

Identifizierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Sandra Fleischer
aus Hannover

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als
Dissertation am 10.06.2004 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. K. Lingelbach

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Will; Heinrich-Pette-Institut für experimen-
telle Virologie und Immunologie in Hamburg

Tag der mündlichen Prüfung am: 12.07.2004

	Zusammenfassung	1
I.	Einleitung	
1.1	Der Zellkern (Nukleus)	3
1.2	PML-Kerndomänen	4
1.1.1	Das PML-Protein und die RBCC/TRIM-Proteinfamilie	6
1.1.2	PML und die Regulation der Transkription	9
1.1.3	Krüppel-C2H2 Zinkfinger Proteine	10
1.3	Der Nukleolus	13
1.1.4	Zelluläre Proteine des Nukleolus	15
1.1.5	Die RNA Polymerase I	15
1.1.6	Der Upstream Binding Factor (UBF)	16
1.1.7	Das RNA-Erkennungsmotiv (RRM)	17
1.1.8	Die Nukleoluslokalisierungssequenz (NoLS)	18
1.4	Ziel der Dissertation	19
II.	Material und Methoden	
1.	Material	
1.1	Chemikalien	21
1.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	21
1.3	Kits	23
1.4	Marker	23
1.5	Enzyme	23
1.6	Plasmidvektoren	24
1.7	Expressionsplasmide	24
1.8	Synthetische Oligonukleotide zur Klonierung	25
1.9	Antikörper	
1.1.1	Primärantikörper	26
1.1.2	Sekundärantikörper	26
1.10	Biologisches Material	
1.1.3	Bakterienstämme	27

1.1.4	Eukaryotische Zellen	27
1.11	Nährmedien	
1.1.5	Bakterielle Nährmedien	27
1.1.6	Medien für die eukaryotische Zellkultur	28
2.	Methoden	
2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	
2.1.1	Allgemeine Arbeitsbedingungen	28
2.1.2	Kultur von adhärent wachsenden Zellen	29
2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
2.2	Molekularbiologische Methoden	
2.1.4	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	29
2.1.5	Transformation von Bakterien	30
2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	
2.1.6.1	Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse (Minipräparation)	31
2.1.6.2	Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse (Maxipräparation)	31
2.1.7	DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
2.1.8	Enzymatische Hydrolyse von DNA durch Restriktionsenzyme	34
2.1.9	DNA-Sequenzierung	34
2.1.10	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	35
2.1.11	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	36
2.1.12	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen	36
2.1.13	Ligation von dsDNA-Fragmenten	37
2.1.14	Random Prime Labelling von dsDNA	37
2.1.15	Northern Blot Analysen	37
2.3	Zellbiologische Methoden	
2.1.16	Transfektion von Zellen	
2.1.16.1	Transfektion adhärenter Zellen durch Kopräzipitation von Calciumphosphat und DNA	38
2.1.16.2	Transfektion adhärenter Zellen mit FuGENE 6 Transfektions-Reagenz	39
2.1.16.3	Transfektion adhärenter Zellen mit SuperFect® Transfektions-Reagenz	39
2.1.17	Herstellung von Zelllysaten für unterschiedliche Zwecke	40
2.1.18	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und EYFP- bzw. EGFP-Markerprotein	40
2.4	Herstellung rekombinanter Fusionsproteine	
2.1.19	Verwendete Konstrukte	42

2.1.20	Test-Induktion und -Expression der Konstrukte in <i>E.coli</i>	43
2.1.21	Induktion und Expression der Proteine in großem Maßstab	43
2.1.22	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	44
2.5	Proteinchemische Methoden	
2.1.23	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.1.24	Anfärben von Proteingelen mit Coomassie-Brilliantblau R 250	45
2.1.25	Western Blot	46
2.1.26	Epitop-Tags zur Detektion und Präzipitation von exogenen Proteinen	47
2.1.27	Analyse der Repressoraktivität des PAROT-Proteins durch Messung der Luciferase Aktivität	47
2.1.28	β -Gal Reportergen Assay	48
2.1.29	Immunisierung von Legehennen und Isolierung von Antikörpern (IgY) aus Hühnerei-Dotter	48
2.1.30	Test der Antikörper (IgY)-Lösungen im Western Blot	49
2.1.31	Test der Antikörper (IgY)-Lösungen in Immunfluoreszenz	50
III.	Ergebnisse	
3.1	Identifizierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine	51
3.2	Charakterisierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine	
3.1.1	Datenbankanalysen	52
3.1.2	PAROT, ein PML-assoziierter Repressor der Transkription	
3.1.2.1	Das PAROT-Protein und seine Domänen	52
3.1.2.2	Die KRAB-Box des PAROT-Proteins	54
3.1.2.3	Die Zinkfinger-Domäne des PAROT-Proteins	56
3.1.2.4	Die genomische Organisation des humanen <i>PAROT</i> -Gens	57
3.1.2.5	PAROT wird in unterschiedlichen Geweben exprimiert	58
3.1.2.6	Die nukleäre Lokalisation von PAROT wird sowohl durch die Zinkfinger- als auch durch die Linker-Domäne bestimmt	59
3.1.2.7	PAROT ist ein Repressor der Transkription	61
3.1.2.8	PAROT kolokalisiert mit dem Korepressor TIF1 β (KAP-1/KRIP-1) und Mitgliedern der HP1-Familie	62
3.1.2.9	Spezifische Rekrutierung von PAROT in PML-Kerndomänen durch die PML-Protein Isoform IV (PML IV)	64
3.1.2.10	Die PML-Isoform PML IV rekrutiert KRIM-1A, ein weiteres KRAB-Repressorprotein, in PML-Kerndomänen	65
3.1.2.11	Rolle der Linker-Domäne in der PAROT PML IV Assoziation	66

3.1.2.12	Aufhebung der PAROT-vermittelten Repression der Transkription durch PML IV	68
3.1.2.13	Herstellung von Antikörpern gegen das PAROT-Protein	69
3.1.2.14	Test der anti-PAROT Antikörper	70
3.1.2.15	Endogenes PAROT-Protein lokalisiert in Mitochondrien	74
3.1.3	Nucleostatmin, ein neues nukleoläres Protein	
3.1.3.1	Das Nucleostatmin Protein	78
3.1.3.2	Sequenz Vergleiche der beiden Nucleostatmin Proteine	79
3.1.3.3	Das RRM-Motiv des Nucleostatmin Proteins	80
3.1.3.4	Die genomische Organisation des humanen <i>Nucleostatmin</i> Gens	81
3.1.3.5	Das murine Nucleostatmin Homolog	82
3.1.3.6	Das Nucleostatmin Protein weist eine speziesübergreifende Sequenzhomologie auf	83
3.1.3.7	Nucleostatmin wird in unterschiedlichen Geweben exprimiert	84
3.1.3.8	Nucleostatmin-mutC kolokalisiert mit der PML-Isoform PML IV	85
3.1.3.9	Herstellung von Antikörpern gegen Nucleostatmin	86
3.1.3.10	Test der anti-Nucleostatmin Antikörper	87
3.1.3.11	Endogenes Nucleostatmin kolokalisiert weder mit endogenem noch mit transfiziertem PML	91
3.1.3.12	Nucleostatmin besitzt eine potentielle NoLS	93
3.1.3.13	Endogenes Nucleostatmin lokalisiert im Fibrillären Zentrum des Nukleolus	94
3.1.3.14	Nucleostatmin ist ein RNA-bindendes Protein	97
3.1.3.15	Flag-markiertes Nucleostatmin lokalisiert überwiegend im Nukleoplasma	99
3.1.3.16	Wirkungsweise genotoxischer Stressoren auf endogenes Nucleostatmin	102
IV.	Diskussion	106
4.1	Identifizierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine	107
4.2	Charakterisierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine	107
4.1.1	Das PAROT-Protein und seine Domänen	107
4.1.2	Die Assoziation von PAROT an PML-Kerndomänen	110
4.1.3	Das endogene PAROT-Protein	112
4.1.4	Das Nucleostatmin Protein und seine Eigenschaften	114
4.1.5	Endogenes Nucleostatmin Protein lokalisiert im Nukleolus	116
4.1.6	Nucleostatmin und PML-Kerndomänen	118
4.1.7	Nucleostatmin – ein rein nukleoläres Protein?	119

V.	Abkürzungsverzeichnis	122
VI.	Literaturverzeichnis	125

Zusammenfassung

Der Zellkern eukaryotischer Zellen zeichnet sich durch zahlreiche morphologisch sowie funktionell unterschiedliche Domänen aus, die als Kernkompartimente bezeichnet werden. Zu ihnen gehören u. a. der Nukleolus und die Promyelozytische Leukämie (PML) Protein-Kerndomänen, die als dynamische subnukleäre Strukturen bei der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose, der Transkription, der Tumorsuppression und der zellulären, antiviralen Antwort eine wichtige Bedeutung besitzen. Die Funktion sowie die Regulation der in Kerndomänen ablaufenden Prozesse sind gegenwärtig weitgehend nur unzureichend verstanden. Ziel dieser Dissertation war es, neue Kerndomänen-assoziierte Komponenten zu identifizieren und zu charakterisieren. Diese Studien sollten zu einem besseren Verständnis der Funktion von Kerndomänen beitragen.

Zu diesem Zweck wurden neue, nicht charakterisierte proteinkodierende Abschnitte von in Sequenzdatenbanken bis zu diesem Zeitpunkt nicht annotierten cDNAs an EYFP fusioniert, in humanen Zelllinien exprimiert und auf ihre subzelluläre Lokalisation analysiert. Zwei dieser neuen Proteine konnten aufgrund ihrer Lokalisation als neue Kerndomänen-assoziierte Komponenten identifiziert werden.

Bei einem der beiden Proteine, dem PAROT (*PML-associated repressor of transcription*)-Protein, handelt es sich um einen Repressor der Transkription, der eine N-terminale Repressordomäne, eine KRAB (*Krüppel associated box*)- Domäne, eine Linker-Domäne und eine C-terminale C2H2-Zinkfinger (ZNF)-Domäne zur DNA-Bindung, sowie drei Konsensus-Kernlokalisierungssignale besitzt. Anhand seiner Domänenstruktur konnte PAROT der ZNF91-Proteinfamilie der „*multiple-adjacent*“-KRAB-C2H2-Zinkfinger Proteine zugeordnet und das zugehörige Gen, ebenso wie die meisten anderen Mitglieder der ZNF91-Proteinfamilie, auf dem Chromosom 19p13.11 kartiert werden. Die PAROT mRNA konnte in verschiedenen menschlichen Geweben wie Skelettmuskel, Niere, Dickdarm und Gehirn als ein 4.4 kb Transkript nachgewiesen werden. Ektopisch exprimiertes PAROT-Protein lokalisiert in Kerndomänen und kann durch die PML-Isoform IV in PML-Kerndomänen rekrutiert werden. Weiterhin kolokalisiert es mit dem Korepressor TIF1 β sowie mit Mitgliedern der Heterochromatin Protein 1 (HP1)-Proteinfamilie, was vermuten lässt, dass das PAROT-Protein, ähnlich wie andere KRAB-ZNF Repressoren, über die direkte Interaktion mit TIF1 β die Genexpression reprimiert. Die Repression der Transkription durch das PAROT-Protein kann aufgrund der Rekrutierung durch die PML-Isoform PML IV in PML-Kerndomänen

dosisabhängig aufgehoben werden. Somit handelt es sich bei PAROT um einen durch seine Assoziation mit PML-Kerndomänen regulierbaren Transkriptionsrepressor. Indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit unterschiedlichen gegen das PAROT-Protein gerichteten Antikörpern zeigten unerwarteterweise eine Kolo-kalisation von PAROT mit Mitochondrien, was als Hinweis verstanden werden kann, dass PAROT nur auf bestimmte Stimuli hin in den Zellkern einwandert und seine Zielgene reprimiert.

Das zweite identifizierte Kerndomänenprotein wurde Nucleostatmin genannt und besitzt zwei putative Kernlokalisationssignale, eine mögliche Nukleoluslokalisierungssequenz und ein RNA-Erkennungsmotiv (RRM), das dieses Protein als ein RNA-bindendes Protein klassifiziert. Nucleostatmin ist ein in Maus und Ratte konserviertes Protein und zeigt eine starke Sequenzhomologie zum Protein aus Maus und Ratte, die besonders in den Bereichen des RRM und der möglichen NoLS ausgeprägt sind. Ektopisch exprimiertes Nucleostatmin lokalisierte überwiegend im Nukleoplasma, war jedoch auch im Nukleolus nachweisbar. Das endogene Nucleostatmin Protein ist zusammen mit der DNA-abhängigen RNA Polymerase I und dem UBF Protein in fibrillären Zentren des Nukleolus lokalisiert. Wurde die DNA-abhängige RNA-Synthese der RNA Pol I durch AMD inhibiert, lokalisierte Nucleostatmin nicht mehr im Nukleolus, sondern war diffus im Nukleoplasma verteilt. Demnach übt Nucleostatmin möglicherweise eine Funktion auf transkriptioneller oder post-transkriptioneller Ebene der rRNA Transkription aus.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass zwei neue, unbekannte Kerndomänen-assoziierte Proteine mithilfe dieses methodischen Lösungsansatzes identifiziert und charakterisiert wurden. Es stellte sich im Laufe dieser Arbeit heraus, dass dabei die Lokalisation der EYFP-Fusionsproteine nicht zwingend der des endogenen Proteins entspricht, was erstmals eine Schwachstelle dieses Ansatzes zur Identifizierung von neuen Kerndomänenkomponenten aufzeigt. Dennoch bestätigte sich für das PAROT Protein als ersten Vertreter der KRAB-C2H2-Zinkfinger Proteinfamilie nachweislich eine PML-Kerndomänen Assoziation. Interessanterweise wurde auch ein weiteres KRAB-C2H2-Zinkfingerprotein, KRIM1A, von PML IV in PML-Kerndomänen rekrutiert. Eine PML-Kerndomänen Assoziation des Nucleostatmin Proteins konnte bisher weder bestätigt, noch gänzlich ausgeschlossen werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei um ein neues RNA-bindendes, nukleoläres Protein, das eine noch unbekannte Funktion in der rRNA Transkription ausübt.

I. Einleitung

1.1 Der Zellkern (Nukleus)

Der Zellkern (Nukleus) wurde als erste intrazelluläre Struktur eukaryotischer Zellen entdeckt und das erste Mal 1802 von Franz Bauer beschrieben (Dundr and Misteli, 2001). Er stellt den charakteristischen Unterschied zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen dar, in denen die Nukleinsäuresynthese und Prozessierung räumlich getrennt in diesem, von der Kernhülle umgebenen Kompartiment, abläuft. Die Kernhülle ist mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert, besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran und wird von den Kernporenkomplexen durchspannt. Über diese findet der Transport von Stoffen zwischen Zellkern und Zytoplasma statt (Stoffler et al., 1999). Der innere Bereich des Nukleus, das Nukleoplasma, ist nicht homogen, sondern in hochorganisierte Domänen oder Kompartimente aufgeteilt. Obwohl erste Studien darauf hinwiesen, dass der Nukleus nur wenig organisiert ist, zeigen aktuelle Studien eine stetig steigende Anzahl von spezialisierten und hochorganisierten Domänen oder subnukleären Organellen (Spector, 2001). Einige dieser Domänen wurden als dynamische Strukturen identifiziert, wobei ein schneller Proteinaustausch zwischen diesen Domänen und dem Nukleoplasma stattfindet. Sie sind sowohl mit spezifischen nukleären Funktionen als auch spezifischen Proteinen assoziiert (Misteli, 2001). Im Nukleoplasma liegen DNA-Proteinkomplexe in sog. chromosomalen Territorien als Euchromatin oder Heterochromatin vor. Euchromatin ist nur schwach kondensiert, so dass spezifische DNA Sequenzen transkribiert werden können. Heterochromatin ist stark kondensiert, die Gene sind inaktiv und es findet keine Transkription statt (Cremer and Cremer, 2001). Das Nukleoplasma enthält ebenfalls, neben unterschiedlichen Anteilen löslicher Proteine, unlösliche Proteine, die bei der Extraktion von Zellkernen mit Hochsalzpuffern als filamentöse Struktur zurück bleiben (Zbarskii and Debov, 1951). Sie wird als nukleäre Matrix bezeichnet und soll die nukleäre Architektur organisieren (Pederson, 2000). Die biologische Existenz der nukleären Matrix wird stark diskutiert, da sie bisher nicht genau definiert werden konnte (Nickerson, 2001; Pederson, 2000). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen ein stark verzweigtes, filamentöses Netzwerk. Dieses ist sowohl in der Masse als auch im Verzweigungsgrad nicht stimmig mit der Topographie des Interchromatin Bereiches von Zellkernen in lebenden Zellen (Bornfleth et al., 1999; Kanda et al., 1998; Manders et al., 1999; Politz et al., 1999; Zink et al., 1998). Die bisher bekannten nukleären Kompartimente sind unterschiedlich gut charakterisiert, wobei der Nukleolus (Carmo-Fonseca et al., 2000; Olson et al., 2000; Scheer

and Hock, 1999) eines der bestcharakterisierten Kompartimente darstellt. Hierbei handelt es sich um ein hochorganisiertes Organell, das die ribosomale DNA beinhaltet, in dem die ribosomalen RNAs transkribiert, prozessiert und mit den ribosomalen Untereinheiten komplexiert werden (Leung et al., 2003). Innerhalb der in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie als Punktstrukturen („Dots“) erscheinenden nukleären Domänen sind es u. a. die PML-Kerndomänen (Promyelozytische Leukämie-Protein), die durch ihre Assoziation mit verschiedenen humanen Erkrankungen ein großes Interesse auf sich ziehen (Borden, 2002).

