und die Expression des Myc-getaggtten Proteins mit einem anti-Myc Antikörper (mouse) nachgewiesen. Der Nachweis mit anti-Tubulin diente zur Kontrolle der aufgetragenen Zellextraktmenge. (D) HEK293-Zellen wurden mit 4 µg pCATCH-FLAG-ZNF711 transfiziert und die Expression des FLAG-getaggtten Proteins wurde mit einem anti-FLAG Antikörper (rabbit) nachgewiesen. (E) Der Fluoreszenz-Nachweis von YFP-ZNF711 in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit 4 µg pYFP-ZNF711 oder 4 µg pYFP als Kontrolle transfiziert. Nach 42 h wurden die Zellen fixiert und in Gegenwart von DAPI eingedeckelt. Die Bilder wurden mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Die im Yeast-two-hybrid-Screen beobachtete Interaktion zwischen ZNF711 und KCTD5 wurde zunächst in Säugerzellen überprüft, wobei die für die Interaktion wichtigen KCTD5-Aminosäuren mittels der KCTD5-Deletionsmutanten identifiziert werden sollten. Dafür wurden HEK293-Zellen mit Myc-getaggttem ZNF711 und FLAG-getaggtten KCTD5-Mutanten transfiziert. Beim KCTD5-1/234-Volllänge-Konstrukt war die Menge an durch FLAG-M2 Agarose präzipitiertem Protein am höchsten, während die KCTD5-1/145-Deletionsmutante von allen Konstrukten die schwächste Bande zeigte (Abb. 4.19, A, Spuren 2-8). Die Bande für die N-terminale Mutante KCTD5-47/234 lief annähernd auf der gleichen Höhe wie die unspezifische Bande der kreuzreagierenden schweren Ketten der IgG's und war daher schwierig zu erkennen (Abb. 4.19, A, Spur 9).

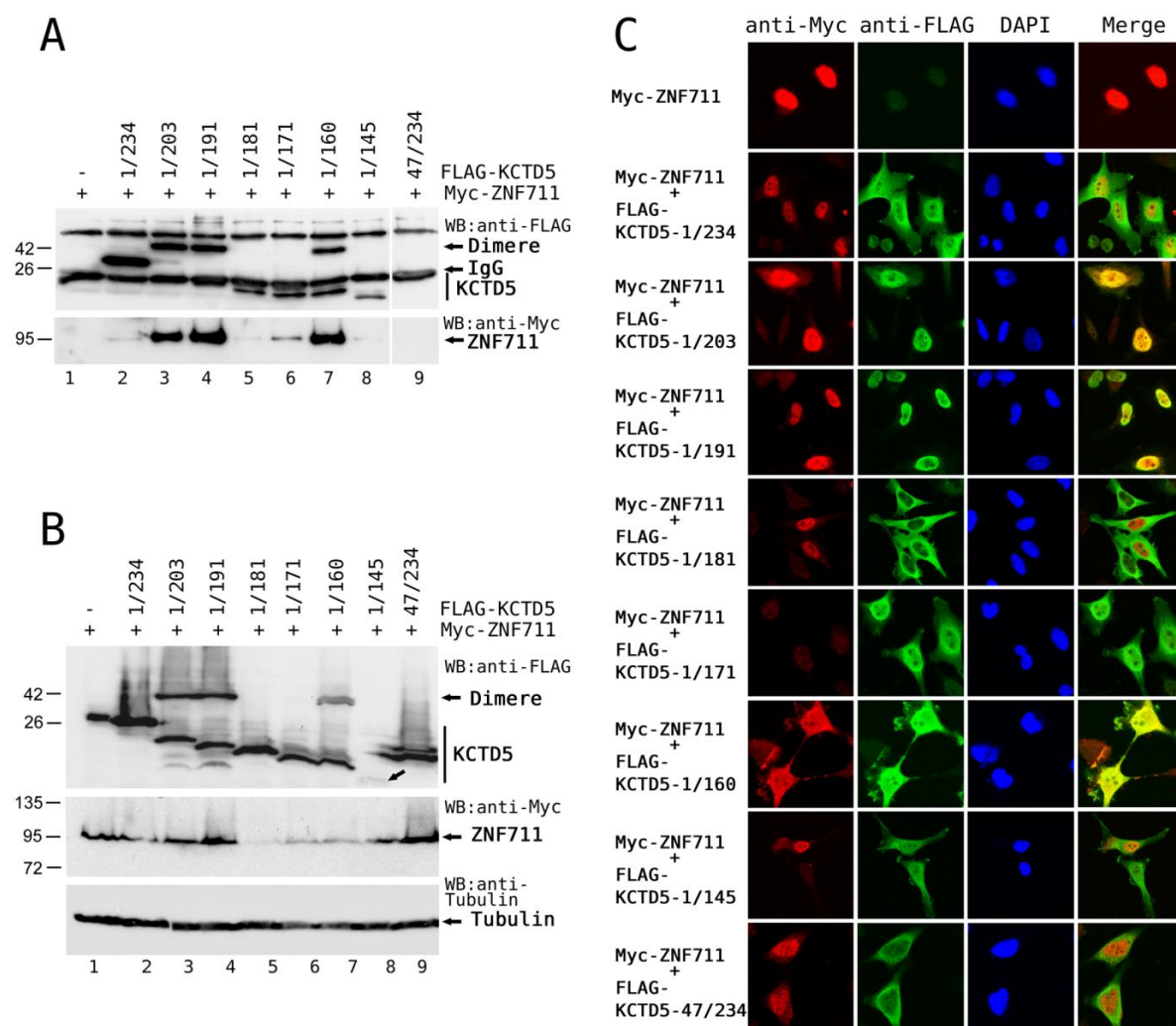


Abb. 4.19: Interaktion und subzelluläre Verteilung von ZNF711 und KCTD5 Proteinen. (A) Kopräzipitation von Myc-getagtem ZNF711 mit FLAG-getagten KCTD5-Deletionsmutanten. HEK293-Zellen wurden in einem 4 µg Ansatz mit 2 µg pMyc-ZNF711 und 2 µg des jeweiligen pCATCH-FLAG-KCTD5-Konstruktes kotransfiziert. Die Zellysate wurden mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert und mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper zum Nachweis von KCTD5 und anti-Myc (rabbit) Antikörper zum Nachweis von ZNF711 analysiert. (B) HEK293-Zellen wurden mit 2 µg pMyc-ZNF711 und 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5-Deletionsmutanten wie angegeben kotransfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden auf die Expression der entsprechenden Fusionsproteine durch anti-FLAG-M2 (mouse) und anti-Myc (rabbit) Antikörpern im Western Blot analysiert. Die Analyse mit anti-Tubulin diente zur Kontrolle der aufgetragenen Zellextraktmenge. (C) Subzelluläre Lokalisation des Myc-ZNF711-Proteins und der KCTD5-Deletionsmutanten nach Kotransfektion in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden in 4 µg Gesamtansätzen mit 2 µg pMyc-ZNF711 und jeweils 2 µg der pCATCH-FLAG-KCTD5-Konstrukte kotransfiziert. Die mit anti-Myc (rabbit) Primärantikörper und TRITC-markierten Sekundärantikörper sowie anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper und FITC-markierten Sekundärantikörper durchgeführten Immunfluoreszenzen wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop dokumentiert.

Eine unspezifische Präzipitation des Myc-getagten ZNF711 durch die FLAG-M2 Agarose wurde nicht beobachtet (Abb. 4.19, A, Spur 1), sodass beim Auftreten einer reaktiven Bande von einer spezifischen Bindung an das jeweilige KCTD5-Protein ausgegangen werden kann. Die stärkste Interaktion konnte zwischen ZNF711 und denjenigen KCTD5-Deletionsmutanten beobachtet werden, die putative Dimere ausbilden und überwiegend im Nukleus lokalisiert sind (Abb. 4.19, A, Spuren 3, 4 und 7). Die Bindung von ZNF711 an das Volllänge-Protein KCTD5-1/234 fiel hingegen deutlich

schwächer aus, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass KCTD5-1/234 in großen Mengen präzipitiert wurde. Keine Interaktion konnte zwischen ZNF711 und KCTD5-47/234 nachgewiesen werden, einer KCTD5-Deletionsmutante, die laut früheren Untersuchungen keine Interaktion mit Cullin3 eingeht (Abb. 4.19, A, Spur 9) [11, 202].

Die ZNF711-Proteinexpression, die parallel mittels Western Blot Analyse untersucht wurde, zeigte nur geringfügige Variationen nach der Koexpression der verschiedenen KCTD5-Deletionsmutanten (Abb. 4.19, B). Während die Deletion der KCTD5-Aminosäuren 181-191 zu einem Rückgang der ZNF711-Proteinexpression führte, blieb die ZNF711-Proteinexpression nach der Koexpression mit den KCTD5-Mutanten, die eine Deletion lediglich bis Aminosäure 191 auswiesen, unverändert (Abb. 4.19, B, Spur 5). Trotz der starken Wechselwirkung und Ausbildung putativer Dimere übte auch KCTD5-1/160 einen leichten inhibitorischen Effekt auf die ZNF711-Expression aus (Abb. 4.19, B, Spur 7). Nach der Kotransfektion der schwach exprimierten KCTD5-1/145 und der N-terminalen Mutante KCTD5-47/234 war ungefähr das Expressionsniveau der ZNF711-Kontrolle zu beobachten (Abb. 4.19, B, Spuren 1 und 6-9).

Aufgrund der Tatsache, dass die verschiedenen KCTD5-Deletionsmutanten eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation aufweisen (vgl. Abb. 4.1), wurde überprüft, ob die Überexpression der KCTD5-Konstrukte eine Änderung der ZNF711-Lokalisation zur Folge hatte. Ferner sollte mit diesen Untersuchungen die Frage beantwortet werden, ob und unter welchen Bedingungen es zu einer Kolokalisation der beiden Proteine kommt. Dafür wurden HeLa-Zellen mit Myc-ZNF711 und den verschiedenen FLAG-KCTD5-Konstrukten kotransfiziert und nach Immunfluoreszenz-Aufarbeitung mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht (Abb. 4.19, C). Bei den KCTD5-Konstrukten wurde die in Abb. 4.1 gezeigte subzelluläre Lokalisation des Wildtyp-Proteins und der verschiedenen Deletionsmutanten bestätigt. Zusätzlich konnte bei diesem Versuch eine zytoplasmatische Lokalisation für zwei Proteine nachgewiesen werden, die Dimere ausbilden: KCTD5-1/160 wurde zu einem großen, KCTD5-1/203 zu einem sehr geringen Anteil im Zytoplasma detektiert (Abb. 4.19, C).

ZNF711 wurde nach Kotransfektion mit den KCTD5-Konstrukten überwiegend im Zellkern detektiert. Zwei Ausnahmen bildeten die schon erwähnten Ansätze mit KCTD5-1/203 und 1/160. Bei diesen konnte in manchen Zellen eine Kolokalisation von ZNF711 und KCTD5 im Zytoplasma beobachtet werden. Während nach der Kotransfektion von KCTD5-1/234, KCTD5-1/181, KCTD5-1/145 und KCTD5-47/234 nur ein kleiner ZNF711-Signlrückgang beobachtet wurde, konnte im Ansatz mit KCTD5-1/171 kaum ZNF711 detektiert werden. Ausnahmen bildeten in diesem Fall die Konstrukte KCTD5-1/203 und 1/191, die ihrerseits selbst überwiegend im Zellkern lokalisiert sind und dort auch zu einer Erhöhung der ZNF711-Proteinspiegel mit einer ausgeprägten Kolokalisation der beiden Proteine führten (Abb. 4.19, C).

Insgesamt konnte in diesen Untersuchungen die initial im Yeast-two-hybrid-Screen gefundene Interaktion von KCTD5 mit ZNF711 in vollem Ausmaß bestätigt werden. Dabei zeigten insbesondere solche KCTD5-Proteinmutanten eine starke Bindung an ZNF711, die sich in der Westernanalyse nach SDS-PAGE durch die ausgeprägte Bildung putativer dimerer Proteinformen auszeichneten. Diese KCTD5-Mutanten zeigten auch eine ausgeprägte Kollokalisierung mit ZNF711, entweder in Nukleus im Fall von KCTD5-1/203 und KCTD5-1/181 oder im Zytoplasma im Fall von KCTD5-1/160. Die Intensität der ZNF711-Expression im Immunfluoreszenz-Nachweis korrelierte wiederum mit der Stärke der Interaktion zwischen KCTD5 und ZNF711, jedoch nicht vollständig mit den im Western Blot erhobenen Expressionsdaten.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Interaktion zwischen ZNF711 und KCTD5 zumindest teilweise durch eine Oligomerisierung von KCTD5 vermittelt wird, die sich im Auftreten von gegenüber SDS stabilen Dimeren in der Proteingelektrophorese niederschlägt. In welchem Ausmaß das Wildtyp-KCTD5 zur Bildung solcher Oligomere befähigt ist, konnte durch die bisherigen Untersuchungen nicht geklärt werden. Auch das Volllänge-Protein kann jedoch unter bestimmten Bedingungen, beispielweise in Anhängigkeit von der Progression des Zellzyklus, im Nukleus akkumulieren (siehe Abschnitt 4.1.2). Durch die Interaktion von KCTD5 mit ZNF711 scheint die ZNF711 Expression und/oder Stabilität erhöht zu werden, zumindest in einzelnen subzellulären Kompartimenten.

4.4.2 Bildung trimerer Komplexe zwischen KCTD5, ZNF711 und Cullin3

Durch die Verifizierung der im Yeast-two-hybrid-Screen beobachteten Interaktion zwischen ZNF711 und KCTD5 in Säugerzellen (Abschnitt 4.4.1) ergab sich in Analogie zu den Untersuchungen mit MCM7 die Frage nach einer möglichen Funktion von KCTD5 als ZNF711-spezifischer Adapter für Cullin3-basierte E3-Ubiquitin-Ligasen. Dafür sollte zunächst die Bildung trimerer Komplexe, bestehend aus KCTD5, Cullin3 und ZNF711, untersucht werden. Nach gemeinsamer Transfektion der unterschiedlich getaggtten Expressionskonstrukte in Säugerzellen wurde über FLAG-M2 Agarose aufgereinigtes FLAG-getaggttes ZNF711 auf kopräzipitiertes KCTD5 und Cullin3 untersucht (Abb. 4.20). Diese Versuche wurden sowohl in Abwesenheit von MG132 (Abb. 4.20, A) als auch zusätzlich in Gegenwart von MG132 durchgeführt (Abb. 4.20, B).

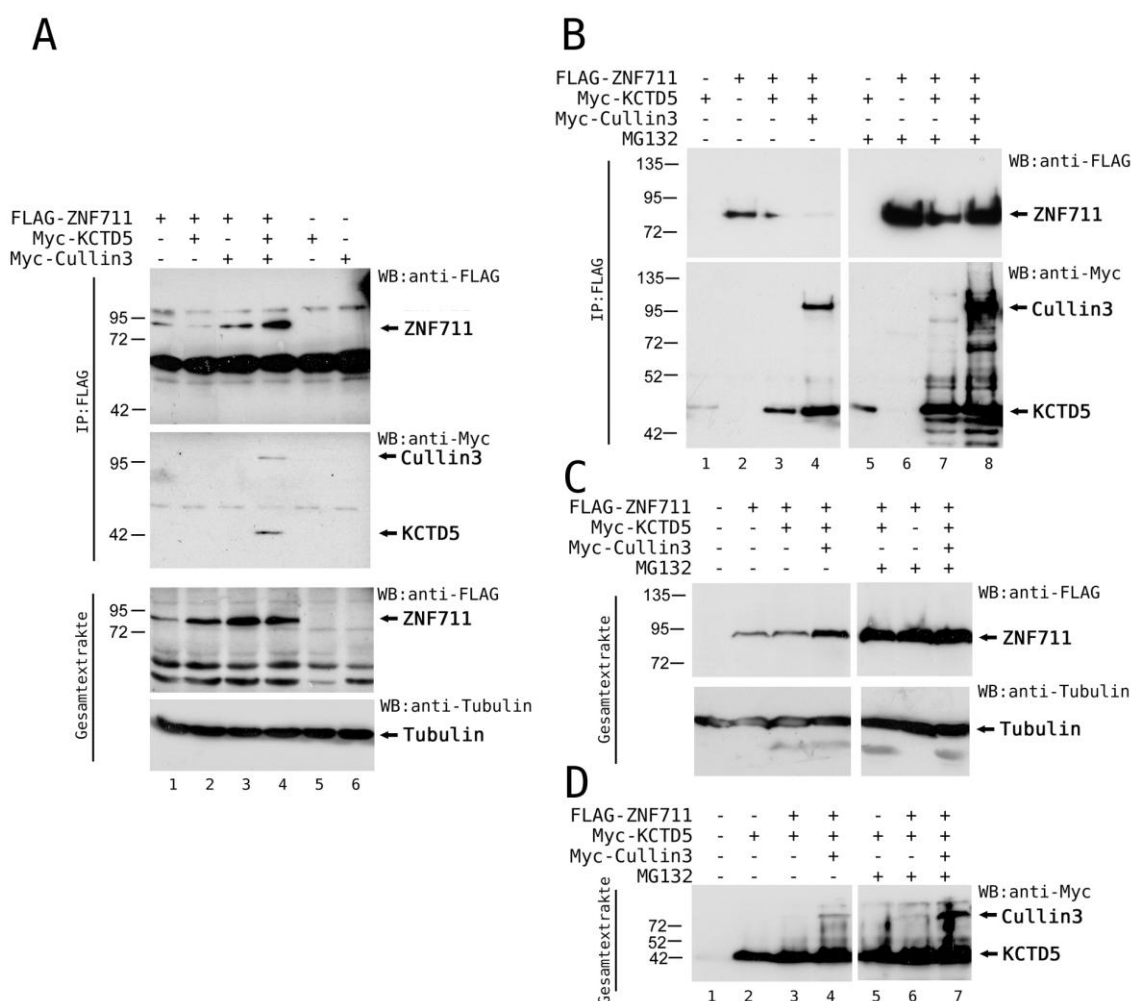


Abb. 4.20: Bildung eines trimeren Komplexes von ZNF711 mit KCTD5 und Cullin3. (A) HEK293-Zellen wurden in einem 4 µg DNA-Ansatz mit 2 µg pCATCH-FLAG-ZNF711, 1 µg pMyc-KCTD5 und 1 µg pMyc-Cullin3 in verschiedenen Kombinationen kotransfiziert. Die Zellysate wurden mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert und mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper zum Nachweis des FLAG-ZNF711 und anti-Myc (rabbit) Antikörper zum Nachweis der Myc-KCTD5 und Myc-Cullin3 im Western Blot analysiert. Die Gesamtextrakte wurden parallel auf die ZNF711-Expression mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper und als Kontrolle mit anti-Tubulin Antikörper im Western Blot untersucht. (B) HEK293-Zellen wurden in einem 4 µg DNA-Ansatz mit 2 µg pCATCH-FLAG-ZNF711, 1 µg pMyc-KCTD5 und 1 µg pMyc-Cullin3 in verschiedenen Kombinationen kotransfiziert. Die Hälfte der Ansätze wurde für 14 h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 inkubiert. Die Zellysate wurden mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert und mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper zum Nachweis des FLAG-ZNF711 und anti-Myc (rabbit) Antikörper zum Nachweis der Myc-KCTD5 und Myc-Cullin3 im Western Blot analysiert. (C-D) Parallelansatz zu B mit 2 µg pCATCH-FLAG-ZNF711, 1 µg pMyc-KCTD5 und 1 µg pMyc-Cullin3. Die Expression von ZNF711, KCTD5 und Cullin3 wurde in den Gesamtextrakten mit anti-FLAG-M2 (mouse) und anti-Myc (rabbit) Antikörpern im Western Blot detektiert. Analyse mit anti-Tubulin Antikörper diente zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

Das FLAG-getaggte ZNF711 konnte in Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG132 nur in geringen Mengen über die FLAG-M2 Agarose präzipitiert werden (Abb. 4.20, A und B, IP:FLAG). Im ersten Versuch wurde keine unspezifische Bindung von Myc-KCTD5 oder Myc-Cullin3 an die FLAG-M2 Agarose detektiert (Abb. 4.20, A, IP: Spuren 5 und 6) und auch im zweiten Versuch wurde nur eine geringe Menge von Myc-KCTD5 unspezifisch präzipitiert (Abb. 4.20, B, Spuren 1 und 5). In beiden Versuchen konnte jedoch eine deutliche gemeinsame Bindung von KCTD5 und Cullin3 an ZNF711 in

Abwesenheit von MG132 nachgewiesen werden (Abb. 4.20, A, IP: Spur 4 und B, Spur 4), was auf eine Bildung eines höhermolekularen Cullin3-KCTD5-ZNF711-Komplexes hinweist, wobei die Bindung von KCTD5 durch Koexpression von Cullin3 wesentlich verstärkt wurde (Abb. 4.20, A und B, Spuren 3 und 4), ohne dass es zu einer Zunahme der KCTD5-Gesamtexpression gekommen wäre (Abb. 4.20, D).

KCTD5 und Cullin3 wurden auch nach proteasomaler Inhibition als Interaktionspartner von ZNF711 bestätigt, wobei es unter diesen Bedingungen zu deutlich erhöhten ZNF711-Proteinspiegeln und damit verbunden auch zu einem verstärkten Nachweis von Cullin3 und KCTD5 in den ZNF711-Immünpräzipitaten kam (Abb. 4.20, B, vgl. Spuren 3-4 und 7-8).

Nach der ZNF711-Koexpression mit KCTD5 und insbesondere nach der Koexpression mit Cullin3 wurden erhöhte Proteinmengen des ZNF711 beobachtet (Abb. 4.20, A, Gesamtextrakte: Spuren 1-4; und C, Gesamtextrakte: Spuren 2-4), während dieser Effekt nach Inkubation mit MG132 nicht nachgewiesen wurde (Abb. 4.20, C, Spuren 5-7). ZNF711 wird in Zellen proteasomal abgebaut, worauf die deutliche Proteinzunahme nach Inhibition des Proteasoms hinweist (Abb. 4.20, C, Gesamtextrakte: vgl. Spuren 2-4 und 5-7). Cullin3, das proteasomal degradiert wird [203, 204], akkumuliert nach Inkubation mit dem MG132 ebenfalls wie ZNF711, während KCTD5 durch das Proteasom nur unwesentlich reguliert wird (Abb. 4.20, D, Gesamtextrakte: Spuren 2-4 und 5-7).

Die Bildung eines trimeren Komplexes zwischen ZNF711, KCTD5 und Cullin3 konnte durch die beschriebenen Versuche nachgewiesen werden. Nach Koexpression von KCTD5 und Cullin3 scheint es jedoch in Abwesenheit von Proteasom-Inhibitor nicht zu verminderten ZNF711-Proteinspiegeln zu kommen, was zunächst gegen eine Rolle von KCTD5 bei der Proteasom-abhängigen Degradation von ZNF711 spricht.

4.4.3 Stabilisierung des ZNF711-Proteins durch KCTD5 und Cullin3

Mit Hilfe weiterer Experimente wurde der induzierende Effekt von KCTD5 und Cullin3 auf die Proteinmenge des exogenen ZNF711 untersucht, der in den vorangegangenen Experimenten nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 4.4.2). FLAG-ZNF711 wurde mit steigenden Mengen von KCTD5- und Cullin3-Expressionskonstrukten kotransfiziert, um deren Effekt auf die ZNF711-Proteinmenge und damit mögliche funktionelle Wechselwirkungen zwischen ZNF711, KCTD5 und Cullin3 zu untersuchen.

Eine kontinuierliche Zunahme des exogenen ZNF711-Proteins wurde sowohl in HeLa- als auch in HEK293-Zellen nach Myc-KCTD5-Kotransfektion in Konzentration oberhalb von 1 µg beobachtet (Abb. 4.21, A). Erst ab dieser Plasmidkonzentration war die Proteinexpression des kotransfizierten KCTD5 mit dem anti-Myc Antikörper detektierbar (Abb. 4.21, A, Spuren 5-6 und 15-16). Die zunehmende Expression des exogenen KCTD5

korrelierte mit steigender ZNF711-Proteinmenge, wobei für diesen positiven Effekt offenbar eine minimale zelluläre Konzentration am KCTD5-Protein erforderlich war, die erst mit Transfektion von 1 μg Plasmid-DNA erreicht wurde. Die Cullin3-Kotransfektion führte ebenfalls zu einer Steigerung der ZNF711-Proteinmenge (Abb. 4.21, B). Dieser positive Effekt war in HEK293-Zellen im Vergleich zu HeLa-Zellen stärker ausgeprägt, was wahrscheinlich auf die stärkere Cullin3-Expression in HEK293-Zellen zurückzuführen ist (Abb. 4.21, B, vgl. Spuren 3-10 mit 13-20). Vergleichbar zu Ansätzen mit KCTD5 führte erst die mit dem anti-Myc Antikörper nachweisbare Menge an exprimierten Cullin3 zu einer Zunahme des ZNF711 (Abb. 4.21, B, Spuren 6-7 und 12-13).

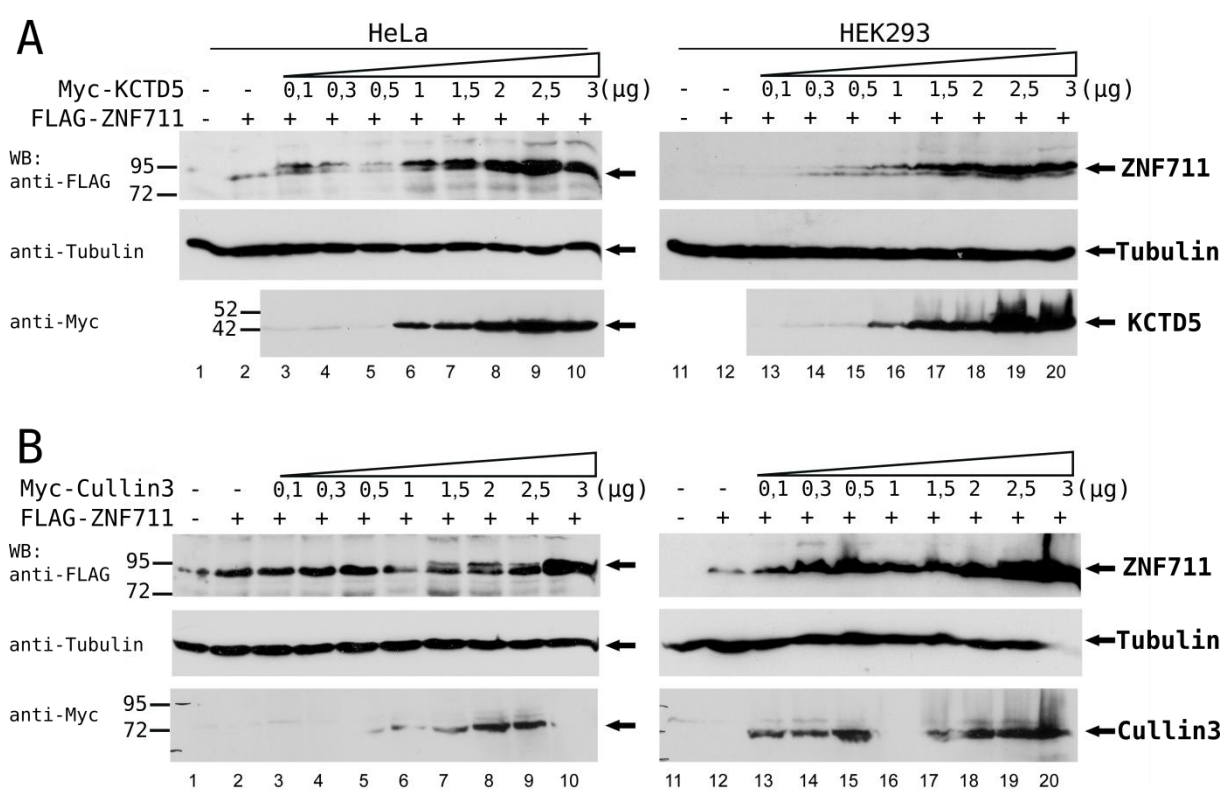


Abb. 4.21: ZNF711-Zunahme nach Koexpression steigender KCTD5 und Cullin3 Proteinmengen. (A) HeLa- und HEK293-Zellen wurden mit 1 μg pCATCH-FLAG-ZNF711 und steigenden DNA-Plasmidkonzentrationen von pMyc-KCTD5 in einem 4 μg Ansatz kotransfiziert. Die Gesamtextrakte wurden im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper auf die Expression von ZNF711 und mit anti-Myc (rabbit) Antikörper auf die Expression von KCTD5 analysiert. (B) HeLa- und HEK293-Zellen wurden mit 1 μg pCATCH-FLAG-ZNF711 und steigenden Plasmid-Mengen von pMyc-Cullin3 in einem 4 μg Ansatz kotransfiziert. Die Gesamtextrakte wurden im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse) und anti-Myc (rabbit) Antikörpern analysiert. (A-B) Die aufgetragene Proteinmenge wurde mit anti-Tubulin Antikörper kontrolliert.

Der bereits vermutete positive Einfluss von KCTD5 und Cullin3 auf die ZNF711-Proteinmenge ließ sich mit Hilfe der durchgeführten Experimente bestätigen. Dabei korrelierte die kotransfizierte Menge an KCTD5 und Cullin3 mit der Erhöhung der ZNF711-Proteinspiegel.

In den Immunfluoreszenz-Untersuchungen zur Analyse einer möglichen Kolokalisation von ZNF711 und KCTD5 wurde nach Kotransfektion der nukleär lokalisierten KCTD5-1/191 Deletionsmutante eine starke Zunahme der ZNF711-Intensität im Nukleus beobachtet, obwohl dieser Effekt im Western Blot nicht detektiert wurde (Abb. 4.19, B und C). Aufgrund des positiven Einflusses der steigenden KCTD5 und Cullin3 Konzentrationen auf ZNF711, wurde daher als Nächstes im Detail analysiert, ob KCTD5-1/191 die Gesamtexpression von YFP-ZNF711 ebenfalls beeinflussen könnte.

Entgegen den Ergebnissen früherer Experimente mit FLAG-getaggttem ZNF711 wurde eine Proteinzunahme des YFP-getaggtten ZNF711 nach Koexpression von KCTD5-1/234 in HeLa-Zellen nicht beobachtet, was möglicherweise durch geringe kotransfizierte KCTD5-Plasmidmenge bedingt war (Abb. 4.22, Spuren 5 und 6). Dagegen hatte die Koexpression der FLAG-KCTD5-1/191-Deletionsmutante, die verstärkt mit ZNF711 interagiert, einen starken positiven Einfluss auf ZNF711 (Abb. 4.22, Spuren 5 und 9). Ein vergleichbarer Effekt wurde auch nach Koexpression des Myc-getaggtten Cullin3 detektiert, der sich nach zusätzlicher Kotransfektion mit FLAG-KCTD5-1/234 oder FLAG-KCTD5-1/191 nur geringfügig verstärkte (Abb. 4.22, Spuren 5, 7, 8 und 10).

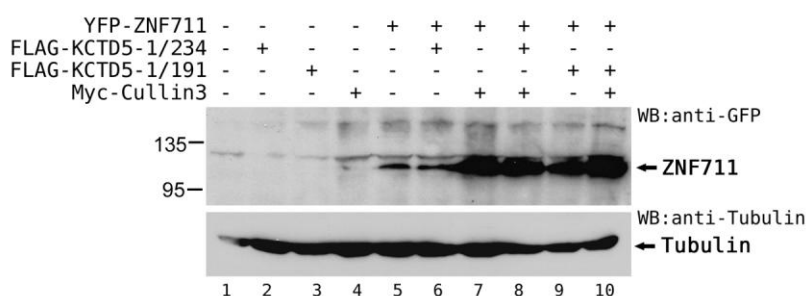


Abb. 4.22: KCTD5-1/191 führt zu einer starken Induktion der ZNF711-Proteinmenge. HeLa-Zellen wurden mit 2 µg pYFP-ZNF711 und wahlweise mit 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5, 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5-1/191 und 1 µg pMyc-Cullin3 in einem 4 µg Gesamtansatz kotransfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden im Western Blot mit anti-GFP Antikörper auf die Expression des YFP-getaggtten ZNF711-Proteins und mit anti-Tubulin Antikörper zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge analysiert.

Die Ergebnisse der zwei in Abb. 4.21 und Abb. 4.22 dargestellten Experimente zeigten eine deutlich erhöhte Proteinmenge des exogenen ZNF711 nach Koexpression von KCTD5-1/191 oder Cullin3. Das Volllänge-KCTD5-1/234 zeigte hingegen erst bei höheren Plasmidkonzentrationen oder nach Koexpression mit Cullin3 einen deutlichen Effekt. Dies war ein erster Hinweis auf eine Funktion des KCTD5-Cullin3-Komplexes bei der Regulation der ZNF711-Proteinkonzentration.

Die beobachtete ZNF711-Proteinzunahme konnte durch eine verstärkte *ZNF711*-Transkription, mRNA-ZNF711-Translation oder eine Stabilisierung des ZNF711-Proteins durch den Cullin3-KCTD5-Komplex hervorgerufen worden sein.

Zunächst wurde der mögliche Einfluss des KCTD5-Cullin3-Komplexes auf die ZNF711-Stabilisierung untersucht. In einem Vorversuch wurden zunächst grundlegende Parameter für die Untersuchung der ZNF711-Proteinlebensdauer ermittelt. Dafür wurden die mit Myc- oder FLAG-getaggten ZNF711-Proteinen transfizierten HeLa- bzw. HEK293-Zellen bis zu 12 h mit Cycloheximid (CHX) zur Hemmung der Proteintranslation inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der ZNF711-Proteinmenge im Western Blot (Abb. 4.23)

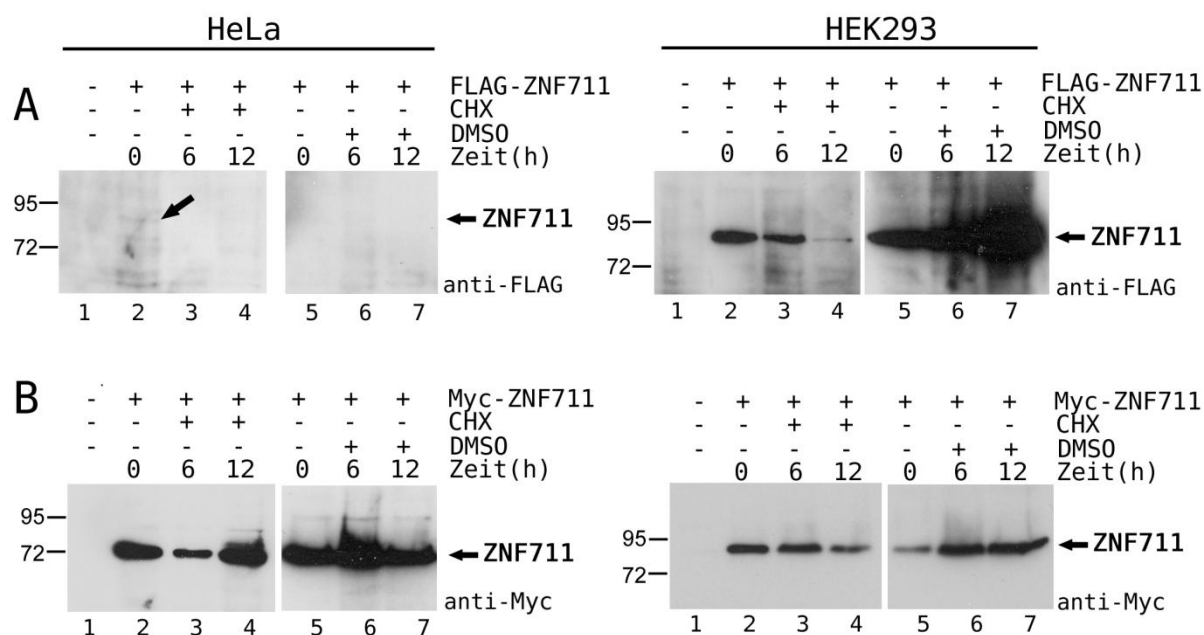


Abb. 4.23: Die ZNF711-Stabilität ist abhängig vom verwendeten Protein-Tag für die Detektion. (A) HeLa- und HEK293-Zellen wurden mit 2 µg pCATCH-FLAG-ZNF711 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde als Zeitpunkt 0 definiert. Das Zellmedium wurde zum Zeitpunkt 0 mit Cycloheximid (CHX) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml versetzt und die Gesamtextrakte wurden 6 und 12 h später aufgearbeitet. DMSO diente als Kontrolle, da die Cycloheximid-Stammlösung in DMSO angesetzt wurde. Die Analyse der FLAG-ZNF711-Proteinmenge erfolgte im Western Blot mit anti-FLAG (rabbit) Primär- und entsprechendem Sekundärantikörper. Expositionszeit: 1 Minute. (B) HeLa- und HEK293-Zellen wurden mit 2 µg pMyc-ZNF711 transfiziert und zum Zeitpunkt 0 (24 h nach Transfektion) mit Cycloheximid (CHX) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml oder mit DMSO als Kontrolle versetzt. Die Gesamtextrakte wurden 6 und 12 h nach Inkubation mit CHX mit anti-Myc (rabbit) Antikörper im Western Blot analysiert. Membran-Expositionszeit: 1 Minute für HeLa-Zellen und 5 Sekunden für HEK293-Zellen.

In HeLa-Zellen konnte für das FLAG-getaggte ZNF711 nur eine schwache Bande nachgewiesen werden, wobei die FLAG-ZNF711-Proteinmenge auch bei den vorangegangenen Versuchen nach der Transfektion von 1 µg Plasmid-DNA unter der Detektionsgrenze lag (vgl. FLAG-ZNF711 in Abb. 4.23, A und Abb. 4.21). Der Translationsstop nach Zugabe des Cycloheximids führte zu einer Abnahme des FLAG-ZNF711-Proteinspiegels in HeLa- und in HEK293-Zellen: FLAG-ZNF711 war in HeLa-Zellen 6 h später nicht mehr detektierbar (Abb. 4.23, A, HeLa: Spuren 2-4) und in HEK293-Zellen konnte eine kontinuierliche Abnahme der ZNF711-Proteinmenge beobachtet werden, sodass 12 h nach Translationsstop die ZNF711-Proteinmenge am Detektionslimit lag (Abb. 4.23, A, HEK293: Spuren 2-4). Als Kontrolle wurde DMSO

verwendet, da die CHX-Stammlösung in DMSO angesetzt worden war. In diesen Kontrollansätzen fand keine Abnahme des FLAG-ZNF711 statt, was auf einen spezifischen zellulären ZNF711-Abbau innerhalb von 12 h hinweist (Abb. 4.23, A, HeLa und HEL293, jeweils 5-7). Eine verstärkte Zunahme in der FLAG-ZNF711-Intensität 12 h nach Inkubation mit DMSO ist möglicherweise durch das Erreichen eines Expressionsmaximums 36 h nach Transfektion zu erklären.

Im Vergleich zum FLAG-getaggtten ZNF711-Protein blieb die Bandenintensität des Myc-getaggtten Proteins in HeLa-Zellen unverändert und nur in HEK293-Zellen war eine geringfügige Abnahme festzustellen (Abb. 4.23, B, HeLa und HEK293: Spuren 2-4). In beiden Zelllinien war die für das Myc-getaggte ZNF711 erhaltene Basalintensität der reaktiven Banden stärker als die für das FLAG-getaggte Protein (Abb. 4.23, vgl. A und B). Dies könnte sowohl durch eine erhöhte Reaktivität der Antikörper im Falle des Myc-Tags als auch durch eine erhöhte Stabilität des Myc-getaggtten Proteins (s.u.) bedingt sein.

Im direkten Vergleich zeichnet sich das Protein mit dem Myc-Tag also durch eine wesentlich höhere Stabilität aus als das mit dem FLAG-Tag. Bei dem hier verwendeten Myc-Tag handelte es sich um sechs hintereinander geschaltete Myc-Epitope, zur Verbesserung der Detektion. Dagegen war das FLAG-Epitop nur einmal vorhanden. Möglicherweise stört der Myc-Tag mit seinen wiederholten Sequenzmotiven die physiologische Regulation der ZNF711-Proteinstabilität viel stärker als der sehr kurze FLAG-Tag. Deswegen wurden die weiteren Untersuchungen zur ZNF711-Proteinstabilität in Gegenwart von exogenem KCTD5 und Cullin3 ausschließlich mit dem FLAG-getaggtten Protein durchgeführt. Wie in den initialen Versuchen (Abb. 4.23), wurde ZNF711 bei alleiniger Transfektion nach Inkubation mit Cycloheximid innerhalb von 12 h fast komplett abgebaut (Abb. 4.24, A, vgl. Spuren 2-4 und die DMSO-Kontrolle, Spuren 9-11). Die Koexpression der Myc-getaggtten KCTD5 und Cullin3 Proteine steigerte den ZNF711-Proteinspiegel und verlangsamte den ZNF711-Abbau, ohne diesen komplett zu stoppen (Abb. 4.24, A, vgl. Spuren 5-7 und 12-14).

Beim nachfolgenden Versuch wurden KCTD5 und Cullin3 nicht nur in Kombination, sondern auch jeweils einzeln überexprimiert und die Effekte auf den Abbau von ZNF711 untersucht. Die ZNF711-Bandenintensität nahm in Abwesenheit der beiden Effektorproteine 6 h nach Translationsstop ab und lag 12 h später unter der Nachweisgrenze (Abb. 4.24, B, Spuren 2-4). Sowohl die individuelle Überexpression von Myc-KCTD5 oder Myc-Cullin3 als auch deren Kombination hatten einen positiven Effekt auf den ZNF711-Proteinspiegel zum Zeitpunkt 0 und verlangsamten den ZNF711-Abbau in Ansätzen mit Cycloheximid (Abb. 4.24, B, Spuren 2-4). In keinem von diesen Ansätzen wurde der ZNF711-Abbau jedoch komplett gestoppt. Zwar unterlag der ZNF711-Proteinspiegel in den mit DMSO behandelten Proben geringen Schwankungen, aber einen

unspezifischen DMSO-Einfluss auf ZNF711 ließ sich nicht nachweisen (Abb. 4.24, B, Spuren 5-7).

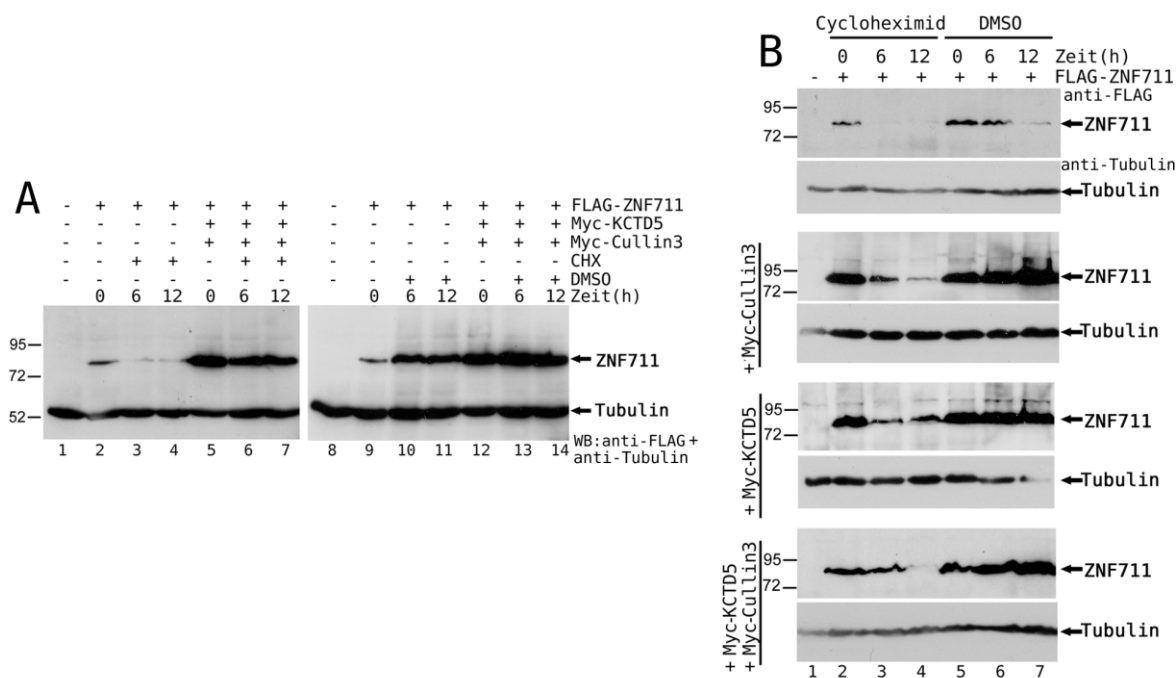


Abb. 4.24: Einfluss von KCTD5 und Cullin3 auf die ZNF711-Proteinstabilität. (A) HEK293-Zellen einer 6 cm-Zellkulturschale wurden mit 2 µg pCATCH-FLAG-ZNF711 oder mit 2 µg pCATCH-FLAG-ZNF711, 2 µg pMyc-KCTD5 und 2 µg pMyc-Cullin3 in 6 µg Ansätzen kotransfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion für den Zeitpunkt 0 in 2×Proteinprobenpuffer lysiert. Die verbliebenen Ansätze wurden für 6 oder 12 h mit Cycloheximid (CHX) mit einer Endkonzentration von 10 µM/ml oder DMSO als Kontrolle inkubiert. Die Gesamtextrakte wurden im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse) und anti-Tubulin Antikörpern analysiert. (B) HEK293-Zellen einer 6 cm-Zellkulturschale wurden mit 2 µg pCATCH-FLAG-ZNF711, 2 µg pMyc-KCTD5 und 2 µg pMyc-Cullin3 in verschiedenen Kombinationen in 6 µg Ansätzen kotransfiziert. Ein Drittel der Ansätze wurde 24 h nach Transfektion zum Zeitpunkt 0 aufgearbeitet und der Rest für 6 oder 12 h mit Cycloheximid oder DMSO inkubiert. Die Gesamtextrakte wurden im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse) und anti-Tubulin Antikörpern analysiert. Die Spur 1 wurde nur mit 6 µg Leervektor als Negativkontrolle transfiziert.

Die Kotransfektion von KCTD5 und/oder Cullin3 führt zu einer verlängerten ZNF711-Halbwertszeit, die im Gegensatz zur regulären ZNF711-Halbwertszeit deutlich über 6 h beträgt. Durch diese Stabilisierung kann auch der deutliche Anstieg in den ZNF711-Proteinmengen nach Überexpression von KCTD5, Cullin3 oder KCTD5-1/191 erklärt werden. Für diese Effekte sind jedoch erhebliche Schwellenwerte von exogenem KCTD5 und Cullin3 erforderlich.

4.4.4 Die Lokalisation und Expression von ZNF711 während der Zellteilung

Sowohl KCTD5 als auch ZNF711 wurden in einer großen Proteom-Studie als essentiell für die Zellteilung identifiziert: *short interfering* (si)-RNA's gegen KCTD5 und ZNF711 führten zu einem Zellteilungsdefekt [103]. KCTD5-1/234 und ZNF711 sind jedoch überwiegend in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert und es konnte trotz der in der Immunpräzipitation nachgewiesenen spezifischen Interaktion in Säugerzellen keine

Kolokalisation der beiden Wildtyp-Proteine in der Immunfluoreszenz detektiert werden (Abb. 4.19, C). Daraus ergab sich die Hypothese, dass KCTD5 und ZNF711 möglicherweise während der Zellteilung in enge räumliche Nähe kommen könnten. Das sonst überwiegend zytoplasmatisch lokalisierte KCTD5-Protein scheint während der Zytokinese stark im perinukleären Bereich und zumindest partiell im Nukleus zu akkumulieren (Abb. 4.4, Abb. 4.12, B; und Immunfluoreszenzdaten der BAC and Cell Line Database), wo es möglicherweise mit ZNF711 zusammentrifft. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Lokalisation der beiden Proteine in synchronisierten HeLa-Zellen untersucht.

KCTD5 und ZNF711 zeigten eine gemeinsame Lokalisation im Nukleus 7 bis 9 h nach Aufhebung des Blocks, unmittelbar vor der Zytokinese (Abb. 4.25, A, 8 und 12 h). Ansonsten war KCTD5 in Übereinstimmung mit den bereits erhobenen Daten ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, während eine zytoplasmatische ZNF711-Lokalisation zu keinem Zeitpunkt der Zellteilung beobachtet wurde. Nach einer Inkubation der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 für 4 h akkumulierten beide Proteine im Zellkern (Abb. 4.25, B). Möglicherweise findet also eine fortlaufende Translokation von KCTD5 in kleinen Mengen in den Zellkern statt, wo das Protein jedoch schnell abgebaut wird.

Aufgrund dessen, dass es nach Cullin3-Kotransfektion zu einer verstärkten zellulären Komplexbildung zwischen KCTD5 und ZNF711 kam (Abb. 4.20), wurde als Nächstes überprüft, ob Cullin3 möglicherweise die Lokalisation der beiden Proteine während des Zellzyklus beeinflusst.

Dargestellt werden ausgewählte Zeitpunkte während des Zellzyklus (Abb. 4.26, A). Die KCTD5-Lokalisation wurde durch die Cullin3-Koexpression nicht beeinflusst. Wie bereits gezeigt, wurde KCTD5 nur in der G2-Phase vor der Zellteilung im perinukleären und nukleären Raum detektiert (Abb. 4.25, A und Abb. 4.26, A: 8 h). Nach Cullin3-Kotransfektion wurde zytoplasmatisches ZNF711 in Zellen unmittelbar vor und während der S-Phase und perinukleäres ZNF711 vor der Zytokinese detektiert (Abb. 4.26, A: 0 h, 3 h und 8 h). Die beobachtete ZNF711-Translokation kann auf die verstärkte Bildung des KCTD5-Cullin3-ZNF711-Komplexes im Zytoplasma oder auf die ZNF711-Proteinzunahme infolge der Cullin3-Überexpression zurückgeführt werden.

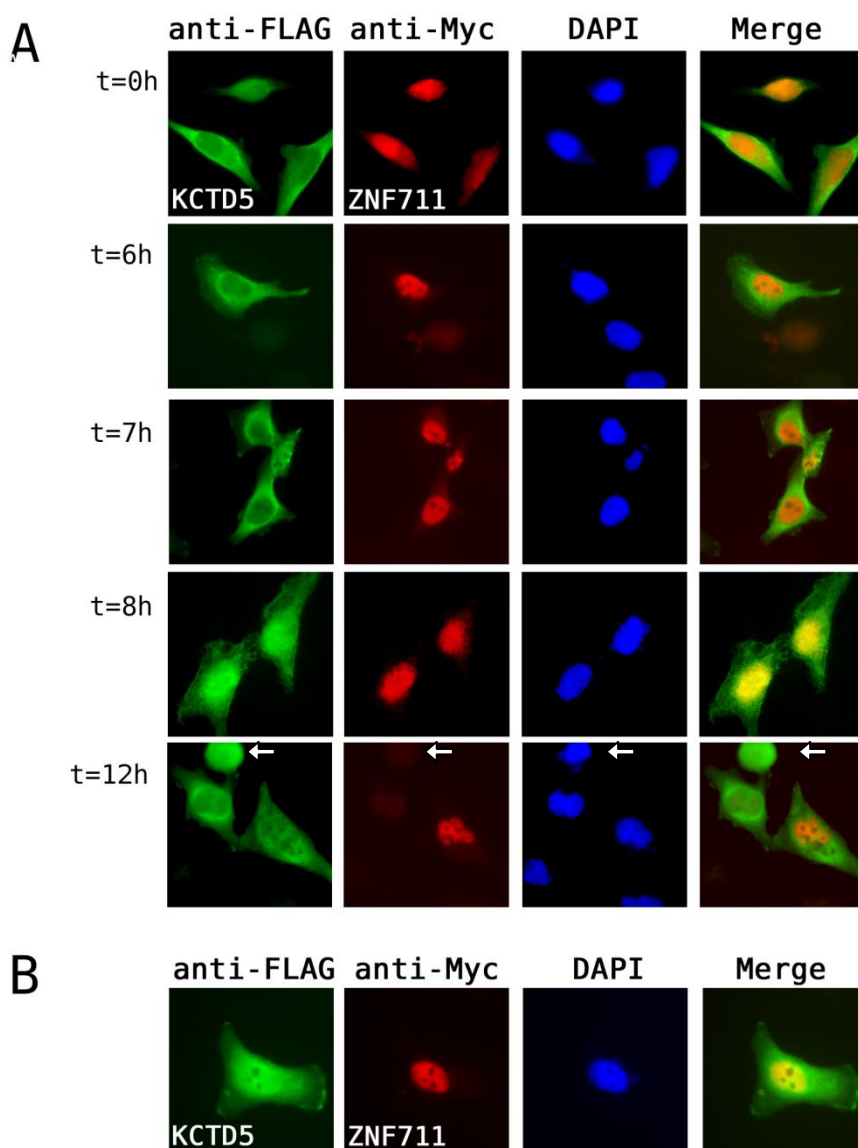


Abb. 4.25: Subzelluläre Lokalisation von KCTD5 und ZNF711 im Verlauf der Zellteilung. (A) HeLa-Zellen wurden mit 2 µg pMyc-ZNF711 und 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 in einem 4 µg Gesamtansatz kotransfiziert. Die Synchronisation erfolgte durch einen Doppelthymidinblock. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach der Aufhebung des Blocks mit anti-FLAG-M2 (mouse) Primär- und FITC-markiertem Sekundärantikörper für KCTD5 sowie mit anti-Myc (rabbit) Primär- und TRITC-markiertem Sekundärantikörper für ZNF711 inkubiert. Die Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus aufgenommen. Weiße Pfeile markieren die ausgewählte Zelle, die sich in der Zytokinese befindet. (B) HeLa-Zellen wurden mit 2 µg pMyc-ZNF711 und 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 in einem 4 µg Ansatz kotransfiziert. Der synchronisierte Ansatz wurde unmittelbar nach der Aufhebung des Doppelthymidinblocks für 4 h mit MG132 inkubiert. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit anti-FLAG-M2 (mouse) Primär- und FITC-markiertem Sekundärantikörper für KCTD5 sowie mit anti-Myc (rabbit) Primär- und TRITC-markiertem Sekundärantikörper für ZNF711 inkubiert. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus.