1.2 PML-Kerndomänen

PML-Kerndomänen, auch bekannt als POD (PML onkogene Domänen), Kremer-Körper, ND10 (Nukleäre Domäne-10) oder einfach nukleäre Punkte wurden bereits vor über 40 Jahren beschrieben (de et al., 1960) und erlangten durch den Gebrauch von Autoimmunsereen ein neues Interesse (Brasch and Ochs, 1992; Szosteki et al., 1997; Zuchner et al., 1997). Die Namen PML-Kerndomänen und POD stammen aus verschiedenen Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass das promyelozytische Leukämie-Protein (PML) mit diesen Strukturen assoziiert ist (Ascoli and Maul, 1991; Dyck et al., 1994; Hodges et al., 1998; Maul et al., 2000). PML-Kerndomänen sind scheinbar evolutionär nicht konserviert innerhalb der Eukaryoten. Sie wurden bislang nur bei Säugern identifiziert und sind in nahezu allen bisher analysierten humanen Zelllinien vorhanden (Borden, 2002). Sie können in Interphase-Zellkernen mit geeigneten Antikörpern sichtbar gemacht werden und erscheinen in der Immunfluoreszenzmikroskopie als vereinzelte punktförmige oder ringähnliche Strukturen (Dyck et al., 1994; Weis et al., 1994). Es handelt sich dabei um dynamische makromolekulare Strukturen bzw. Multiproteinkomplexe, die mit der unlöslichen nukleären Matrix assoziiert sind (Nayler et al., 1998; Sahlas et al., 1993; Stuurman et al., 1992). Sie variieren in ihrer Größe, Anzahl und Zusammensetzung in verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit von endogenen und exogenen Stimuli wie z.B. extrazellulären Signalen, viralen Infektionen und genotoxischem Stress (Borden, 2002). Unter normalen Bedingungen liegt die Anzahl der PML-Kerndomänen jedoch zwischen 10 und 30 dieser nukleären Domänen pro Zellkern mit einem Durchmesser von ~ 0,2 bis 1 µm (Dyck et al., 1994; Lallemand-Breitenbach et al., 2001; Melnick and Licht, 1999). Anzahl und Größe der PML-Kerndomänen ändern sich während des Zellzykluses (Koken et al., 1995). Die PML-Kerndomänen und die Aufklärung ihrer molekularen Zusammensetzung war Gegenstand zahlreicher Forschungen der vergangenen Jahre und ist auch heute noch ein sehr aktives Forschungsgebiet. In den frühen

1960er Jahren wurden sie das erste Mal elektronenmikroskopisch dargestellt und rückten, aufgrund ihrer Verbindung mit mehreren humanen Erkrankungen wie beispielsweise der akuten promyelozytischen Leukämie (APL), in den frühen 1990er Jahren erneut in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Obwohl die molekulare Funktion der PML-Kerndomänen bis heute noch unklar ist, gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass es sich dabei um regulatorische Domänen handelt, die an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind. So wird beispielsweise das 11S Proteasom rekrutiert, das an der Protein-Degradierung beteiligt ist (Lallemand-Breitenbach et al., 2001). Proteine, die an der Regulation der Transkription von Genen (Li et al., 2000; Zhong et al., 2000a), am RNA-Transport (Lai and Borden, 2000), oder an Signalübertragungswegen der Apoptose beteiligt sind (D'Orazi et al., 2002; Guo et al., 2000; Hofmann et al., 2002; Wang et al., 1998; Zhong et al., 2000b), sind in PML-Kerndomänen zu finden. Selbst an der Kontrolle von Zellwachstum (Cohen et al., 2001; Fagioli et al., 1998) und Differenzierung (Wang et al., 1998), der Alterung von Zellen (Bischof et al., 2002; Ferbeyre et al., 2000; Langley et al., 2002; Pearson et al., 2000), der Tumorsuppression (Salomoni and Pandolfi, 2002) und der DNA Reparatur (Bischof et al., 2001; Carbone et al., 2002) sind PML-Kerndomänen assoziierte Proteine beteiligt. Neben PML wurde das kleine ubiquitinähnliche Protein SUMO-1 (PIC1/Sentrin) in PODs nachgewiesen. SUMO-1 ist für die korrekte Bildung der PODs essentiell, da nur nach kovalenter Bindung von drei Lysinresten an PML PML-Kerndomänen ausgebildet werden (Boddy et al., 1996). SUMO-1 modifiziertes PML bildet somit vermutlich das Gerüst für die POD Struktur während nicht modifiziertes PML in der löslichen Kernplasmafraktion verteilt ist (Muller et al., 1998). Erst die Modifizierung von PML durch kovalent gebundenes SUMO-1 ermöglicht die Lokalisierung verschiedener Proteine wie beispielsweise Daxx oder CBP in PML-Kerndomänen (Doucas et al., 1999; Ishov et al., 1999; Zhong et al., 2000b). Die Vielzahl und Verschiedenheit der PML-Kerndomänen und der an sie assoziierten Proteine führte zu der Vermutung, dass PML-Kerndomänen selbst keine aktiven Kompartimente sind, sondern eine Art Depot zur Lagerung und Regulation dieser Proteine darstellen könnten (Maul et al., 2000). Abbildung 1.1 zeigt eine Zusammenstellung von zellulären Proteinen, die nachweislich mit PML-Kerndomänen assoziiert sind (Hofmann and Will, 2003).

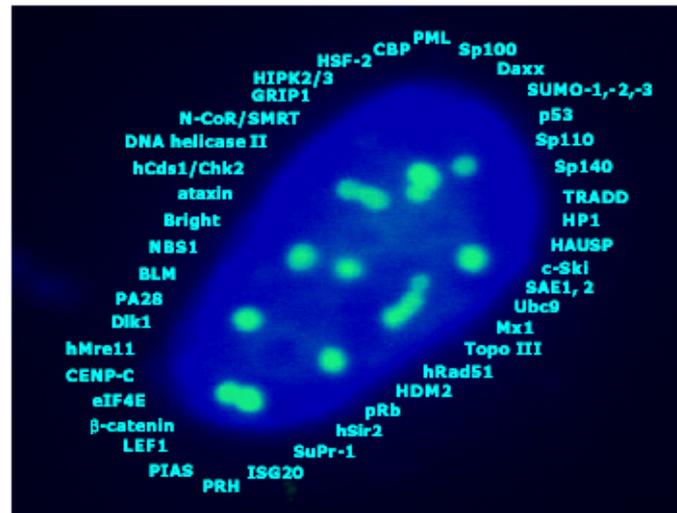


Abb.1.1: Zelluläre Proteine, die mit PML-Kerndomänen assoziieren. 2003 veröffentlicht von T.G. Hofmann und H. Will. „Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation.“ *Cell Death and Differentiation* 10, 1290-1299.

PML-Kerndomänen und deren Komponenten weisen dynamische Eigenschaften auf, die wahrscheinlich für deren Funktionen in verschiedenen zellulären Prozessen eine große Rolle spielen (Boisvert et al., 2001; Misteli, 2001; Wiesmeijer et al., 2002). Nach Induktion von Stress z.B. in Form von Hitzeschock, Schwermetallbehandlung oder nach der Expression einiger viraler Proteine konnte gezeigt werden, dass PML-Kerndomänen dissoziieren und wieder reassemblieren (Eskiw et al., 2003; Everett et al., 1998; Maul et al., 1995). Das SUMO-1 Protein scheint bei diesem Mechanismus der Stress-induzierten Dissoziation und Wiederherstellung von PML-Kerndomänen eine Schlüsselrolle einzunehmen (Eskiw et al., 2003).

1.2.1 Das PML-Protein und die RBCC/TRIM-Proteinfamilie

Die häufigste Form der APL zeichnet sich durch chromosomale Translokation t(15:17) aus, bei der das *Retinsäurerezeptor- α* -Gen (*RAR α* -Gen) an das *Promyelozytische Leukämie*-Gen (*PML*-Gen) fusioniert wird und es dadurch zur Expression des PML-RAR α Fusionsproteins kommt (Alcalay et al., 1991; Chang et al., 1992; de The et al., 1990; Goddard et al., 1991; Kakizuka et al., 1991; Pandolfi et al., 1991; Rowley et al., 1977). Charakteristisch für die APL ist die Blockierung der Differenzierung von Promyelozyten zu Myelozyten. Die leukämischen Zellen zeichnen sich durch eine massive Umverteilung der PML-Kerndomänen in sogenannte „Mikrodots“ aus, die durch die Expression des Fusionsproteins PML-RAR α hervorgerufen wird. Diese Umverteilung kann durch Behandlung mit *trans*-Retinsäure (ATRA) behoben werden und durch die daraus resultierende Aufhebung der Blockierung der

Differenzierung zu einer, wenn auch nur kurzzeitigen, klinischen Remission in Patienten führen (Degos and Wang, 2001; Grimwade and Solomon, 1997; Melnick and Licht, 1999). Die Behandlung mit Arsenitrioxid hingegen, führt zur Apoptose der leukämischen Zellen (Chen et al., 1996; Zhu et al., 1997). Obwohl die Anzahl der APL Patienten weltweit relativ gering ist, ist die erfolgreiche Differenzierungstherapie beispielhaft für die Bekämpfung von Tumorzellen ohne Chemotherapeutika und wird deshalb in zahlreichen wissenschaftlichen Abhandlungen diskutiert (Benoit et al., 2001a; Benoit et al., 2001b; Grimwade and Solomon, 1997; Melnick and Licht, 1999; Roussel and Lanotte, 2001).

Das PML-Protein gehört, ebenso wie die TIF1-Proteinfamilie (siehe 1.2.4), zu einer Proteinfamilie, die sich durch das dreigeteilte RBCC/TRIM-Motiv auszeichnen, das sehr wahrscheinlich der Protein-Protein Interaktion dient und in Abbildung 1.2 dargestellt ist (Borden, 1998; Borden, 2002).

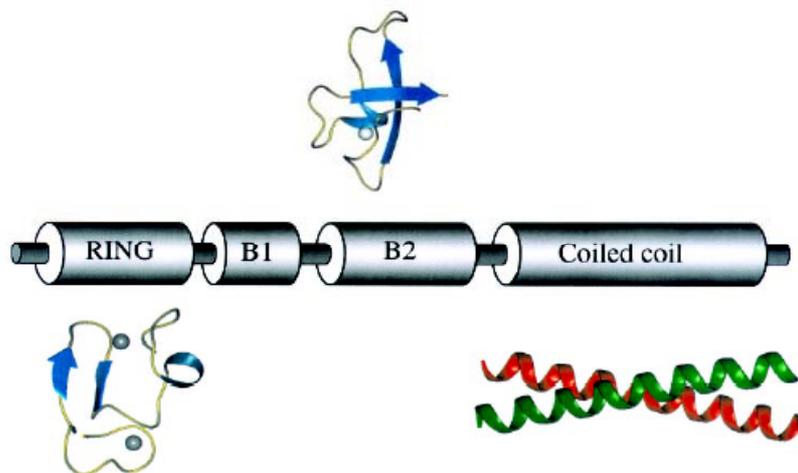


Abb.1.2: Schematische Darstellung des PML RBCC/TRIM Motivs. Die Abbildung zeigt die schematische dreidimensionale Struktur der drei Subdomänen; die PML RING-Finger Domäne (Borden et al., 1995), die XNF7 B-Box Domäne (Borden et al., 1995) und eine idealisierte heterodimere α -helikale „coiled-coil“ Domäne. Zink-Atome sind durch grau-weiße Kugeln dargestellt, β -Faltblätter als Pfeile und α -Helizes als Spiralbänder. Die räumliche Anordnung der drei Subdomänen ist unbekannt, wie auch die der mutmaßlichen „coiled-coil“ Domäne, obwohl die B2 B-Box des PML-Proteins direkt in diese Region übergeht (Borden, 2002).

Das entscheidende Element dieses dreigeteilten Motivs (RING-Finger, B-Box, „coiled-coil“ oder „TRIpartite Motif“ (Reymond et al., 2001)) ist der N-terminale RING-Finger, der als Cystein-reiches Motiv der Form C_3HC_4 zwei Zink-Ionen bindet (Barlow et al., 1994; Bellon et al., 1997; Borden et al., 1995). Es wird vermutet, dass die RING-Finger Struktur durch die Bindung von Zink ein hydrophobes Grundgerüst bildet, und die variable Sequenz dazwischen

die spezifische Proteinbindung in sich birgt (Borden, 1998; Cao et al., 1997). Die RING-Finger Domäne des PML-Proteins ist u. a. für die Formation der PML-Kerndomänen essentiell (Borden et al., 1995; Kastner et al., 1992). Das zweite Motiv der RBCC-Domäne ist die B-Box, die ebenfalls als Cystein-reiches Motiv der Form CHC_3H_2 Zink bindet (Reddy and Etkin, 1991). Bei der B-Box handelt es sich um eine unabhängig globulär gefaltete Domäne, die sich in doppelter Ausführung C-terminal des RING-Fingers befindet (Peng et al., 2000). Das dritte Motiv der RBCC-Domäne ist die „coiled-coil“ Dimerisierungsdomäne, die sich durch hydrophobe Reste, von denen angenommen wird, dass sie eine ausgedehnte α -helikale Region bilden, auszeichnet (Lupas, 1996). Diese Domäne ist für die Aufrechterhaltung von PML und PML-RAR α Homo- und Heterodimeren notwendig (Kastner et al., 1992). Als vollständige RBCC-Domäne ist diese notwendig und hinreichend für die Lokalisation von PML in PML-Kerndomänen *in vivo*, Wachstumssuppression, apoptotische sowie anti-virale Aktivitäten des PML-Proteins (Barlow et al., 1994; Borden et al., 1996; Le et al., 1996).

Bisher sind 15 PML-Isoformen bekannt, die sich hauptsächlich im C-Terminus des Proteins unterscheiden (Jensen et al., 2001). Im Verlauf dieser Arbeit wurden jedoch nur die beiden Isoformen PML III und PML IV verwendet (Abbildung 1.3). Wie alle PML-Isoformen besitzen beide Proteine das RBCC-Motiv und unterscheiden sich lediglich im C-Terminus, der durch alternatives Spleißen aus verschiedenen Exons zusammengesetzt wird.

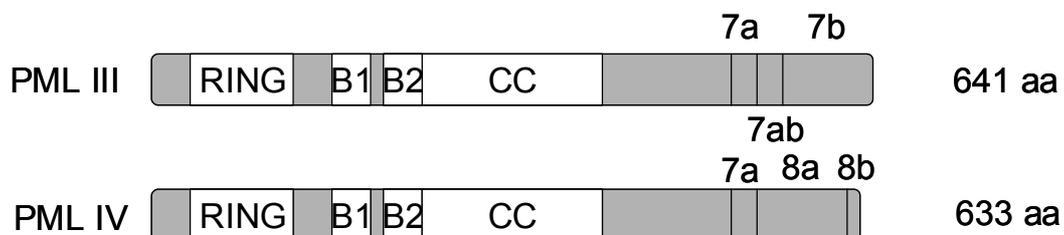


Abb.1.3: Schematische Darstellung der PML-Isoformen PML III und PML IV. Alle PML-Isoformen besitzen das N-terminale RBCC-Motiv, so auch PML III und PML IV. Die unterschiedlichen C-Termini entstehen durch alternatives Spleißen. PML III ist 641 Aminosäuren (aa) lang und setzt sich im C-Terminus aus den Exons 7a, 7ab und 7b zusammen. PML IV ist 633 Aminosäuren lang und setzt sich im C-Terminus aus den Exons 7a, 8a und 8b zusammen (Jensen et al., 2001).

Zahlreiche Studien weisen auf eine Vielzahl von physiologischen Funktionen hin, in denen PML eine Rolle zu spielen scheint. So wurde beispielsweise für die PML-Isoform PML IV eine spezifische Interaktion mit p53 nachgewiesen, was darauf hinweist, dass PML IV sowohl bei der Tumorsuppression als auch bei der Kontrolle des Zellwachstum eine Rolle spielt

(Fogal et al., 2000; Guo et al., 2000). Andere Studien zeigen, dass PML als pro-apoptotischer Faktor agieren kann (Borden et al., 1997; Fagioli et al., 1998; Quignon et al., 1998; Wang et al., 1998) und sowohl PML als auch die PML-Kerndomänen für die intrazelluläre Virusabwehr von Bedeutung sind (Grotzinger et al., 1996a; Grotzinger et al., 1996b; Lavau et al., 1995; Stadler et al., 1995). Da PML auch mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (z. B.: CBP, Daxx, p53) interagiert, wird für diese Proteinfamilie eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation einer Vielzahl von Genen angenommen (Fogal et al., 2000; Li et al., 2000; Pearson et al., 2000; Zhong et al., 2000a). Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um die genaue biologische Funktion von PML zu klären.

1.2.2 PML und die Regulation der Transkription

Die Rolle, die das PML-Protein in der Transkriptionsregulation spielt, wird aufgrund gegensätzlicher Ergebnisse kontrovers diskutiert. Wie bereits erwähnt, gehört das PML-Protein, ebenso wie die TIF1-Proteinfamilie, zu den RBCC-Proteinen (siehe 1.2.1). Im Gegensatz zu PML konnte für TIF1 β gezeigt werden, dass sowohl die Formation von Multimeren als auch die Interaktion dieses Proteins mit der KRAB-Domäne von Zinkfinger-Proteinen über dessen RBCC-Domäne stattfindet, spezifisch und essentiell ist für die Repression der Transkription (Peng et al., 2000). Die RBCC-Domäne des PML-Proteins ist notwendig für die Formation von PML Homo- und Heterodimeren und für die Lokalisation von PML in PML-Kerndomänen (Borden et al., 1996; Kastner et al., 1992; Le et al., 1996); siehe auch 1.2.1). In Abhängigkeit vom molekularen Kontext wird dem PML-Protein eine Rolle als Kofaktor sowohl bei der Repression als auch bei der Aktivierung der Transkription zugeschrieben (Melnick and Licht, 1999). Sowohl Aktivatoren der Transkription (CBP, p53) als auch Proteine, die an der Repression der Transkription beteiligt sind (HP1, Daxx, pRB, Histon-Deazetylasen (HDACs)) wurden in Assoziation mit PML-Kerndomänen gefunden (Alcalay et al., 1998; Borden, 2002; Khan et al., 2001b; LaMorte et al., 1998; Melnick and Licht, 1999). So interagiert PML beispielsweise *in vitro* und *in vivo* mit p53 und unterstützt, durch Rekrutierung von p53 in PML-Kerndomänen, die Transkription von p53 Zielgenen (de Stanchina et al., 2004). In Kooperation mit CBP/p300 aktiviert PML die Tax-vermittelte Genexpression (Ariumi et al., 2003). Durch PML-vermittelte Rekrutierung des Repressorproteins Daxx in PML-Kerndomänen wird die Repression der Transkription durch Daxx aufgehoben (Li et al., 2000). PML selbst wird ebenfalls, wegen seiner direkten Interaktion mit Histon-Deazetylasen eine Repressorfunktion bei der Transkription

zugesprochen (Wu et al., 2001). In der Mad-vermittelten Repression von Genen der Proliferation z.B. von E2F-1 und c-myc interagiert PML mit HDAC1 und Kopressoren der Transkription (c-Ski, N-CoR, Sin3A). PML-RAR α hingegen hebt die Mad-vermittelte Repression dieser Gene auf (Khan et al., 2001a). In APL Zellen ist möglicherweise die transkriptionelle Repressorfunktion von PML durch die Expression des Fusionsproteins PML-RAR α zerstört, was die Veränderung der Chromatinordnung und der Expression verschiedener Gene zur Folge hat und schließlich zum Ausbruch der Leukämie führt (Saha et al., 1998). Verschiedene Reporter Studien unterstützen die Vermutung, dass PML eine Funktion bei der Transkription hat. In Abhängigkeit des jeweilig verwendeten Promotors und Systems, kann PML die Transkription reprimieren oder aktivieren (Guiochon-Mantel et al., 1995; Melnick and Licht, 1999; Vallian et al., 1997).

1.2.3 Krüppel-C2H2 Zinkfinger-Proteine

Zinkfinger-Proteine sind eine Klasse regulatorischer Proteine, die an zahlreichen zellulären Prozessen wie beispielsweise Entwicklungsprozessen, Differenzierung und Tumorsuppression beteiligt sind (Iuchi, 2001). Die ersten C2H2-Zinkfinger-Motive wurde 1985 von Miller, McLachlan und Klug für den Krüppel-Transkriptionsfaktor TIFIIIA aus *Xenopus laevis* identifiziert. Bis heute wurden auch in anderen Spezies wie beispielsweise Hefen, Nematoden, Pflanzen, *Drosophila melanogaster*, Spinnen, Fröschen, Mäusen und Menschen Zinkfinger-Motive identifiziert (Kohlhase et al., 1996; Venter et al., 2001). Die Krüppel-assoziierte Box (KRAB-Domäne) im N-Terminus dieser C2H2-Zinkfinger Proteine, wurde 1991 von Bellfroid et al. entdeckt und beschrieben. Die Krüppel-C2H2-Zinkfinger Proteine stellen etwa ein Drittel (290) der 799 verschiedenen, bisher bekannten Zinkfinger Proteine des humanen Genoms und die größte Familie von Regulatoren der Transkription in Säugern dar (Urrutia, 2003). Viele Gene, die für KRAB-Zinkfinger Proteine kodieren, sind auf dem Chromosom 19 in großen Bereichen kodiert, erscheinen jedoch auch vereinzelt auf anderen Chromosomen (Rousseau-Merck et al., 2002). Proteine, die KRAB-Domänen enthalten, besitzen zusätzlich eine charakteristische DNA-bindende Domäne, die zwischen vier und etwa dreißig Zinkfinger-Motiven enthalten kann (Abb.1.4; (Looman et al., 2002). Die Zinkfinger-Domäne zeichnet sich durch eine spezielle Sekundärstruktur aus, die durch ein Zink-Ion, komplexiert von zwei Cystein- und zwei Histidinresten (C2H2), stabilisiert wird. Unter allen Zinkfinger-Proteinen ist der C2H2 der klassische Zinkfinger und wird oft als CX₂-₄CX₁₂HX₂₋₆H beschrieben, um die Intervalle zwischen den Zink-bindenden Aminosäureresten darzustellen (Iuchi, 2001).