Wie bereits gezeigt, interagiert ZNF711 mit der KCTD5-Deletionsmutante KCTD5-1/191 stärker als mit dem Volllänge-Protein, wobei die KCTD5-1/191 Kotransfektion zu einer ähnlich starken ZNF711-Proteinzunahme wie Cullin3-Überexpression führte (Abb. 4.19 und Abb. 4.22). Im folgenden Experiment wurde daher untersucht, ob ZNF711 nach Kotransfektion mit Cullin3 und KCTD5-1/191 ebenfalls zytoplasmatisch lokalisiert vorlag. Die Kolokalisation zwischen der KCTD5-1/191 Deletionsmutante und ZNF711

konnte während der untersuchten 12 h nach Eintritt in die S-Phase durchgehend beobachtet werden (Abb. 4.26, B). Dabei wurden beide Proteine verstärkt im Zellkern und nur teilweise im Zytoplasma nachgewiesen. Die zytoplasmatische Lokalisation von KCTD5-1/191 war aufgrund der Tatsache, dass diese Deletionsmutante im SDS-PAA-Proteingel zu einem Teil als Monomer vorliegt, zu erwarten.

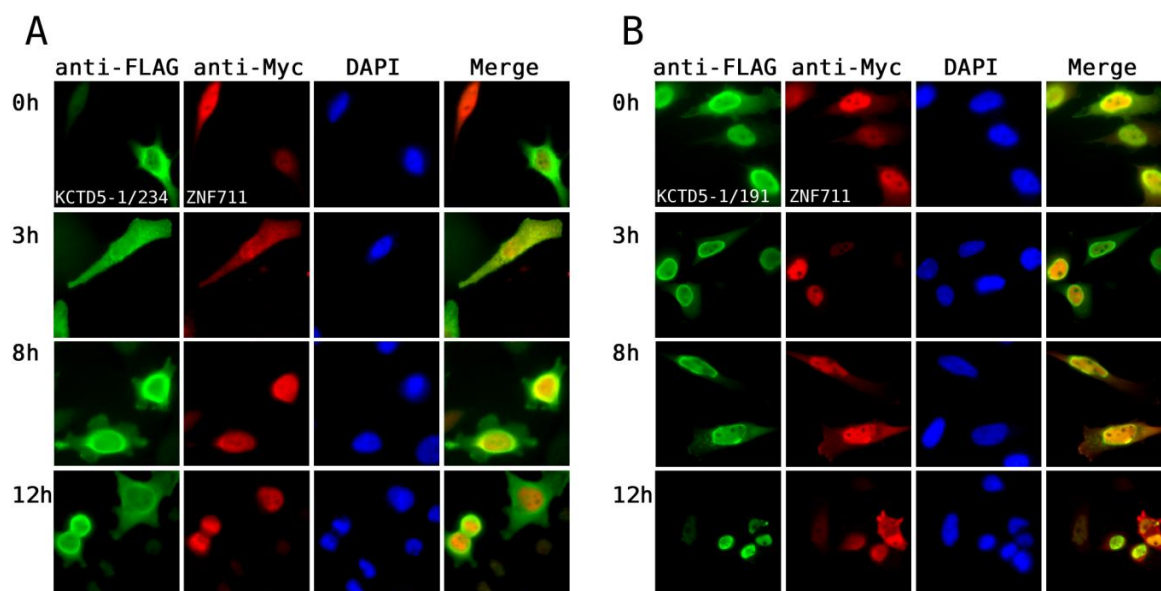


Abb. 4.26: Partielle zytoplasmatische ZNF711-Lokalisation nach KCTD5- und Cullin3-Überexpression. (A) HeLa-Zellen wurden mit 2 µg pMyc-ZNF711, 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5-1/234 und 2 µg pCATCH-His-Cullin3 in einem 6 µg Ansatz transfiziert und mittels Doppelthymidinblock synchronisiert. Die Ansätze wurden zu den angegebenen Zeiten nach Aufhebung des Blocks für die IF aufgearbeitet und mit anti-FLAG-M2 (mouse) Primär- und FITC-markiertem Sekundärantikörper sowie anti-Myc (rabbit) Primär- und TRITC-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Die Proteinlokalisierung wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus untersucht. (B) HeLa-Zellen wurden mit 2 µg pMyc-ZNF711, 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5-1/191 und 2 µg pCATCH-His-Cullin3 in einem 6 µg Ansatz transfiziert. Die Proben wurden mittels Doppelthymidinblock synchronisiert, zu den angegebenen Zeiten nach Aufhebung des Blocks gesammelt und mit anti-FLAG-M2 (mouse) Primär- und FITC-markiertem Antikörper sowie anti-Myc (rabbit) Primär- und TRITC-markiertem Sekundärantikörper inkubiert. Die Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 plus aufgenommen.

Zusammenfassend konnte in der Immunfluoreszenz teilweise eine perinukleäre und zytoplasmatische ZNF711-Lokalisation in Anwesenheit von Cullin3 und dem Wildtyp-KCTD5-Protein beobachtet werden. Bei Kotransfektion mit KCTD5-1/191 statt des Volllänge-Proteins zeigte der Großteil der Zellen eine gemeinsame Lokalisation von KCTD5 und ZNF711 im Zellkern. Während die zusätzliche Cullin3-Überexpression nur zu geringfügigen Schwankungen in der ZNF711-Intensität führte (Abb. 4.26, A und B), ging die nukleäre ZNF711-Fluoreszenzintensität nach der Kotransfektion mit KCTD5-1/234 zurück (Abb. 4.19, C). Aus diesem Grund wurde als Nächstes überprüft, ob KCTD5 und Cullin3 die ZNF711-Gesamtexpression im Zeitraum nach Eintritt in die S-Phase bis zur Zytokinese beeinflussten.

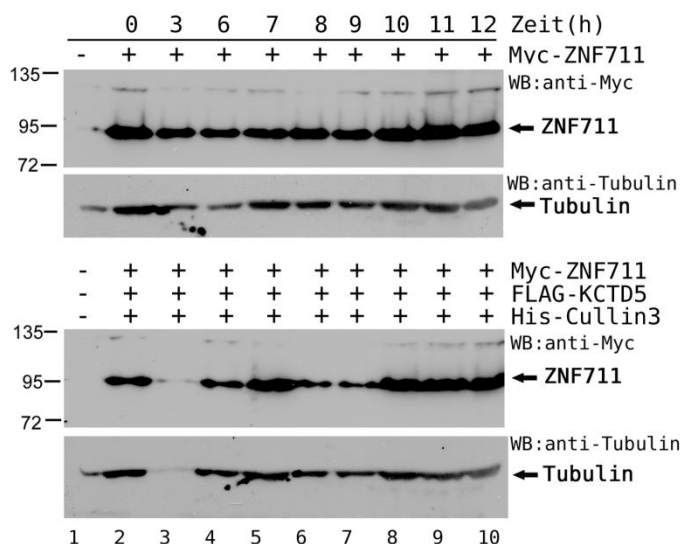


Abb. 4.27: ZNF711-Expression während der Zellteilung. HeLa-Zellen wurden entweder mit 2 µg pMyc-ZNF711 oder mit 2 µg pMyc-ZNF711, 2 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 und 2 µg pCATCH-His-Cullin3 kotransfiziert. Nach der Synchronisation durch Doppelthymidinblock wurden die Zellen durch die Zugabe von frischem Medium in die S-Phase freigesetzt und anschließend zu bestimmten Zeitpunkten gesammelt. Die Myc-ZNF711-Proteinmenge in den Gesamtzellextrakten wurde im Western Blot mit anti-Myc (rabbit) Antikörper detektiert; anti-Tubulin diente zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge.

Während der ersten 12 h nach Freilassung der Zellen wurden keine Schwankungen in der ZNF711-Proteinmenge festgestellt, die nicht mit gleichzeitiger Abnahme des Tubulins einhergingen (Abb. 4.27).

Insgesamt unterlag die ZNF711-Proteinmenge während der Zellteilung nur geringen Schwankungen und ein Einfluss von KCTD5 oder Cullin3 konnte nicht nachgewiesen werden. ZNF711 war während der S- und G2-Phasen und am Ende der G1-Phase durchgehend im Zellkern lokalisiert und eine Überexpression von KCTD5 führte zu keiner Veränderung in der ZNF711-Lokalisation. Nach Cullin3-Kotransfektion konnte ZNF711 im Laufe der DNA-Synthese im Zytoplasma nachgewiesen werden, wobei die zytoplasmatische ZNF711-Lokalisation möglicherweise erst durch die Zunahme der ZNF711-Proteinkonzentration nach Cullin3-Überexpression detektierbar ist. Eine partielle ZNF711-Lokalisation im Zytoplasma wurde nach KCTD5-1/191 Kotransfektion beobachtet, was möglicherweise auf die starke Interaktion zwischen den beiden Proteinen und eine damit verbundene KCTD5-induzierte Translokation des ZNF711-Proteins zurückzuführen ist.

4.4.5 ZNF711 als transkriptioneller Regulator

Für ZNF711 wurde eine Rolle bei der Regulation der zellulären Genexpression beschrieben [96]. Nach Applikation von shRNA gegen ZNF711 kam es zu einer bis zu 50%-igen Hemmung der Expression von ZNF711-Zielgenen, obwohl dieser Hemmeffekt nicht alle gezeigten Gene gleichermaßen beeinflusste [96]. Für einige Proteine der KCTD-

Familie wird neben der Funktion der Substratubiquitinierung für den proteasomalen Abbau auch eine Beteiligung an der Regulation der Genexpression beschrieben [205, 206].

Um zu untersuchen, ob KCTD5 an der Regulation der ZNF711-gesteuerten Genexpression beteiligt ist, wurden Luciferase-Vektoren mit für ZNF711 spezifischen Bindestellen generiert. Vor einem Minimal-CMV-Promotor wurden verkürzte Varianten der von Kleine-Kohlbrecher und Kollegen identifizierten ZNF711-Bindestellen aus den *JARID1C*, *PCBP2*- und *C2orf34*-Genen [96] über eine PCR-Amplifikation der entsprechenden Sequenzen aus genomischer DNA aus HEK293-Zellen kloniert.

Für die Untersuchung des Einflusses einer ZNF711- und KCTD5-Überexpression auf die generierten Reportergene mit verkürzten ZNF711-Bindestellen wurden vier unabhängige Versuche in HeLa- und HEK293-Zellen durchgeführt (Abb. 4.28).

Ein aktivierender Effekt von ZNF711 wurde in HEK293-Zellen auf die Reportergene mit den PCBP2- und C2orf34-Teilsequenzen gemessen (Abb. 4.28, A). Bei den PCBP2-Ansätzen erfolgte eine 4- bis 10-fache Zunahme der Luciferaseaktivität, während bei den C2orf34-Ansätzen eine 5- bis 30-fache Reporterogenaktivierung gemessen wurde (Abb. 4.28, A). Die Koexpression von KCTD5 führte zu einer weitgehenden Aufhebung der ZNF711-vermittelten Aktivierung der Reporterkonstrukte. Ein Einfluss von ZNF711 oder ZNF711-KCTD5 auf die JARID-Luciferase-Genexpression wurde bei den durchgeführten Versuchen nicht gemessen (Abb. 4.28, A).

In HeLa-Zellen resultierte die ZNF711-Koexpression bei JARID und C2orf34 in einer 50%-igen Genrepression, die durch KCTD5 noch verstärkt wurde (Abb. 4.28, B). Dieser inhibitorische Effekt des KCTD5-Proteins war beim PCBP2-Konstrukt weniger stark ausgeprägt, wobei die ZNF711-Überexpression in diesem Fall zu einer 1,4-fachen Luciferase-Aktivierung führte.

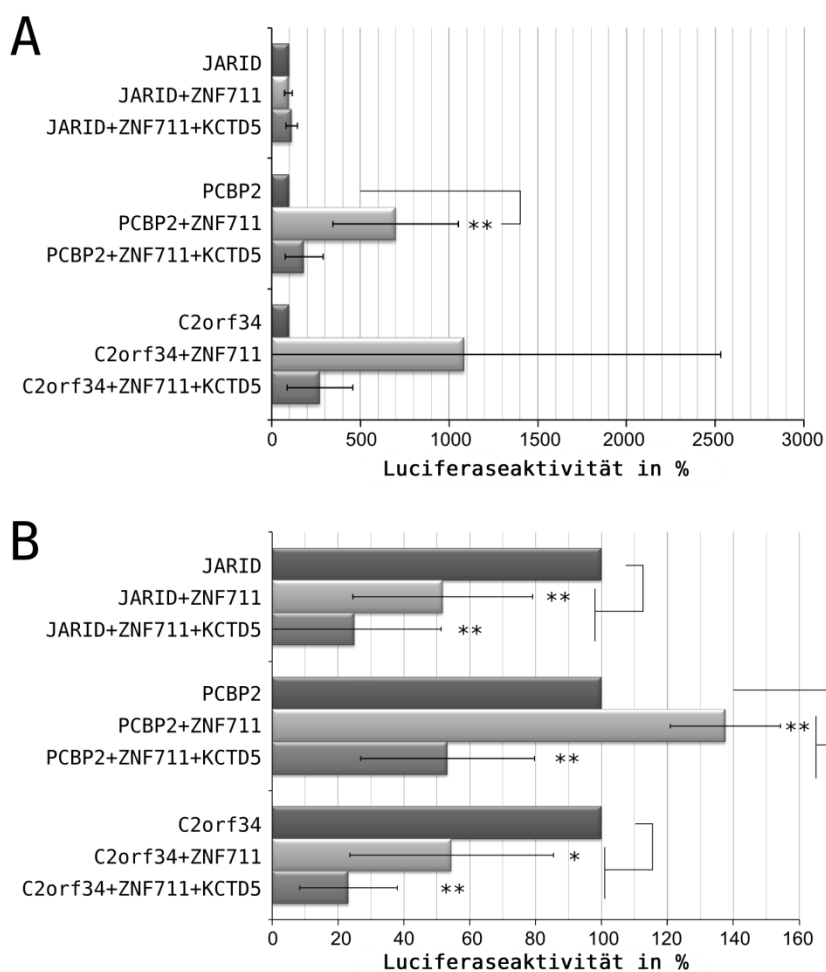


Abb. 4.28: Einfluss von ZNF711 und KCTD5 auf die Expression ausgewählter zellulärer Promotoren im Reporteragen-Assay in HeLa- und HEK293-Zellen. (A) HEK293-Zellen wurden mit 1 µg Luciferase-Konstrukten (JARID, PCBP2 oder C2orf34 Promotor bzw. Gensequenz), 1 µg pMyc-ZNF711 und 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 in den gezeigten Kombinationen kotransfiziert. Gezeigt sind Mittelwerte aus 5 Messungen von 2 unabhängigen Versuchen für JARID und 7 Messungen aus 4 unabhängigen Versuchen für PCBP2 und C2orf34. (B) HeLa-Zellen wurden mit 1 µg Luciferase-Konstrukten (JARID, PCBP2 oder C2orf34 Promotor bzw. Gensequenz), 1 µg pMyc-ZNF711 und 1 µg pCATCH-FLAG-KCTD5 in den gezeigten Kombinationen kotransfiziert. Gezeigt sind Mittelwerte aus 6 Messungen von 4 unabhängigen Versuchen. (A-B) Die Zellen wurden 42 h nach Transfektion in Triton-Lyse-Puffer lysiert und die Luciferaseaktivität wurde mittels Lumimeter gemessen. Die Luciferaseaktivitäten der einzeln transfizierten Luciferasevektoren mit den ZNF711-Bindestellen wurden auf 100% gesetzt. Alle Reporteragenaktivitäten sind bezogen auf diese Kontrollen in Abwesenheit von exogenem ZNF711 und KCTD5 dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten abhängigen t-Test ermittelt. $0,01 < P^* < 0,05$ und $P^{**} < 0,01$.

Ein statistisch signifikanter Einfluss von ZNF711 oder ZNF711 und KCTD5 auf die Reporteragenexpression konnte bei allen Ansätzen in HeLa-Zellen detektiert werden, während es in HEK293-Zellen nur bei dem PCBP2-Konstrukt zu einer statistisch signifikanten ZNF711-vermittelten Genaktivierung kam (statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten abhängigen t-Test ausgerechnet). Generell zeigte sich jedoch nach Koexpression von KCTD5 eine Repression der in Gegenwart von ZNF711 gemessenen Promotoraktivitäten. ZNF711 alleine zeigte in HeLa einen hemmenden Effekt auf die Reporteragenexpression der *JARID*- und *C2orf34*-Luciferase, während in HEK293-Zellen eine Aktivierung der *JARID*- und *C2orf34*-Luciferase-Expression beobachtet wurde. Nur

bei den Ansätzen mit dem *PCBP2*-Luciferase-Konstrukt erfolgte in beiden Zelltypen eine Genaktivierung durch die ZNF711-Überexpression, die in HEK293-Zellen jedoch viel stärker ausfiel (Abb. 4.28). Aufgrund des einheitlichen positiven Effekts von ZNF711 auf die *PCBP2*-Luciferase-Genexpression wurde dieses Konstrukt für eine detaillierte Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der ZNF711- und KCTD5-Wirkungen ausgewählt (Abb. 4.29).

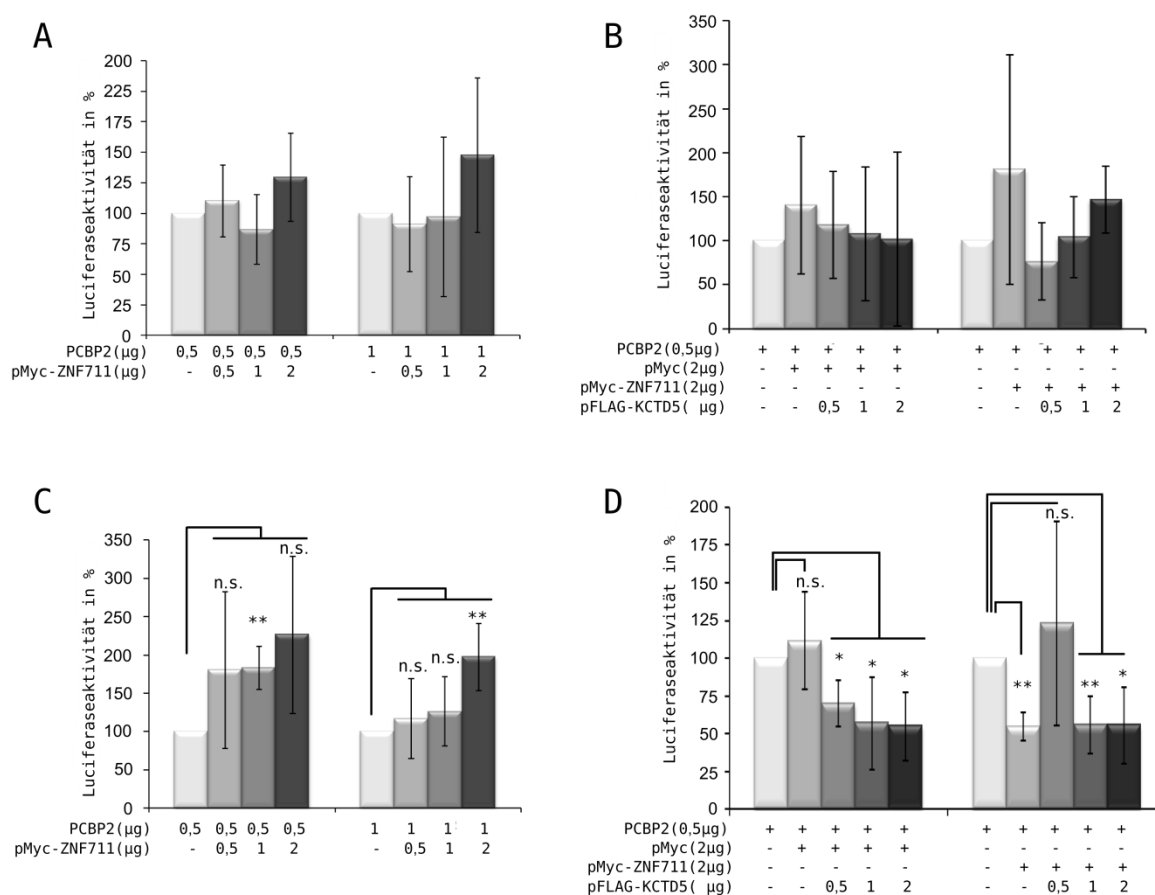


Abb. 4.29 ZNF711- und KCTD5-konzentrationsabhängige Reporterexpression. (A-B) HEK293-Zellen wurden mit dem *PCBP2*-Luciferase-Konstrukt, *pMyc-ZNF711* und *pCATCH-FLAG-KCTD5* in den angegebenen Plasmidkonzentrationen kotransfiziert, die sich auf einen 4,5 µg Transfektionsansatz für die 6 cm-Schale bezogen. Grafisch dargestellt sind die Mittelwerte (A) der 8 Messungen aus 3 unabhängigen Versuchen und (B) der 4 Messungen aus 2 unabhängigen Versuchen. (C-D) HeLa-Zellen wurden mit dem *PCBP2*-Luciferase-Konstrukt, *pMyc-ZNF711* und *pCATCH-FLAG-KCTD5* in den angegebenen Plasmidkonzentrationen kotransfiziert, die sich auf einen 4,5 µg Transfektionsansatz für die 6 cm-Schale bezogen. (C) Gezeigt sind die Mittelwerte aus 5 Messungen von 2 unabhängigen Versuchen für 0,5 µg *PCBP2* und 8 Messungen aus 3 unabhängigen Versuchen für 1 µg *PCBP2*-Luciferase. (D) Gezeigt sind die Mittelwerte der 5 Messungen aus 2 unabhängigen Versuchen. (A-D) Als 100% wurde die Luciferaseaktivität des *PCBP2*-Luciferase-Vektors gesetzt. Alle Reporterogenaktivitäten sind bezogen auf die Kontrolle dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten abhängigen t-Test ermittelt. $0,01 < P^* < 0,05$ und $P^{**} < 0,01$; n.s.-nicht signifikant.

In HEK293-Zellen wurde die stärkste Luciferase-Aktivität bei der höchsten eingesetzten Menge des Myc-getaggten ZNF711-Expressionskonstruktes gemessen (Abb. 4.29, A), während bei der niedrigen Menge von 1 µg *pMyc-ZNF711* im Gegensatz zu den früheren Versuchen eine Expressionshemmung des Reportergens beobachtet wurde, unabhängig

von der eingesetzten Menge an PCBP2-Luciferase-Vektor (Abb. 4.28, A und Abb. 4.29, A). Verglichen mit der Transfektion von 0,5 µg des PCBP2-Luciferase-Konstruktes kam es bei den Ansätzen mit 1 µg PCBP2-Luciferase zu größeren Schwankungen in der Messung. Diese Schwankungen könnten durch die Bindung weiterer zellulärer Faktoren außer ZNF711 an die Promotorsequenzen aufgrund deren höherer zellulärer Konzentration bedingt sein (Abb. 4.29, A und B). Für weitere Versuche wurden deswegen 0,5 µg PCBP2-Luciferase pro Ansatz transfiziert.

Die ZNF711-vermittelte Luciferase-Aktivierung konnte bei weiteren Versuchen nicht bestätigt werden: Die ZNF711-Überexpression führte bei der Hälfte der Ansätze zu einer Expressionshemmung des Reportergens, während die zweite Hälfte eine schwache Aktivierung verzeichnete (Abb. 4.29, B). Dieser Effekt ließ sich auch nach Transfektion des leeren pMyc-Vektors beobachten, sodass eine ZNF711-vermittelte Genaktivierung oder Repression nicht beobachtet wurde. Durch das mit ZNF711 zusätzlich kotransfizierte KCTD5 kam es in HEK293-Zellen zu einer Expressionshemmung des Reportergens, die allerdings mit steigender KCTD5-Konzentration nachließ. Ob dieser Effekt möglicherweise auf die Wechselwirkung zwischen KCTD5 und ZNF711 zurückzuführen ist, bedarf weiterer Untersuchungen: Die KCTD5-Kontrollansätze ohne ZNF711 zeigten zwar keine klare konzentrationsabhängige Tendenz wie eine ansteigende Aktivierung, könnten aber durch das endogene ZNF711 die Genaktivität beeinflussen (Abb. 4.29, B).

Die stärkste Luciferase-Aktivierung wurde in HeLa-Zellen ebenfalls nach der Kotransfektion von 2 µg ZNF711 gemessen (Abb. 4.29, C). Ein tendenziell positiver ZNF711-Einfluss auf die Genexpression war in HeLa-Zellen gut zu erkennen, außerdem war die ZNF711-vermittelte Genaktivierung teilweise signifikant. Widersprüchlich ist jedoch die statistisch signifikante Reporter-genrepression nach Kotransfektion von 2 µg ZNF711 in den nachfolgenden Versuchen (Abb. 4.29, C und D: 2 µg ZNF711 ohne KCTD5).

Ähnlich wie in HEK293 konnte der leere pMyc-Vektor die Reporter-genexpression in HeLa-Zellen positiv beeinflussen, während die KCTD5-Überexpression einen viel stärkeren, statistisch signifikanten repressorischen Effekt auf die PCBP2-Luciferase-Expression ausübte, mit oder ohne ZNF711-Kotransfektion (Abb. 4.29, D). KCTD5 konnte die Genaktivität effektiv reprimieren; eine Beteiligung von ZNF711 an dieser KCTD5-vermittelten Hemmung der Genexpression konnte jedoch aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Eine Beteiligung des endogenen ZNF711 in den Ansätzen ohne Koexpression von exogenem ZNF711 kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

4.5 Charakterisierung des KCTD5 Interaktionspartners FAM193B

4.5.1 Subzelluläre Lokalisation von FAM193B und Interaktion mit KCTD5

Das Protein FAM193B, auch als LOC54540 oder IRIZIO bezeichnet, war als weiterer Interaktionspartner von KCTD5 im vorangegangenen Yeast-two-hybrid-Screen identifiziert worden [11]. Für die Untersuchungen in Säugerzellen mussten zunächst entsprechende Expressionskonstrukte generiert werden. Mit spezifischen Primern und mRNA aus HEK293-Zellen als Template wurde FAM193B zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert. Für die funktionellen Untersuchungen wurden FAM193B-Fusionsproteine mit verschiedenen Tags generiert: FLAG-FAM193B, Myc-FAM193B und His-FAM193B.

Picchione und Kollegen hatten für FAM193B eine zytoplasmatische Lokalisation gezeigt, wobei nach Deletion des Exons 9 oder Zugabe von Leptomycin B das Protein im Zellkern beobachtet wurde [82]. Daher wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation von FAM193B in HeLa-Zellen überprüft.

FAM193B wurde in Übereinstimmung mit den vorhandenen Literaturdaten im Zytoplasma detektiert und bei den sich teilenden Zellen wurde teilweise eine perinukleäre Lokalisation beobachtet (Abb. 4.30, A und B). Aus diesem Grund wurde im nächsten Versuch überprüft, ob FAM193B mit Bestandteilen des Zytoskeletts wie Tubulin kolokalisiert. Tatsächlich wurde eine starke perinukleäre Kolokalisation von FAM193B mit Tubulin bei der Zelladhäsion direkt im Anschluss an die Zellteilung beobachtet (Abb. 4.30, B, obere Reihe). In anderen Zellzyklusstadien konnte eine Kolokalisation mit Tubulin nur bedingt nachgewiesen werden (Abb. 4.30, B, untere Reihe).

Der FAM193B-Interaktionspartner KCTD5 zeigte während des Zellzyklus ebenfalls eine starke perinukleäre Lokalisation (Abb. 4.4), sodass als Nächstes die Kolokalisation der beiden Proteine in HeLa-Zellen untersucht wurde. Eine Kolokalisation mit dem Pearson-Koeffizienten $0,55 \pm 0,05$ wurde zwischen KCTD5 und FAM193B sowohl perinukleär als auch zytoplasmatisch beobachtet (Abb. 4.30, C). Dabei zeigten beide Proteine eine verstärkte perinukleäre Akkumulation insbesondere direkt nach der Zellteilung.

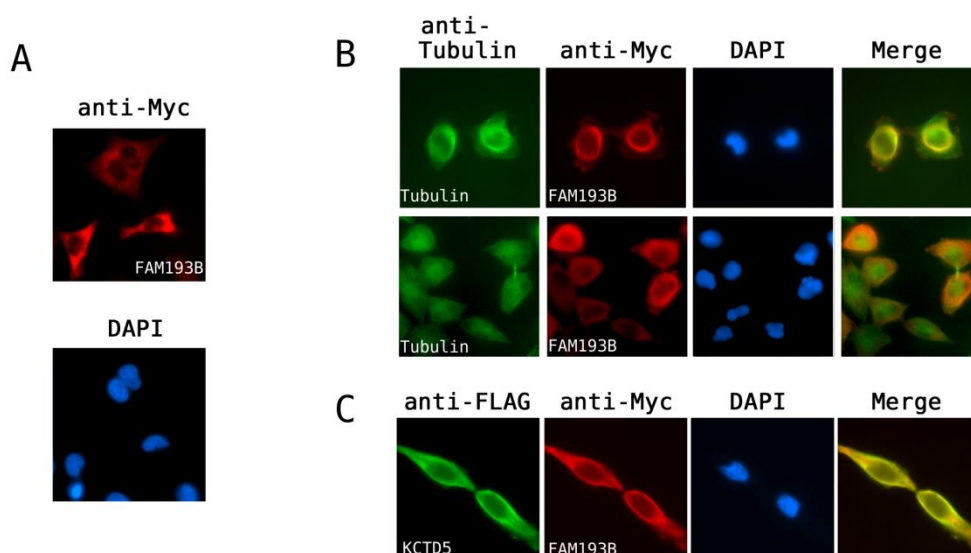


Abb. 4.30: Subzelluläre Lokalisation von FAM193B. (A) HeLa-Zellen wurden mit 4 μ g pMyc-FAM193B transfiziert. Der FAM193B-Immunfluoreszenz-Nachweis erfolgte durch Inkubation mit anti-Myc (rabbit) Primärantikörper und TRITC-markiertem Sekundärantikörper. (B) HeLa-Zellen wurden mit 4 μ g pMyc-FAM193B transfiziert. Fixierte Zellen wurden mit anti-Myc (rabbit) Primär- und TRITC-Sekundärantikörper zum FAM193B-Nachweis und mit anti-Tubulin (mouse) Primär- und FITC-markierten Sekundärantikörper zum Tubulin-Nachweis inkubiert. (C) HeLa-Zellen wurden mit 2 μ g pMyc-FAM193B und 2 μ g pCATCH-FLAG-KCTD5 kotransfiziert. Die Zellen wurden mit anti-FLAG-M2 (mouse) Primär- und FITC-markiertem Sekundärantikörper und zusätzlich mit anti-Myc (rabbit) Primär- und TRITC-markiertem Sekundärantikörper gefärbt. (A-C) Die Bilder wurden mit dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop 2 plus aufgenommen.

Die initial im Yeast-two-hybrid-Screen identifizierte Interaktion zwischen KCTD5 und FAM193B wurde als Nächstes in Säugerzellen überprüft. Dafür wurden HEK293-Zellen mit Myc-FAM193B und FLAG-KCTD5-Deletionsmutanten kotransfiziert, um zusätzlich die Rolle der C-terminalen KCTD5-Aminosäuren bei der Interaktion mit FAM193B zu untersuchen.

Alle KCTD5-Proteine außer KCTD5-47/234 wurden mit FLAG-M2 Agarose aus den Zelllysaten präzipitiert (Abb. 4.31, A). FAM193B interagiert am stärksten mit den ausschließlich im Zytoplasma lokalisierten KCTD5-Proteinen: KCTD5-1/234, KCTD5-1/181 und KCTD5-1/171 (Abb. 4.31, A, Spuren 2, 5 und 6). Die FAM193-Bindung an die KCTD5-Mutanten mit einer nukleären Lokalisation, die stabile Dimere ausbilden, war dagegen viel schwächer (Abb. 4.31, A, Spuren 3, 4 und 7). Die Deletion der Aminosäuren 160-171 hatte trotz der zytoplasmatischen Lokalisation von KCTD5-1/160 und KCTD5-1/145 eine starke Minderung der kopräzipitierten FAM193B-Proteinmenge zur Folge (Abb. 4.31, A, Spur 8).

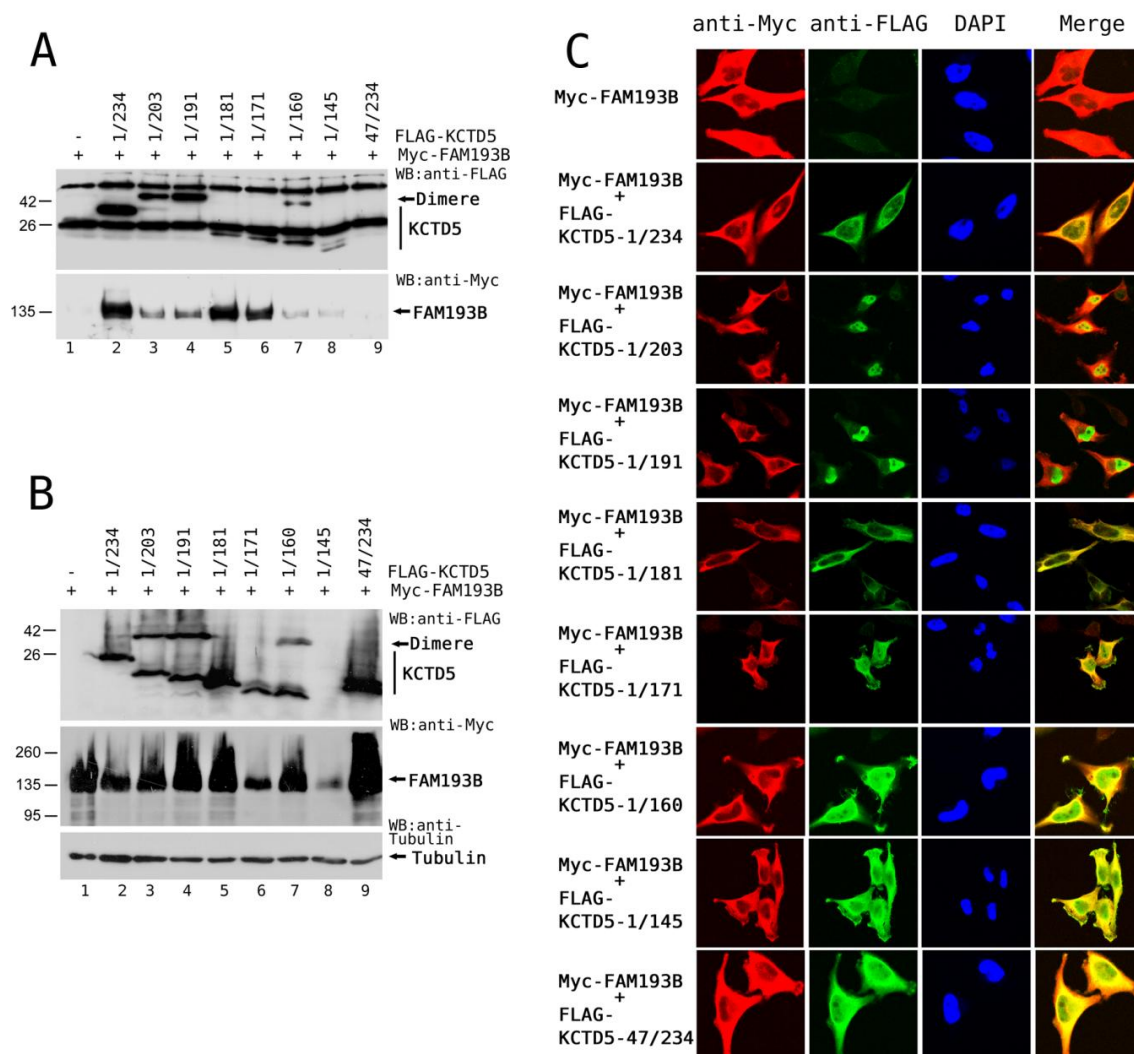


Abb. 4.31: Interaktion, Expression und subzelluläre Lokalisation der FAM193B- und KCTD5-Proteine. (A) Kopräzipitation des Myc-getaggtten FAM193B mit FLAG-getaggtten KCTD5-Deletionsmutanten. HEK293-Zellen wurden mit 2 µg pMyc-FAM193B und 2 µg eines der pCATCH-FLAG-KCTD5-Konstrukte in einem 4 µg Ansatz kotransfiziert. Die Zelllysate wurden mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert und die Präzipitation zwischen KCTD5-Mutanten und FAM193B wurde mit anti-FLAG-M2 (mouse) und anti-Myc (rabbit) Antikörpern im Western Blot analysiert. (B) Transfektion von HEK293-Zellen wie in (A). Die Gesamtzelllysate wurden mit anti-FLAG-M2 (mouse) und anti-Myc (rabbit) Antikörpern im Western Blot analysiert. Mit anti-Tubulin wurde die aufgetragene Zellextraktmenge kontrolliert. (C) Subzelluläre Lokalisation des Myc-FAM193B-Proteins und der KCTD5-Deletionsmutanten nach Kotransfektion in HeLa-Zellen wie in (A) beschrieben. FAM193B wurde mit anti-Myc (rabbit) Primär- und TRITC-markiertem Sekundärantikörper und KCTD5 mit anti-FLAG (mouse) Primär- und FITC-markiertem Sekundärantikörper analysiert. Die Immunfluoreszenzen wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop dokumentiert.

Die FAM193B-Proteinexpression unterliegt nach Kotransfektion der KCTD5-Deletionsmutanten geringfügigen Schwankungen (Abb. 4.31, B). Eine minimale Abnahme der FAM193B-Proteinexpression fand nach der KCTD5-1/171-Kotransfektion verglichen mit dem KCTD5-1/234-Ansatz statt (Abb. 4.31, B, Spuren 2 und 6), während ein Rückgang der FAM193B-Proteinmenge insbesondere bei der KCTD5-1/145-Kotransfektion beobachtet wurde (Abb. 4.31, B, vgl. Spuren 1-7 und 6). Obwohl das KCTD5-1/145-Protein in diesem Western Blot nicht nachgewiesen wurde, konnte der negative KCTD5-1/145-Effekt in anderen Versuchen bestätigt werden (Abb. 4.31, B, Spur

8). Zunahmen der FAM193B-Proteinkonzentration, die in diesem Versuch beobachtet wurden, erwiesen sich bei wiederholten Experimenten als experimentelle Schwankungen (Abb. 4.31, B, Spuren 4, 5, 7 und 9).

Die zytoplasmatische Lokalisation von FAM193B wurde durch Überexpression verschiedener KCTD5-Deletionsmutanten in HeLa-Zellen nicht beeinflusst (Abb. 4.31, C). Eine Kolokalisation wurde zwischen allen zytoplasmatisch lokalisierten KCTD5-Mutanten und FAM193B detektiert, nur zwischen FAM193B und den nukleären Mutanten KCTD5-1/203 und KCTD5-1/191 war der mittels ImageJ-Coloc2 errechnete Pearson-Koeffizient $\leq 0,1$ (Abb. 4.31, C). Trotz der schwachen FAM193B-Interaktion mit KCTD5-1/160 und KCTD5-1/145 kolokalisierten diese Proteine in HeLa-Zellen (Abb. 4.31, C mit dem Pearson-Koeffizient $0,4 \pm 0,1$), sodass auf die identische subzelluläre Lokalisation beider Proteine geschlossen werden kann. Die KCTD5-Aminosäuren 145-171 sind wahrscheinlich in die Interaktion mit FAM193B involviert, weil ihre Deletion zu einer Abschwächung der Interaktion führte, genauso wie die Deletion der Aminosäuren 1-47 (Abb. 4.31, C). Allerdings konnten nur geringe Proteinmengen an KCTD5-47/234 überhaupt präzipitiert werden, sodass die beobachtete Reduktion in der Menge an kopräzipitiertem FAM193B unter Umständen ausschließlich durch die ineffektive Bindung dieses KCTD5-Proteins an FLAG-M2 Agarose bedingt war.

Neben den C-terminalen Aminosäuren ist die Lokalisation des KCTD5-Proteins bei der Interaktion mit FAM193B entscheidend. Die nukleären, Dimere ausbildenden KCTD5-Proteine gehen im Vergleich zu zytoplasmatischen KCTD5-Proteinen eine viel schwächere Interaktion mit FAM193B ein. FAM193B kolokalisiert mit den zytoplasmatischen KCTD5-Mutanten. Die Bindung an KCTD5-1/203, -1/191 und -1/160 kann durch die partiell zytoplasmatische Lokalisation der Monomere dieser Deletionsmutanten erklärt werden, die insbesondere im Perinukleärraum mit FAM193B kolokalisieren.

KCTD5-Deletionsmutanten könnten die FAM193B-Proteinmenge positiv oder negativ beeinflussen. Dieser Punkt bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

4.5.2 Bildung trimerer Komplexe zwischen FAM193B, KCTD5 und Cullin3

Nachdem die Interaktion und Kolokalisation des FAM193B-Proteins mit KCTD5 eindeutig nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob die KCTD5-Cullin3-E3-Ligase einen Komplex mit FAM193B ausbildet. Dafür wurde transfiziertes FLAG-getaggtetes FAM193B mit FLAG-M2 Agarose aus HEK293-Zellen präzipitiert und auf die Anwesenheit von kotransfizierten, Myc-getaggteten KCTD5 und Cullin3 Proteinen getestet.

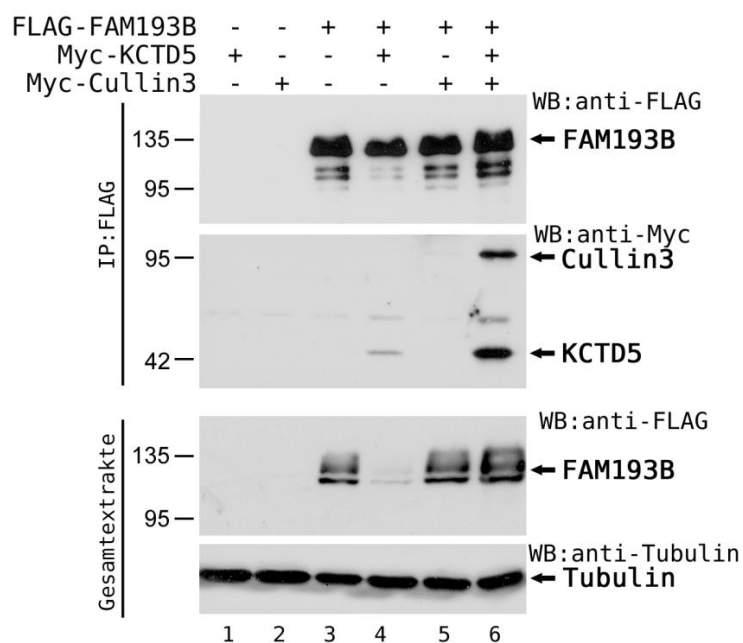


Abb. 4.32: Komplexbildung zwischen KCTD5, Cullin3 und FAM193B. HEK293-Zellen wurden in einem 4 µg Gesamtansatz mit 2 µg pCATCH-FLAG-FAM193B, 1 µg pMyc-KCTD5 und 1 µg pMyc-Cullin3 in den angegebenen Kombinationen kotransfiziert. Für die Immunpräzipitation (IP) wurde die Hälfte der Ansätze jeweils mit FLAG-M2 Agarose präzipitiert und die Präzipitate mit anti-FLAG-M2 (mouse) oder anti-Myc (rabbit) im Western Blot auf die Gegenwart der entsprechend getaggten Proteine untersucht. Die zweite Hälfte wurde direkt mit Proteinprobenpuffer lysiert und die Gesamtzellextrakte wurden im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper auf die FAM193B Proteinexpression und als Kontrolle für die Gesamtproteinmenge in den Zellextrakten zusätzlich mit anti-Tubulin Antikörper untersucht.

FLAG-FAM193B konnte spezifisch präzipitiert werden, unabhängig von kotransfizierten KCTD5 und Cullin3 (Abb. 4.32, IP:FLAG). Weder bei KCTD5 noch bei Cullin3 konnte eine unspezifische Bindung an die FLAG-M2 Agarose in Abwesenheit des FLAG-getaggten FAM193B detektiert werden (Abb. 4.32, IP:FLAG, Spuren 1 und 2). Die Interaktion zwischen FAM193B und KCTD5 wurde bestätigt, wobei diese Interaktion in Gegenwart von exogenem Cullin3 verstärkt wird (Abb. 4.32, IP:FLAG, vgl. Spuren 4 und 6). Während nach alleiniger Expression von Cullin3 dieses nicht kopräzipitiert werden konnte, kam es nach Koexpression von KCTD5 zu einer sehr starken Kopräzipitation von Cullin3 (Abb. 4.32, IP:FLAG, Spuren 5 und 6). FAM193B scheint also sehr stark an den KCTD5-Anteil im Cullin3-KCTD5-Komplex, jedoch nicht direkt an nicht mit KCTD5 komplexiertes Cullin3 zu binden. Ähnlich scheint die Bindung von KCTD5 an Cullin3 seine Affinität für FAM193B zu erhöhen.

Nach KCTD5-Kotransfektion ging die FAM193B-Proteinmenge stark zurück, während die Cullin3-Kotransfektion mit oder ohne KCTD5 keinen Einfluss auf den FAM193B-Proteinspiegel zeigte (Abb. 4.32, Gesamtextrakte).

In Säugerzellen bildet sich folglich ein trimere Komplex zwischen KCTD5, Cullin3 und FAM193B, der über KCTD5 als zentrales Glied vermittelt wird. Darüber hinaus führt die Gegenwart von Cullin3 zu einer verstärkten Bindung von KCTD5 an FAM193B, die auf eine hohe Stabilität des trimere Komplexes hinweist.

4.5.3 FAM193B-Proteinexpression und Ubiquitinierung

Nach der Kotransfektion von FAM193B mit den KCTD5-Expressionskonstrukten wurde eine Abnahme der FAM193B-Proteinkonzentration in den Gesamtextrakten festgestellt, die beim FLAG-getaggten FAM193B-Fusionsprotein wesentlich deutlicher ausfiel als beim Myc-getaggten Fusionsprotein (Vgl. Abb. 4.31, B: Spuren 1, 2 und Abb. 4.32, Spuren 3-4). Die Stabilitätsversuche mit exogen exprimiertem ZNF711 hatten ebenfalls gezeigt, dass Myc-getaggtetes ZNF711-Protein im Vergleich zu einem FLAG-getaggten ZNF711 in der Zelle eine längere Halbwertszeit hat (Abb. 4.23). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen zur FAM193B-Proteinexpression unter steigenden KCTD5 und Cullin3-DNA-Plasmidkonzentrationen mit einem FLAG-getaggten FAM193B-Konstrukt durchgeführt.

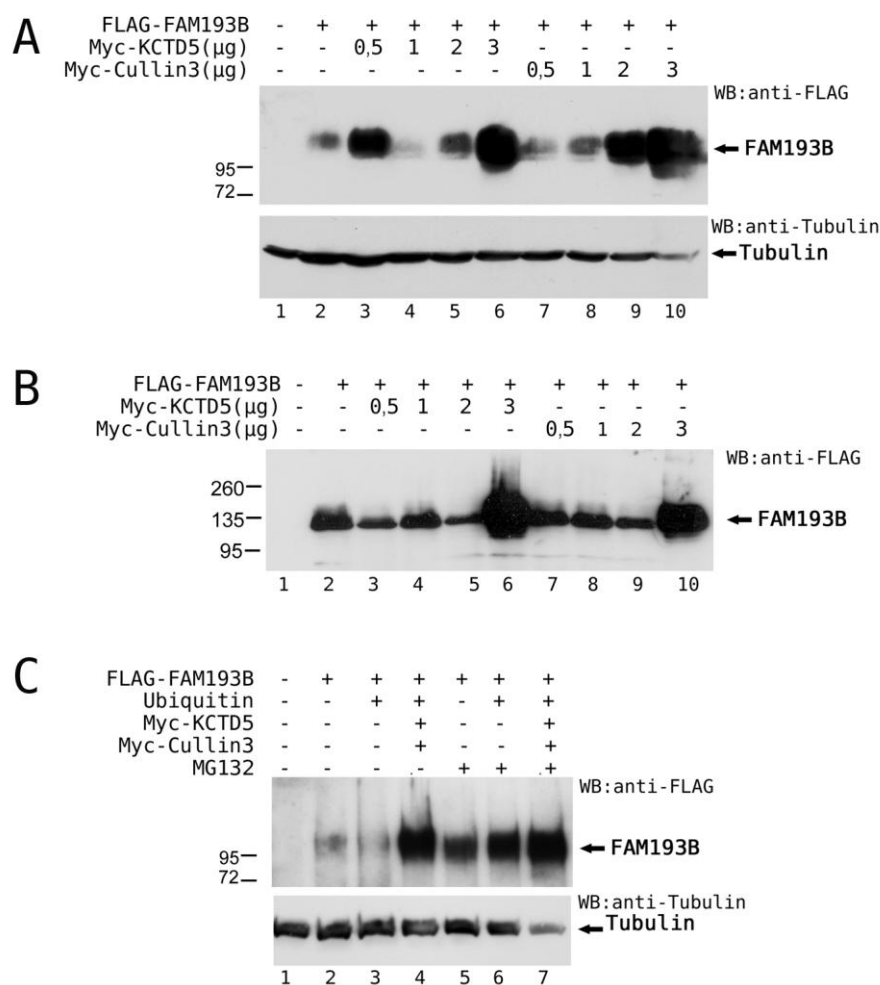


Abb. 4.33: Die Expression von exogenem KCTD5 und Cullin3 führt zu einer erhöhten FAM193B-Proteinkonzentration. (A-B) HEK293-Zellen wurden in einem 4 µg Ansatz mit 1 µg pCATCH-FLAG-FAM193B und mit den in der Abbildung angegebenen pMyc-KCTD5 und pMyc-Cullin3 DNA-Plasmidkonzentrationen kotransfiziert. Für den FAM193B-Nachweis wurden die Gesamtzellextrakte im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper analysiert. (A) Eine Analyse mit anti-Tubulin (mouse) Antikörper diente zur Kontrolle der aufgetragenen Zellextraktmenge. (C) HEK293-Zellen wurden mit 2 µg pCATCH-FLAG-FAM193B, 1 µg pCATCH-His-Ubiquitin, 1 µg pMyc-KCTD5 und 1 µg pMyc-Cullin3 kotransfiziert. Ein Teil der Ansätze wurde mit 3 µg/ml MG132 für 15 h vor der Aufarbeitung inkubiert. Die Zellen wurden in Proteinprobenpuffer lysiert und die Gesamtextrakte im Western Blot mit anti-FLAG-M2 (mouse) Antikörper auf FAM193B und anti-Tubulin Antikörper zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge untersucht.