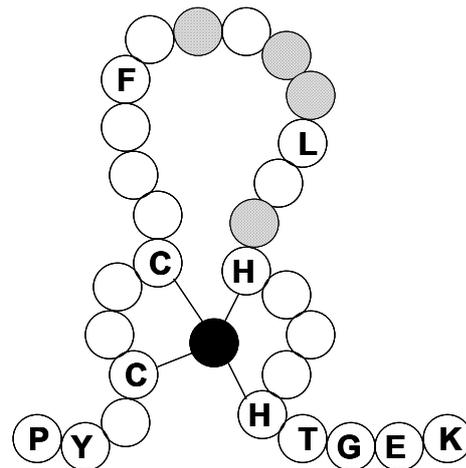


Abb.1.4: Schematische Darstellung des Zinkfinger-Motivs. Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung eines Krüppel-Zinkfinger Motivs. Konservierte Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Reste, die an der DNA-Bindung beteiligt sind, sind grau unterlegt (Wolfe et al., 2000). Der schwarze Kreis stellt das Zink-Ion dar, das die Struktur des Zinkfinger-Motivs zusammenhält (Looman et al., 2002).

Zwischen den hintereinander liegenden Zinkfinger-Motiven liegen die konservierten Linker mit der Aminosäuresequenz TGEKP und stabilisieren den Zinkfinger-DNA Komplex. Dabei stellt der Linker mit dem C-Terminus der benachbarten α -Helix durch eine Wasserstoffbrücke den Kontakt her und interagiert gleichzeitig über das Lysin (K) mit dem Phosphat-Rückgrad der DNA. Das wird als *C-capping* bezeichnet (Elrod-Erickson et al., 1996; Laity et al., 2000). In Anwesenheit von Zink formt der Zinkfinger eine kompakte $\beta\beta\alpha$ -Domäne, in der das Zink-Ion tetraedrisch zwischen den beiden Cysteinen und Histidinen gebunden wird (Krishna et al., 2003). Eine zusätzliche strukturelle Stabilität wird durch ein hydrophobes Gerüst bereitgestellt, das aus den konservierten Aminosäuren Tyrosin (Y), Phenylalanin (F) und Leucin (L) besteht. Zwischen der Zinkfinger-Domäne und der KRAB-Domäne befindet sich die sog. Linker-Domäne, deren Funktion bisher unbekannt ist. Sie zeigt jedoch den höchsten Grad an Sequenzvariation in allen Zinkfinger-Proteinen (Bellefroid et al., 1993). Die KRAB-Box stellt das Modul der transkriptionellen Repression dar (Majello et al., 1997; Margolin et al., 1994; Pengue et al., 1994; Witzgall et al., 1994). Sie besteht aus einer KRAB-A und -B Box von insgesamt etwa 50-75 Aminosäuren, die auf zwei verschiedenen Exons in der genomischen Struktur kodiert sind und nachweislich alternativ gespleißt werden. Dabei entstehen auch Spleißvarianten, die nur eine der beiden Boxen besitzen (Bellefroid et al., 1991; Lovering and Trowsdale, 1991; Rosati et al., 1991; Takashima et al., 2001). Die KRAB-Domäne zeigt innerhalb der Mitglieder eine hohe Homologie, die besonders in der KRAB-A Box, die für die Repressoraktivität der Proteine verantwortlich ist, ausgeprägt ist

(Witzgall et al., 1994). Die Repression der Transkription erfolgt über die Bindung an den Korepressor *KRAB-associated protein-1* (KAP-1; (Friedman et al., 1996)), auch bekannt als *KRAB-A interacting protein-1* (KRIP-1; (Kim et al., 1996)) oder *transcription intermediary factor 1 β* (TIF1 β ; (Moosmann et al., 1996)). TIF1 β gehört zu der Proteinfamilie, die sich durch das RBCC-Motiv auszeichnen (siehe 1.2.1). Dieses Motiv ist zur Interaktion mit KRAB-Zinkfinger Proteinen und zur Repression der Transkription absolut notwendig. Friedman et al. (1996) konnten zeigen, dass die Aminosäureabfolge DV und MLE der KRAB-A Box für die Interaktion mit TIF1 β /KAP-1/KRIP-1 und die damit verbundene Repression der Transkription essentiell sind. Diese Aminosäuren sind hoch konserviert innerhalb der KRAB-Zinkfinger Proteinfamilie (Abrink et al., 2001; Mark et al., 1999). Die KRAB-B Box alleine kann die Transkription nicht reprimieren, sie kann jedoch die Repressoraktivität der KRAB-A Box erhöhen (Vissing et al., 1995). Das aktuellste Modell der transkriptionellen Repression besagt, dass TIF1 β an die KRAB-Domäne als ein Oligomer bindet und Heterochromatin Protein 1 Isoformen (HP1 α , HP1 β , HP1 γ), Histon Deazetylasen (HDACs) und Setdb1 (*SET-domain binding protein 1*) in den Komplex rekrutiert (Abb. 1.5; (Urrutia, 2003)).

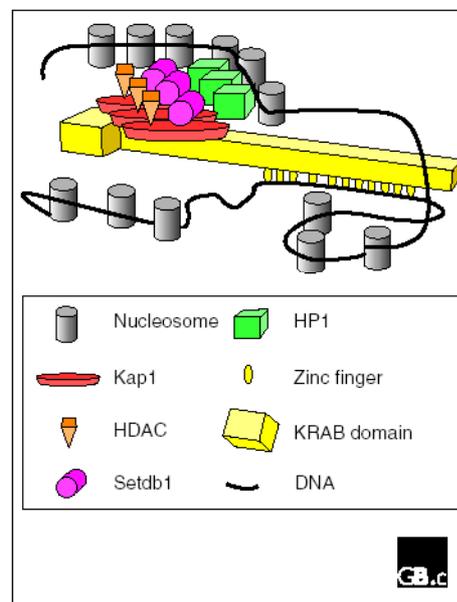


Abb.1.5: Modell des KRAB-Repressorkomplexes. Ein KRAB-Zinkfinger Protein bindet spezifisch über seine Zinkfinger-Domäne an den Promotor eines Gens. Ein trimerer TIF1 β -Komplex bindet an die KRAB-Domäne des KRAB-Zinkfinger Proteins und rekrutiert HP1, HDACs und Setdb1 in den Komplex, um Heterochromatin auszubilden und Gene still zu legen (Urrutia, 2003).

Das Setdb1 Protein ist eine Methyltransferase, die Histon Protein 3 (HP3) spezifisch am Lysin-9 methyliert (Schultz et al., 2002). Dieses Modell weist auf eine schrittweise Formation des Repressorkomplexes hin, weitere Untersuchungen dazu stehen jedoch noch aus. Die Eigenschaften der KRAB Domäne gelten auch Spezies-übergreifend (Looman et al., 2002). Für KRAZ1 und KRAZ2 beispielsweise, zwei murine KRAB-Zinkfinger-Proteine, konnte eine Interaktion mit TIF1 β und die damit verbundene Repression der Transkription nachgewiesen werden (Agata et al., 1999).

1.3 Der Nukleolus

Der Nukleolus ist die prominenteste Struktur des eukaryotischen Zellkerns und aufgrund seiner hohen Dichte das einzige subnukleäre Kompartiment, das lichtmikroskopisch sichtbar ist. Bereits 1836 wurde der Nukleolus von Gabriel Gustav Valentin beschrieben (Leung et al., 2003). 1930 fand Heitz, gefolgt von McClintock, heraus, dass die Anzahl und Länge der weniger kompakten Regionen mitotischer Chromosomen in einem direkten Bezug stehen zu der Anzahl und Größe der Nukleoli. Diese Regionen sind heute bekannt als die Nukleolus-Organisator-Regionen oder NORs (*nucleolar organizing regions*) (Heitz, 1931; McClintock, 1934). Es zeigte sich, dass Nukleoli dynamische Strukturen sind, die während des Zellzyklus zerfallen und sich schließlich wieder um die rRNA-Gengruppen reformieren (Shaw and Jordan, 1995). Elektronenmikroskopische Dünnschnitte offenbarten, dass sich die Nukleoli der meisten höheren Eukaryoten morphologisch in drei wesentliche Kompartimente unterteilen lassen. Von innen nach außen handelt es sich dabei um das fibrilläre Zentrum (*fibrillar centre* (FC)) , die dichte fibrilläre Komponente (*dense fibrillar component* (DFC)) und die granuläre Komponente (*granular component* (GC)) ((Carmo-Fonseca et al., 2000); Abb.1.6). Die Hauptaufgabe des Nukleolus liegt vermutlich in der Biosynthese der Ribosomen. Hierbei handelt es sich um einen sehr komplexen Prozess, der die Zusammenführung der primären rRNA Transkripte und etwa 80 verschiedene Proteine beinhaltet (Gorlich and Mattaj, 1996). Die Transkription und Prozessierung der rRNA reflektiert sich in der Struktur des Nukleolus (Hyttel et al., 2000). In den fibrillären Zentren befinden sich die Proteine der Transkription (z.B. Topoisomerase I, *Upstream Binding Factor* UBF, und RNA Polymerase I) und frühen rRNA Prozessierung (z.B. Fibrillarin) und die Nukleolus-Organisator-Regionen, von denen bereits seit den 1960er Jahren bekannt ist, dass sie mehrere hundert hintereinander geschaltete Kopien der 18S, 5,8S und 28S ribosomalen RNA Gene enthalten (Abb.1.6 B) (Birnstiel et al., 1971; Chipchase and Birnstiel, 1963; Hadjiolov, 1980; Ritossa and Spiegelman, 1965).

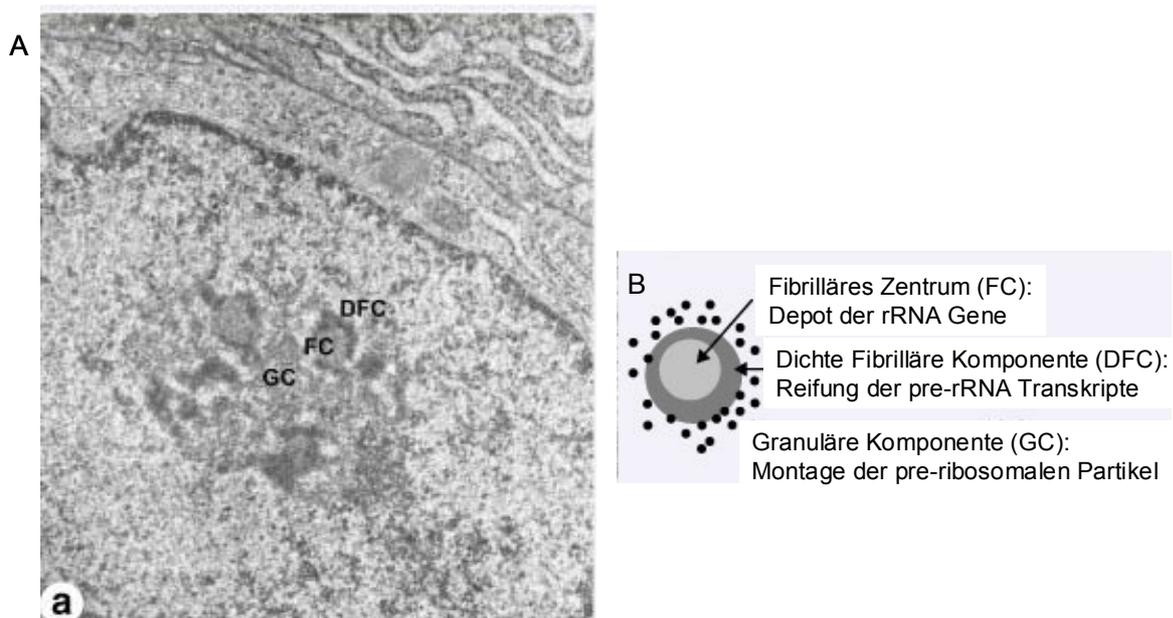


Abb.1.6: Elektronenmikroskopische Darstellung der Morphologie des Nukleolus. A) Nukleoli der Säugerzelle enthalten typischerweise mehrere fibrilläre Zentren (FC), jedes umgeben mit einem Bereich der dichten fibrillären Komponente (DFC), welche wiederum selbst von der granulären Komponente (GC) umgeben ist. B) Schematische Darstellung des in A) gezeigten Nukleolus und die wesentlichen Aufgaben seiner Kompartimente.

Diese rRNA Gene werden mit einer hohen Effizienz transkribiert, je nach Bedarf an Ribosomen und metabolischer Aktivität der Zelle (Grummt, 2003). Sie scheinen an der Peripherie des fibrillären Zentrums zu lokalisieren und sogar in die dichten fibrillären Komponenten hinein zu ragen. Die genaue Lokalisation der rRNA-Transkription durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase I innerhalb dieser Komponenten wird jedoch kontrovers diskutiert (Scheer and Hock, 1999; Shaw and Jordan, 1995). In den DFCs, die das FC umgeben, sind neben den primären rRNA Transkripten ebenfalls die Proteine der frühen Prozessierung (z.B. Fibrillarin) zu finden. Die primären rRNA Transkripte werden von innen nach außen transportiert, d.h. von den dichten fibrillären Komponenten in die granulären Komponenten. Dabei durchlaufen sie eine komplexe Serie post-transkriptionaler Prozessierungen und Modifikationen (Scheer and Hock, 1999). Hierbei assoziieren die ribosomalen Proteine bereits mit den Primärtranskripten der rRNAs zum 90S prä-Ribosom, woran sich die Prozessierung der teilweise polycistronischen rRNAs anschließt, sowie die Trennung der prä-ribosomalen Untereinheiten. Die Markerproteine der GCs sind also die ribosomalen Untereinheiten und Proteine der späten Prozessierung (z.B. Nucleophosmin und Nucleolin). Schließlich erfolgt der Export der prä-ribosomalen Untereinheiten aus dem Nukleus in das Zytoplasma (Aitchison and Rout, 2000; Carmo-Fonseca et al., 2000; Dundr and Misteli, 2001). Der gesamte Prozess der ribosomalen Biogenese ist bis heute nicht vollkommen entschlüsselt (Leung et al., 2003). Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass der Nukleolus nicht nur für die Biogenese der Ribosomen verantwortlich ist, sondern auch andere Funktionen übernimmt (siehe auch 1.3.1). Dazu gehören beispielsweise die RNA-Prozessierung,

mRNA-Export, die Kontrolle des Zellzyklus, Alterung (Bond and Wold, 1993; Olson et al., 2000; Pederson and Politz, 2000; Visintin and Amon, 2000), Virus Replikation (Hiscox, 2002) und Tumorsuppression (Leung et al., 2003).

1.3.1 Zelluläre Proteine des Nukleolus

Nucleoli sind dynamische nukleäre Domänen, die sowohl mit dem Zytoplasma als auch mit anderen nukleären Domänen in permanentem Kontakt stehen (Chen and Huang, 2001). Seit langem ist bekannt, dass die Hauptaufgabe des Nukleolus wohl in der Biosynthese der Ribosomen liegt, jedoch zeigen immer mehr aktuelle Studien, dass dies offensichtlich nicht die alleinige Aufgabe dieses subnukleären Kompartiments ist (Olson et al., 2000; Pederson, 1998a; Pederson, 1998b). Aus diesem Grund wurden in mehreren Laboren in den letzten Jahren funktionelle Proteom-Analysen des humanen Nukleolus durchgeführt (Andersen et al., 2002; Leung et al., 2003; Scherl et al., 2002). Über 500 nukleoläre Proteine, die unter bestimmten metabolischen Konditionen, Zellzyklus-abhängig oder permanent im Nukleolus lokalisieren, wurden identifiziert. Dies beinhaltet, zusätzlich zu RNA-bindenden Proteinen und ribosomalen Proteinen, beispielsweise Wachstumsfaktoren, jedoch auch Hitzeschock-Proteine und Proteine, die in der Apoptose, der Interferon- oder UV-Induktion eine Rolle spielen (Leung et al., 2003). In dieser Arbeit wurde ein Protein charakterisiert, das sowohl RNA bindet als auch mit der DNA-abhängigen RNA Polymerase I im Fibrillären Zentrum kolokalisiert. Im folgenden werden daher nur die RNA Polymerase I und der für die Transkription von rDNA Genen benötigte *Upstream Binding Factor* (UBF) näher beschrieben.

1.3.2 Die RNA Polymerase I

In Säugerzellen ist einzig und allein die DNA-abhängige RNA Polymerase I (Pol I) für die Transkription der großen ribosomalen RNA Gene verantwortlich. Es handelt sich dabei um einen Multiprotein-Komplex, der aus mehreren Untereinheiten besteht (Grummt, 1999). Neueste Studien zeigten, dass die Pol I Untereinheiten einzeln und nicht als bereits zusammengefügtter Komplex in den Nukleolus gelangen (Dundr et al., 2002). Die Pol I lokalisiert in den fibrillären Zentren des Nukleolus, in denen auch die rRNA Gene zu finden sind (Hyttel et al., 2000). Diese Gene werden in Abhängigkeit von der metabolischen Aktivität und dem Bedarf an Ribosomen mit einer hohen Effizienz transkribiert. Ebenso wie die RNA Polymerasen II und III benötigt auch die Pol I Hilfsfaktoren zur Promotorerkennung

und zur Unterstützung der Elongation und Termination der Transkription. Zur Formation des Preinitiationskomplexes wird sowohl der *Upstream Binding Factor* UBF (siehe 1.3.3) als auch der RNA Pol I spezifische TBP-TAF_I Komplex (TATA-bindendes Protein und TBP-assoziierte Faktoren) TIF-IB und SL1 (*selectivity factor 1*) benötigt (Comai et al., 1992; Eberhard et al., 1993). Durch die Rekrutierung der RNA Polymerase I zusammen mit den beiden Initiationsfaktoren TIF-IA und TIF-IB an den rDNA Promotor, wird die rDNA Transkription aktiviert (Hanada et al., 1996; Seither et al., 1997). Es handelt sich dabei um einen dynamischen Prozess (French et al., 2003), bei dem die Menge der zellulären rRNA vermutlich eher durch die Transkriptionsrate bereits aktiver Gene als durch die erneute Aktivierung bereits stillgelegter Gene reguliert wird (Conconi et al., 1989). Die Regulation der Pol I Transkription ist einerseits vom Zellzyklus abhängig und andererseits durch verschiedene äußere Faktoren beeinflussbar, wie beispielsweise Alterung der Zelle, Krebs und virale Infektionen (Grummt, 2003).

1.3.3 Der Upstream Binding Factor (UBF)

Der *Upstream Binding Factor* UBF (Jantzen et al., 1990) ist neben dem humanen SL1 Protein (TIF-IB in Maus) verantwortlich für die Formation des Preinitiationskomplexes zur Initiation der Transkription von rRNA Genen. Dieses Protein enthält mehrere *high mobility group* (HMG)-Boxen, ein Motiv, das DNA-Strukturen mitbestimmt. Dabei interagiert UBF mit der großen Furche der DNA und bindet an Knoten- oder Kreuzstrukturen in der DNA (Putnam et al., 1994). Ein UBF-Dimer kann aus der DNA eine Schlaufe von nahezu 360° bilden und so die Start-Stelle des Promotors (*core promotor*: CP) und das davor geschaltete Kontrollelement (*upstream control element*: UCE) einander annähern (Bazett-Jones et al., 1994; Copenhaver et al., 1994). UBF rekrutiert Pol I an den rDNA Promotor, stabilisiert die Bindung von SL1 und aktiviert auf diese Weise die Transkription (Kuhn and Grummt, 1992; Kuhn et al., 1993). Zusätzlich bindet UBF an Nukleosomen und verdrängt das Histon Protein HP1 von der Linker-Region der Nukleosomen (Kermekchiev et al., 1997). UBF spielt eine Schlüsselrolle bei der Modulation der rDNA Aktivität während des Zellzyklus. Es besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, wobei beispielsweise die Phosphorylierung des C-Terminus durch die Casein Kinase II die Interaktion von UBF und TIF-IB/SL1 begünstigt (Tuan et al., 1999). Durch Hyperphosphorylierung wird UBF transkriptionell inaktiv (O'Mahony et al., 1992; Voit et al., 1995; Voit et al., 1992; Zatssepina et al., 1993). Die Interaktion von pRb, p130 und p53 mit UBF beeinflussen sowohl die DNA-Bindung durch UBF als auch die Interaktion mit TIF-IB/SL1 negativ (Budde and Grummt, 1999; Cavanaugh et al., 1995; Ciarmatori et al., 2001;

Voit et al., 1997; Zhai and Comai, 2000). Die Azetylierung von UBF durch die Histon Azetyltransferase CBP beschleunigt die UBF Aktivität *in vitro*, wobei die Überexpression von CBP und zusätzlich p300 die Pol I Aktivität *in vivo* unterstützt (Hirschler-Laszkiewicz et al., 2001). Die reversible Azetylierung und Phosphorylierung der basalen Komponenten des Pol I Multiprotein-Komplexes scheint einen Einfluss auf die Regulation der rDNA Transkription zu haben (Grummt, 2003).

1.3.4 Das RNA-Erkennungsmotiv (RRM)

Die bei der Transkription der rDNA entstehenden großen sog. *precursor* RNAs (pre-RNA) durchlaufen einen post-transkriptionellen Prozess, für den mehrere Faktoren benötigt werden. Dies sind beispielsweise Nukleasen, und zahlreiche nicht-ribosomale Proteine, die im Nukleolus lokalisieren oder dorthin rekrutiert werden (Maxwell and Fournier, 1995; Tollervey and Kiss, 1997). Sie gehören alle zur Familie der RNA-bindenden Proteine, die sich durch die Existenz eines oder mehrerer RNA-Erkennung-Motive (RRMs) auszeichnen. Neben Argininreichen Motiven, KH-Motiven oder einer RGG-Box (RGG = Arg-Gly-Gly) sind insbesondere diese 80 – 100 Aminosäuren langen RRM als RNA Bindungsmotive beschrieben, die sich durch die Präsenz von zwei charakteristischen RNP-Konsensussequenzen auszeichnen (Bandziulis et al., 1989; Burd and Dreyfuss, 1994a; Burd and Dreyfuss, 1994b; Haynes, 1992; Kenan et al., 1991; Mattaj, 1993; Nagai et al., 1990).

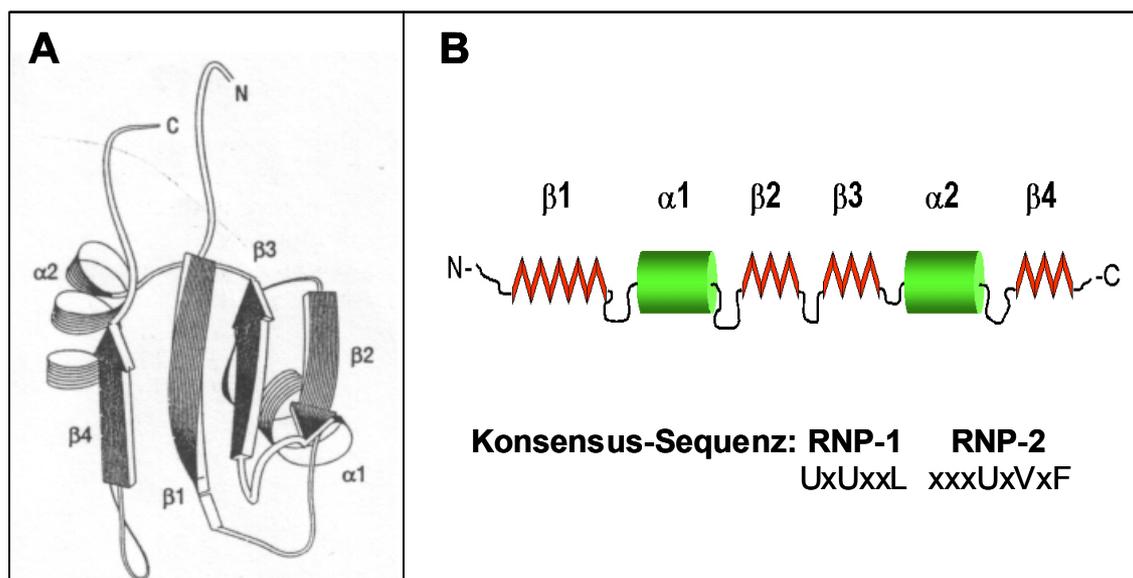


Abbildung 1.7: Strukturelle Organisation von RRM. A) Die Abbildung zeigt die Struktur des RRM des mRNA-bindenden Proteins hnRNP C (Birney et al., 1993). Dieses Motiv weist eine $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4$ -Organisation auf, wie sie für RRM typisch ist. Die hochkonservierten RNP-1 und RNP-2 Konsensussequenzen, welche sich je in der $\beta 3$ und $\beta 1$ Struktur befinden, liegen sich in einer Ebene gegenüber und sind an der direkten Kontaktbildung

mit der RNA beteiligt. Pfeile = β -Faltblätter; Spiralbänder = α -Helices; N = N-Terminus; C = C-Terminus. B) Schematische Darstellung der RRM-Struktur mit angedeuteten β -Faltblättern (*rot*) und α -Helices (*grün*) wie oberhalb angegeben. Konsensussequenzen der RNPs -1 und -2 sind unterhalb der schematisch dargestellten RRM-Struktur angegeben (Horke, 2003).

Die RNPs-1 und -2 liegen als Oktamer bzw. Hexamer vor und sind durch einen etwa 30 Aminosäuren langen *Spacer* getrennt. Das RRM ist strukturell, jedoch nicht in seiner Aminosäuresequenz konserviert (Lorkovic and Barta, 2002). Es nimmt eine $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ -Struktur ein (Abb.1.7 A und B), wie es für einige RRM enthaltende Proteine gezeigt wurde (Birney et al., 1993). Dabei liegen die RNP-Sequenzen in den β_1 und β_3 Strukturen in einer Ebene nebeneinander, wobei extern orientierte aromatische Reste in diesen Sequenzen die RNA-Bindung vermitteln (Jessen et al., 1991; Scherly et al., 1990; Scherly et al., 1991). Demgegenüber sind aromatische Reste außerhalb der β -Faltblätter für die richtige Positionierung der RNA und des RRM verantwortlich (Birney et al., 1993).

1.3.5 Die Nukleoluslokalisierungssequenz (NoLS)

Der Nukleolus ist kein membranumschlossenes Kompartiment wie beispielsweise das endoplasmatische Retikulum oder der Nukleus, für die definierte Signale bekannt sind, die den Eintritt der dort lokalisierenden Proteine bewirken (Horke et al., 2004; Macara, 2001). In Folge dessen könnten theoretisch lösliche Moleküle in und aus dem Nukleolus diffundieren. Nicht lösliche Komponenten müssten demnach im Nukleoplasma bzw. im Nukleolus, in Abhängigkeit von Bindungspartnern, verweilen. Studien von verschiedenen im Nukleolus lokalisierenden Proteinen ergaben, dass sie in ihrer Aminosäuresequenz einen Sequenzabschnitt besitzen, der aus mehreren basischen Aminosäuren besteht und als NoLS (*nucleolar localization sequence*), oder auch als NTS (*nucleolar targeting sequence*) bezeichnet wird (Warner, 1990). 1995 definierten Henderson et al. die NTS mit der Sequenzabfolge RRQRR (Scott et al., 2001), die sich für einige, jedoch nicht alle bisher bekannten im Nukleolus lokalisierenden Proteine bewahrheitet. Dennoch konnte für einige verschiedene Proteine bis heute gezeigt werden, dass sie eine NoLS besitzen, die sich durch basische Aminosäuren auszeichnet (Annilo et al., 1998; Etheridge et al., 2002; Rizos et al., 2000; Thebault et al., 2000; Ueki et al., 1998; Valdez et al., 1994). Wie bereits erwähnt, zeigen immer mehr aktuelle Studien, dass der Nukleolus neben der Biosynthese der Ribosomen auch in andere zelluläre Prozesse involviert ist. Für verschiedene Proteine, die unter normalen Bedingungen nicht im Nukleolus lokalisieren, konnte gezeigt werden, dass sie nach bestimmten Stimuli im Nukleolus zu finden sind. Ein Beispiel dafür ist das ING1

Protein (*inhibitor of growth family, member 1*), ein Tumorsuppressor Protein, das nach UV-induziertem DNA-Schaden in den Nukleolus wandert (Scott et al., 2001). Auch das MDM2 Protein, das für die Regulation des Tumorsuppressor Proteins p53 verantwortlich ist (Kubbutat and Vousden, 1998), besitzt eine kryptische NoLS, die in ungestressten Zellen nicht funktioniert. Dieses Signal bedingt die Kooperation mit NoLS von p14ARF zur Lokalisation in Nukleoli (Lohrum et al., 2000). Bioinformatische Analysen unterstützen die Ergebnisse, dass sowohl Proteine der Apoptose, Hitzeschockproteine, Wachstumsfaktoren und andere Proteine im Nukleolus zu finden sind (Leung et al., 2003). Welche von ihnen ein NoLS besitzen oder auf anderen Wegen in den Nukleolus gelangen, bleibt zu untersuchen.

1.4 Ziel der Dissertation

Kerndomänen, wie die PML-Kerndomänen oder der Nukleolus, übernehmen wichtige Funktionen bei der Kontrolle verschiedener zellulärer Prozesse wie z.B. der Regulation der Transkription, der Apoptose, Differenzierung und der Biogenese der Ribosomen. Bis heute sind die Funktionen dieser Multiprotein-Komplexe nicht ausreichend verstanden, so dass es von besonderem Interesse ist, neue Kerndomänen assoziierte Proteine zu identifizieren. Dies sollte einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis und möglicherweise zur Aufdeckung der verschiedenen Signalwege, die von diesen subnukleären Kompartimenten ausgehen, leisten. Zur Identifizierung neuer Kerndomänen-assoziiierter Proteine wurden an EYFP fusionierte cDNAs, die bisher nicht in Sequenzdatenbanken annotiert worden waren, in humanen Zellen exprimiert und ihre subzelluläre Lokalisation bestimmt (Simpson et al., 2000). Diese cDNAs stammen von cDNA-Bibliotheken aus bisher unzureichend charakterisierten Geweben, die vom Deutschen cDNA Konsortium in Heidelberg generiert wurden. Von den unterschiedlich in der Zelle lokalisierenden EYFP-Fusionsproteinen waren für diese Arbeit insbesondere solche von Interesse, die im Zellkern in punktartigen Kerndomänen lokalisieren. Zwei dieser unbekannt Proteine, die diese Kriterien erfüllten, wurden ausgewählt und sollten im Rahmen dieser Dissertation auf eine mögliche PML-Kerndomänen Assoziation analysiert werden. Dies beinhaltete zunächst eine genaue Charakterisierung der beiden Proteine, mithilfe verschiedener Datenbanken zur Analyse der Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenz in Bezug auf bekannte Domänen oder Motive, um hierdurch einen möglichen Hinweis auf die Funktion der Proteine zu erhalten. Ebenso sollte die genomische Organisation und die Gewebespezifität dieser Proteine ermittelt werden. Funktionelle Studien, in Form von zellbiologischen, biochemischen und immunologischen Versuchsansätzen, sollten schließlich

Aufschluss über eine mögliche Funktion dieser Proteine geben. Durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie sollte darüber hinaus auch die subzelluläre Lokalisation der beiden Proteine im Hinblick auf eine mögliche PML-Kerndomänen Assoziation analysiert werden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma (München), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Biozol (München) und Merck (Darmstadt) bezogen. Radioaktive Reagenzien wurden von der Firma Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig) bezogen.

1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

TE-Puffer, pH 8,0	10 mM	Tris-HCL
	1 mM	EDTA
TAE-Puffer (50x)	2 M	Tris-Acetat
	50 mM	EDTA
PBS, pH 7,4	137 mM	NaCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	2,7 mM	KCL
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
TBS, pH 7,4 (10x für Western Blot)	250 mM	Tris-HCL
	1,87 M	NaCl
	50 mM	KCl
	7 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
SDS-Probenpuffer (5x, reduz.)	312,5 mM	Tris-HCL, pH = 6,8
	25% (v/v)	β-Mercaptoethanol
	50% (v/v)	Glycerol
	10% (w/v)	SDS
	0,01% (w/v)	Bromphenolblau

SDS-Sammelgel (3%)	125 mM	Tris-HCL, pH = 6,8
	3% (v/v)	Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)
	0,1% (w/v)	SDS
	0,04% (v/v)	APS
	0,075% (v/v)	TEMED
SDS-Trenngel	350 mM	Tris-HCL, pH = 8,8
	7,5-14%	Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)
	0,1% (w/v)	SDS
	0,04% (v/v)	APS
	0,075% (v/v)	TEMED
SDS-Laufpuffer (5x)	125 mM	Tris-Base
	960 mM	Glycin
	0,5% (w/v)	SDS
Coomassie-Brilliantblau Färbelösung	0,5%	Coomassie
	40%	Methanol (wahlweise)
	10%	Eisessig (wahlweise)
Coomassie-Brilliantblau Entfärber	30%	Methanol
	10%	Eisessig
Transferpuffer Western Blot	25 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
	0,038% (w/v)	SDS
DNA-Probenpuffer (6x)	85% (v/v)	Formamid
	10 mM	EDTA, pH = 8,0
	1 mg/ ml	Bromphenolblau
	1 mg/ ml	Xylencyanol

Weitere Puffer und Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

1.3 Kits

Kit	Herkunft
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
Rediprime [™] II	Amersham Pharmacia Biotech
QIAprep [®] Spin Mini Kit	Qiagen
QIAprep [®] Plasmid Midi, Maxi Kit	Qiagen
Gel Drying Kit	Promega

1.4 Marker

Marker	Herkunft
Rainbow [™] coloured protein molekular weight marker	Amersham Pharmacia Biotech
Prestained protein molekular weight marker	MBI Fermentas
GeneRuler [™] 1kb DNA ladder	MBI Fermentas

1.5 Enzyme

Enzym	Herkunft
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)	Roche Diagnostics
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Stratagene
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Roche Diagnostics
T4 DNA Ligase	New England BioLabs
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
Trypsin EDTA Lösung	Life Technologies

Die verschiedenen Restriktionsendonukleasen wurden von MBI Fermentas, Roche Diagnostics und New England BioLabs bezogen.

1.6 Plasmidvektoren

Name	Verwendungszweck	Herkunft/Referenz
pCMV-Tag 2B, 4A	eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression Epitop-markierter Proteine	Stratagene
pGEX-4T-1	prokaryotischer Expressionsvektor zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen	Pharmacia Biotech
pM2	eukaryotischer Expressionsvektor zur Untersuchung transkriptioneller Aktivität	(Sadowski et al., 1992)
pEGFP-C1	eukaryotischer Expressionsvektor zur Herstellung von GFP-Fusionsproteinen	Clontech

1.7 Expressionsplasmide

cDNA	Vektor	Epitop-Tag	Herkunft
#1 (Nucleostatmin-mutC)	pSport1	YFP	S. Wiemann, DKFZ Heidelberg
#9 (PAROT)	pSport1	YFP	S. Wiemann, DKFZ Heidelberg
Nucleostatmin (DKFZ)	pCMV-Tag 2B	FLAG	T.G. Hofmann, Hamburg
Nucleostatmin (NIH)	pCMV-Tag 2B	FLAG	S. Fleischer, Hamburg
Nucleostatmin (DKFZ)	pGEX-4T1	GST	T.G. Hofmann, Hamburg
Nucleostatmin (NIH)	pCMV-Tag 2B	FLAG	S. Fleischer, Hamburg
PAROT	pEGFP-C1	GFP	S. Fleischer, Hamburg
KRAB	pEGFP-C1	GFP	S. Fleischer, Hamburg
□ZF	pEGFP-C1	GFP	S. Fleischer, Hamburg
Linker	pEGFP-C1	GFP	S. Fleischer, Hamburg
Linker	pGEX-4T1	GST	S. Fleischer, Hamburg
□KRAB	pEGFP-C1	GFP	S. Fleischer, Hamburg
ZF	pEGFP-C1	GFP	S. Fleischer, Hamburg
ZF	pGEX-4T1	GST	S. Fleischer, Hamburg
PAROT	pM2	Gal4-DBD	S. Fleischer, Hamburg
KRAB	pM2	Gal4-DBD	S. Fleischer, Hamburg
ΔKRAB	pM2	Gal4-DBD	S. Fleischer, Hamburg
mTIF1β	pCX-FLAG	FLAG	P. Chambon, Strasbourg

mHP1 α	pCX-FLAG	FLAG	P. Chambon, Strasbourg
mHP1 β	pCX-FLAG	FLAG	P. Chambon, Strasbourg
mHP1 γ	pCX -FLAG	FLAG	P. Chambon, Strasbourg
KRIM-1A	pCDNA2-HXb	Gal4-DBD	L. Vaßen, Essen
KRIM-1A	pD-EGFP-N3	GFP	L. Vaßen, Essen
PML III	pSG5		T. Sternsdorf, Hamburg
PML IV	pCDNA3		G. Del Sal, Trieste
mUBF	pRc/CMV	FLAG	R. Voit, Heidelberg

1.8 Synthetische Oligonukleotide zur Klonierung

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technologies (Eggenstein) bezogen und auf eine Standardkonzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt. Zusätzlich eingeführte Stop-Triplets sind unterstrichen dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5' \rightarrow 3')
Nucleostatmin-sense(EcoRI)	GAA TTC ATG GCG TCG AGC GGC GGG GAG
Nucleostatmin-STOP(XhoI)	CTC GAG TTA ATG GAT GAC TTG TAT GTA CAT CAA G
Nucleostatmin-end(XhoI)	CTC GAG TAT TCT TCT TCT TTG TTT TAA TGG ATG AC
Nucleostatmin-endI(XhoI)	CTC GAG <u>TTA</u> TAT TCT TCT TCT TTG TTT TAA TGG ATG
PAROT1(BamHI)	GGA TCC ATG GGA CCA TTG CAA TTT AGA GAT G
PAROT-end(XhoI)	CTC GAG <u>TTA</u> TCT TAT GCT TAT TAA GGG TTG AG
PAROT-endI(XhoI)	CTC GAG ATA TCT TAT GCT TAT TAA GGG TTG AG
PAROT2as(XhoI)	CTC GAG AGT TAA AGG TTT TTT TCC TTG CTC CAG
PAROT3(BamHI)	GGA TCC ATG AAG AGG CAT GAG ATG ATT GCC
PAROT4as(XhoI)	CTC GAG CTC TCC AGC ATC AAT TTT CTT ATA TG
PAROT5(BamHI)	GGA TCC AAA CGC TAT AAA TGT GAA GAA TGT G

1.9 Antikörper

1.9.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Herkunft/Referenz
anti-Flag	Maus	DYKDDDDK	Eastman Kodak
anti-GFP	Kaninchen	GFP	Santa Cruz
anti-GAL4DBD	Kaninchen	GAL4DBD	Santa Cruz
anti-Nucleostatmin, (A13)	Kaninchen	PVDRAPDSSKDGRNH	S. Fleischer
anti-Nucleostatmin	Huhn	Nucleostatmin	S. Fleischer, Hamburg
anti-PAROT, (P12)	Kaninchen	QSSTRTTYKKIDAGE	S. Fleischer
anti-PAROT	Huhn	Linker Region	S. Fleischer, Hamburg
anti-PAROT	Huhn	Zinkfinger Region	S. Fleischer, Hamburg
anti-RNA Pol I	Mensch	RNA Polymerase I	R. Voit, Heidelberg
anti-UBF	Mensch	Upstream Binding Factor	R. Voit, Heidelberg
anti-PML, PG-M3	Maus	PML	Santa Cruz
anti-Nucleolin	Maus	Nucleolin	MB Laboratories
anti-Fibrillarin	Maus	Fibrillarin	Cytoskeleton
anti-NOH61	Maus	NOH61	M.S. Schmidt-Zachmann, Heidelberg
anti- β -Aktin	Maus	C-Terminus	Sigma
anti-Golgi 58K	Maus	Golgi Membranprotein 58K	Sigma
anti-alpha-Tubulin	Maus	C-Terminus	Sigma

1.9.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Konjugat	Herkunft/Referenz
Alexa Flour®	Ziege	Fluoreszenzfarbstoff 488	Molecular Probes
Alexa Flour®	Ziege	Fluoreszenzfarbstoff 594	Molecular Probes
Alexa Flour®	Ziege	Fluoreszenzfarbstoff 633	Molecular Probes
anti-human IgG(H+L)	Ziege	LRSC-conjugated (Lissamine Rhodamine)	Dianova
anti-Chicken IgY	Kaninchen	Peroxidase	Jackson Laboratories

anti-Mouse IgG (H+L) Ziege	Peroxidase	Jackson Laboratories
anti-Rabbit IgG (H+L) Ziege	Peroxidase	Jackson Laboratories

1.10 Biologisches Material

1.10.1 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> Stamm	Verwendung	Referenz/Bezugsquelle
BL21 (DE3)pLysS	Herstellung rekombinanter Proteine	Novagen
TOP10	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen

1.10.2 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Herkunft
293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit dem langen T-Antigen des SV-40 Virus
C3a	Humane Hepatozytenkarzinomzelllinie
Hep G2	Humane Hepatozytenkarzinomzelllinie
U2 OS	Humane Osteosarkomzelllinie
H1299	Humane Lungenkarzinomzelllinie
HeLa	humane Cervixkarzinomzelllinie
WI-38	Humane embryonale Lungenfibroblasten
NIH/3T3	Murine embryonale B-Lymphomyelomzelllinie
MEF	Murine embryonale Fibroblasten

1.11 Nährmedien

1.11.1 Bakterielle Nährmedien

Luria Broth (LB)-Medium	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefe-Extrakt
	5 g/l	NaCl

Zur Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar hinzugefügt. Zur Selektion resistenter Bakterienkolonien wurden während des Abkühlens bei etwa 50°C folgende Antibiotika in den u.a. Konzentrationen zugesetzt:

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml
Gentamycin	100 µg/ml

1.11.2 Medien für die eukaryotische Zellkultur

DMEM (Gibco)	10% (v/v)	hitzeinaktiviertes FCS
	100 U/ml	Penicillin
	100 U/ml	Streptomycin
	2 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natrium Pyruvat
RPMI 1640 (Gibco)	10% (v/v)	hitzeinaktiviertes FCS
	100 U/ml	Penicillin
	100 U/ml	Streptomycin
	2 mM	L-Glutamin
	1 mM	Natrium Pyruvat

2. Methoden

2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.1.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen

Alle Tätigkeiten im Zusammenhang mit der Kultivierung von eukaryotischen Zellen erfordern sterile Arbeitstechniken zur Vermeidung bakterieller und sonstiger Kontaminationen. Aus diesem Grund wurden alle diesbezüglichen Arbeiten in eigens dafür vorgesehenen Sterilwerkbänken durchgeführt.