Bei Kotransfektion von KCTD5 oder Cullin3 Expressionskonstrukten in einer Menge zwischen 0,5 und 2 μg Plasmid-DNA, bezogen auf einen 4 μg Gesamtansatz, war zwar tendenziell eine Zunahme der FAM193B-Proteinmenge zu beobachten, diese war jedoch nicht für alle Werte eindeutig (Abb. 4.33, A und B, Spuren 2-5 und 7-9). Dagegen stieg die FAM193B-Proteinmenge nach Überexpression von 3 μg KCTD5 oder Cullin3 erheblich gegenüber der Kontrolle (Abb. 4.33, A und B, Spuren 6 und 10). Dieser positive Effekt wurde auch nach KCTD5- und Cullin3-Kotransfektion in geringen Mengen in Anwesenheit von Ubiquitin unabhängig vom Proteasom-Inhibitor MG132 beobachtet, während Ubiquitin allein keinen positiven Einfluss auf FAM193B ausübte (Abb. 4.33, C). Dieser Befund deutet auf eine langzeitige Protein stabilisierung oder eine erhöhte Proteinexpression als eine mögliche Folge einer Regulation durch den KCTD5-Cullin3-Komplex hin, wobei es unklar ist, ob eine KCTD5-Cullin3-vermittelte Ubiquitinierung dabei eine Rolle spielt.

Als putativer KCTD5-Cullin3-Ubiquitinierungssubstrat wurde FAM193B auf Ubiquitinierung getestet. Der Nachweis möglicher FAM193B-Ubiquitinierung wurde in HEK293-Zellen mit Myc-FAM193B durchgeführt und die Eluate wurden nach der spezifischen Anreicherung des His-getaggten Ubiquitins durch NiNTA mit anti-Myc Antikörper auf Myc-getaggtes FAM193B untersucht. Tatsächlich konnte ubiquitiniertes FAM193B detektiert werden (Abb. 4.34, Spur 4). Es handelt sich um einen spezifischen Nachweis der FAM193B-ubiquitinierten Form, denn eine unspezifische Bindung an NiNTA-Agarose wurde nicht beobachtet (Spur 3).

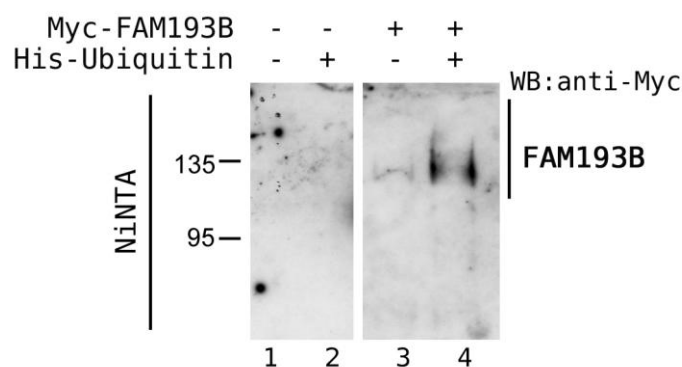


Abb. 4.34: FAM193B-Ubiquitinierung. HEK293-Zellen wurden für 40 h mit 2 μg pMyc-FAM193B und 1 μg pCATCH-His-Ubiquitin transfiziert. Anschließend erfolgte die Anreicherung des His-getaggten Ubiquitins unter denaturierenden Bedingungen. Das Eluat wurde mittels Western Blot mit anti-Myc (rabbit) Antikörper auf Myc-FAM193B untersucht.

Die KCTD5- oder Cullin3-Überexpression führte bei FAM193B zu einer Zunahme der Proteinspiegel. Die zelluläre FAM193B-Ubiquitinierung lieferte einen interessanten Punkt für weitere Untersuchungen des FAM193B als ein potenzielles KCTD5-Cullin3-Ubiquitinierungssubstrat.

5 Diskussion

KCTD5 ist ein Vertreter der KCTD-Familie (*Potassium channel tetramerization domain containing proteins*), die durch das Vorhandensein einer BTB/POZ-Domäne charakterisiert ist. Für viele KCTD-Proteine wird aufgrund ihrer Interaktion mit Cullin3 eine Funktion als Substratadapter für Cullin3-basiertes E3-RING-Ubiquitin-Ligase-Komplex vermutet und für einige Vertreter ist eine solche Funktion auch bereits nachgewiesen [17, 62, 207]. An der Interaktion mit Cullin3 sind auf der Seite von KCTD5 die N-terminalen Aminosäuren 40-45 zusammen mit der BTB-Domäne beteiligt, wobei es unklar ist, ob der N-Terminus ohne die BTB-Domäne für die Interaktion ausreichend wäre [9]. Außerdem wurde eine Interaktion zwischen KCTD5 und den großen Rep78/Rep68-Proteinen des Adeno-assoziierten Virus AAV-2 beschrieben; die Auswirkungen dieser Komplexbildung für den AAV-2 Replikationszyklus sind jedoch noch nicht geklärt [10]. Infolge der Interaktion mit Rep78/Rep68 transloziert KCTD5, ein ansonsten überwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes Protein, in den Zellkern. Eine Änderung der subzellulären Lokalisation von KCTD5 konnte auch nach Deletion seiner C-terminalen Aminosäuren 203-234 beobachtet werden, bei der eine nun überwiegend nukleäre Lokalisation des verkürzten Proteins mit der Bildung stabiler putativer dimerischer Proteinformen einhergeht [10, 11].

Im Hinblick auf eine mögliche Funktion von KCTD5 als Substratadapter für Cullin3-basierte Ubiquitin-E3-Ligasen konnten als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit drei potentielle zelluläre Interaktionspartner im Yeast-two-hybrid-System identifiziert werden, unter denen sowohl überwiegend nukleär lokalisierte als auch zytoplasmatische Proteine vertreten sind. Es handelt sich dabei um den Replikationsfaktor MCM7, das Zink-Finger-Protein ZNF711 und ein zytoplasmatisches Protein, FAM193B/IRIZIO[11].

5.1 Translokation von KCTD5 zwischen Zytoplasma und Nukleus

Für das Volllänge-Protein KCTD5 wurde in meinen Untersuchungen eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation mit einer verstärkten perinukleären Präsenz beobachtet. Trotz der beschriebenen Interaktion mit dem GRASP55-Protein [8], das an der Bildung des Golgi-Apparates mitwirkt, ist KCTD5 im gesamten Zytoplasma verteilt. Die beobachtete Translokation der KCTD5-Deletionsmutanten in den Zellkern korreliert mit Ausbildung stabiler Dimere, mit Involvierung des C-Terminus (Abb. 4.1, D und E). Bereits in der Diplomarbeit wurde aufgrund der beschriebenen KCTD5-

Röntgenstrukturanalyse diskutiert, dass die endständigen, vermutlich ins Zytoplasma exponierten Aminosäuren 203-234 für die zytoplasmatische Lokalisation verantwortlich sind [8, 11]. Möglicherweise führt die schrittweise Deletion der C-terminalen Aminosäuren zu einer Strukturveränderung, die eine verstärkte Interaktion oder eine Unfähigkeit zum rückgängigen Monomerisieren zur Folge hat. Die Deletion der Aminosäuren 181-191, die mit der Aminosäure 183 die engste Stelle des Pentamers bilden, betrifft das β 5-Faltblatt und beeinträchtigt möglicherweise die Wechselwirkung mit weiteren KCTD5-Monomeren [8, 11]. Die Aminosäuren 150-160 bilden eine Schleife und einen Teil des β 4-Faltblatts, die die Dimere stabilisieren oder verstärkte Dimerisierung einleiten können. Dass die KCTD5-1/181- oder KCTD5-1/171-Mutanten trotz dieses Bereichs monomerisiert vorliegen, wird womöglich durch strukturelle Veränderungen aufgrund der Deletionen verursacht.

Die Kopräzipitation des KCTD5-Volllänge-Konstrukts mit dem KCTD5-1/191-Dimer und seine anschließende nukleäre Translokation (Abb. 4.2) spricht für eine KCTD5-Oligomerisierung im Zytoplasma als Voraussetzung für eine direkte nukleäre Translokation oder die Interaktion mit weiteren Proteinen, die dann als Shuttle-Proteine für KCTD5 dienen. Der zelluläre Mechanismus der KCTD5-Translokation bedarf weiterer Untersuchungen. Interessanterweise wurde für BACH1, ein zytoplasmatisches Protein mit einer BTB-Domäne, ein zellulärer Mechanismus mit einer alternativen BACH1-Splice-Isoform beschrieben, die eine Translokation des zytoplasmatischen BACH1-Proteins in den Zellkern bewirkt [208].

Die Analyse mittels schrittweiser Deletion deutet darauf hin, dass neben der BTB-Domäne der C-Terminus in die KCTD5-Dimer- und Oligomerbildung involviert ist. Für einen weiteren Cullin3-Adapter, SPOP, zeigte van Geersdaele *et al.*, dass neben der BTB-Domäne der C-Terminus sowohl für die Dimerisierung als auch Oligomerisierung entscheidend ist [209]. Die Untersuchung einer Oligomerisierung zwischen KCTD5-1/145 und KCTD5-1/191 und ihrer subzellulären Lokalisation könnte die Frage beantworten, ob nur die BTB-Domäne oder zusätzliche C-terminale Aminosäuren für die stabile Dimerisierung und Oligomerisierung essentiell sind.

Aufgrund der Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, dass KCTD5-Dimere oder höhere Oligomere auch im Fall des Volllänge-Wildtyp-Proteins ständig in geringen Mengen im Zellkern präsent sind. Eine putative Dimer-Bande konnte für das Wildtyp-KCTD5 erst bei großen Proteinmengen im Western Blot detektiert werden und lag bei den Immunfluoreszenz-Untersuchungen vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 4.1, A und Abb. 4.7, C:Gesamtextrakte). Es könnte also ständig ein geringer Teil des zellulären KCTD5-Pools durch Dimerisierung und/oder Oligomerisierung zwischen Zytoplasma und Zellkern transloziert werden und dieser Prozess könnte durch die

Wechselwirkung mit weiteren zellulären Proteinen reguliert werden. Für Keap1, ein BTB-Protein und einen Cullin3-Interaktionspartner, wurde eine durch Dimerisierung regulierte ständige Translokation zwischen Zytoplasma und Zellkern beschrieben [64, 210]. Diese Hypothese könnte für KCTD5 durch Zellfraktionierung oder Einsatz von Leptomycin B in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden.

KCTD5 kolokalisiert partiell mit Tubulin (Abb. 4.1, B) und könnte daher über eine Wechselwirkung mit Tubulin oder zellulären Transportproteinen funktionelle Auswirkungen auf die Bildung des Zytoskeletts haben. Bei einer großen RNA-Interferenz-Studie wurde KCTD5 als essentiell für die Zellteilung identifiziert, die es möglicherweise positiv reguliert [103]. Außerdem zeigte das KCTD5-Volllänge-Protein eine nukleäre Lokalisation 8 bis 10 h nach dem Eintritt von Zellen in die S-Phase, die unmittelbar vor der Zytokinese liegt. In diesem Fall könnte KCTD5 vor der Zytokinese verstärkt auf seine nukleären Interaktionspartner für deren Regulierung treffen. Eine verstärkte KCTD5-Dimerisierung in einer der Zellteilungsphasen ließ sich mittels Western Blot jedoch nicht nachweisen, möglicherweise wegen eines schnellen Monomerisierens oder eines KCTD5-Abbaus im Zellkern: Eine verstärkte nukleäre Lokalisation von KCTD5 konnte nach Inkubation mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 detektiert werden (Abb. 4.25, B).

Für einige BTB-haltige Cullin3-Substratadapter wurde eine Kolokalisation mit Aktin-Filamenten beschrieben: Keap1 assoziiert über Aktinfilamente möglicherweise mit dem Proteasom und Mayven/KLHL2 assoziiert mit F-Aktin in neuronalen Zellen [211-213]. Für die Überprüfung einer Kolokalisation von KCTD5 mit Aktin fehlte jedoch ein in der Immunfluoreszenz-Analyse funktioneller anti-Aktin Antikörper. Bioinformatische Vorhersagen in Datenbanken lieferten ebenfalls kein einheitliches Ergebnis für eine mögliche Assoziation von KCTD5 mit zytoplasmatisch lokalisierten Strukturen: Für eine Assoziation mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ergab sich in der PredictProtein Database eine 21%-ige, in der PSORT II Prediction Database jedoch nur eine 4,3%-ige Wahrscheinlichkeit. Für eine Assoziation mit dem Zytoskelett liegt die Wahrscheinlichkeit laut PSORT II Prediction Database bei 13%.

5.2 Wechselwirkung von KCTD5 mit dem Replikationsfaktor MCM7

5.2.1 Detaillierte Charakterisierung der Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7

Die detaillierte Analyse der C-terminalen KCTD5-Domäne und seiner Rolle bei der Interaktion mit MCM7 zeigte, dass die Aminosäuren 171-180 und eine nukleäre KCTD5-Lokalisation für die Interaktion mit MCM7 von entscheidender Bedeutung sind (Abb. 4.6, C). Die Aminosäuren 171-180 bilden in der KCTD5-Pentamerstruktur einen Teil der α 6-Helix und den Loop zum β 5-Faltblatt [8], wobei sowohl der Loop als auch die α 6-Helix für putative Interaktionspartner gut zugänglich sind. Die MCM7-Interaktion mit KCTD5-1/160 zeigte jedoch, dass die Aminosäuren 145-160, die in der Pentamerstruktur ebenfalls gut zugänglich sind, und die räumliche Nähe zu MCM7 aufgrund der nukleären Lokalisation für die Interaktion ausreichend sind. Es ist wahrscheinlich, dass die Interaktion von KCTD5 mit MCM7 durch die Aminosäuren aus dem Bereich 171-180 vermittelt wird, unterstützt von den Aminosäuren 145-160 und möglicherweise durch Cullin3. Ganz wesentlich ist naturgemäß eine räumliche Nähe der beiden Interaktionspartner. Dies erklärt die schwache MCM7-Interaktion mit dem zytoplasmatischen KCTD5-1/234 und die ebenfalls schwache Interaktion mit dem nukleären KCTD5-1/160, dem der Bereich zwischen den Aminosäuren 171-180 fehlt. Ein Teil der KCTD5-1/181-Mutante dimerisiert ebenfalls, wobei der geringe Anteil von Dimeren mit der Situation beim KCTD5-Wildtyp vergleichbar ist (Abb. 4.13, B). Möglicherweise ist die beobachtete Bindung an MCM7 für das Wildtyp-Protein und die KCTD5-1/181 ausschließlich auf diese dimerischen, nukleär lokalisierten Formen zurückzuführen.

Im Yeast-two-hybrid-Screen war die MCM7-Proteindomäne mit den C-terminalen Aminosäuren 591-719 für die Interaktion mit KCTD5 ausreichend. Bei der Untersuchung der MCM7-Deletionsmutanten führte die Deletion der Aminosäuren 500-650 zu einer Abschwächung der Bindung an KCTD5, sodass die Domäne zwischen den Aminosäuren 591 und 650 an der Interaktion maßgeblich beteiligt ist. Interessanterweise liegen die Aminosäuren für die Bindung an E6-AP in der L2G-Box (Aminosäuren 640-646) und somit im gleichen Proteinabschnitt, der damit möglicherweise die Wechselwirkung mit zwei putativen Ubiquitin-Ligase-Komplexen vermittelt.

KCTD5 und MCM7 interagieren miteinander vermutlich im Zellkern. Die permanente nukleäre Lokalisation geringer KCTD5-Mengen könnte eine Rolle bei der Regulation des MCM-Komplexes spielen. Die Untersuchung der synchronisierten Zellen zeigte eine nukleäre KCTD5-Lokalisation unmittelbar vor der Zytokinese in der G2-Phase (Abb. 4.4),

eine Änderung wurde jedoch weder in der MCM7-Proteinmenge noch in der MCM7-Lokalisation nach KCTD5-Überexpression detektiert (Abb. 4.12), wobei ein nukleärer MCM7-Export tatsächlich während der G2-Phase beschrieben wurde [122]. Ein Zusammentreffen von MCM7 und KCTD5 im Zellkern wird zwar von Ergebnissen der Immunpräzipitation ganz wesentlich unterstützt, für eine genaue Aussage zu dem Interaktionsort müssten jedoch während des Zellzyklus parallele Untersuchungen mittels der konfokalen Mikroskopie, Koimmunpräzipitation und Zellfraktionierung durchgeführt werden.

5.2.2 MCM7 als putatives Substrat des KCTD5-Cullin3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes

MCM7 interagiert mit der zellulären E6-AP Ubiquitin-Ligase, die MCM7 wahrscheinlich für die proteasomale Degradation poly-ubiquitiniert [130]. Neben der E6-AP-vermittelten MCM7-Ubiquitinierung findet man jedoch noch weitere Ubiquitinierung, die durch bisher noch nicht identifizierte Ubiquitinierungskomplexe vermittelt wird [109, 130]. Die funktionellen Konsequenzen der MCM7-Ubiquitinierung sind nicht bekannt. Bei der Bildung des maßgeblich an der DNA-Replikation beteiligten MCM-Komplexes scheinen jedoch die Ubiquitinierung einer weiteren Komponente, des MCM3-Proteins, und die USP7, die Ubiquitin Carboxyl-terminale Hydrolase 7, wichtige Rollen zu spielen [131, 214].

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation deuten auf die Bildung des MCM7-KCTD5-Cullin3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes (Abb. 4.7, C). Es ist allerdings nicht eindeutig, ob die Interaktion zwischen MCM7 und Cullin3 direkt ist oder durch KCTD5 vermittelt wird, denn die Cullin3-Bindung an MCM7 wurde auch nach Kotransfektion der shRNA's gegen KCTD5 detektiert. Die Effektivität der KCTD5-shRNA's variierte bei den durchgeführten Versuchen (Abb. 4.7, A und Abb. 4.16, B) und ihre Effektivität gegen das endogene KCTD5 konnte nicht überprüft werden, sodass die Cullin3-MCM7-Interaktion durch endogenes KCTD5 vermittelt werden könnte. Bei einer von Bennet und Kollegen durchgeführten Studie wurde MCM7 als Cullin3-Interaktionspartner isoliert, genauso wie MCM-BP, MCM3 und MCM6 [14]. In diesem Fall ist es ebenfalls unklar, ob die Interaktion durch weitere zelluläre Proteine wie KCTD5 vermittelt wird. Für eine endgültige Beantwortung dieser Fragestellung wäre es vorteilhaft, die Interaktionsstudien zwischen MCM7, KCTD5 und Cullin3 *in vitro* mit gereinigten Proteinkomponenten durchzuführen.

Laut einer proteomischen Studie werden insgesamt 9 MCM7-Lysine ubiquitiniert, wobei 6 davon zwischen den Aminosäuren 15 und 231 lokalisiert sind [109]. Deswegen ist es nicht verwunderlich, dass die MCM7-1/500 Deletionsmutante immer noch sehr stark

ubiquitiniert wird. Nur 6 der 9 Lysinreste sollen laut der Studie am proteasomalen MCM7-Abbau beteiligt sein. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine andere Studie, in der MCM7 mono-ubiquitiniert und nicht durch das Proteasom abgebaut wird [215].

Steigende Mengen von exogenem KCTD5 führten tendenziell zu einer verminderten Bildung poly-ubiquitinerter MCM7-Formen (Abb. 4.11, C). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde keine Abnahme in der MCM7-Proteinmenge nach KCTD5-Überexpression beobachtet (Abb. 4.8). Die Hemmung des Proteasoms durch Inhibitoren führte zu einer MCM7-Akkumulation (Abb. 4.10, B, und Abb. 4.11). Diese Daten sprechen recht eindeutig gegen eine Beteiligung von KCTD5 an der Proteasom-vermittelten Degradation von MCM7, schließen jedoch eine durch KCTD5-Cullin3-vermittelte MCM7-Mono-Ubiquitinierung nicht aus. Eine solche spezifische Mono-Ubiquitinierung wäre vor dem Hintergrund der übrigen Ubiquitinierung des Proteins nach NiNTA-Aufreinigung nicht zu detektieren. Eine Regulation durch Mono-Ubiquitinierung wurde für viele Faktoren bei der Genexpression und der DNA-Replikation beschrieben [105, 216]. Um diese putative MCM7-Ubiquitinierung durch den KCTD5-Cullin3-Komplex zu untersuchen, müssten Experimente mit K48- und K63-Ubiquitinmutanten durchgeführt werden und die 9 beschriebenen MCM7-Lysine müssten individuell *in vitro* auf Ubiquitinierung untersucht werden.

Der vermutete KCTD5- und Cullin3-Einfluss auf das exogene MCM7-Protein ließ sich nicht eindeutig nachweisen (Abb. 4.8). Der für die Regulation der MCM7 Proteinexpression beschriebene Rückkopplungsmechanismus würde die bei einem Versuch konstant verbliebene MCM7-Menge erklären [217]. Die in einem weiteren Versuch nach starker Überexpression von KCTD5 detektierte Zunahme in der MCM7-Proteinmenge ließe sich zwar durch eine nichtproteolytische, regulatorische Ubiquitinierung erklären, steht aber in leichtem Widerspruch zu den ersten Ergebnissen. Möglicherweise gibt es komplexe Wechselwirkungen zwischen der MCM7-Autoregulation und einer noch hypothetischen Regulation durch einen KCTD5-Cullin3-Ligase-Komplex [217, 218].

Die Bindung des MCM-Komplexes an die Replikationsursprünge bei der Regulation der zellulären DNA-Replikation wird nicht nur durch Modifikation der MCM-Proteine reguliert, wie z.B. MCM4-Phosphorylierung [136], sondern auch durch Interaktion mit anderen Proteinkomplexen. Es wäre möglich, dass KCTD5 MCM7 nicht ubiquitiniert, sondern dessen Protein-DNA-Wechselwirkung reguliert: Die Proteine mit einer BTB/POZ-Domäne können eine direkte Bindung an die DNA und Genaktivierung vermitteln oder Genexpression ohne Cullin3 wie KCTD1 oder KCTD10 regulieren. Hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass KCTD1 und KCTD10 im Gegensatz zu KCTD5 überwiegend im Nukleus lokalisiert sind [219, 220].

5.2.3 Interaktion von MCM7 mit Rep78/Rep68 und seine Rolle bei der AAV-2-Replikation

MCM7 wurde als Interaktionspartner von Rep78 beschrieben, wobei jedoch eine direkte Interaktion nicht gezeigt wurde [139]. Interessanterweise kommt es nach Überexpression der Rep78/Rep68-Proteine zu einer deutlichen Abschwächung oder einer kompletten Aufhebung der Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7 (Abb. 4.13). Die Interaktion von KCTD5 mit Rep78/Rep68 wird durch die BTB-Domäne (Aminosäuren 47-70) und die C-terminalen Aminosäuren 203-234 vermittelt, sodass die MCM7-KCTD5-Wechselwirkung möglicherweise weniger durch die Bindung an die gleichen KCTD5-Domänen als vielmehr durch die sterische Hinderung zwischen MCM7 und Rep78/Rep68 beeinträchtigt wird. Interessant wäre die Untersuchung der MCM7-KCTD5-Interaktion nach Überexpression der Rep78/Rep68-NLS Mutanten, die keine Veränderung in der subzellulären KCTD5-Lokalisation bewirken. Die von Nash *et al.* [139] beschriebene Interaktion zwischen Rep78/Rep68 und MCM7 ließ sich im Rahmen dieser Arbeit durch verschiedene Kopräzipitationsansätze nicht bestätigen, sodass diese Wechselwirkung *in vitro* mit aufgereinigten Proteinpartnern untersucht werden müsste.

Die durchgeführten Versuche zeigten außerdem kaum eine Veränderung im MCM7-Ubiquitinierungsmuster durch Rep78/Rep68-Überexpression. Interessanterweise wurde die MCM7-Ubiquitinierung nach Expression der kernwanderungsdefizienten Mutante der großen Rep-Proteine Rep68-NLS, welche überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist, geringfügig verstärkt (Abb. 4.15, C). Sollte die Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7 zu einer MCM7-Ubiquitinierung mit regulatorischer Funktion führen, könnten Rep78/Rep68 durch Bindung an KCTD5 diese Interaktion verhindern und dadurch in den Zellzyklus eingreifen. Die Beteiligung der Rep78/Rep68-Proteine bei der DNA-Replikation oder seine anti-onkogene Wirkung wurden bereits beschrieben [150, 164, 165].

Die Fragestellung nach der Rep78/Rep68-vermittelten MCM7 Regulation durch geschwächte KCTD5-MCM7-Interaktion konnte nicht beantwortet werden. Die Untersuchungen zeigten keine Veränderungen in der MCM7-Proteinmenge oder -Ubiquitinierung, die durch KCTD5 oder die Rep-Proteine eingeleitet wurden. Die geschwächte Interaktion zwischen KCTD5 und MCM7, verursacht durch Rep78/Rep68-Proteine, könnte eine KCTD5-vermittelte MCM7-Modifikation verhindern, ohne dass dieser Effekt detektiert wurde. Um diese Frage zu beantworten, müssten zunächst die funktionellen Auswirkungen der KCTD5-MCM7-Interaktion im Detail charakterisiert werden.

MCM7 ist als Teil des MCM-Replikationskomplexes für die AAV-2-Replikation essentiell [140]. Der Einsatz der siRNA's gegen MCM2 und MCM6 führt zu einer

80%-igen AAV-2-Replikationsminderung, während die Wirkung der siRNA gegen MCM7 nicht untersucht wurde [140]. Die Effektivität der verwendeten siRNA's gegen MCM2 und MCM6 wird nicht gezeigt, obwohl die Hemmungsstärke wahrscheinlich eine wichtige Rolle spielt: Für MCM7 wurde berichtet, dass es bei einer Hemmung der MCM7-Proteinmenge um 80 bis 90 % trotzdem noch zu einer effizienten DNA-Synthese kommt [133].