2.1.2 Kultur von adhärent wachsenden Zellen

Adhärenente Zelllinien wurden unter identischen Bedingungen wie Suspensionszellen in DMEM Medium kultiviert. Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurden diese einmalig mit PBS gewaschen und anschließend für ca. 3 Minuten mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert, um die Zellen von der Kulturflasche zu lösen. Überschüssiges Trypsin wurde im Anschluss daran durch Zugabe von frischem, vorgewärmten Vollmedium inaktiviert und die resuspendierten Zellen in der Regel 1:10 in eine neue Kulturflasche umgesetzt.

2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Als Einfriermedium diene entweder hitzeinaktiviertes FCS mit 10% DMSO oder Vollmedium mit 10% DMSO. Jeweils etwa 10^7 Zellen wurden in 1 ml des vorgekühlten Einfriermediums aufgenommen und nach einer Zwischenlagerung bei -80°C dauerhaft in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch bei RT bzw. 37°C durch sofortiges Überführen der Zellsuspension in vorgewärmtes Vollmedium.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

RF1-Puffer, pH 5,8	100mM	RbCl
	30 mM	K-Acetat
	10 mM	CaCl ₂
	50 mM	MnCl ₂
	15 % (v/v)	Glycerin
RF2-Puffer, pH 6,8	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂
	15% (v/v)	Glycerin

Beide Puffer müssen sterilfiltriert werden.

E.coli Bakterien können durch Behandlung mit Rubidiumchlorid, Manganchlorid und Calciumchlorid bei niedriger Temperatur in die Lage versetzt werden, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen.

Es wurde zunächst eine 4 ml-Übernachtskultur in LB-Medium ohne Antibiotika von einer frischen Kolonie oder einem Glycerolstock angeimpft. Mit dieser wurde am nächsten Tag eine 40 ml-Kultur in Antibiotika-freiem LB-Medium angeimpft und ca. 1 Stunde bei 37°C, 200 upm bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ kultiviert. Die Bakterien wurde in eiskalte COREX Zentrifugenröhrchen überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation in einem SS34-Rotor für 5 min bei 4°C und 6000 upm. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 0,5 Vol (hier: 20 ml) eiskaltem RF1-Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation in einem SS34-Rotor für 5 min bei 4°C und 6000 upm. Der Überstand wurde wiederum verworfen, die Bakterien in 1/20 Vol (hier: 2ml) eiskaltem RF2-Puffer aufgenommen und 1 h auf Eis inkubiert.

Die kompetenten Bakterien wurde in 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Eine zweite Methode, mit der *E.coli* Bakterien zur Aufnahme von DNA kompetent gemacht werden können, ist die $CaCl_2$ -Methode von B. Pope und H.M. Kent, 1996. Mit einer 5 ml-Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und ca. 2 Stunden bei 37°C, 200 upm bis zu einer $OD_{600} = 0,5 - 0,8$ kultiviert. Nach einer 15-minütigen Abkühlung auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 10 min, 5000 upm, 4°C). Die sedimentierten Bakterien wurden in 50 ml sterilfiltrierter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung vorsichtig resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Sedimentieren wurden die Zellen in 5 ml 10%(v/v) Glycerol/ 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert, auf Eis aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bzw. in einer Mischung aus Trockeneis und vergälltem Ethanol schockgefroren. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten Bakterien bei -80°C gelagert.

2.2.2 Transformation von Bakterien

Zur Vermehrung der hier verwendeten Vektoren dienen in erster Linie chemisch kompetente Bakterien des *E.coli*-Stammes TOP10. Für die Transformation wurden jeweils 100 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und 1-10 µl DNA-Lösung (je nachdem ob es sich um eine einfache Vermehrung eines Vektors oder einen Ligationsansatz handelte) zugefügt. Im Anschluss an eine 30-minütige Inkubation auf Eis wurde durch kurzes Erhitzen auf 42°C für 42 Sekunden und eine sich unmittelbar anschließende zweiminütige Eiskühlung die Bakterienzellwand für die Aufnahme der DNA permeabilisiert. Die Reaktionsansätze wurden dann mit 900 µl antibiotikafreiem LB-Medium versehen und eine Stunde zur Induktion der Antibiotikaresistenz unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Selektion auf plasmidtragende

und somit antibiotikaresistente Bakterien erfolgte über Nacht auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten.

Zur Herstellung rekombinanter Proteine wurden chemisch kompetente Bakterien der *E.coli*-Stämme BL21 (DE3)pLysS und BL21-CodonPlus (DE3)-RIL verwendet. Es wurden ebenfalls 100 µl Bakterien 30 min auf Eis mit der jeweilig zu transformierenden DNA-Lösung inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 45 Sekunden. Diese Bakterien wurden sofort auf einer antibiotikahaltigen (Ampicillin/Chloramphenicol) LB-Agar-Platte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

2.2.3.1 Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse (Minipräparation)

Zur Analyse von Ligationen und Transformationen wurde unter Verwendung des QIAprep[®] Spin Mini Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben Plasmid-DNA aus Bakterien isoliert.

Dazu wurden einzelne Bakterienkolonien von einer LB-Agar-Platte bzw. Bakterien aus Glycerolstocks in 2,5 ml LB-Medium mit einem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 34 µg/ml Chloramphenicol, 100 µg/ml Gentamycin) überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 upm) inkubiert.

Die Ausbeuten lagen, bei Verwendung von 2 ml Bakterienkultur des *E.coli* Stammes „TOP10“, routinemäßig bei etwa 30-50 µg.

2.2.3.2 Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse (Maxipräparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Maxi-Maßstab wurde mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit durchgeführt. 250 ml einer Bakterienkultur wurden unter den beschriebenen Bedingungen (siehe Minipräparation) angesetzt. Nach Inkubation über Nacht wurde die Bakterienkultur abzentrifugiert (Sorvall GS-3-Rotor, 6000 upm, 10 min, 4°C) und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Unter Zugabe von 10 ml des Puffers P2 wurden die Bakterien 5 min bei RT lysiert. Proteine und chromosomale DNA wurden durch die sich anschließende Zugabe von eiskaltem Puffer N3 ausgefällt. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden diese unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (Sorvall SS-34-Rotor, 30 min, 13000 upm, 4°C). Der Überstand wurde schließlich auf eine Anionenaustauschersäule (Qiagen-tip 500) gegeben, die zuvor mit 15 ml Puffer QBT äquilibriert worden war. Unter den gegebenen

pH- und Salzbedingungen wurde dabei die Plasmid-DNA an die Säulenmatrix gebunden. Nach zweimaligem Waschen mit je 30 ml Puffer QC erfolgte die Elution der gebundenen Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF in ein 50 ml Corex Zentrifugenglas. Die durch Zugabe von 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol gefällte DNA wurde anschließend abzentrifugiert (Sorvall SS-34, 10 min, 13000 upm, 4°C) und nach vorsichtigem Dekantieren des Überstandes einmalig mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde schließlich in 100-250 µl Puffer EB aufgenommen und die DNA-Konzentration dieser Lösung UV-photometrisch (Ultrospec 3000*pro*, Amersham Pharmacia) bestimmt. Die Lagerung aller DNA-Lösungen erfolgte bei -20°C.

2.2.4 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

In der Polymerasekettenreaktion (PCR) können kleinste Mengen spezifischer DNA nachgewiesen werden (Saiki et al., 1988). Das Prinzip der PCR ist die selektive Vervielfältigung eines beliebigen Abschnittes in einem DNA-Molekül. Die Sequenzen an beiden Enden der DNA müssen jedoch bekannt sein, damit zwei *Primer* gegenläufig an die komplementären DNA-Stränge binden können. Sie begrenzen den zu vervielfältigenden Abschnitt.

Die gewünschte DNA-Sequenz wird mit exponentiell ansteigender Rate reproduziert. Die Reproduktion erfolgt in drei zyklischen Reaktionsschritten: Denaturierung der DNA, Hybridisierung der *Primer* und DNA-Elongation.

Die Vervielfältigung erfolgte in der Regel durch die thermostabile DNA-Polymerase I von *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-Polymerase), die eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität („Proof-Reading“) besitzt. Punktmutationen im amplifizierten Produkt aufgrund fehlerhafter Basenpaarungen werden somit vermieden. Die *Pfu*-Polymerase produziert sog. *blunt-end* Produkte, die sich durch das Fehlen von Überhängen leicht weiterverarbeiten lassen.

Für eine PCR, die im Anschluss an eine cDNA Synthese folgte (siehe 2.2.13), wurde die „klassische“ DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) verwendet.

Beide Enzyme sind hitzestabil, so dass sie bei hohen Temperaturen nicht denaturiert werden.

Folgender Reaktionsansatz, mit einem Gesamtvolumen von 100 µl, wurde in der Regel verwendet:

1 µl	Template (100 ng)
3 µl	<i>Primer</i> 1 (10 pmol/µl)
3 µl	<i>Primer</i> 2 (10 pmol/µl)
1 µl	<i>Pfu</i> Polymerase (2,5 Units)

10 μ l	Desoxyribonukleotide (je 2 mM)
10 μ l	10x <i>Pfu</i> -Puffer
72 μ l	dH ₂ O

Reaktionsansätze, die in einer PCR-Maschine (RoboCycler Gradient 40, Stratagene) ohne Deckelheizung inkubiert wurden, wurden mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet, um eine Änderung der Salzkonzentration während der PCR durch Verdunstung flüssiger Bestandteile zu verhindern.

Das Temperaturprogramm für die Durchführung der PCR gestaltete sich wie folgt:

Initiale Denaturierung	95 °C, 3-5 min	1 Zyklus

Denaturierung	95 °C, 1 min	
Annealing	58-65 °C, 45 sec-2,5 min	25-28 Zyklen
Elongation	72 °C, 1,5-2,5 min	

Termination	72 °C, 3 min	1 Zyklus
	6 °C	∞

Für eine PCR im Anschluss an eine cDNA Synthese wurde ein Reaktionsansatz verwendet, der neben den *Primern* für das gesuchte Fragment zwei Kontroll-*Primer* zur Amplifikation eines β -Aktin Fragmentes enthielt :

6 μ l	RT-Reaktionsmix
5 μ l	10x <i>Taq</i> -Puffer
5 μ l	Desoxyribonukleotide (je 2mM)
2 μ l	<i>Primer</i> 1-4 (10 pmol/ μ l)
1 μ l	<i>Taq</i> Polymerase
25 μ l	dH ₂ O

Das Temperaturprogramm für die Durchführung der PCR gestaltete sich wie folgt:

Initiale Denaturierung	94 °C, 5 min	1 Zyklus

Denaturierung	94 °C, 1 min	
Annealing	58 °C, 2 min	30 Zyklen

Elongation	72 °C, 3 min	

Termination	72 °C, 3 min	1 Zyklus
	6 °C	∞

2.2.5 Enzymatische Hydrolyse von DNA durch Restriktionsenzyme

Die Restriktionsspaltung von DNA diente entweder der Analyse aufgereinigter DNA aus Mini- bzw. Maxipräparationen oder der Isolation spezifischer DNA-Fragmente zum Zwecke der Klonierung bzw. Subklonierung. Analytische Restriktionsverdau-Ansätze wurden in der Regel in einem Volumen von 15 µl durchgeführt. Dabei wurden je Mikrogramm DNA mindestens 2 *Units* der jeweiligen Restriktionsendonuklease(n) eingesetzt. Optimierte Pufferbedingungen wurden durch das SuRE/Cut Puffersystem der Firma Roche Diagnostics gewährleistet. Mit A. dest. wurde das Reaktionsvolumen aufgefüllt und die Reaktion 2 bis 2,5 Stunden bei der für die Aktivität der (des) Restriktionsenzyme(s) optimalen Temperatur (in der Regel 37°C) inkubiert.

Präparative Restriktionsverdau-Ansätze erfolgten, abhängig von der DNA-Menge, in einem Volumen von 30 bis 100 µl. Zur Analyse und Präparation wurden die Reaktionsansätze mit einem DNA-Probenpuffer versehen, in einem Agarosegel aufgetrennt und ggf. weiterverarbeitet.

2.2.6 DNA-Sequenzierung

Für den Erfolg der Klonierung war es nicht nur wichtig, ob das Gen tatsächlich im Plasmid enthalten ist, sondern von entscheidender Bedeutung, dass es zu keiner Verschiebung des Leserahmens oder zu zufälligen Mutationen des Gens oder des Zielvektors kam. Eine Sequenzierung des Plasmides war somit essentiell.

Die Methode beruht auf dem DNA-Kettenabbruch in einer PCR nach Sanger et al. und der Nachweis der Produkte erfolgte über Fluoreszenz, die von den markierte Oligonukleotiden stammt. Der Laser des Sequenziergerätes detektiert die in einem Gel aufgetrennten DNA Fragmente und gibt die Informationen an die angeschlossene Software weiter.

Zur Sequenzierung wurde der ABI PRISM BigDye-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit Version 1.1 verwendet. In diesem Kit sind die Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide (A-markiert mit Dichloro[R6G], C- markiert mit Dichloro[ROX], G- markiert mit

Dichloro[R110] und T- markiert mit Dichloro[TAMRA]), dNTPs (dATP, dCTP, dITP und dUTP), die Taq-Polymerase und der Reaktionspuffer bereits vorgelegt.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µg Plasmid
2 µl *Primer* (100 pmol)
4 µl BigDye Mix
ad 20 µl H₂O

Das Temperaturprogramm für die Durchführung der PCR gestaltete sich wie folgt:

Initiale Denaturierung	96 °C, 2,5 min	1 Zyklus
	96 °C, 20 sek	
	50 °C, 10 sek	30 Zyklen
Termination	60 °C, 4 min	∞

Anschließend wurden die Extensionsprodukte gefällt. Hierzu wurde der Ansatz mit dH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Es wurden 5 µl 3 M CH₃COO-Na pH 4,8 und 125 µl Ethanol zugesetzt. Das Gemisch wurde bei 13000 upm für 30 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 300 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut bei 13000 upm für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und lagerte bis zur Analyse bei -20°C im Dunkeln.

Die Analyse erfolgte außer Haus am DKFZ Heidelberg oder bei der Firma Agowa in Berlin.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird ein Gemisch aus verschiedenen großen DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei macht man sich die durch die Phosphatgruppen bedingte negative Ladung der DNA zunutze. In einem Agarosegel ist die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Fragmente umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihrer Größe. Durch Erhöhung der Agarosekonzentration werden die Poren des Gels enger, so dass auch kleinere Fragmente

aufgetrennt werden können. Bei niedrigerer Agarosekonzentration werden die Gelporen hingegen weitmaschiger und lassen eine Auftrennung größerer Fragmente zu.

Je nach Größe der Gelkammer wurden 50-250 ml TAE-Puffer mit 0,8 – 1,5% Agarose gemischt. Die Agarose wurde durch Aufkochen komplett gelöst und mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde die Agarose in eine Gelkammer gegossen und mit einem Kamm bestückt. Nachdem die Agarose zu einem Gel auspolymerisiert war, wurde die Gelkammer mit TAE-Puffer gefüllt, bis die Elektroden und das Gel vollständig bedeckt waren. Der Kamm wurde aus dem Gel entfernt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Für eine spätere Größenbestimmung der aufgetrennten Fragmente wurde zusätzlich ein DNA-Größenstandard mit aufgetragen. Bei einer konstanten Spannung zwischen 80 und 130 Volt wurden die Fragmentgemische aufgetrennt. Unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) konnten die durch unspezifisch in DNA interkalierendes Ethidiumbromid markierten DNA-Banden sichtbar gemacht, fotografisch dokumentiert und ggf. zwecks Isolierung (siehe 2.2.8) ausgeschnitten werden.

2.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Plasmid-DNA und DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Gel Extraction Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel isoliert. Zur Überprüfung der Reinheit und der DNA-Menge wurde ein Aliquot auf einem 1%igen Agarosegel analysiert.

2.2.9 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen

Vektor-DNA, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, kann rezirkularisieren. Um den Einbau von Fremd-DNA zu fördern und die Rezirkularisierung zu verhindern, wurde die linearisierte Plasmid-DNA mit dem Enzym CIP („calf intestinal alkaline phosphatase“) behandelt. Das Enzym katalysiert die Dephosphorylierung von 5'-Phosphatresten, die Voraussetzung für die Rezirkularisierung durch die T4-DNA-Ligase sind.

Nach dem Verdau eines Vektors durch Restriktionsendonukleasen wurde dieser mit 2 bis 10 *Units* des Enzyms CIP für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz 10 min bei 65°C inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch präparative Agarosegel-Elektrophorese (2.2.7).

2.2.10 Ligation von dsDNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase verknüpft kovalent doppelsträngige DNA-Fragmente mit glatten oder überhängenden, kompatiblen Enden. Zur Durchführung der Ligation wurden geschnittene Vektor-DNA und zu inserierende DNA 1:3 in einem 20 µl Ligationsansatz gemischt. Dieses Gemisch wurde in Ligationspuffer mit 5 Units T4 DNA-Ligase über Nacht bei RT inkubiert und anschließend für die Transformation von kompetenten Bakterien verwendet.

Blunt-end Ligationen von PCR-Fragmenten der *Pfu*-Polymerase wurden in der Regel mit dem Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit der Firma Invitrogen durchgeführt.