Durch den Einsatz der gegen MCM7 gerichteten shRNA-Konstrukte konnte in dieser Arbeit keine Reduktion der endogenen MCM7-Menge von mehr als 90% erreicht werden. Die Restmenge ist wahrscheinlich entsprechend den oben genannten Befunden auch für die AAV-Replikation noch ausreichend. Aus diesem Grund war weder die Verifizierung der MCM7-Funktion bei der AAV-2-Replikation möglich noch konnte die genaue Rolle des KCTD5-Proteins dabei untersucht werden.

Obwohl einige Viren, wie z.B. das Cytomegalovirus, einen Einfluss auf den MCM-Komplex ausüben [135], wurde nach Infektion mit Adenovirus oder AAV-2 keine Änderung in der MCM7-Proteinmenge oder dem MCM7-Ubiquitinierungsmuster detektiert (Abb. 4.16). Entweder erfolgt durch die getesteten Viren keine MCM7-Regulation oder die dafür verwendeten Methoden waren nicht sensitiv genug, sollte es sich beispielsweise nur um eine regulatorische MCM7-Mono-Ubiquitinierung handeln.

5.3 Funktionelle Wechselwirkungen des KCTD5-Cullin3-Komplexes mit dem ZNF711-Transkriptionsfaktor

5.3.1 Bildung eines trimeren ZNF711-KCTD5-Cullin3-Komplexes und KCTD5-Cullin3-vermittelte ZNF711-Stabilisierung

ZNF711 ist ein Transkriptionsfaktor, der auf dem X-Chromosom kodiert wird. Der N-terminale Teil zwischen den Aminosäuren 69 und 400 zeigt eine 40%-ige Homologie zu der GAL4-Aktivierungsdomäne, die bei Zfx und ZnfY2 Faktoren beschrieben wurde [221].

Neben der beschriebenen Interaktion mit PHF8 [96] gibt es putative ZNF711-Interaktionspartner, die mit Hilfe der OPHID Text Mining und Yeast-two-hybrid-Pooluntersuchungen identifiziert wurden. Viele sind in Zytoplasma und Zellmembran lokalisiert, wie z.B. MAP3K5, SLC16A2 oder IL1RAPL2 (Datenbanken in PSICQUIC bei EMBL-EBI und GeneCards). Diese Protein-Protein-Interaktionen sind noch nicht in Säugerzellen evaluiert und können zurzeit nur als eine Orientierung für weitere Untersuchungen und mögliche biologische Funktionen von ZNF711 dienen.

Die durch Yeast-two-hybrid-Screen identifizierte Interaktion zwischen ZNF711 und KCTD5 konnte im Rahmen dieser Arbeit in Immunpräzipitationsstudien in Säugerzellen bestätigt werden. Für die Interaktion mit ZNF711 spielt die KCTD5-Dimerisierung/Oligomerisierung eine Schlüsselrolle, denn eine starke Interaktion konnte nur zwischen ZNF711 und nukleär lokalisierten KCTD5-Mutanten nachgewiesen werden, die putative stabile Dimere bilden (Abb. 4.19). Zwar erfolgte die initiale Identifizierung des ZNF711 im Yeast-two-hybrid-Screen durch Bindung an KCTD5-1/234, jedoch liegt die an das KCTD5-Volllänge-Protein bindende ZNF711-Menge in den untersuchten Säugerzellen (HeLa und HEK293) nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Dabei ist zu berücksichtigen, dass im Hefesystem beide untersuchten Interaktionspartner durch die fusionierten Domänen der verwendeten Hefe-Transkriptionsfaktoren in den Zellkern geschleust werden. Möglicherweise entspricht die schwache ZNF711-Bande dem Proteinanteil, der an die KCTD5-Dimere bindet, die nur einen geringen Anteil des KCTD5-1/234-Volllänge-Proteins ausmachen. Aufgrund des Versuchsaufbaus ist es allerdings nicht eindeutig, ob die nukleäre KCTD5-Lokalisation der KCTD5-Proteine und somit die räumliche Nähe oder die stabile strukturelle Dimerisierung und damit eine mögliche KCTD5-Konformationsänderung für die Interaktion mit ZNF711 maßgeblich sind.

Die für die Interaktion mit ZNF711 essentiellen KCTD5-Proteindomänen wurden nicht genau identifiziert, der C-Terminus bis Aminosäure 160 ist jedoch entbehrlich. Für eine detaillierte Domänenanalyse müsste die Interaktion zwischen aus Zytoplasma oder Nukleus isolierten KCTD5-Proteinen und -Mutanten mit ZNF711 *in vitro* mit und ohne aufgereinigtes Cullin3 erfasst werden.

Sowohl die KCTD5- als auch die Cullin3-Überexpression führte zu einer Proteinzunahme des exogenen FLAG-ZNF711 (Abb. 4.21). Der ZNF711-Proteinanstieg konnte erst ab einem bestimmten Schwellenwert von kotransfizierten KCTD5- oder Cullin3-Expressionskonstrukten beobachtet werden, sodass die Komplexbildung anscheinend eine bestimmte Menge an KCTD5-Dimeren oder Cullin3 in der Zelle erfordert. Die Tatsache, dass die nukleär lokalisierte KCTD5-1/191-Mutante bereits bei niedrigen Konzentrationen zu einem ähnlich starken Anstieg der YFP-ZNF711-Proteinkonzentration führt wie das Wildtyp-Protein bei sehr hohen Konzentrationen (Abb. 4.22), spricht dafür, dass durch die KCTD5-Überexpression die Anzahl der KCTD5-Dimere steigt, die laut Untersuchungen des Western Blots eine sehr stabile Struktur bilden und zu einem geringen Teil immer in der Zelle vorhanden sind. Die Dimerisierung leitet womöglich die KCTD5-Pentamerisierung und die Translokation in den Nukleus ein, wie die Trimerbildung des KCTD5-1/234 mit dem KCTD5-1/191 zeigte (Abb. 4.2). Das kotransfizierte Cullin3 erhöht die KCTD5-Bindung an ZNF711. Denkbar wäre deswegen eine durch Cullin3

eingeleitete KCTD5-Konformationsänderung [70]. Für Keap1, einen zytoplasmatischen Cullin3-Substratadapter mit einer BTB-Domäne, wurden beispielsweise eine geöffnete und eine geschlossene Konformationen beschrieben [222]. Durch Dimerisierung und Änderung seiner Konformation reguliert Keap1 für sein Substrat Nrf2 Stabilität und Translokation zwischen Nukleus und Zytoplasma [64, 223].

Die ZNF711-Proteinzunahme durch den KCTD5-Cullin3-Komplex beruhte auf der Stabilisierung des ZNF711 Proteins (Abb. 4.24) und damit auf einer nicht-proteolytischen Funktion des KCTD5-Cullin3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes. Die ZNF711-Halbwertszeit ist jedoch von dem Protein-Tag abhängig: Der in einigen Untersuchungen verwendete Myc-Tag mit 6 Wiederholungen des Myc-Epitops scheint die Halbwertszeit von ZNF711 artifiziell zu erhöhen und führte daher zu einer starken Nivellierung der KCTD5-Cullin3-Effekte (Abb. 4.23). Für die Beurteilung der physiologischen Regulation von ZNF711 wurden daher vorzugsweise die Ergebnisse mit dem FLAG-ZNF711-Fusionsprotein herangezogen, welches sich durch einen sehr viel kürzeren Fusionsanteil auszeichnet. Der Vergleich zum endogenen ZNF711 fehlte jedoch, sodass die Stabilisierung des ZNF711-Proteins durch KCTD5-Cullin3 nur am Beispiel des exogenen FLAG-ZNF711 überprüft werden konnte.

5.3.2 Der Einfluss von KCTD5-Cullin3 auf ZNF711 im Verlauf des Zellzyklus

Zusätzlich zu der verstärkten Interaktion zwischen KCTD5 und ZNF711 leitet Cullin3 eine ZNF711-Translokation in das Zytoplasma ein, die ohne Cullin3-Überexpression viel schwächer ausfällt und in der S-Phase am deutlichsten auftritt (Abb. 4.26). Steigende KCTD5-1/234 und Cullin3-Expression führen zu einer ZNF711-Proteinzunahme, die mit der nukleär lokalisierten KCTD5-1/191 Deletionsmutanten schon bei geringen Konzentrationen beobachtet wurde (Abb. 4.21 und Abb. 4.22). Diese durch KCTD5-Cullin3 vermittelte ZNF711-Modifikation, die das Protein stabilisiert, korreliert nicht mit seiner Translokation in das Zytoplasma: Die zytoplasmatische Lokalisation fiel in Gegenwart von KCTD5-1/191 im Vergleich zum Volllänge-KCTD5 schwächer aus, wahrscheinlich durch die starke, permanente KCTD5-1/191 Präsenz im Zellkern.

Eine deutliche Veränderung in der Proteinmenge des exogenen ZNF711 wurde im Verlauf des Zellzyklus kaum beobachtet, aber in der S-Phase erfolgt ein minimaler Rückgang der ZNF711-Proteinmenge (Abb. 4.27). Möglicherweise ist der durch KCTD5 und Cullin3 modifizierte Anteil des gesamten ZNF711 unabhängig vom Zellzyklus zu gering für eine quantitative Auswertung, denn nur ein geringer Teil des KCTD5-Volllänge-Proteins dimerisiert in der Zelle. Denkbar ist deswegen eine KCTD5-Cullin3-abhängige Regulation der ZNF711-Funktion durch Stabilisierung und die KCTD5-bedingte Steuerung der

ZNF711-Lokalisation während des Zellzyklus, die zusätzlich durch die Cullin3-RING-Ligase reguliert wird. KCTD5 und Cullin3 selbst könnten in ihrer Funktion durch Zellzyklusfaktoren gesteuert sein. Die Applikation von siRNA's gegen ZNF711 zeigte eine Beteiligung von ZNF711 an der Regulation der Mitose, denn der ZNF711 "Knock-down" rief nach Kittler *et al.* einen Zellteilungsdefekt durch gestörte Spindelassemblierung oder Chromosomenaggregation hervor [103]. Aufgrund der großen Anzahl der beschriebenen ZNF711-Bindestellen bei über 1000 Genen wäre dies jedoch zu erwarten [96].

5.3.3 ZNF711 als Transkriptionsfaktor

Zink-Finger sind nicht nur bei Protein-DNA, sondern auch bei Protein-Protein-Interaktionen von entscheidender Bedeutung. Die im Yeast-two-hybrid-Screen gefundene, für die Bindung an KCTD5 ausreichende ZNF711-Region liegt zwischen den Aminosäuren 476-733 und beinhaltet 9 Zink-Finger, obwohl die minimale, an KCTD5-bindende ZNF711-Sequenz nicht näher charakterisiert wurde. Durch diese Wechselwirkung zwischen KCTD5 und ZNF711 könnte die ZNF711-Bindung an DNA oder an seine Interaktionspartner auch direkt beeinflusst werden.

Das Einsetzen von shRNA gegen ZNF711 hat in HEK293-Zellen einen repressiven Effekt auf die *JARID1C*-, *C2orf34*- und *PCBP2*-Genexpression, was ZNF711 zwar als Transkriptionsfaktor aber nicht zwingend als Transkriptionsaktivator charakterisiert [96]. Die Untersuchungen der ZNF711-Funktion bei einem Reporter-gen-Assay im Rahmen dieser Arbeit bescheinigten ZNF711 eine repressorische Funktion in HeLa-Zellen und konnten bei Versuchen in HEK293-Zellen eine tendenzielle Aktivatorfunktion zeigen (Abb. 4.28). Obwohl steigende Konzentrationen des Zink-Finger Proteins tendenziell zu einem Anstieg der Reporter-genexpression mit der *PCBP2*-Sequenz in beiden Zelltypen führten (Abb. 4.29), ist es aufgrund starker Differenzen zwischen den Messwerten einzelner Versuche kaum möglich, ZNF711 auf Basis durchgeführter Experimente eindeutig als einen Transaktivator oder Transrepressor zu charakterisieren. Interessanterweise ist die *JARID1C*- und *C2orf34*-Grundexpression in HEK293-Zellen stärker als in HeLa-Zellen, während *PCBP2* vergleichbar stark in beiden Zelltypen exprimiert wird (The Human Protein Atlas). Möglicherweise findet eine ZNF711-vermittelte zelltypspezifische Genregulation statt, die zu einer *JARID1C*- und *C2orf34*-Repression in HeLa und einer vergleichbaren Aktivierung der *PCBP2*-Genexpression in HeLa- und HEK293-Zellen führt.

Die KCTD5-Kotransfektion führte zur Repression der Reporter-genexpression: Sie verstärkte die repressorische ZNF711-Funktion in HeLa-Zellen und minderte die ZNF711-vermittelte Genaktivierung in HEK293-Zellen (Abb. 4.28). Verstärkte

Reportergenrepression des PCBP2-Vektors wurde in HeLa-Zellen allein durch KCTD5-Transfektion gemessen (Abb. 4.29), wobei dieser Effekt möglicherweise durch die Interaktion mit dem endogenen ZNF711-Protein vermittelt wird.

Trotz der experimentellen Schwankungen deuten die Versuchsergebnisse auf eine zelltypspezifische ZNF711-KCTD5-vermittelte Genregulation. KCTD5 könnte die ZNF711-DNA-Bindungsaktivität entweder direkt durch Wechselwirkung mit ZNF711 oder indirekt durch eine KCTD5-vermittelte Modifikation beeinflussen.

Obwohl sie häufig für die Untersuchung der Wirkung von putativen Transkriptionsfaktoren auf die entsprechenden responsiven Promotorelemente eingesetzt werden, handelt es sich bei Reportergenuntersuchungen doch um teilweise artifizielle Systeme, welche die physiologische Regulation nicht immer vollständig abbilden. Dies könnte erklären, warum ZNF711, welches von Kleine-Kohlbrecher und Kollegen als Transkriptionsaktivator beschrieben wurde, gerade in HeLa-Zellen auch reprimierende Effekte zeigte [96]. Zudem binden die verwendeten DNA-Sequenzelemente wahrscheinlich außer ZNF711 noch weitere Transkriptionsfaktoren, deren Bindung wiederum Gegenstand einer Regulation durch ZNF711 sein könnte. In diesem Zusammenhang konnte Kleine-Kohlbrecher zeigen, dass ZNF711 genregulatorische Funktion ausübt und mit PHF8, einer Histon-Lysin-Demethylase, interagiert [96]. Möglich wäre, dass ZNF711 Histonmodifikationen steuert und dadurch bei der DNA-Regulation als Transaktivator bzw. Transrepressor fungiert. Im Gegensatz zur Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren werden solche Histonmodifikationen in Reportergen-Assays nur unzureichend abgebildet.

Unter den putativen ZNF711-Interaktionspartnern befinden sich beispielsweise HIST1H3A (*histone cluster 1 H3a*) und JARID1C (*lysine-specific Histondemethylase 5C*), welche laut Kleine-Kohlbrecher durch ZNF711 reguliert wird [96]. Falls ZNF711 nur mit weiteren Faktoren wie PHF8 die Genexpression durch Methylierung reguliert, wird kein Effekt auf die Genexpression von einem Plasmid detektiert werden können. Die Genregulation durch ZNF711 sollte daher in zukünftigen Untersuchungen am besten durch die endogene mRNA-Menge mittels Northern Blot untersucht werden. Ein weiteres Problem könnte am Vorhandensein von nur einer Bindungssequenz liegen. Die ZNF711-Bindungsintensität wurde an ausgewählten DNA-Sequenzen nicht untersucht, sodass möglicherweise aufgrund zu geringer DNA-ZNF711-Interaktion keine Auswirkungen auf die Genexpression detektiert wurden. Eine Alternative wäre ein Gal4-Fusionssystem, in welchem die isolierte Bindung von ZNF711 an seine Bindesequenzen untersucht werden könnte.

5.4 Interaktion des KCTD5-Cullin3-Ligase-Komplexes mit FAM193B

FAM193B/LOC54540/IRIZIO ist ein zytoplasmatisches Protein ohne konservierte Strukturdomänen. Laut verschiedenen Datenbanken ist seine mRNA in einer Vielzahl von menschlichen Geweben und in vielen Tumorzellen vorhanden, wobei eine verstärkte mRNA Expression in Milz, Hirngewebe und weiblichen Reproduktionsorganen detektiert wurde (<http://biogps.org> Genportal, The Human Protein Atlas, RefExA-Datenbank). Die Untersuchungen von Picchione und seinen Kollegen und die Suche in Datenbanken bestätigen trotz der zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins die Präsenz eines Kernwanderungssignals KRARHKLKKK (Hum-mPLoc 2.0; NLS Mapper; PsortII prediction; ESLpred; [82]).

Das FAM193B-Protein selbst konnte nach Inhibition des nukleären Transports durch Leptomycin B im Nukleus detektiert werden [82]. Unklar ist, unter welchen Bedingungen FAM193B nukleär lokalisiert vorliegt. Trotz seiner NLS-Sequenz kommt das Protein auch während der Zellteilung ausschließlich perinukleär vor. Diese verstärkt perinukleäre FAM193B-Lokalisation kann unmittelbar nach der Zellteilung detektiert werden, wo das ansonsten homogen im Zytoplasma verteilte FAM193B teilweise mit Tubulin kolokalisiert (Abb. 4.30, B). Aufgrund der perinukleären KCTD5-Lokalisation während der Zellteilung (Abb. 4.4) ist es möglich, dass FAM193B zusammen mit KCTD5 bei der Zytokinese oder dem Transport von zellulären Faktoren zwischen Zytoplasma und Zellkern eine Rolle spielt. Die Applikation einer siRNA gegen FAM193B führte in einer RNA-Interferenz-Studie zu einer Störung in der Zellteilung [103].

Neben dem beschriebenen PAX3-FOXO1 sind laut verschiedenen proteomischen Studien Ataxin-1, ein Chromatinbindungsfaktor, CDC25 (*cell division cycle 25A*) und MAPK8 (*mitogen-activated protein kinase 8*) unter den putativen FAM193B-Interaktionspartnern [224]. Aufgrund dieser nukleär und zytoplasmatisch lokalisierten Interaktionspartner lässt sich vermuten, dass FAM193B an vielen zellulären Prozessen beteiligt sein könnte, wie die Zellteilung, Zellproliferation oder Proteinregulation.

Für die Interaktion mit FAM193B ist die zytoplasmatische KCTD5-Lokalisation von zentraler Bedeutung (Abb. 4.31). Die C-terminalen KCTD5-Aminosäuren 171 bis 234 sind für die Interaktion nicht erforderlich und auch der Bereich zwischen den Aminosäuren 145 und 171 ist wahrscheinlich entbehrlich. Der letztere Befund ist allerdings aufgrund einer geringen Proteinexpression der KCTD5-1/145-Mutante mit leichten Unsicherheiten behaftet. Wie bei ZNF711 ist auch die Bindung von KCTD5 an FAM193B von der zellulären KCTD5-Lokalisation abhängig, allerdings auf Grund der unterschiedlichen subzellulären Lokalisation dieser KCTD5-Interaktionspartner mit

unterschiedlichen Vorzeichen. Für die KCTD5 und FAM193B Interaktion muss KCTD5 im Zytoplasma lokalisiert sein. Möglicherweise ist die Lokalisation in demselben Zellkompartiment für die Interaktion von entscheidender Bedeutung oder die zytoplasmatischen KCTD5-Monomere weisen eine von Dimeren verschiedene Struktur des C- oder N-Terminus auf, die maßgeblich für die Interaktion mit FAM193B ist. Möglicherweise bedarf es auch einer durch die Bindung an Cullin3 modifizierten KCTD5-Proteinstruktur, die erst eine starke Wechselwirkung mit FAM193B ermöglichen, denn trotz einer starken Interaktion zwischen FAM193B und KCTD5 scheint Cullin3 diese Bindung noch weiter zu verstärken (Abb. 4.32). Diese Fragestellung könnte in zukünftigen Untersuchungen an KCTD5-Mutanten adressiert werden, die keine Dimere und auch keine Oligomere mehr ausbilden können [64].

Die FAM193B-Proteinzunahme nach KCTD5- oder Cullin3-Proteinüberexpression deutet auf eine positive regulatorische Rolle des Ubiquitin-Ligase-Komplexes hin (Abb. 4.33). Laut Udeshi *et al.* wird der FAM193B Lysinrest 567 ubiquitiniert [85]. Die Ubiquitinierung des Lysinrestes 567 ist wohl nicht in proteasomale Degradation involviert [85], aber ob der positive Effekt der KCTD5 und Cullin3 Proteine auf FAM193B auf einer Ubiquitinierung beruht, muss noch experimentell untersucht werden. Die FAM193B-Ubiquitinierung wurde in dieser Arbeit zwar nachgewiesen, eine K567R-FAM193B-Mutante konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr untersucht werden.

Um den KCTD5-Cullin3-Einfluss auf FAM193B zu klären, bedarf es Untersuchungen des endogenen FAM193B-Proteins, damit künstliche Tags keinen Einfluss auf die Proteinlebensdauer ausüben, wie dies bei dem Myc-getaggten ZNF711-Protein gezeigt wurde, oder keine sterischen Hinderungen bei Wechselwirkungen mit KCTD5-Cullin3 darstellen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die schwache Interaktion zwischen FLAG-FAM193B, Myc-KCTD5 und Myc-Cullin3 den Myc-Tags an Ligase-Komplex-Proteinen verschuldet ist (Abb. 4.32).

5.5 Evidenzen für eine Funktion von KCTD5 als Substratadapter für Cullin3-Ubiquitin-Ligasen

Die Ausbildung trimerer Komplexe von ZNF711-KCTD5-Cullin3 und FAM193B-KCTD5-Cullin3 und die ähnlichen funktionellen Auswirkungen einer KCTD5- oder Cullin3-Überexpression auf die potentiellen Substrate ZNF711 und FAM193B befinden sich im Einklang mit der Ausgangshypothese der Arbeit: einer Rolle von KCTD5 als spezifischer Substratadapter für Cullin3-Ubiquitin-Ligasen.

Dass potentielle zelluläre Substrate des Cullin3-KCTD5-Komplexes sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert sind, erscheint zunächst widersprüchlich. Allerdings wurde Cullin3 bereits in sehr unterschiedlichen Zellkompartimenten detektiert: nach Neddylierung an der Zellmembran [225], im ER, im Zellkern und im Zytoplasma [63, 226]. Auch KCTD5 scheint durch seine Dimerisierung und Oligomerisierung zwischen Zytoplasma und Nukleus zu translozieren.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurde ein hypothetisches Modell für die Funktion von KCTD5 als potentieller Cullin3-Ubiquitin-E3-Ligase-Substratadapter entwickelt. Dieses ist in der Abb. 5.1 dargestellt.

Für nukleäre Substrate muss zunächst eine Dimerisierung von KCTD5 erfolgen, die möglicherweise durch eine teilweise Maskierung der C-terminalen Aminosäuren 203-234 vermittelt wird. Dadurch wird das Protein in den Nukleus transloziert und kann dort an Cullin3 und das nukleäre Substrat binden. Nach erfolgter Substratubiquitinierung oder durch Einfluss eines weiteren Proteins erfolgt eine Monomerisierung des KCTD5-Anteils des Komplexes, die den Export von KCTD5 in das Zytoplasma einleitet. Aus den vorhandenen Daten kann jedoch nicht eindeutig geschlussfolgert werden, ob das Substrat und Cullin3 dabei an KCTD5 gebunden bleiben. Für zytoplasmatische Interaktionspartner von KCTD5 wie FAM193B findet die Bindung wahrscheinlich an die monomere KCTD5-Form im Zytoplasma statt, scheint aber auch hier durch die zusätzliche Bindung von Cullin3 unterstützt zu werden.

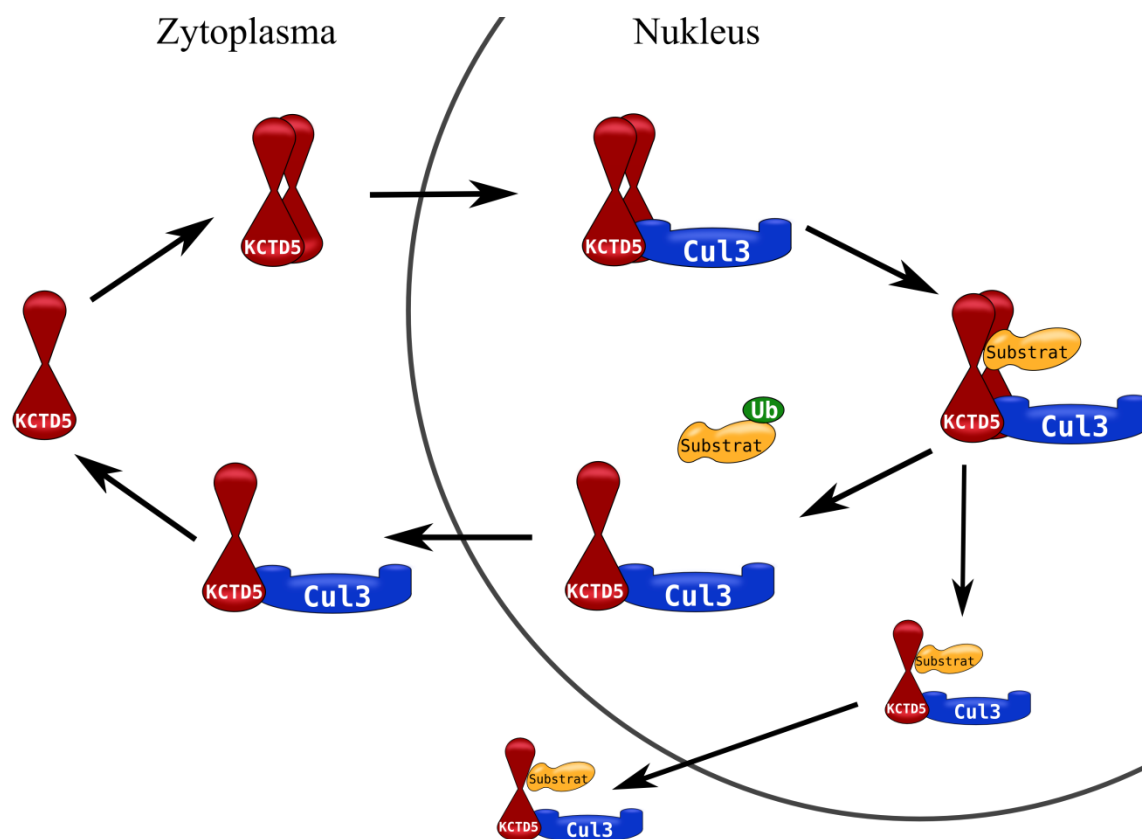


Abb. 5.1: Modell der Regulation nukleärer Substrate durch den KCTD5-Cullin3-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex. Nach der Dimerisierung (Oligomerisierung) im Zytoplasma translozieren KCTD5-Dimere (Oligomere) in den Zellkern und binden an Cullin3 und KCTD5-Substrate, wobei Cullin3 die Bindung von KCTD5 an das jeweilige Substrat verstärken kann. Die Substratmodifikation (als Beispiel hier die Mono-Ubiquitinierung) könnte zu einer Monomerisierung von KCTD5 führen, die einen Export des Proteins in das Zytoplasma zur Folge hat, mit oder ohne gebundenes Cullin3. Parallel dazu könnte eine geringe Menge des KCTD5-Cullin3-Komplexes mit einem gebundenen Substrat ins Zytoplasma transloziert werden.