2.2.11 Random Prime Labelling von dsDNA

Zur radioaktiven Markierung dsDNA Fragmente, die als Sonden zur Hybridisierung von Northern Blots eingesetzt wurden, wurde das Random Prime Labelling System (Rediprime™ II) der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet.

25 ng des zu markierenden DNA Fragmentes wurden in 45 µl TE Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA) gelöst, bei 95-100 °C für 5 Minuten denaturiert und im sofortigen Anschluss daran 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Die denaturierte DNA wurde kurz abzentrifugiert und in das den Reaktionsmix enthaltende Gefäß gegeben. Nachdem 5 µl [α^{32} -P] dCTP hinzugefügt waren, wurde der Reaktionsansatz durch auf- und abpipettieren gemischt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5 µl einer 0,2 M EDTA-Lösung gestoppt und die markierte DNA durch Säulenchromatographie (NICK™ Column, Pharmacia Biotech) von freien, 32 P-markierten Nukleotiden befreit.

Die Aktivität der Probe wurde in einem Counter der Firma Beckmann Coulter bestimmt und eine Konzentration von $1-2 \times 10^6$ cpm/ml der markierten Probe zur Hybridisierung eingesetzt. Kurz vor dem Einsatz der Probe zur Hybridisierung wurde diese bei 95-100°C für mindestens 2-5 Minuten denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt.

2.2.12 Northern Blot Analysen

SSC (20x)	3M	NaCl
	0,3M	Natriumcitrat, pH 7,0
Waschlösung I	2x	SSC
	0,05%	SDS
Waschlösung II	0,1x	SSC

	0,1%	SDS
Waschlösung III	2x	SSC
	0,1%	SDS

Sowohl der FirstChoiceTM Northern Human Blot I der Firma Ambion als auch der Multiple Tissue Northern (MTN[®]) Blot der Firma Clontech wurden mind. 30 Minuten bei 68°C in 8 ml der auf 68°C vorgewärmten ExpressHybTM Hybridisierungslösung der Firma Clontech prehybridisiert. Im Anschluss daran wurde die Lösung zur Prehybridisierung durch frische ExpressHybTM Hybridisierungslösung und der radioaktiv markierten Probe (Konzentration s.o.) ersetzt und für mind. 2 Stunden bzw. über Nacht bei 68°C in einem eigens dafür vorgesehenen Hybridisierungsofen inkubiert. Nach 40-minütigem Schwenken bei RT des Blots in Waschlösung I folgte eine 40-minütige Inkubation des Blots bei 50°C in Waschlösung II. Je nach Höhe der nach jedem Waschen gemessenen Aktivität folgte eine weitere Inkubation bei 50°C in Waschlösung II bzw. wurde sofort eine Filmplatte für mind. 2 Stunden bzw. über Nacht aufgelegt. Die Auswertung des Films erfolgte im Phosphoimager FUJIX Bas 2000 der Firma Fuji.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Transfektion von Zellen

2.3.2.1 Transfektion adhärenter Zellen durch Kopräzipitation von Calciumphosphat und DNA

2x HBS Puffer, pH 7,05	3,2 g	NaCl
	0,148 g	KCl
	0,054 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	0,4 g	Dextrose (D(+)-Glucose)
	2 g	HEPES
		NaOH zur pH-Wert Einstellung
	ad 200 ml	dH ₂ O
CaCl ₂ -Lösung, (steril filtriert)	2 M	CaCl ₂

Die Calciumphosphat-Kopräzipitations-Methode wurde für die transiente Transfektion von 293T Zellen verwendet. Diese beruht auf der Ausbildung von DNA-Präzipitaten, die unter definierten Salz- und pH-Bedingungen in der Gegenwart von unlöslichem Calciumphosphat ausfallen. Die DNA-Präzipitate lagern sich an der Zelloberfläche an, so dass die DNA schließlich in die Zelle aufgenommen werden kann.

Einen Tag vor der Transfektion wurden ca. 1×10^6 Zellen in eine 10 cm-Zellkulturschale gut vereinzelt gesetzt. Am nächsten Tag wurden 10 µg Gesamtmenge Plasmid-DNA in 220 µl dH₂O aufgenommen, mit 250 µl 2x HBS Puffer gut gemischt und tropfenweise mit 31 µl CaCl₂-Lösung versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation des Ansatzes bei RT, wurde dieser tropfenweise auf den Zellen verteilt und die Kulturschale so geschwenkt, dass sich das Präzipitat gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Die so transfizierten Zellen wurden nach 24 bis 48 Stunden geerntet und weiterverarbeitet.

2.3.1.2 Transfektion adhärenter Zellen mit FuGENE 6 Transfektions-Reagenz

Diese Art der Transfektion wurde bei allen anderen Zelllinien, ausgenommen 293T Zellen, insbesondere für spätere Immunfluoreszenz Analysen angewendet.

FuGENE 6 Transfektions-Reagenz (Roche) ist eine sterilfiltrierte Mischung von Lipiden und anderen Verbindungen in 80% Ethanol (nicht-liposomale Form), die mit DNA komplexiert und diese in die Zellen transportiert.

Zur Durchführung der Transfektion von Zellen in einer 24-Lochplatte, wurden 97 µl DMEM Medium ohne Zusätze in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, direkt mit 3 µl FuGENE 6 versetzt und gemischt. Dieser Mischung wurden dann insgesamt 2 µg Plasmid-DNA zugesetzt und 10 bis 15 Minuten bei RT inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde schließlich direkt in das sich auf den Zellen befindliche Vollmedium (500 µl) gegeben. Nach 24 bis 48 Stunden wurden die Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen aufgearbeitet.

2.3.1.3 Transfektion adhärenter Zellen mit SuperFect[®] Transfektions-Reagenz

Das SuperFect[®] Transfektions-Reagenz (Qiagen) wurde speziell zur Transfektion von 293T Zellen verwendet, die für spätere Luziferase-Assays (siehe 2.5.5 und 2.5.6) verwendet wurden.

SuperFect[®] Transfektions-Reagenz ist ein aktiviertes Dendrimer, das DNA in kompakte Strukturen zusammenzieht, um so die Aufnahme der DNA in die Zelle zu optimieren. SuperFect[®]-DNA Komplexe sind positiv geladen, was eine Bindung an negativ geladene Rezeptoren an der Zelloberfläche von eukaryotischen Zellen begünstigt. In der Zelle puffert

das SuperFect[®] Transfektions-Reagenz nach der Fusion mit dem Endosom das Lysosom, was zu einer pH-bedingten Inhibierung von lysosomalen Nukleasen und einer Stabilisierung des SuperFect[®]-DNA Komplexes führt.

Zur Durchführung der Transfektion von Zellen in 6 cm Schalen wurden insgesamt 5 µg Plasmid-DNA in TE Puffer mit DMEM Medium ohne Zusätze auf ein Volumen von 150 µl aufgefüllt, gemischt und kurz abzentrifugiert. Zu diesem Ansatz wurden 30 µl SuperFect[®] Transfektions-Reagenz hinzugegeben und durch 10-sekündiges Vortexen gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation des Ansatzes bei RT wurde dieser mit 1 ml Vollmedium versetzt und auf die vorher mit 1x PBS gewaschenen Zellen gegeben. Die Zellen wurden 3 Stunden unter normalen Bedingungen mit den Transfektionskomplexen inkubiert, in PBS gewaschen und 24-48 Stunden in Vollmedium weiter kultiviert.

2.3.2 Herstellung von Zelllysaten für unterschiedliche Zwecke

Transfizierte Zellen, deren Lysate für spätere Western Blot Analysen eingesetzt werden sollten, wurden je nach anschließender Analyse und Proteineigenschaften in verschiedenen Puffern lysiert. 293T Zellen, die mit den unterschiedlichen GFP-PAROT Expressionsplasmiden transfiziert waren, wurden in einem NP40-Puffer (20 mM NP40/1% IGEPAL, 150 mM NaCl pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 25 mM NaF) mit 1% SDS 10 min auf Eis lysiert, ultrabeschallt und mit 5X SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben 5-10 min bei 99°C denaturiert, bei -20°C gelagert oder direkt für Western Blots eingesetzt. 293T Zellen, die mit den GAL4DBD-PAROT Expressionsplasmiden transfiziert waren, wurden im RIPA-Puffer (1% Deoxycholat, 1% IGEPAL, 1% SDS, 25 mM Tris pH 8,2, 50 mM NaCl) 20 min auf Eis lysiert, mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 99°C aufgeköcht. Die Proben wurden bei -20°C gelagert, bzw. direkt für Western Blot-Analysen eingesetzt.

2.3.3 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und EYFP- bzw. EGFP-Markerprotein

Bei EYFP-/EGFP-Fluoreszenz („Enhanced Yellow/Green Fluorescent Protein“) handelt es sich um zwei durch Punktmutationen optimierte Versionen der YFP-/GFP-Proteine aus der Qualle *Aequorea victoria*, die verbesserte fluoreszierende Eigenschaften aufweisen. Diese wurden zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen in fusionierter Form eingesetzt. Dazu wurden adhärent wachsende Zellen (HeLa, U2 OS, H1299, NIH3T3, MEF, WI38) in einer 24-Lochplatte (Greiner, Frickenhausen) auf mikroskopischen, runden Deckgläschen ausplattiert und am darauffolgenden Tag mittels FuGENE 6 Transfektions-

Reagenz transfiziert (siehe 2.3.1). Nach 24-48 Stunden wurden die Zellen zunächst auf Eis in PBS gewaschen und in der Regel anschließend für 3 min auf Eis in tiefgekühltem Methanol/Aceton (1:1) fixiert. Die Zellen wurden getrocknet, 30 min in PBS rehydriert und bei gleichzeitigem Bedarf für den Nachweis eines Proteins durch indirekte Immunfluoreszenz mit dem entsprechenden Primärantikörper (siehe Tabelle) eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgten mehrmaliges Waschen der Zellen in PBS und die Inkubation der Zellen mit dem der Spezies entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (siehe 1.9.2). Diese wurden in der Regel in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

Im Falle der Antikörper gegen UBF und RNA Pol I wurden die Zellen zunächst 3 mal für 5 min in PBS gewaschen, 10 min in 2% Paraformaldehyd inkubiert und 3 mal 10 min in PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Zellen in -20°C gekühltem Methanol für 90 sec und 3-maliges Waschen in PBS. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C .

Zur Anfärbung der chromosomalen DNA wurde anfangs der Interkalator Hoechst 33258 (1:1000), später der Interkalator DRAQ5 der Firma Alexis Biochemicals (1:1000), zur konfokalen Mikroskopie verwendet. Diese Substanzen wurden zusammen mit dem Sekundärantikörper eine Stunde bei RT inkubiert. Es schlossen sich 3 weitere 10-minütige Waschschriffe mit PBS bei RT an. Die Einbettung der Zellen auf einem Objektträger erfolgte bei EYFP-/GFP-Fluoreszenz durch Moviol[®], bei allen anderen mit Mounting Medium (Sigma Diagnostics) und einem Nagellackrand, um das Deckglas auf dem Objektträger zu fixieren und die Präparate zu konservieren.

Zur Anfärbung von Mitochondrien wurden die Zellen 20 min mit 50 nM MitoTracker[®] Red CMXRos (Molecular Probes) in komplettem DMEM Medium unter normalen Bedingungen kultiviert. Das zellpermeable MitoTracker[®] Reagenz besitzt eine Thiol-reaktive Chloromethyl-Gruppe, die mit Thiol-Gruppen von Peptiden und Proteinen zu einem Aldehyd-Konjugat reagiert und somit in den Mitochondrien akkumuliert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Methanol/Aceton fixiert und für Immunfluoreszenzen aufgearbeitet.

Die Analyse der Färbungen wurde mit einem Axiophot-Mikroskop der Firma Zeiss, die konfokale Mikroskopie mit dem Axiovert 200M-Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Beide Mikroskope waren zur unmittelbaren EDV-gestützten Weiterverarbeitung der aufgenommenen Bilder mit einer Digitalkamera gekoppelt. Die konfokalen Bilder konnten mit dem Programm LSM 5 Image Browser geöffnet und anschließend mit Adobe Photoshop 7.0.1 nachbearbeitet werden.

Für Lokalisationsstudien in lebenden Zellen wurde die direkte Immunfluoreszenz durch EYFP-/EGFP und EYFP-/EGFP-Fusionen verwendet. 293T Zellen wurde mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert und nach in der Regel 24 Stunden unter einem Axiovert S 100 Mikroskop analysiert. Das Mikroskop war mit einer Digitalkamera der Firma Hamamatsu gekoppelt. Die Bilder konnten mit dem Programm Openlab 2.2.5 für Macintosh geöffnet und anschließend mit Adobe Photoshop 7.0.1 nachbearbeitet werden.

Bezeichnung	Spezies	eingesetzte Verdünnung
anti-Flag	Maus	1 :1000
anti-Nucleostatmin, (A13)	Kaninchen	8 ng/ μ l
anti-Nucleostatmin	Huhn	1:50
anti-PAROT, (P12)	Kaninchen	8 ng/ μ l
anti-PAROT-Linker (3b)	Huhn	1:50
anti-PAROT-ZF (5b)	Huhn	1:50
anti-RNA Pol I	Mensch	1:1500
anti-UBF	Mensch	1:1200
anti-PML	Maus	1:50
anti-Nucleolin	Maus	5 ng/ μ l
anti-Fibrillarin	Maus	1:200
anti-NOH61	Maus	1:100
anti- β -Aktin	Maus	1:200
anti-Golgi 58K	Maus	1:50
anti-alpha-Tubulin	Maus	1 :500

2.4 Herstellung rekombinanter Fusionsproteine

2.4.1 Verwendete Konstrukte

Die Herstellung rekombinanter Proteine humanen Ursprungs in Bakterien erfolgte ausschließlich in Form von Fusionen mit Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum*. Diese Fusion ermöglicht eine leichte Aufreinigung der Proteine auf der Grundlage einer hochaffinen Bindung zwischen GST und reduziertem Glutathion. Als Basisvektor für diese Konstrukte wurde der Vektor pGEX-4T-1 der Firma Pharmacia verwendet. Die Expression der Proteine steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors, der durch das Lactose-Analog Isopropyl β -D Thiogalactosid (IPTG) induzierbar ist:

Name	Bereich (AS)
GST-Nucleostatmin-mutC (DKFZ)	1-360
GST-Nucleostatmin (NIH)	1-367
GST-Linker	65-198
GST-ZF	199-444

2.4.2 Test-Induktion und -Expression der Konstrukte in *E.coli*

Die oben beschriebenen Plasmide wurden zunächst in *E.coli* BL21 (DE3)pLysS transformiert. Für Test-Induktionen wurden zunächst 3 ml-Kulturen einzelner Klone mit 100µg/ml Ampicillin (Amp) und 34µg/ml Chloramphenicol (Chl) über Nacht bei 37°C und 200 upm hochgeschüttelt.

Von jeder Übernachtskultur wurden 2 mal 500 µl in je ein 1,5 ml-Reaktionsgefäße gegeben und mit 500 µl LB-(Amp/Chl)-Medium aufgefüllt. Eine der 1ml-Kulturen wurde mit IPTG (Isopropyl β-D Thiogalaktosid (1mM Endkonzentration) induziert und 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die zweite 1ml-Kultur wurde ebenfalls bei 37°C 4 Stunden geschüttelt und diente als Negativkontrolle.

Die Bakterien wurden schließlich 1 min bei 13000 upm sedimentiert (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf) und mit 50 µl 1x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 99°C aufgeköcht.

Der Vergleich des Bandenmusters von Proteinextrakten induzierter und nicht-induzierter Kulturen in einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel (siehe 2.5.1 und 2.5.2) ergab in der Regel Aufschluss über die Expression der GST-Fusionen.

Von positiven Klonen wurden Glycerol-Stocks angelegt (500 µl Bakterienkultur mit 500 µl 60%-igem Glycerol) und bei -80°C gelagert.

2.4.3 Induktion und Expression der Proteine in großem Maßstab

100 ml einer Übernachtskultur positiver BL21-Klone wurden mit LB-(Amp/Chl)-Medium auf 750 ml aufgefüllt. Nach etwa einstündigem Wachstum bei 37°C, 200 upm wurde die Expression der GST-Fusionen durch Zugabe von IPTG (1mM Endkonzentration) induziert. Die Bakterien wurden dann für 7 weitere Stunden bei 37°C unter Schütteln (200 upm) inkubiert. In der Regel begünstigt eine Temperatur von 30°C die Produktion der rekombinanten Proteine gegenüber dem bakteriellen Wachstum. In diesen Fällen erwiesen sich 37°C jedoch als optimaler in bezug auf die Proteinmenge.

Die Bakterien wurden anschließend sedimentiert (Sorvall GSA, 6000 upm, 15 min, 4°C) und bei -80°C bis zur Proteinaufreinigung gelagert.

2.4.4 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Die Bakterienpellets (siehe 2.4.3) wurden zunächst aufgetaut, in 9 ml PBS resuspendiert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 10% (v/v) Triton X-100 (Endkonzentration 1% (v/v)) versetzt. Zur endgültigen Lyse der Bakterien wurden diese ultrabeschallt, bis die Suspension aufgrund der freigesetzten Bakterien-DNA eine viskose Konsistenz annahm. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine anschließende Zentrifugation (Sorvall SS34, 13000 upm, 20 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 375 µl GSH-Sepharose (Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow, Amersham Biosciences, Uppsala Schweden), die zuvor 3 mal mit PBS gewaschen wurde, versetzt. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die GSH-Sepharose erfolgte dann während einer ein- bis dreistündigen Inkubation auf einem Drehmischer bei 4°C. Es folgten drei weitere Waschschrte der Sepharose mit PBS. Die gebundenen Proteine wurden anschließend entweder mit 300 µl Elutionspuffer G (8mM reduziertes Glutathion, 20 mM Tris, pH 7,5) 1 Stunde bei 4°C auf einem Drehmischer eluiert oder mit 5x SDS-Probenpuffer bei 99°C aufgeköcht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und für die Immunisierung von Legehennen eingesetzt (siehe 2.5.4).

Wurden die Proteine eluiert, folgte eine Zentrifugation (Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, 13000 upm, 1min bei 4°C). Zur Entfernung des Glutathions wurde der die Proteine enthaltende Überstand in einem Dialyseschlauch (Spectra/Por® Membrane 1, Spectrum laboratories inc.) mind. 3 Stunden bzw. über Nacht gegen 2 l Dialysepuffer (20 mM HEPES, pH 7,5) dialysiert. Die Proteine wurden anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Konzentration und Reinheit der so aufgereinigten Proteine wurde dann mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (siehe 2.5.2) zusammen mit einem Albumin-Standard ermittelt.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische lassen sich unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihrer molekularen Masse auftrennen. SDS als anionisches Detergenz überdeckt dabei durch Anlagerung an Proteine deren Eigenladung. Erhitzung der Proben auf über 95°C mit einem Überschuss an SDS spaltet die Wasserstoffbrücken von Tertiär- und Sekundärstrukturen und führt zur

Streckung der Moleküle. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen werden durch β -Mercaptoethanol (Schwefelbrücken-spaltendes Thiolreagenz) reduziert.

In einem Polyacrylamidgel laufen die Proteine dann im elektrischen Feld mit einer Wanderungsgeschwindigkeit, die sich umgekehrt proportional zu ihrer Größe verhält, zur Anode. Diese gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970) mit 7,5-14%igen Acrylamid-Trenngelen und 3%igen Acrylamid-Sammelgelen. In Abhängigkeit von der Proteingröße und der daraus resultierenden erforderlichen Trennung wurden Gele mit verschiedenen Längen des Trenngels eingesetzt (Minigele im vertikalen BioRad-System, Maxigele im vertikalen Biometra-System).

Mit Hilfe von Größenstandards (siehe 1.4) lassen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln.

Das Gel entsteht durch die Polymerisation eines Acrylamid-N,N'-Methylenbisacrylamid Gemisches. APS dient dabei als Radikalkettenstarter und TEMED als Katalysator. Durch Variationen der Acrylamid-N,N'-Methylenbisacrylamid Menge lassen sich die Porengrößen des Gels verändern. Die genaue Zusammensetzung der Gele sowie des Laufpuffers ist dem Abschnitt II.1.2 zu entnehmen.

Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet, um eine schnellere Polymerisation unter Ausschluss von Luftsauerstoff zu gewährleisten. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Alkohol vollständig entfernt und das Sammelgel gegossen.

Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99°C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten elektrischen Spannung zwischen 80 und 140 V.

2.5.2 Anfärben von Proteingelen mit Coomassie-Brilliantblau R 250

Durch die Anfärbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliantblau können in einer Proteinbande ca. 0,1 μ g Protein nachgewiesen werden.

Die Proteingele wurden mind. 2 Stunden oder über Nacht durch leichtes Schwenken bei RT in Coomassie-Färbelösung (siehe II.1.2) gefärbt. Nachfolgendes Schwenken in Entfärber (siehe II.1.2), wobei dieser mehrfach ausgewechselt wurde, ließ die Proteinbanden sichtbar werden. Schließlich wurde das Gel in dH₂O äquilibriert und zur dauerhaften Aufbewahrung zwischen zwei Zellophanfolien (Gel Drying Kit, Promega) getrocknet.

Durch kurzes Erhitzen (nicht Kochen!) des Gels in Coomassie-Färbelösung in einem Mikrowellen-Ofen, anschließendes 15-minütiges Schwenken und ebensolches Verfahren mit dem Entfärber, kann die langwierige Prozedur des Färbens und Entfärbens beschleunigt werden.

2.5.3 Western Blot

Die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine werden beim Western Blot über Elektrotransfer auf einen Träger, in diesem Fall eine Polyvinylidifluorid (PVDF)-Membran (HybondTM-P, Amersham Biosciences), übertragen und für den nachfolgenden Immunnachweis immobilisiert.

Im Fall der Semi-Dry Blotting Methode wurden auf die Anode einer horizontalen Transferapparatur (Trans-Blot[®]SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) folgende Lagen übereinander geschichtet:

1 Lage *Extra Thick Blot Paper* (CriterionTM size) der Firma BioRad, die PVDF-Membran, das Polyacrylamidgel, 1 Lage *Extra Thick Blot Paper* (CriterionTM size) der Firma BioRad und die Kathode der Apparatur.

Die *Blot Paper* wurden vorher mit Transferpuffer (II.1.2) durchtränkt. Die PVDF-Membran wurde ebenfalls mit Transferpuffer äquilibriert, nachdem sie zuvor in Methanol geschwenkt wurde.

Der Proteintransfer erfolgte in der Regel bei einer konstanten Spannung von 10 V/10 min und anschließenden 20V/45 min.

Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde die Membran über Nacht in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T (0,1% Tween 20 in TBS) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 mal 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend für mind. 1 h bei RT bzw. 4°C (in Abhängigkeit von den jeweils verwendeten Antikörpern) mit einer Lösung des Erstantikörpers (0,1-1 µg/ml in TBS-T/1,5% Magermilchpulver) geschwenkt. Es folgten 3 weitere Waschschrte mit TBS-T und anschließend eine Inkubation für eine Stunde bei RT mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:20000 in TBS-T/1,5% Magermilchpulver). Die Membran wurde 3 weitere Male mit TBS-T gewaschen.

Die Visualisierung der antikörperbeladenen Proteine erfolgte dann durch Chemilumineszenz unter Verwendung der unterschiedlich sensitiven SuperSignal[®] Substrate der Firma Pierce. Dazu wurden gleiche Teile der *Luminol/Enhancer Solution* und des *Peroxide Buffers* gemischt, die Membran in einer Plastikhülle eine Minute darin inkubiert und auf einem Röntgenfilm exponiert.

2.5.4 Epitop-Tags zur Detektion und Präzipitation von exogenen Proteinen

Zur Detektion von überexprimierten Proteinen, gegen die keine Antikörper verfügbar waren, sowie zur Unterscheidung endogener und exogener Proteine wurden sogenannte Epitop-Tags verwendet. Dieses Prinzip beruht darauf, dass die kodierende Region einer cDNA eines Proteins in einem Plasmid an ihrem N- oder C-Terminus mit einer Sequenz fusioniert wird, die für einen kurzen, antigenen Proteinabschnitt kodiert. Dieser kann mit Hilfe entsprechender Antikörper nachgewiesen werden. In diesem Fall wurde das FLAG[®]-Epitop-Tag verwendet. Es ist synthetischen Ursprungs mit der Proteinsequenz DYKDDDDK und wird von dem anti-FLAG M2 Antikörper erkannt (siehe auch 1.9.1)

2.5.5 Analyse der Repressoraktivität des PAROT-Proteins durch Messung der Luciferase Aktivität

Das Enzym Luciferase des Glühwürmchens *Photinus pyralis* wandelt Luciferin in Gegenwart von molekularem Luftsauerstoff, ATP und Mg²⁺ in Oxyluciferin und CO₂ um. Dies ist eine biolumineszente Reaktion, bei der Licht einer Wellenlänge von 562 nm emittiert und in einem Luminometer gemessen werden kann. Diesen Umstand kann man sich zunutze machen, indem man die Expression des Luciferasegens unter die Kontrolle von 5 vorgeschaltete Gal4 Promotoren stellt. Zur Analyse der Repressoraktivität des PAROT Proteins wurde dieses an die Gal4 DBD (DNA Bindungsdomäne) fusioniert und zusammen mit dem 5xGal4-*Luc*-Vektor in 293T Zellen cotransfiziert (siehe 2.3.1.3). Durch die Bindung des Gal4-DBD PAROT Fusionsprotein an die Gal4-Promotoren kann anhand der messbaren Luciferaseaktivität festgestellt werden, ob es sich bei dem PAROT Protein um einen Repressor handelt oder nicht.

20-24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit 250 µl (12-Lochplatten) Reporter Lysis Buffer (RLB; Luciferase Assay System, Promega) versehen und, zur vollständigen Lyse der Zellen, bei -70°C mind. 10 min bzw. über Nacht eingefroren. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch eine 15-minütige Zentrifugation (13200 upm, 4°C) sedimentiert. Die Aktivität der im Überstand enthaltenen Luciferase wurde im MicroLumat LB96P der Firma Berthold Technologies bestimmt. Dazu wurden 50 µl des Lysats in einer 96-Lochplatte in das Gerät eingebracht. Die Injektion von 100 µl der das Luciferin enthaltenden Substratlösung (siehe Herstellerangaben) wurde automatisch von dem Luminometer vorgenommen. Die Messung der Lichtemission erfolgte in einem Zeitintervall von 20 Sekunden. Die Messdaten wurden mit Hilfe des Programms EG&G WinGlow aufgezeichnet und anschließend im Microsoft Excel Programm ausgewertet.

2.5.6 β -Gal Reportergen Assay

Das Reportergensystem auf der Basis der β -Galactosidase der Firma Roche diente als interne Kontrolle der Luciferase-Assays, um Schwankungen der Luciferaseaktivität auf die Aktivität der β -Galactosidase zu normalisieren. Zusammen mit dem 5xGal4-*Luc* und dem pM2-PAROT Vektor wurde der pVR-*LacZ* Vektor in 293T Zellen cotransfiziert. In diesem Vektor steht das *LacZ* Gen aus *Escherichia coli*, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert, unter dem konstitutiven SV40-Promotor. Das Enzym β -Galactosidase deglycosyliert bei einem neutralen pH-Wert β -Galctoside und künstliche 1,2-Dioxetan-Galactopyranosid-Derivate. Im Reaktionsansatz akkumuliert abgespaltenes Dioxetan als stabiles Zwischenprodukt, das nach einem pH-Shift in den alkalischen Bereich deprotoniert wird und dabei Licht einer Wellenlänge von 475 nm aussendet.

Zur Messung der β -Galactosidaseaktivität wurden 50 μ l des Lysats in einer 96-Lochplatte mit 100 μ l des Substratreagenzes (siehe Herstellerangaben) 30-60 min bei RT inkubiert. Die Injektion von 50 μ l des Initiationsreagenzes (siehe Herstellerangaben) erfolgte automatisch durch das Luminometer. Die Messung der Lichtemission erfolgte in einem Zeitintervall von 5 Sekunden. Die Messdaten wurden mit Hilfe des Programms EG&G WinGlow aufgezeichnet und anschließend im Microsoft Exel Programm ausgewertet.

2.5.7 Immunisierung von Legehennen und Isolierung von Antikörpern (IgY) aus

Hühnerei-Dotter

Phosphat-Puffer I	10 mM	Kaliumphosphat, pH 7,2
	100 mM	NaCl
Phosphat-Puffer II	10 mM	Kaliumphosphat, pH 7,2
	100 mM	NaCl
	7%	Polyethylenglycol 6000 (w/v)
Phosphat-Puffer III	10 mM	Kaliumphosphat, pH 7,2
	100 mM	NaCl
	24%	Polyethylenglycol 6000 (w/v)

Die Fusionsproteine GST-Nucleostatmin, GST-Linker und GST-ZF wurden nach Aufreinigung über Glutathion Sepharose und SDS-PAGE (siehe 2.4.4 und 2.5.1) für die Immunisierung von Legehennen eingesetzt. 150 bis 200 μ g Antigen im Polyacrylamidgel

wurden homogenisiert, mit gleichen Volumen PBS versetzt (vorgeschriebene Injektionsmenge beachten!) und den Hühnern subkutan injiziert. Die Immunisierung wurde nach 2 und 4 Wochen mit der gleichen Menge Antigen wiederholt. Aus den etwa ab der zweiten Woche nach der Sekundär-Immunisierung gelegten Eiern wurden die Antikörper (IgY) isoliert. Für die Herstellung einer Prä-Immun-Antikörperlösung wurden Eier verwendet, die vor der Immunisierung gelegt worden waren.

Die Extraktion der Antikörper erfolgte aus dem Eigelb der Eier durch fraktionierende Polyethylenglycol-Fällung (Polson et al., 1985; Polson et al., 1980a; Polson et al., 1980b). Zunächst wurde das Eigelb vom Eiweiß getrennt und mehrmals mit A. dest gewaschen, um das Eiweiß so gut wie möglich zu entfernen. Das Eigelb wurde vom Dottersack befreit und mit einem Volumen Phosphat-Puffer I gemischt. Anschließend wurde ein Volumen Phosphat-Puffer II hinzugefügt, so dass die Endkonzentration von Polyethylenglycol (PEG) 6000 3,5% betrug. Dies wurde dann 30 Minuten bei 4°C auf einem Drehmischer inkubiert. Dabei wurden Lipidverbindungen des Eigelbs gefällt und nachfolgend durch Zentrifugation (10 min, Sorvall SS-34-Rotor, 10000 upm, 4°C) und Filtration (Faltenfilter, Schleicher & Schüll, Dassel/Weserbergland; Mull) von den im klaren Überstand gelösten Antikörpern getrennt. Das Filtrat wurde durch Zusatz von 10% PEG Trockensubstanz auf 12% PEG eingestellt, um die Antikörper zu fällen und anschließend durch Zentrifugation (10 min, Sorvall SS-34-Rotor, 10000 upm, 4°C) zu sedimentieren. Das Sediment wurde in 10 ml Phosphat-Puffer I je Eigelb gelöst und die Antikörper nochmals durch die Zugabe von einem Volumen Phosphat-Puffer III (Endkonzentration 12% PEG) gefällt. Nach Zentrifugation (10 min, Sorvall SS-34-Rotor, 10000 upm, 4°C) wurde das Präzipitat in 5 ml Phosphat-Puffer I je Eigelb gelöst und nochmals zentrifugiert (15 min, Sorvall SS-34-Rotor, 18000 upm, 4°C), um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der als Antikörper-Lösung verwendete klare Überstand wurde mit 0,02% Natriumazid versetzt, aliquotiert und bei 4°C aufbewahrt bzw. bei -80°C gelagert.

2.5.8 Test der Antikörper (IgY)-Lösungen im Western Blot

Die Antikörper-Lösungen wurden zunächst im Western Blot getestet. Dazu wurden definierte Mengen (10 ng, 50 ng, 100 ng) aufgereinigter Antigene (GST-Fusionen, siehe 2.4.4) auf einem SDS-Polyacrylamidgel (siehe 2.5.1) aufgetrennt und für einen anschließenden Immunnachweis auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe 2.5.3). Die Antikörper-Lösungen wurden in einer Verdünnung von 1:1000 bzw. in einer Verdünnungsreihe von 1:200 bis 1:1000 eingesetzt.

2.5.9 Test der Antikörper (IgY)-Lösungen in Immunfluoreszenz

Die Antikörper-Lösungen wurden ebenfalls in der Immunfluoreszenz getestet. Dazu wurden U2 OS Zellen auf einem Deckglas fixiert (siehe 2.3.2) und mit den Antikörper-Lösungen bei einer Verdünnung von 1:50 und 1:200 eine Stunde bei RT inkubiert. Als Kontrolle dienten die von der Firma Eurogentec hergestellten Peptidantikörper (A13 und P12).

III. Ergebnisse

3.1 Identifizierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine

Im Zuge des Deutschen Genom Projektes wurde 1997 das Deutsche cDNA-Konsortium in Heidelberg (Dr. Stefan Wiemann und Dr. Annemarie Poustka, DKFZ Heidelberg; Dr. Rainer Pepperkok, EMBL Heidelberg) gegründet. Dieses hatte sich als Ziel gesetzt, cDNA-Bibliotheken aus bisher unzureichend charakterisierten Geweben zu generieren und zu sequenzieren, um neue, uncharakterisierte proteinkodierende Abschnitte zu identifizieren. Nicht in Sequenzdatenbanken annotierte cDNAs wurden anschließend mit EYFP fusioniert, das Fusionsprotein in humanen Zellen exprimiert und seine subzelluläre Lokalisation bestimmt (Simpson et al., 2000).

Von vorliegenden unterschiedlich in der Zelle lokalisierenden EYFP-Fusionsproteinen wurden für die Arbeit zwei ausgewählt, die in punktartigen Kerndomänen lokalisieren (Abb.3.1). Die beiden bisher unbekannt Proteine (DKFZphfbr2_2305 (Nr.1; im Folgenden Nucleostatmin genannt) und DKFZphamy2_121g18 (Nr.9; im Folgenden PAROT genannt), wurden im Hinblick auf eine mögliche Assoziation mit PML-Kerndomänen bzw. anderen Kerndomänen untersucht.

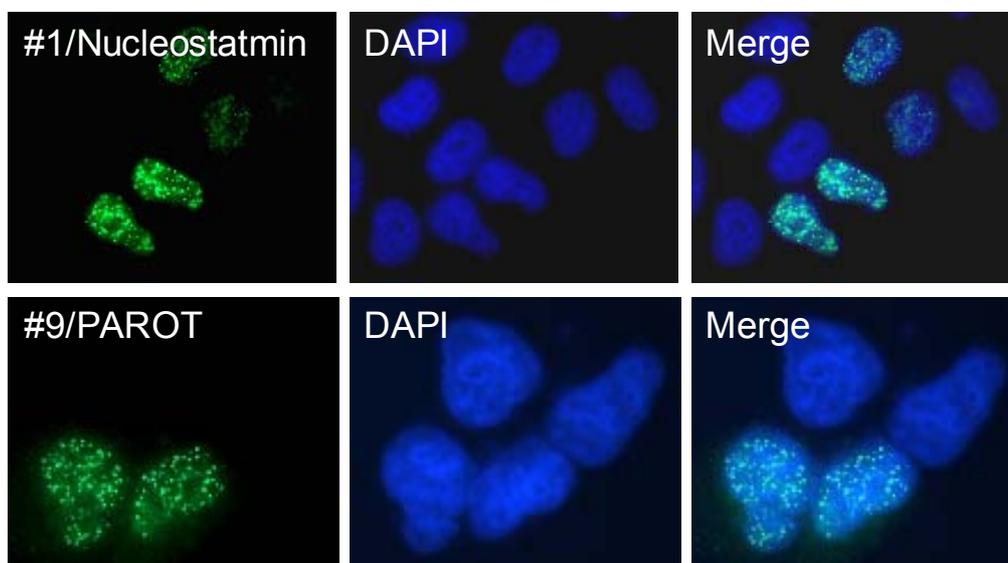


Abb.3.1: Identifizierung zweier mit Kerndomänen assoziierter Proteine. HeLa Zellen wurden mit 1 μ g EYFP-#1 (A) und EYFP-#9 (B) transfiziert und am Folgetag fixiert. Die genomische DNA wurde mittels DAPI sichtbar gemacht. Die rechten Bilder zeigen die Überlagerung der exprimierten EYFP-Fusionsproteine und der DNA.

Charakterisierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine

3.2.1 Datenbankanalysen

Da es sich bei den beiden identifizierten Proteinen um bisher unbekannte Proteine handelte, wurden zunächst verschiedene Datenbankanalysen durchgeführt, um durch mögliche Sequenzhomologien einen Hinweis auf in ihre zelluläre Funktion zu bekommen. Der „ExPASy“ (Expert Protein Analysis System) Molekularbiologie Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik (SIB) bietet verschiedene Programme an, um sowohl Nukleinsäure- als auch Aminosäuresequenzen in Bezug auf ihre Eigenschaften zu analysieren. Zunächst wurden die cDNAs im MacVector-7.0 Programm translatiert, um den offenen Leserahmen zu finden und die daraus resultierenden Aminosäuresequenzen zur Identifizierung von möglichen bekannten Domänen oder Profilen beider Proteine verwenden zu können. Die Aminosäuresequenzen wurden sowohl über das „Prosite“ als auch über das „Motif Scan“ Programm charakterisiert. Beide Programme ergaben die gleichen Ergebnisse, die später sowohl durch die CELERA Datenbank als auch das BLAST Programm des NCBI bestätigt wurden.

PAROT, ein PML-assoziierter Repressor der Transkription

3.2.2.1 Das PAROT-Protein und seine Domänen

Einer der beiden identifizierten Proteine (#9) wurde aufgrund seiner Domänenstruktur, die im folgenden erläutert wird, PAROT (PML-assoziierter Repressor der Transkription) genannt. Der PAROT cDNA-Klon (Accession Nummer NCBI: AL136548) ist 4117 Basenpaare lang und enthält einen einzelnen offenen Leserahmen, der für ein Polypeptid von 444 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von ~ 49 kDa kodiert (siehe Abbildung 3.2). Datenbankanalysen (siehe 3.2.1) seiner Aminosäuresequenz (siehe 3.2.1), die in den Abbildungen 3.2, 3.4, 3.5 und 3.6 beschrieben sind, deuten darauf hin, dass das PAROT-Protein verschiedene Sequenzmotive besitzt, die charakteristisch für die „Krüppel-Familie“ von Transkriptionsfaktoren sind.

Buchstaben hervorgehoben und durch einen Unterstrich markiert. Die Nukleinsäurepositionen sind auf der rechten Seite angezeigt. Die PAROT GenBank/EMBL Accession Nummer ist AL136548.

Das PAROT-Protein besitzt eine N-terminale KRAB-Box (*Krüppel associated box*), bestehend aus einer KRAB-A und einer KRAB-B Box, die in etwa einem Drittel aller C2H2 Zinkfinger-Proteine zu finden ist (Bellefroid et al., 1991; Collins et al., 2001). Weiterhin befindet sich im C-terminalen Bereich eine Zinkfinger-Domäne. Diese besteht aus 8 sequentiell aufeinanderfolgenden C2H2-Zinkfingern. Somit handelt es sich beim PAROT-Protein um ein Mitglied der „*multiple-adjacent*“-C2H2 Zinkfinger-Proteinfamilie (Iuchi, 2001). Zwischen der KRAB-Domäne und den Zinkfingern befindet sich eine etwa 134 Aminosäuren lange sog. Linker-Domäne, deren Funktion bisher unbekannt ist. Die Linker-Domäne zeigt den höchsten Grad an Sequenzvariation in allen Zinkfinger-Proteinen (Bellefroid et al., 1993). Weitere Analysen der Aminosäuresequenz zeigten, dass sich im Bereich der Zinkfinger-Domäne drei potentielle Kernlokalisierungssignale (NLSs; *nuclear localization signal*) befinden (Abb.3.3).