Die Trimerbildung des KCTD5-1/234 mit dem KCTD5-1/191-Dimer und anschließende KCTD5-1/234-Translokation in den Zellkern erhärten die These, dass KCTD5 im Zytoplasma Dimere und sogar Oligomere ausbildet, welche eine nukleäre Lokalisation einleiten. Dabei vollzieht KCTD5 wahrscheinlich eine Konformationsänderung. Es konnte gezeigt werden, dass die dimerisierenden KCTD5-Deletionsmutanten stärker an Cullin3 binden [11], sodass die Deletion bestimmter C-terminaler Bereiche möglicherweise die KCTD5-Konformation zugunsten der Interaktion mit Cullin3 verändert. Diese Konformationsänderung könnte für die Bindung an seine nukleären Substrate MCM7 oder ZNF711 ebenfalls notwendig sein und wird möglicherweise durch Cullin3 stabilisiert: Die KCTD5-Bindung an seine Substrate wird in Anwesenheit von Cullin3 verstärkt.

Ein nukleärer Export von KCTD5 setzt wahrscheinlich eine KCTD5-Monomerisierung voraus, die durch KCTD5-Cullin3 vermittelte Substratmodifikation oder ein weiteres Protein eingeleitet wird. Daran ist der C-Terminus von KCTD5 wahrscheinlich erneut maßgeblich beteiligt: Die Aminosäuren 203-234 sind für die Interaktion mit Ubiquitin-Ligase-Substraten zwar vernachlässigbar, aber ihre Deletion führt zu stabilen, nukleär

verbleibenden KCTD5-1/203-Dimeren. Die großen Rep78/Rep68-Proteine des Adeno-assoziierten Virus Typ 2 verhindern möglicherweise durch Interaktion mit den KCTD5-Aminosäuren 203-234 einen nukleären KCTD5-Export. Die KCTD5-Monomerisierung und Relokation ins Zytoplasma könnte selbst von Cullin3 eingeleitet werden: Durch Cullin3-Überexpression transloziert KCTD5 trotz der großen AAV-2 Rep78/Rep68-Proteine wieder ins Zytoplasma [202], was für einen gemeinsamen Export von KCTD5 und Cullin3 als Komplex spricht. Sogar der gesamte KCTD5-Cullin3-Substrat-Komplex könnte in geringen Mengen ins Zytoplasma translozieren. Dies könnte die Kopräzipitation der KCTD5 monomeren und dimeren Form bei der MCM7- und ZNF711-Immunpräzipitation erklären und auch das Auftreten von ZNF711 im Zytoplasma bei der Cullin3-Kotransfektion (Abb. 4.6, A; Abb. 4.20 und Abb. 4.26).

Im Einklang mit diesem Modell setzt auch die Bildung eines weiteren Cullin3-Ubiquitin-Komplexes eine Dimerisierung des BTB-Domänen Substratadaper-Proteins SPOP voraus [227]. Die Dimerisierung ist bei einigen weiteren Cullin3-Substratadaptern eine wichtige Voraussetzung für die Substraterkennung [64, 227, 228] und das KCTD11-Monomer wurde sogar als eine inaktive Form beschrieben [229]. Bei KCTD5 könnte die Dimerisierung/Oligomerisierung von zellulären Signalwegen oder vom Zellzyklus abhängig sein, um KCTD5-Lokalisation und Bindung an seine zytoplasmatischen oder nukleären KCTD5-Substrate zu regulieren [67].

Die Untersuchung der zytoplasmatischen Translokation des gesamten KCTD5-Cullin3-Komplexes mit MCM7 oder ZNF711 ließe sich eindrucksvoll und effektiv durch Zellfraktionierung nachweisen. Der Einfluss von Cullin3 auf die KCTD5-Bindung an seine Substrate ließe sich durch eine effektive Inhibition der endogenen Cullin3-Proteinexpression, beispielsweise mittels RNA-Interferenz, untersuchen. Eine *in vitro* Untersuchung der Interaktion zwischen KCTD5 und seinen Substraten in Abwesenheit der Cullin3-Ligase wäre ebenfalls interessant und würde die Frage nach einer Notwendigkeit der Interaktion zwischen KCTD5 und Cullin3 für die Bindung an die Substrate beantworten.

Eine durch den KCTD5-Cullin3-Komplex vermittelte Ubiquitinierung konnte weder bei MCM7 noch bei ZNF711 explizit gezeigt werden. Für Cullin-E3-Ligasen wurde in einigen Fällen eine Ubiquitinierung nur nach vorangegangener Phosphorylierung beschrieben [56] oder sie konnte nur *in vitro* mittels massenspektrometrischer Untersuchungen gezeigt werden, wie die Ubiquitinierung von BMI1 durch den CULLIN3-SPOP-ROC1-Komplex oder die PLK1-Ubiquitinierung durch KLHL22 [69, 230]. Dabei wurde keine zusätzliche Bande bei der Immunpräzipitation zwischen PLK1 und KLHL22 detektiert. Dass bei den in dieser Arbeit untersuchten KCTD5-Substraten ebenfalls keine zusätzliche, potenziell modifizierte Bande detektiert wurde, die eindeutig als Folge der

Interaktion mit dem Ubiquitin-Ligase-Komplex zu identifizieren war, bedeutet daher keinesfalls, dass KCTD5-Cullin3 nicht an der Ubiquitinierung dieser Proteine beteiligt ist.

5.6 Ausblick

Bei einigen Vertretern der KCTD-Familie wurden Mutationen im Zusammenhang mit dem Auftreten von Krankheitsbildern beschrieben: Der ATP5H/KCTD2-Lokus assoziiert mit Alzheimer [231] und Mutationen in KCTD7 assoziieren mit progressiver Myoklonusepilepsie [232, 233].

Bei KCTD5 wurden noch keine Mutationen beschrieben, die mit einem Krankheitsbild assoziiert werden können. Anhand der in dieser Arbeit charakterisierten KCTD5-Interaktionspartner und vieler Proteine, die laut verschiedener Datenbanken mit KCTD5 interagieren, könnte KCTD5 bei Zytokinese, Gentranskription und Signaltransduktion funktionell beteiligt sein (Abschnitt 1.6).

Eine Vielzahl putativer KCTD5-Interaktionspartner sind in die Zellteilung involviert, wie beispielsweise NEK6 (Chromosomensegregation und Spindelbildung), CKAP5 (Polorganisation des Spindelapparates) oder GIT2 (Zytoskelett und Zellmotilität). Möglicherweise werden diese Proteine durch KCTD5 in ihrer Funktion reguliert, deswegen wäre es zu erwarten, dass eine KCTD5-Inhibition mittels RNA-Interferenz die Zellteilung negativ beeinträchtigt [103].

Ein genregulatorischer Einfluss von KCTD5 über ZNF711 konnte in dieser Arbeit nur tendenziell nachgewiesen werden. Weitere putative KCTD5-Interaktionspartner EP300 (Histonacetyltransferase), NXF1 (mRNA Exportfaktor) und ELF3 (ein transkriptioneller Aktivator der ETS) deuten ebenfalls auf eine genregulatorische KCTD5-Funktion hin.

Mit ILK, TRIP6 und PRKAB2 als Interaktionspartner könnte KCTD5 auch in Regulation verschiedener zellulärer Signaltransduktionskaskaden involviert sein.

Aufgrund der Vielfältigkeit seiner putativen, sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär lokalisierten zellulären und viralen Interaktionspartner und seiner Fähigkeit, unter bestimmten Bedingungen in den Nukleus zu translozieren, stellt KCTD5 ein interessantes Protein mit vielen potenziellen regulatorischen Funktionen dar. Die genauen Mechanismen und potenziell beteiligten Modifikationen, die zur KCTD5- und Cullin3-vermittelten Erhöhung der Proteinspiegel von FAM193B und ZNF711 führen, bedürfen weiterer Aufklärung. Dies würde zu einer wesentlich verbesserten Vorstellung der potenziellen Funktionen von Cullin3-basierten Ubiquitin-Ligase-Komplexen führen und unter Umständen neue Regulations-mechanismen aufzeigen. Außerdem würde es unser Verständnis der BTB/POZ-Substratadapter und der KCTD-Proteinfamilie erweitern, deren Vertreter in zahlreiche zelluläre Prozesse und Krankheitsbilder involviert sind.

6 Zusammenfassung

KCTD5 (Potassium channel tetramerization domain containing protein 5) wurde erstmalig als zellulärer Bindungspartner der großen regulatorischen Rep78/Rep68-Proteine des Adeno-assoziierten Virus (AAV-2) identifiziert. Es gehört zu der KCTD-Familie, deren Vertreter sich durch eine N-terminal lokalisierte Domäne mit ausgeprägter Homologie zur T1-Domäne der Kaliumkanal-bildenden Proteine und zur BTB/POZ-Domäne auszeichnen. Viele bisher charakterisierte Proteine mit der BTB/POZ-Domäne sind Substratadapter für Cullin3-basierte Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexe und auch für KCTD5 konnte eine direkte Interaktion mit Cullin3, aber nicht mit anderen Cullin-Proteinen nachgewiesen werden.

Für ein verbessertes Verständnis möglicher zellulärer Funktionen von KCTD5 wurden in dieser Arbeit zunächst seine Interaktionen mit putativen, im Yeast-two-hybrid-System identifizierten zellulären Bindungspartnern, dem Replikationsfaktor MCM7, dem Zink-Finger Protein ZNF711 und dem bisher kaum charakterisierten Protein FAM193B im Detail untersucht.

Das Volllänge-KCTD5-Protein ist überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert, am Ende der G2-Phase des Zellzyklus kommt es jedoch in synchronisierten Zellen zu einer verstärkten nukleären Lokalisation. Eine solche kann auch durch die Deletion von C-terminalen KCTD5-Aminosäuren oder durch die Expression der Rep78/Rep68-Proteine, die mit diesen Aminosäuren in Wechselwirkung treten, erreicht werden. In der biochemischen Analyse zeichnen sich diese C-terminalen KCTD5-Deletionsmutanten durch die Bildung sehr stabiler Dimere aus.

Für alle drei untersuchten putativen zellulären Interaktionsspartner konnte in Säugerzellen eine lokalisationsabhängige Bindung an KCTD5 nachgewiesen werden. Die nukleär lokalisierten KCTD5-Dimere/Oligomere interagieren dabei verstärkt mit MCM7 und ZNF711, während überwiegend im Zytoplasma lokalisierte Deletionsmutanten und das Wildtyp-Protein eine starke Interaktion und ausgeprägte Kollokalisierung mit FAM193B aufweisen. Für ZNF711 und MCM7 ist hingegen eine Kollokalisierung mit dem Wildtyp-Protein überwiegend in der G2-Phase zu beobachten, was auf mögliche funktionelle Beteiligungen an der Zytokinese hindeutet.

Die Bildung trimerer Komplexe von KCTD5 und Cullin3 mit den drei KCTD5-Bindungspartnern lieferte deutliche Hinweise, dass diese als Substrate des KCTD5-Cullin3-Komplexes dienen könnten. Für keines der drei Proteine konnte jedoch eine KCTD5-Cullin3-vermittelte Poly-Ubiquitinierung und Proteasom-abhängige Degradation nachgewiesen werden. Für ZNF711 führen steigende KCTD5- oder Cullin3-

Konzentrationen im Gegenteil zu einer Zunahme der ZNF711-Proteinmenge, die auf der Ebene der Proteinstabilisierung vermittelt wird. Die KCTD5-Cullin3-Komplexe könnten also die Funktion von ZNF711 über eine experimentell schwer nachzuweisende Mono-Ubiquitinierung regulieren. Um eine solche regulatorische Funktion näher zu untersuchen, wurden Reporter-gen-Assays mit ZNF711-spezifischen Bindestellen durchgeführt. Dabei ergab sich keine Korrelation zwischen der Funktion von ZNF711 als transkriptioneller Regulator und der KCTD5-vermittelten Regulation der ZNF711-Proteinmenge. Auch die FAM193B-Proteinmenge wird durch KCTD5 reguliert, ähnlich wie bei ZNF711 kommt es zu einer Zunahme der Proteinspiegel in Gegenwart hoher KCTD5- oder Cullin3-Konzentrationen. Ob die Regulation von ZNF711 und FAM193B tatsächlich durch KCTD5-vermittelte Mono-Ubiquitinierung erfolgt, muss in weiterführenden Versuchen untersucht werden.

Für MCM7 konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen eine Poly-Ubiquitinierung eindeutig nachgewiesen werden, die nicht auf die bisher charakterisierte Akzeptor-Stelle beschränkt war. Weder für die Poly-Ubiquitinierung noch für die damit verbundene Regulation der MCM7-Proteinmenge konnte jedoch ein eindeutiger Einfluss einer veränderten zellulären KCTD5- oder Cullin3-Konzentration gefunden werden.

Da KCTD5 sowohl an die AAV-2 Rep78/Rep68-Proteine als auch an MCM7 bindet und MCM7 wiederum als Interaktionspartner von Rep78/Rep68 und essenzieller Faktor für die AAV-2-DNA-Replikation beschrieben war, stellte der AAV-2 Replikationszyklus einen interessanten Ansatz für die Untersuchung der physiologischen Funktion von KCTD5 dar. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass es nach Expression von Rep78/Rep68 zu einer Schwächung der Bindung zwischen KCTD5 und MCM7 kommt. Ein Einfluss auf die MCM7-Proteinmenge und Ubiquitinierung ließ sich jedoch nicht nachweisen. Da auch die Modulation der MCM7-Konzentration im Gegensatz zu den Literaturdaten keinen Einfluss auf die AAV-2-Replikation ausübte, kann eine mögliche Beteiligung von KCTD5 am AAV-2-Replikationszyklus daher nicht endgültig bewertet werden.

7 Abstract

KCTD5 (potassium channel tetramerization domain containing protein 5) has been identified as interaction partner of the large regulatory Rep78/Rep68 proteins of adeno-associated virus (AAV-2). It belongs to the KCTD family characterized by a N-terminal T1 and BTB/POZ homologous domain. Various proteins with the BTB/POZ domain function as substrate adaptors for Cullin3 ubiquitin E3 ligases and KCTD5 interacts directly with Cullin3 but not with other proteins of the Cullin family.

The aim of this work was to unravel possible functions of KCTD5 through a detailed investigation of the interaction between KCTD5 and its putative binding partners MCM7, ZNF711 and FAM193B identified by yeast two-hybrid screening.

The KCTD5 wild type protein localizes predominantly to the cytoplasm but translocates into the nucleus at the end of the G2 phase in synchronized HeLa cells. KCTD5 nuclear translocation could also be induced by deletion of C-terminal amino acids or overexpression of the AAV-2 Rep proteins, which interact with the same C-terminal KCTD5 region. The C-terminal KCTD5 deletion mutants are characterized by the formation of very stable dimers.

The interaction between KCTD5 and its putative cellular binding partners was verified in mammalian cells and strongly depended on the subcellular localization of the respective protein. The cytoplasmic FAM193B preferentially interacted with the wild type KCTD5 protein and mutants located in the cytoplasm. Strong interaction with the mainly nuclear MCM7 and ZNF711 proteins required nuclear translocation of KCTD5 associated with dimer or oligomer formation. The wildtype KCTD5 colocalized with MCM7 and ZNF711 during the late G2 phase of the cell cycle suggesting a KCTD5 involvement in cytokinesis. The formation of trimeric complexes composed of KCTD5, Cullin3 and the respective KCTD5 binding partner provided strong hints that these proteins were substrates for KCTD5-Cullin3 ubiquitin E3 ligase complexes. However, for none of them an influence of the modulation of KCTD5 expression levels on polyubiquitination and proteasome-dependent degradation could be demonstrated. On the contrary, increasing KCTD5 or Cullin3 concentrations lead to an increase in ZNF711 protein levels through stabilization of the protein. It may be speculated that ZNF711 cellular function is regulated by a difficult to detect monoubiquitination mediated by KCTD5-Cullin3 complex. In order to investigate such a ZNF711 regulatory function, reporter gene assays were carried out with ZNF711-specific DNA binding sites. Transcriptional ZNF711 function, however, did not correlate with the increase in protein expression induced by KCTD5. Overexpression of KCTD5 or Cullin3 also led to increasing steady state protein levels of the second KCTD5

binding partner analyzed, the FAM193B protein. A possible regulation of ZNF711 and FAM193B activity by Cullin3-KCTD5 mediated monoubiquitination will require further investigations.

In line with published results, MCM7 polyubiquitination could be demonstrated, which was not exclusively limited to the described L2G Box acceptor site. However, altering cellular KCTD5 or Cullin3 concentration had no influence on the MCM7 polyubiquitination or MCM7 protein amount.

As could be shown, KCTD5 interacts with both the Rep78/Rep68-Proteins of AAV-2 and MCM7. MCM7 in turn was described as binding partner of Rep78/Rep68 and demonstrated to be essential for AAV-2 DNA-replication. Therefore an involvement of KCTD5 in the regulation of the AAV-2 replication cycle was studied. Whereas Rep78/Rep68 expression was able to weaken the interaction between KCTD5 and MCM7, it was not associated with changes in MCM7 protein levels and polyubiquitination. As opposed to previously published data, the modulation of MCM7 protein concentration did not influence AAV-2 DNA replication, so that a KCTD5 involvement in the AAV-2 replication cycle could not be evaluated conclusively.

8 Literaturverzeichnis

1. Zollman, S., et al., *The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10717-21.
2. Bardwell, V.J. and R. Treisman, *The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif*. Genes Dev, 1994. **8**(14): p. 1664-77.
3. Hunter, S., et al., *InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D306-12.
4. Birerdinc, A., et al., *Pro-apoptotic and antiproliferative activity of human KCNRG, a putative tumor suppressor in 13q14 region*. Tumour Biol, 2010. **31**(1): p. 33-45.
5. Stogios, P.J., et al., *Sequence and structural analysis of BTB domain proteins*. Genome Biol, 2005. **6**(10): p. R82.
6. Ahmad, K.F., C.K. Engel, and G.G. Prive, *Crystal structure of the BTB domain from PLZF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12123-8.
7. Pirone, L., et al., *Thermal and chemical stability of two homologous POZ/BTB domains of KCTD proteins characterized by a different oligomeric organization*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 162674.
8. Dementieva, I.S., et al., *Pentameric assembly of potassium channel tetramerization domain-containing protein 5*. J Mol Biol, 2009. **387**(1): p. 175-91.
9. Bayon, Y., et al., *KCTD5, a putative substrate adaptor for cullin3 ubiquitin ligases*. FEBS J, 2008. **275**(15): p. 3900-10.
10. Weger, S., et al., *Identification of a cytoplasmic interaction partner of the large regulatory proteins Rep78/Rep68 of adeno-associated virus type 2 (AAV-2)*. Virology, 2007. **362**(1): p. 192-206.
11. Rutz, N., *Charakterisierung des BTB-Domänen Proteins KCTD5, eines zellulären zytoplasmatischen Interaktionspartners der großen regulatorischen Proteine Rep78/68 des Adeno-assoziierten Virus vom Typ 2 (AAV-2)*, 2010.
12. Furukawa, M., et al., *Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(11): p. 1001-7.
13. Geyer, R., et al., *BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 783-90.
14. Bennett, E.J., et al., *Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics*. Cell, 2010. **143**(6): p. 951-65.
15. Skoblov, M., et al., *Protein partners of KCTD proteins provide insights about their functional roles in cell differentiation and vertebrate development*. Bioessays, 2013. **35**(7): p. 586-96.
16. Lange, S., et al., *Obscurin and KCTD6 regulate cullin-dependent small ankyrin-1 (sAnk1.5) protein turnover*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(13): p. 2490-504.
17. Canettieri, G., et al., *Histone deacetylase and Cullin3-REN(KCTD11) ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(2): p. 132-42.
18. De Smaele, E., et al., *Identification and characterization of KCASH2 and KCASH3, 2 novel Cullin3 adaptors suppressing histone deacetylase and Hedgehog activity in medulloblastoma*. Neoplasia, 2011. **13**(4): p. 374-85.
19. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system for protein degradation*. Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 761-807.

20. Hershko, A., et al., *Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown.* J Biol Chem, 1983. **258**(13): p. 8206-14.
21. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination.* Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
22. Hershko, A., et al., *Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(4): p. 1783-6.
23. Peng, J., et al., *A proteomics approach to understanding protein ubiquitination.* Nat Biotechnol, 2003. **21**(8): p. 921-6.
24. Kim, H.T., et al., *Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages.* J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17375-86.
25. Ciechanover, A., et al., *ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1365-8.
26. Thrower, J.S., et al., *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal.* EMBO J, 2000. **19**(1): p. 94-102.
27. Finley, D., et al., *Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(8): p. 5501-9.
28. Xu, P., et al., *Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation.* Cell, 2009. **137**(1): p. 133-45.
29. Deng, L., et al., *Activation of the I kappa B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain.* Cell, 2000. **103**(2): p. 351-61.
30. Spence, J., et al., *Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain.* Cell, 2000. **102**(1): p. 67-76.
31. Chen, Z.J., *Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway.* Nat Cell Biol, 2005. **7**(8): p. 758-65.
32. Roth, A.F. and N.G. Davis, *Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor receptor.* J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 8143-53.
33. Robzyk, K., J. Recht, and M.A. Osley, *Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast.* Science, 2000. **287**(5452): p. 501-4.
34. Garcia-Higuera, I., et al., *Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway.* Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 249-62.
35. Terrell, J., et al., *A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor.* Mol Cell, 1998. **1**(2): p. 193-202.
36. Pham, A.D. and F. Sauer, *Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila.* Science, 2000. **289**(5488): p. 2357-60.
37. Haglund, K., et al., *Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p. 461-6.
38. Hoege, C., et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO.* Nature, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
39. Stelter, P. and H.D. Ulrich, *Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation.* Nature, 2003. **425**(6954): p. 188-91.
40. Haas, A.L., et al., *Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation.* J Biol Chem, 1982. **257**(5): p. 2543-8.

41. Jin, J., et al., *Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1135-8.
42. Markson, G., et al., *Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network*. Genome Res, 2009. **19**(10): p. 1905-11.
43. Michelle, C., et al., *What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor?* J Mol Evol, 2009. **68**(6): p. 616-28.
44. Huibregtse, J.M., et al., *A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2563-7.
45. Lorick, K.L., et al., *RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11364-9.
46. Lovering, R., et al., *Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2112-6.
47. Bailly, V., et al., *Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 23360-5.
48. Bordallo, J., et al., *Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(1): p. 209-22.
49. Zachariae, W., et al., *Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins*. Science, 1998. **279**(5354): p. 1216-9.
50. Ohta, T., et al., *ROCI1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity*. Mol Cell, 1999. **3**(4): p. 535-41.
51. Furukawa, M., et al., *The CUL1 C-terminal sequence and ROCI1 are required for efficient nuclear accumulation, NEDD8 modification, and ubiquitin ligase activity of CUL1*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(21): p. 8185-97.
52. Seol, J.H., et al., *Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1614-26.
53. Kipreos, E.T., et al., *cul-1 is required for cell cycle exit in C. elegans and identifies a novel gene family*. Cell, 1996. **85**(6): p. 829-39.
54. Hori, T., et al., *Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8*. Oncogene, 1999. **18**(48): p. 6829-34.
55. Zheng, N., et al., *Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex*. Nature, 2002. **416**(6882): p. 703-9.
56. Feldman, R.M., et al., *A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p*. Cell, 1997. **91**(2): p. 221-30.
57. Skowyra, D., et al., *F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex*. Cell, 1997. **91**(2): p. 209-19.
58. Pintard, L., et al., *The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase*. Nature, 2003. **425**(6955): p. 311-6.
59. Xu, L., et al., *BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3*. Nature, 2003. **425**(6955): p. 316-21.
60. Lu, A. and S.R. Pfeffer, *Golgi-associated RhoBTB3 targets cyclin E for ubiquitylation and promotes cell cycle progression*. J Cell Biol, 2013. **203**(2): p. 233-50.
61. Sumara, I., et al., *A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells*. Dev Cell, 2007. **12**(6): p. 887-900.

62. Chen, Y., et al., *Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement*. Mol Cell, 2009. **35**(6): p. 841-55.
63. Cullinan, S.B., et al., *The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(19): p. 8477-86.
64. Zipper, L.M. and R.T. Mulcahy, *The Keap1 BTB/POZ dimerization function is required to sequester Nrf2 in cytoplasm*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36544-52.
65. Lee, D.F., et al., *KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta*. Mol Cell, 2009. **36**(1): p. 131-40.
66. Zhang, D.D., et al., *Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch substrate adaptor protein for Cul3, targets Keap1 for degradation by a proteasome-independent pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(34): p. 30091-9.
67. Bunce, M.W., I.V. Boronenkov, and R.A. Anderson, *Coordinated activation of the nuclear ubiquitin ligase Cul3-SPOP by the generation of phosphatidylinositol 5-phosphate*. J Biol Chem, 2008. **283**(13): p. 8678-86.
68. Bade, D., et al., *The E3 ligase CUL3/RDX controls centromere maintenance by ubiquitylating and stabilizing CENP-A in a CAL1-dependent manner*. Dev Cell, 2014. **28**(5): p. 508-19.
69. Beck, J., et al., *Ubiquitylation-dependent localization of PLK1 in mitosis*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(4): p. 430-9.
70. Balasco, N., et al., *Molecular recognition of Cullin3 by KCTDs: Insights from experimental and computational investigations*. Biochim Biophys Acta, 2014.
71. Wu, C., I. Macleod, and A.I. Su, *BioGPS and MyGene.info: organizing online, gene-centric information*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D561-5.
72. Uhlen, M., et al., *Towards a knowledge-based Human Protein Atlas*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(12): p. 1248-50.
73. Ponten, F., et al., *A global view of protein expression in human cells, tissues, and organs*. Mol Syst Biol, 2009. **5**: p. 337.
74. Lee, O.H., et al., *Genome-wide YFP fluorescence complementation screen identifies new regulators for telomere signaling in human cells*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(2): p. M110 001628.
75. Rual, J.F., et al., *Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1173-8.
76. Chatr-Aryamontri, A., et al., *The BioGRID interaction database: 2013 update*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D816-23.
77. Orchard, S., et al., *The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D358-63.
78. Shorter, J., et al., *GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system*. EMBO J, 1999. **18**(18): p. 4949-60.
79. Nagase, T., R. Kikuno, and O. Ohara, *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XXII. The complete sequences of 50 new cDNA clones which code for large proteins*. DNA Res, 2001. **8**(6): p. 319-27.
80. *Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D191-8.
81. Flicek, P., et al., *Ensembl 2014*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D749-55.
82. Picchione, F., et al., *IRIZIO: a novel gene cooperating with PAX3-FOXO1 in alveolar rhabdomyosarcoma (ARMS)*. Carcinogenesis, 2011. **32**(4): p. 452-61.

83. Galili, N., et al., *Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma*. Nat Genet, 1993. **5**(3): p. 230-5.
84. Lim, J., et al., *A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration*. Cell, 2006. **125**(4): p. 801-14.
85. Udeshi, N.D., et al., *Methods for quantification of in vivo changes in protein ubiquitination following proteasome and deubiquitinase inhibition*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(5): p. 148-59.
86. Miller, J., A.D. McLachlan, and A. Klug, *Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes*. EMBO J, 1985. **4**(6): p. 1609-14.
87. Pavletich, N.P. and C.O. Pabo, *Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å*. Science, 1991. **252**(5007): p. 809-17.
88. Molnar, A. and K. Georgopoulos, *The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(12): p. 8292-303.
89. Renda, M., et al., *Critical DNA binding interactions of the insulator protein CTCF: a small number of zinc fingers mediate strong binding, and a single finger-DNA interaction controls binding at imprinted loci*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33336-45.
90. Brayer, K.J. and D.J. Segal, *Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains*. Cell Biochem Biophys, 2008. **50**(3): p. 111-31.
91. Wolfe, S.A., L. Nekludova, and C.O. Pabo, *DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. **29**: p. 183-212.
92. Lu, D., M.A. Searles, and A. Klug, *Crystal structure of a zinc-finger-RNA complex reveals two modes of molecular recognition*. Nature, 2003. **426**(6962): p. 96-100.
93. Mackay, J.P. and M. Crossley, *Zinc fingers are sticking together*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(1): p. 1-4.
94. Klug, A., *The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation*. Q Rev Biophys, 2010. **43**(1): p. 1-21.
95. Lloyd, S.L., et al., *An X-linked zinc finger gene mapping to Xq21.1-q21.3 closely related to ZFX and ZFY: possible origins from a common ancestral gene*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(18): p. 4835-41.
96. Kleine-Kohlbrecher, D., et al., *A functional link between the histone demethylase PHF8 and the transcription factor ZNF711 in X-linked mental retardation*. Mol Cell, 2010. **38**(2): p. 165-78.
97. Tarpey, P.S., et al., *A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation*. Nat Genet, 2009. **41**(5): p. 535-43.
98. Laumonnier, F., et al., *Mutations in PHF8 are associated with X linked mental retardation and cleft lip/cleft palate*. J Med Genet, 2005. **42**(10): p. 780-6.
99. Koivisto, A.M., et al., *Screening of mutations in the PHF8 gene and identification of a novel mutation in a Finnish family with XLMR and cleft lip/cleft palate*. Clin Genet, 2007. **72**(2): p. 145-9.
100. Qi, H.H., et al., *Histone H4K20/H3K9 demethylase PHF8 regulates zebrafish brain and craniofacial development*. Nature, 2010. **466**(7305): p. 503-7.
101. Qiu, J., et al., *The X-linked mental retardation gene PHF8 is a histone demethylase involved in neuronal differentiation*. Cell Res, 2010. **20**(8): p. 908-18.

102. Safran, M., et al., *Human Gene-Centric Databases at the Weizmann Institute of Science: GeneCards, UDB, CroW 21 and HORDE*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(1): p. 142-6.
103. Kittler, R., et al., *Genome-scale RNAi profiling of cell division in human tissue culture cells*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(12): p. 1401-12.
104. van Loosdregt, J. and P.J. Coffey, *Post-translational modification networks regulating FOXP3 function*. *Trends Immunol*, 2014. **35**(8): p. 368-78.
105. Geng, F., S. Wenzel, and W.P. Tansey, *Ubiquitin and proteasomes in transcription*. *Annu Rev Biochem*, 2012. **81**: p. 177-201.
106. Hammond-Martel, I., H. Yu, and B. Affar el, *Roles of ubiquitin signaling in transcription regulation*. *Cell Signal*, 2012. **24**(2): p. 410-21.
107. Holmberg, C.I., et al., *Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(12): p. 619-27.
108. Li, T., et al., *Sumoylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, zinc finger proteins, and nuclear pore complex proteins: a proteomic analysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(23): p. 8551-6.
109. Wagner, S.A., et al., *A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles*. *Mol Cell Proteomics*, 2011. **10**(10): p. M111 013284.
110. Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. *Science*, 2007. **316**(5828): p. 1160-6.
111. Kubota, Y., et al., *Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of MCM/P1 proteins in Xenopus eggs*. *EMBO J*, 1997. **16**(11): p. 3320-31.
112. Thommes, P., et al., *The RLF-M component of the replication licensing system forms complexes containing all six MCM/P1 polypeptides*. *EMBO J*, 1997. **16**(11): p. 3312-9.
113. Gambus, A., et al., *MCM2-7 form double hexamers at licensed origins in Xenopus egg extract*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(13): p. 11855-64.
114. Brewster, A.S., et al., *Crystal structure of a near-full-length archaeal MCM: functional insights for an AAA+ hexameric helicase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(51): p. 20191-6.
115. Slaymaker, I.M., et al., *Mini-chromosome maintenance complexes form a filament to remodel DNA structure and topology*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(5): p. 3446-56.
116. Coleman, T.R., P.B. Carpenter, and W.G. Dunphy, *The Xenopus Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts*. *Cell*, 1996. **87**(1): p. 53-63.
117. Drury, L.S., G. Perkins, and J.F. Diffley, *The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast*. *EMBO J*, 1997. **16**(19): p. 5966-76.
118. Nishitani, H., et al., *The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast*. *Nature*, 2000. **404**(6778): p. 625-8.
119. Ilves, I., et al., *Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins*. *Mol Cell*, 2010. **37**(2): p. 247-58.
120. Moyer, S.E., P.W. Lewis, and M.R. Botchan, *Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(27): p. 10236-41.
121. Pasion, S.G. and S.L. Forsburg, *Nuclear localization of Schizosaccharomyces pombe Mcm2/Cdc19p requires MCM complex assembly*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(12): p. 4043-57.
122. Nguyen, V.Q., et al., *Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7*. *Curr Biol*, 2000. **10**(4): p. 195-205.

123. Shultz, R.W., et al., *Dynamic localization of the DNA replication proteins MCM5 and MCM7 in plants*. Plant Physiol, 2009. **150**(2): p. 658-69.
124. Takei, Y., et al., *The MCM3 acetylase MCM3AP inhibits initiation, but not elongation, of DNA replication via interaction with MCM3*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43121-5.
125. Takei, Y., et al., *MCM3AP, a novel acetyltransferase that acetylates replication protein MCM3*. EMBO Rep, 2001. **2**(2): p. 119-23.
126. Hendrickson, M., et al., *Phosphorylation of MCM4 by cdc2 protein kinase inhibits the activity of the minichromosome maintenance complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12223-8.
127. Wei, Q., et al., *Phosphorylation of minichromosome maintenance protein 7 (MCM7) by cyclin/cyclin-dependent kinase affects its function in cell cycle regulation*. J Biol Chem, 2013. **288**(27): p. 19715-25.
128. Huang, T.H., et al., *Epidermal growth factor receptor potentiates MCM7-mediated DNA replication through tyrosine phosphorylation of Lyn kinase in human cancers*. Cancer Cell, 2013. **23**(6): p. 796-810.
129. Buchsbaum, S., et al., *Human INT6 interacts with MCM7 and regulates its stability during S phase of the cell cycle*. Oncogene, 2007. **26**(35): p. 5132-44.
130. Kuhne, C. and L. Banks, *E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34302-9.
131. Jagannathan, M., et al., *A role for USP7 in DNA replication*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(1): p. 132-45.
132. You, Z., et al., *Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42471-9.
133. Cortez, D., G. Glick, and S.J. Elledge, *Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10078-83.
134. Roberts, S., et al., *Identification of an arginine-rich motif in human papillomavirus type 1 E1/E4 protein necessary for E4-mediated inhibition of cellular DNA synthesis in vitro and in cells*. J Virol, 2008. **82**(18): p. 9056-64.
135. Wiebusch, L., R. Uecker, and C. Hagemeyer, *Human cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting MCM loading onto chromatin*. EMBO Rep, 2003. **4**(1): p. 42-6.
136. Kudoh, A., et al., *Phosphorylation of MCM4 at sites inactivating DNA helicase activity of the MCM4-MCM6-MCM7 complex during Epstein-Barr virus productive replication*. J Virol, 2006. **80**(20): p. 10064-72.
137. Biswas, N., V. Sanchez, and D.H. Spector, *Human cytomegalovirus infection leads to accumulation of geminin and inhibition of the licensing of cellular DNA replication*. J Virol, 2003. **77**(4): p. 2369-76.
138. Berthet, C., et al., *How adeno-associated virus Rep78 protein arrests cells completely in S phase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13634-9.
139. Nash, K., et al., *Identification of cellular proteins that interact with the adeno-associated virus rep protein*. J Virol, 2009. **83**(1): p. 454-69.
140. Nash, K., W. Chen, and N. Muzyczka, *Complete in vitro reconstitution of adeno-associated virus DNA replication requires the minichromosome maintenance complex proteins*. J Virol, 2008. **82**(3): p. 1458-64.
141. Young, S.M., Jr., et al., *Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 3953-66.

142. Pereira, D.J., D.M. McCarty, and N. Muzyczka, *The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection.* J Virol, 1997. **71**(2): p. 1079-88.
143. Hermonat, P.L., et al., *Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants.* J Virol, 1984. **51**(2): p. 329-39.
144. Srivastava, A., E.W. Lusby, and K.I. Berns, *Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome.* J Virol, 1983. **45**(2): p. 555-64.
145. Mendelson, E., J.P. Trempe, and B.J. Carter, *Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide.* J Virol, 1986. **60**(3): p. 823-32.
146. Becerra, S.P., et al., *Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript.* J Virol, 1988. **62**(8): p. 2745-54.
147. Samulski, R.J., et al., *Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV.* Cell, 1983. **33**(1): p. 135-43.
148. Senapathy, P., J.D. Tratschin, and B.J. Carter, *Replication of adeno-associated virus DNA. Complementation of naturally occurring rep- mutants by a wild-type genome or an ori- mutant and correction of terminal palindrome deletions.* J Mol Biol, 1984. **179**(1): p. 1-20.
149. Beaton, A., P. Palumbo, and K.I. Berns, *Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein.* J Virol, 1989. **63**(10): p. 4450-4.
150. Atchison, R.W., B.C. Casto, and W.M. Hammon, *ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES.* Science, 1965. **149**(3685): p. 754-6.
151. Buller, R.M., et al., *Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication.* J Virol, 1981. **40**(1): p. 241-7.
152. Laughlin, C.A., C.B. Cardellicchio, and H.C. Coon, *Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2.* J Virol, 1986. **60**(2): p. 515-24.
153. Samulski, R.J., *Adeno-associated virus: integration at a specific chromosomal locus.* Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(1): p. 74-80.
154. Huser, D., et al., *Integration preferences of wildtype AAV-2 for consensus rep-binding sites at numerous loci in the human genome.* PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1000985.
155. Labow, M.A., P.L. Hermonat, and K.I. Berns, *Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome.* J Virol, 1986. **60**(1): p. 251-8.
156. Tratschin, J.D., I.L. Miller, and B.J. Carter, *Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function.* J Virol, 1984. **51**(3): p. 611-9.
157. Walker, S.L., R.S. Wonderling, and R.A. Owens, *Mutational analysis of the adeno-associated virus Rep68 protein: identification of critical residues necessary for site-specific endonuclease activity.* J Virol, 1997. **71**(4): p. 2722-30.
158. Smith, R.H. and R.M. Kotin, *The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity.* J Virol, 1998. **72**(6): p. 4874-81.
159. Im, D.S. and N. Muzyczka, *The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity.* Cell, 1990. **61**(3): p. 447-57.

160. Im, D.S. and N. Muzyczka, *Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization*. J Virol, 1992. **66**(2): p. 1119-28.
161. Pereira, D.J. and N. Muzyczka, *The cellular transcription factor SP1 and an unknown cellular protein are required to mediate Rep protein activation of the adeno-associated virus p19 promoter*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 1747-56.
162. Weger, S., E. Hammer, and R. Heilbronn, *Topors, a p53 and topoisomerase I binding protein, interacts with the adeno-associated virus (AAV-2) Rep78/68 proteins and enhances AAV-2 gene expression*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 3): p. 511-6.
163. Chiorini, J.A., et al., *Inhibition of PrKX, a novel protein kinase, and the cyclic AMP-dependent protein kinase PKA by the regulatory proteins of adeno-associated virus type 2*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(10): p. 5921-9.
164. Batchu, R.B., et al., *Interaction of adeno-associated virus Rep78 with p53: implications in growth inhibition*. Cancer Res, 1999. **59**(15): p. 3592-5.
165. Saudan, P., J. Vlach, and P. Beard, *Inhibition of S-phase progression by adeno-associated virus Rep78 protein is mediated by hypophosphorylated pRb*. EMBO J, 2000. **19**(16): p. 4351-61.
166. Wistuba, A., et al., *Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5311-9.
167. Horer, M., et al., *Mutational analysis of adeno-associated virus Rep protein-mediated inhibition of heterologous and homologous promoters*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5485-96.
168. Cassell, G.D. and M.D. Weitzman, *Characterization of a nuclear localization signal in the C-terminus of the adeno-associated virus Rep68/78 proteins*. Virology, 2004. **327**(2): p. 206-14.
169. Georgiev, O., et al., *Two versatile eukaryotic vectors permitting epitope tagging, radiolabelling and nuclear localisation of expressed proteins*. Gene, 1996. **168**(2): p. 165-7.
170. Boyer, H.W. and D. Roulland-Dussoix, *A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli*. J Mol Biol, 1969. **41**(3): p. 459-72.
171. Greener, A., *E. coli SURE' strain: clone "unclonable" DNA*. . Strategies (1990) **3**: p. 5-6.
172. G.O., G., C. W.D., and K. M.T., *Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium*. . Cancer Res., (1952). **12**: p. 264-265.
173. Boshart, M., et al., *A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer*. EMBO J, 1984. **3**(5): p. 1151-7.
174. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
175. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.
176. Schrodinger, L., *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*, 2010.
177. Prieto, C. and J. De Las Rivas, *APID: Agile Protein Interaction DataAnalyzer*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Web Server issue): p. W298-302.
178. Kosugi, S., et al., *Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha*. J Biol Chem, 2009. **284**(1): p. 478-85.

179. Bhasin, M. and G.P. Raghava, *ESLpred: SVM-based method for subcellular localization of eukaryotic proteins using dipeptide composition and PSI-BLAST*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W414-9.
180. Shen, H.B. and K.C. Chou, *A top-down approach to enhance the power of predicting human protein subcellular localization: Hum-mPLoc 2.0*. Anal Biochem, 2009. **394**(2): p. 269-74.
181. Licata, L., et al., *MINT, the molecular interaction database: 2012 update*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D857-61.
182. Razick, S., G. Magklaras, and I.M. Donaldson, *iRefIndex: a consolidated protein interaction database with provenance*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 405.
183. Calderone, A., L. Castagnoli, and G. Cesareni, *mentha: a resource for browsing integrated protein-interaction networks*. Nat Methods, 2013. **10**(8): p. 690-1.
184. Marchler-Bauer, A., et al., *CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D225-9.
185. la Cour, T., et al., *Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals*. Protein Eng Des Sel, 2004. **17**(6): p. 527-36.
186. Rost, B., G. Yachdav, and J. Liu, *The PredictProtein server*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W321-6.
187. Nakai, K. and P. Horton, *PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(1): p. 34-6.
188. Paz, A., et al., *SPIKE: a database of highly curated human signaling pathways*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D793-9.
189. Franceschini, A., et al., *STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): p. D808-15.
190. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 235-42.
191. Briesemeister, S., J. Rahnenfuhrer, and O. Kohlbacher, *YLoc--an interpretable web server for predicting subcellular localization*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Web Server issue): p. W497-502.
192. Briesemeister, S., J. Rahnenfuhrer, and O. Kohlbacher, *Going from where to why--interpretable prediction of protein subcellular localization*. Bioinformatics, 2010. **26**(9): p. 1232-8.
193. Poser, I., et al., *BAC TransgeneOmics: a high-throughput method for exploration of protein function in mammals*. Nat Methods, 2008. **5**(5): p. 409-15.
194. Whitfield, M.L., et al., *Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(12): p. 4188-98.
195. Bostock, C.J., D.M. Prescott, and J.B. Kirkpatrick, *An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border*. Exp Cell Res, 1971. **68**(1): p. 163-8.
196. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
197. Siegel, M.R. and H.D. Sisler, *SITE OF ACTION OF CYCLOHEXIMIDE IN CELLS OF SACCHAROMYCES PASTORIANUS. II. THE NATURE OF INHIBITION OF PROTEIN SYNTHESIS IN A CELL-FREE SYSTEM*. Biochim Biophys Acta, 1964. **87**: p. 83-9.
198. Fang, G., H. Yu, and M.W. Kirschner, *Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 163-71.

199. Rodriguez, M.S., et al., *SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6455-61.
200. Querido, E., et al., *Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex*. Genes Dev, 2001. **15**(23): p. 3104-17.
201. Isobe, T., et al., *Adenovirus E1A inhibits SCF(Fbw7) ubiquitin ligase*. J Biol Chem, 2009. **284**(41): p. 27766-79.
202. Tank, J., *Untersuchung einer möglichen funktionellen Wechselwirkung der großen regulatorischen Rep78/Rep68-Proteine des Adeno-assoziierten Virus Serotyp 2 (AAV-2) mit einem Cullin3-E3-Ligase-Komplex über das BTB-Domänen-Protein KCTD5*, 2009, Freie Universität Berlin.
203. Kim, S.H., et al., *Drosophila Cand1 regulates Cullin3-dependent E3 ligases by affecting the neddylation of Cullin3 and by controlling the stability of Cullin3 and adaptor protein*. Dev Biol, 2010. **346**(2): p. 247-57.
204. Leljok Levanic, D., et al., *A novel bipartite nuclear localization signal guides BPM1 protein to nucleolus suggesting its Cullin3 independent function*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51184.
205. Tong, X., et al., *Kctd10 regulates heart morphogenesis by repressing the transcriptional activity of Tbx5a in zebrafish*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3153.
206. Zarelli, V.E. and I.B. Dawid, *Inhibition of neural crest formation by Kctd15 involves regulation of transcription factor AP-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(8): p. 2870-5.
207. Kasahara, K., et al., *Ubiquitin-proteasome system controls ciliogenesis at the initial step of axoneme extension*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5081.
208. Kanezaki, R., et al., *Transcription factor BACH1 is recruited to the nucleus by its novel alternative spliced isoform*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7278-84.
209. van Geersdaele, L.K., et al., *Structural basis of high-order oligomerization of the cullin-3 adaptor SPOP*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2013. **69**(Pt 9): p. 1677-84.
210. Karapetian, R.N., et al., *Nuclear oncoprotein prothymosin alpha is a partner of Keap1: implications for expression of oxidative stress-protecting genes*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(3): p. 1089-99.
211. Itoh, K., et al., *Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles*. Genes Cells, 2003. **8**(4): p. 379-91.
212. Soltysik-Espanola, M., et al., *Characterization of Mayven, a novel actin-binding protein predominantly expressed in brain*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(7): p. 2361-75.
213. Montague, P., P.G. Kennedy, and S.C. Barnett, *Subcellular localization of Mayven following expression of wild type and mutant EGFP tagged cDNAs*. BMC Neurosci, 2010. **11**: p. 63.
214. Cheng, I.H., L.A. Roberts, and B.K. Tye, *Mcm3 is polyubiquitinated during mitosis before establishment of the pre-replication complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41706-14.
215. Kim, W., et al., *Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome*. Mol Cell, 2011. **44**(2): p. 325-40.
216. Roseaulin, L.C., C. Noguchi, and E. Noguchi, *Proteasome-dependent degradation of replisome components regulates faithful DNA replication*. Cell Cycle, 2013. **12**(16): p. 2564-9.
217. Fitch, M.J., J.J. Donato, and B.K. Tye, *Mcm7, a subunit of the presumptive MCM helicase, modulates its own expression in conjunction with Mcm1*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25408-16.

218. Espinas, M.L., et al., *The N-terminal POZ domain of GAGA mediates the formation of oligomers that bind DNA with high affinity and specificity*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16461-9.
219. Ding, X., et al., *The interaction of KCTD1 with transcription factor AP-2alpha inhibits its transactivation*. J Cell Biochem, 2009. **106**(2): p. 285-95.
220. Ding, X.F., et al., *Characterization and expression of a human KCTD1 gene containing the BTB domain, which mediates transcriptional repression and homomeric interactions*. DNA Cell Biol, 2008. **27**(5): p. 257-65.
221. Mardon, G., et al., *Mouse Zfx protein is similar to Zfy-2: each contains an acidic activating domain and 13 zinc fingers*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(2): p. 681-8.
222. Baird, L., et al., *Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(38): p. 15259-64.
223. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 76-86.
224. Vinayagam, A., et al., *A directed protein interaction network for investigating intracellular signal transduction*. Sci Signal, 2011. **4**(189): p. rs8.
225. Meyer-Schaller, N., et al., *The human Dcn1-like protein DCNL3 promotes Cul3 neddylation at membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(30): p. 12365-70.
226. Ferry, C., et al., *Cullin 3 mediates SRC-3 ubiquitination and degradation to control the retinoic acid response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(51): p. 20603-8.
227. Errington, W.J., et al., *Adaptor protein self-assembly drives the control of a cullin-RING ubiquitin ligase*. Structure, 2012. **20**(7): p. 1141-53.
228. Chew, E.H., et al., *Characterization of cullin-based E3 ubiquitin ligases in intact mammalian cells--evidence for cullin dimerization*. Cell Signal, 2007. **19**(5): p. 1071-80.
229. Correale, S., et al., *Molecular organization of the cullin E3 ligase adaptor KCTD11*. Biochimie, 2011. **93**(4): p. 715-24.
230. Hernandez-Munoz, I., et al., *Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(21): p. 7635-40.
231. Boada, M., et al., *ATP5H/KCTD2 locus is associated with Alzheimer's disease risk*. Mol Psychiatry, 2014. **19**(6): p. 682-7.
232. Azizieh, R., et al., *Progressive myoclonic epilepsy-associated gene KCTD7 is a regulator of potassium conductance in neurons*. Mol Neurobiol, 2011. **44**(1): p. 111-21.
233. Kousi, M., et al., *Novel mutations consolidate KCTD7 as a progressive myoclonus epilepsy gene*. J Med Genet, 2012. **49**(6): p. 391-9.

9 Publikationen

Veröffentlichungen:

Natalja Rutz, Regine Heilbronn, Stefan Weger

Interactions of the putative E3 ligase substrate adaptor protein KCTD5 with cytoplasmic and nuclear proteins: Evidence for cullin3/KCTD5 mediated protein stabilization

In submission

Kongressbeiträge:

Natalja Rutz and Stefan Weger

Roles of KCTD5, a putative substrate adaptor for cullin3 ubiquitin ligases, in MCM7 ubiquitination and AAV-2 genome replication

XIV International Parvovirus Workshop, Cornell Universtät, Ithaca, Juni 2012

10 Danksagung

Ich möchte Herrn PD Dr. Stefan Weger für die Möglichkeit und das Vertrauen danken, dieses Thema zu erforschen. Ich danke ihm für seine fachliche Unterstützung und wertvolle Tipps bei Besprechungen und Diskussionen und für die Möglichkeit, selbstbestimmt zu arbeiten. Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel möchte ich für die Übernahme der Zweitbetreuung danken.

Ich danke der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle Förderung, die diese Arbeit ermöglicht hat. Herrn Prof. Dr. Ludger Wöste danke ich für interessante Stipendiatengruppentreffen und für die Zeit in seinem Terminkalender.

Frau Prof. Regine Heilbronn danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für ihre Unterstützung und für kritische Diskussionen der Experimente.

Den aktuellen und ehemaligen Mitstreitern der AG Heilbronn: Daniela, Melanie, Eva-Maria, Kristina, Catrin, Mario, Dina, Kerstin und Eva; möchte ich für schöne Zeit und interessante Gespräche danken.

Eva-Maria Hammer danke ich insbesondere für ihre Unterstützung im Labor, für ihre Tipps und ihr sonniges Gemüt. Kristina und Catrin danke ich für wertvolle Tipps während des Schreibens meiner Arbeit und einfach für eine angenehme, nette Arbeitsatmosphäre. Mario danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft und Dina bin ich für ihr geduldiges Zuhören dankbar.

Meinen Freunden möchte ich dafür danken, dass sie immer da waren, wenn ich sie brauchte.

Meinen Eltern und Andrejas Eltern danke ich für ihre Geduld und ihr Verständnis. Mit ihrer Unterstützung im Rücken war der Promotionsweg einfacher.

Andrej danke ich für seine unendliche Geduld, seinen unerschöpflichen Optimismus und dafür, dass er immer für mich da war und mich aufgefangen hat.

11 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, 18.11.2014

Natalja Rutz