Abb.3.3: Schematische Darstellung des PAROT- Proteins und seiner Domänen.

Das PAROT-Protein ist 444 Aminosäuren lang. Es enthält eine N-terminale KRAB (*Krüppel associated box*) Box, die aus einer KRAB-A und einer KRAB-B Box besteht. Es folgt eine Linker-Region im mittleren Teil des Proteins. Im C-terminalen Bereich des PAROT-Proteins befinden sich 8 C2H2-Zinkfinger. Weiterhin befinden sich innerhalb der Zinkfinger-Domäne 3 vorhergesagte NLSs (*nuclear localization signal*).

3.2.2.2 Die KRAB-Box des PAROT-Proteins

Die *Krüppel associated Box* des PAROT-Proteins weist im wesentlichen die Eigenschaften auf, die vielfach in der Literatur beschrieben wurden (Bellefroid et al., 1991; Collins et al., 2001; Peng et al., 2000a; Urrutia, 2003; Witzgall et al., 1994). KRAB-Boxen umfassen etwa 50-75 Aminosäuren und bestehen aus einer KRAB-A und einer KRAB-B-Box, wie in Abbildung 3.4 dargestellt.

DV und MLE für die Interaktion mit TIF1 β und die damit verbundene Repression der Transkription essentiell sind. Die KRAB-B Box alleine kann die Transkription nicht reprimieren, sie kann jedoch die Repressor Aktivität der KRAB-A Box erhöhen (Vissing et al., 1995). Diese Eigenschaften der KRAB Domäne gelten auch Spezies-übergreifend (Looman et al., 2002). Für KRAZ1 und KRAZ2 beispielsweise, zwei murine KRAB-Zinkfinger-Proteine, konnte eine Interaktion mit TIF1 β und die damit verbundene Repression der Transkription nachgewiesen werden (Agata et al., 1999). Somit lässt die Domänenstruktur des PAROT-Proteins vermuten, dass es sich um einen Repressor der Transkription handelt.

3.2.2.3 Die Zinkfinger-Domäne des PAROT-Proteins

Zinkfinger-Proteine sind vermutlich die größte Familie regulatorischer Proteine in Säugern, die sowohl DNA, RNA als auch Proteine binden. Das PAROT-Protein ist eines davon und aufgrund seiner in gleichen Abständen nebeneinander liegenden acht Zinkfinger ein Mitglied der sog. „multiple-adjacent“-C2H2-Zinkfinger Familie (Iuchi, 2001). Die C2H2 Zinkfinger binden DNA, werden als klassische Zinkfinger bezeichnet und oft mit der Formel CX₂-₄CX₁₂HX₂₋₆H beschrieben. In Abbildung 3.5 sind die acht Zinkfinger des PAROT-Proteins dargestellt. Die Zinkfinger-Domäne ist ein kurzes Peptid mit z.T. hochkonservierten Bereichen, wie sich in der Konsensussequenz zeigt. Die unterstrichenen Aminosäuren zeigen die Linker-Region zwischen den Zinkfingern.

ZF1	A	G	E	K	R	Y	K	C	E	E	C	G	K	A	Y	K	Q	S	S	H	L	T	T	H	K	K	I	H
ZF2	T	G	E	K	P	Y	K	C	E	E	C	G	K	A	Y	K	Q	S	C	N	L	T	T	H	K	I	I	H
ZF3	T	G	E	K	P	Y	R	C	R	E	C	G	K	A	F	N	H	P	A	T	L	F	S	H	K	K	I	H
ZF4	T	G	E	K	P	Y	K	C	D	K	C	G	K	A	F	I	S	S	S	T	L	T	K	H	E	I	I	H
ZF5	T	G	E	K	P	Y	K	C	E	E	C	G	K	A	F	N	R	S	S	N	L	T	K	H	K	R	I	H
ZF6	T	G	D	V	P	Y	K	C	D	E	C	G	K	T	F	T	W	Y	S	S	L	S	K	H	K	R	A	H
ZF7	T	G	E	K	P	Y	K	C	E	E	C	G	K	A	F	T	A	F	S	T	L	T	E	H	K	I	I	H
ZF8	T	G	E	K	P	Y	K	C	E	E	C	G	K	A	F	N	W	S	S	A	L	N	K	H	K	K	I	H
Kons	T	G	E	K	P	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>C</u>	E	E	<u>C</u>	G	K	A	<u>F</u>	.	S	S	.	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>H</u>	<u>K</u>	.	I	<u>H</u>		

Abb.3.5: Aminosäuresequenzvergleich der C2H2-Zinkfinger motive des PAROT-Proteins. Zur Erstellung des Vergleichs und der Konsensussequenz wurde das *ClustalW*-Programm der MacVektor-7.0 Software verwendet. Die Sequenzen der acht Zinkfinger des PAROT-Proteins wurden in einem Sequenzvergleich einander gegenübergestellt. Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben; Punkte in der Konsensussequenz bezeichnen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften. Die unterstrichenen Aminosäuren markieren die sog. Linker zwischen den einzelnen Zinkfingern. Die beiden Cysteine und Histidine, die für die Bindung des Zink-Ions

verantwortlich sind, sind schwarz unterlegt. Drei konservierte Aminosäuren, die zur strukturellen Stabilisierung beitragen, sind mit einem schwarzen Kasten umzeichnet. *Kons* steht für Konsensussequenz.

Die beiden Cysteine und Histidine, die ein Zink-Ion tetraedrisch zwischen sich binden (Krishna et al., 2003), sind schwarz unterlegt. Die zur strukturellen Stabilisierung dienenden drei konservierten Aminosäuren Tyrosin (Y), Phenylalanin (F) und Leucin (L) sind mit einem schwarzen Kasten versehen.

3.2.2.4 Die genomische Organisation des humanen *PAROT*-Gens

Bereits 1989 veröffentlichten Bellefroid et al. eine Studie darüber, dass das humane Genom hunderte von Genen besitzt, die für KRAB-Zinkfinger Proteine kodieren. Wenig später wurde bekannt, dass das Zinkfinger-Protein 91 (ZNF91, HTF7, HTF10) und die Mitglieder dieser Familie in sog. „Tandem-Arrays“ auf dem Chromosom 19 kodiert sind (Bellefroid et al., 1993). Auch das Zinkfinger-Protein 85, zu dem das *PAROT*-Protein eine hohe Homologie besitzt (~54% Identität), ist auf dem Chromosom 19 kodiert. Das gesamte *PAROT*-Gen, das in sechs Exons unterteilt ist, spannt sich über mehr als 35 kb der chromosomalen DNA des Chromosoms 19 in der Zytobande p13.11 (Abb.3.6). Interessanterweise zieht sich die kodierende Region nur über die ersten vier Exons und nimmt nur ca. zwei Drittel des gesamten Gens in Anspruch. Das Start-Kodon ATG liegt am Ende des ersten Exons und das Stop-Kodon im hinteren Drittel des vierten Exons.

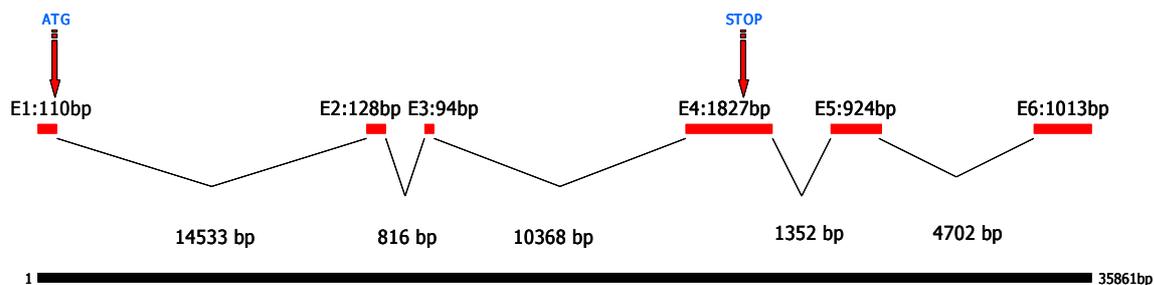


Abb.3.6: Die genomische Organisation des humanen *PAROT*-Gens. Die genomische Organisation des *PAROT*-Proteins wurde mithilfe der CELERA-Datenbank erstellt. Das Gen befindet sich auf dem Chromosom 19 in der Zytobande p13.11 und umfasst 35861 Basenpaare. Es besteht vermutlich aus 6 Exons (E1-E6) deren Länge in Basenpaaren über dem jeweiligen Exon angegeben ist, und 5 Introns, deren Länge in Basenpaaren unter den Introns angegeben ist. Das Start-Kodon ATG ist am Ende des ersten Exons und das STOP-Kodon im hinteren Drittel des vierten Exons zu finden.

3.2.2.5 PAROT wird in unterschiedlichen Geweben exprimiert

Einen Hinweis auf die Expression der PAROT-mRNA in verschiedenen Geweben gibt der Northern Blot der Firma Ambion, auf dem polyadenylierte RNA aus zehn verschiedenen Geweben aufgetragen ist. Die ca. 400 bp der Linker-Domäne wurden als Sonde verwendet, da diese Domäne innerhalb der KRAB-Zinkfinger-Proteinfamilie am geringsten konserviert ist. Auf diese Weise wird die Spezifität für PAROT-Transkripte maximiert. Sowohl mit RNA von Gehirn als auch Skelettmuskel, Niere und Dickdarm wurde ein 4.4 kb Transkript sichtbar (Abb. 3.7). Zwei zusätzliche Transkripte von ca. 6.0 kb im Gehirn und in der Plazenta bzw. 1.9 kb in der Plazenta wurden markiert. Dies ist möglicherweise auf unterschiedliche Spleißvarianten zurückzuführen. Unter Berücksichtigung der β -Aktin-Markierung zeigt sich, dass die aufgetragene RNA-Menge nicht in allen Spuren gleich ist. Aus diesem Blot lässt sich somit nicht schließen, dass z.B. im Pankreas und in der Leber keine PAROT mRNA exprimiert wird. Möglicherweise ist der Expressionslevel für die Sensitivität des gewählten Nachweissystems zu gering. Die EST-Datenbank des NCBI unterstützt die Relevanz des gefundenen Expressionsmusters und weist zusätzlich auch auf zahlreiche weitere Gewebe hin, deren mRNAs auf diesen Blot nicht aufgetragen sind.

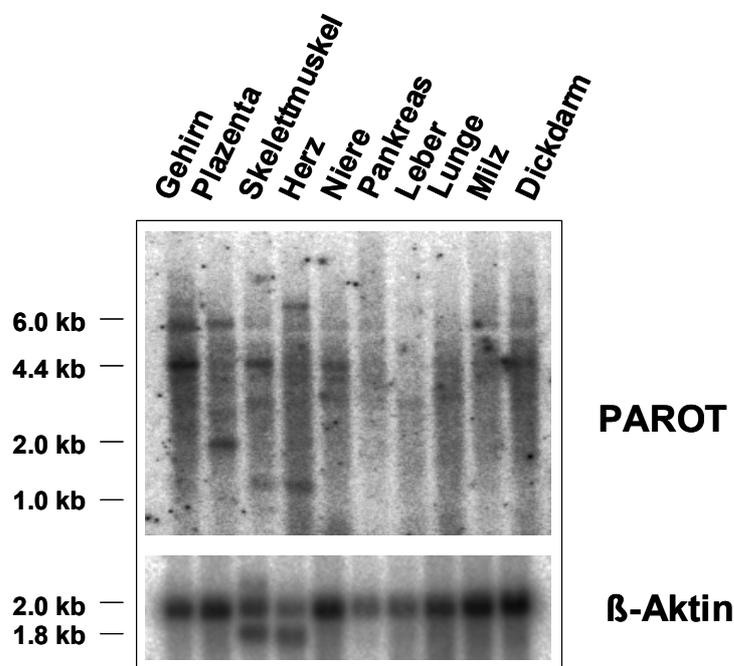


Abb.3.7: Expressionsmuster der PAROT-mRNA in verschiedenen Geweben. Polyadenylierte RNA (2 μ g pro Spur) auf dem Northern Human Blot I (Ambion) wurden mit einer α^{32} -P-markierten Sonde hybridisiert. Als Sonde wurde die ca. 400 bp cDNA der PAROT- Linker-Domäne verwendet, um die Spezifität für PAROT-Transkripte zu

sichern. Links neben dem Blot sind die Markerbanden in kb angegeben. Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA Menge wurde β -Aktin (Clontech) als α^{32} -P-markierte Sonde verwendet.

3.2.2.6 Die nukleäre Lokalisation von PAROT wird sowohl durch die Zinkfinger- als auch durch die Linker-Domäne bestimmt

Die ersten immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen haben bereits gezeigt, dass das PAROT-Protein im Zellkern in einer punktierten Kerndomänen lokalisiert. Datenbankanalysen geben einen Hinweis darauf, dass sich im C-terminalen Bereich der Zinkfinger-Domäne, drei potentielle Kernlokalisierungssignale befinden. Zunächst wurden sowohl das PAROT-Protein als auch 5 hergestellte Deletionsmutanten von PAROT (siehe Abbildung 3.8A), an das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) fusioniert. Diese Konstrukte wurden mittels der Calciumphosphat-Methode in 293T Zellen transfiziert und die Proteine im Western Blot nachgewiesen (Abb.3.8 B).

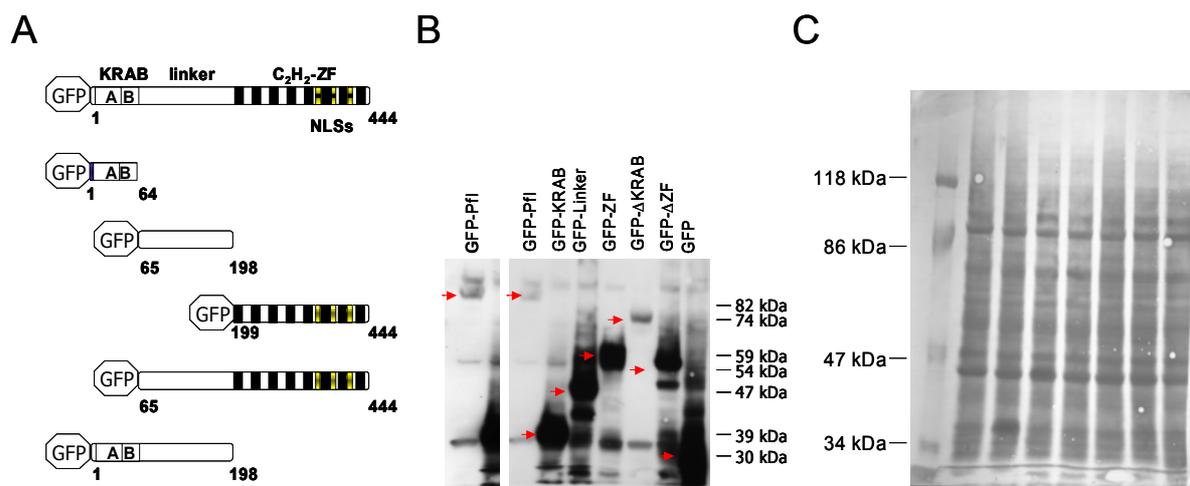


Abb.3.8: Western Blot Analysen des GFP-PAROT-Proteins und der GFP-PAROT-Deletionsmutanten. A) Die kodierende Sequenz des PAROT-Proteins und die von fünf Deletionsmutanten wurden an die des GFPs fusioniert. B) Die Expression der GFP-Fusionsproteine wurde durch Western Blot Analysen nachgewiesen. Dazu wurde der Kaninchen anti-GFP polyklonale Antikörper (1:200) verwendet. Die mit einem Pfeilkopf markierten Proteinbanden zeigen das jeweils erwartete molekulare Gewicht, das auf der rechten Seite des Blots für jedes Protein vermerkt ist. Der linke Blot zeigt die Aufnahme der GFP-PAROT Spur mit einer längeren Exposition. C) Amidoschwarzfärbung der Western-Blotmembran zur Dokumentation gleich aufgetragener Proteinmengen.

Wie in Abbildung 3.8B zu sehen ist, werden alle GFP-Fusionen in den Zellen exprimiert und sind mit dem Kaninchen anti-GFP polyklonalen Antikörper nachweisbar. Bei den zusätzlichen Banden in verschiedenen Spuren handelt es sich entweder um Hintergrund oder

Abbauprodukte des jeweiligen Proteins, die ebenfalls durch den anti-GFP Antikörper erkannt werden. Die Färbung der Western Blotmembran mit Amidoschwarz zeigt, dass in allen Spuren ähnliche Proteinmengen aufgetragen wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die verschiedenen GFP-Fusionen unterschiedlich stark in den Zellen exprimiert werden. Das komplette GFP-PAROT-Protein wird am schwächsten exprimiert. Zur Analyse der Lokalisation der unterschiedlichen GFP-PAROT Deletionsmutanten wurden transfizierte 293T Zellen auf Deckgläschen fixiert, fluoreszenzmikroskopisch analysiert und fotografiert (Abbildung 3.9).

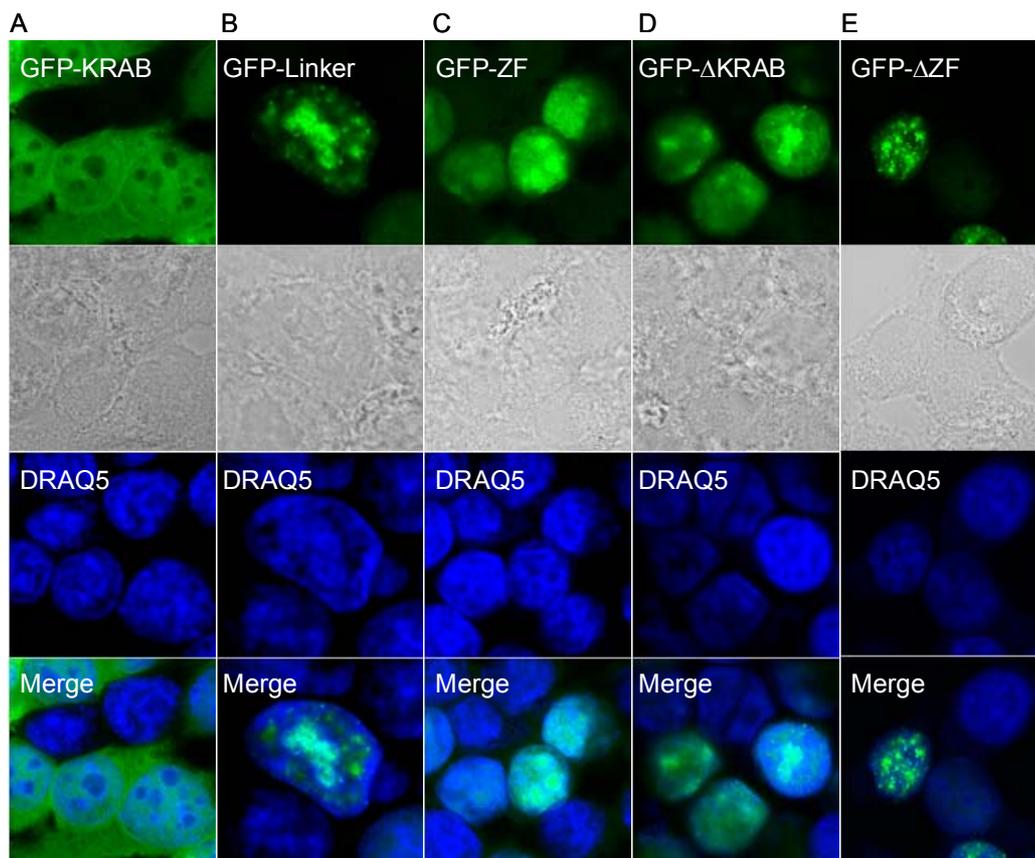


Abb.3.9: Lokalisation von GFP-PAROT und der GFP-PAROT Deletionsmutanten in 293T Zellen. 293T Zellen wurden mittels der Calciumphosphat-Methode mit Expressionsplasmiden der entsprechenden GFP-PAROT Deletionsmutanten transfiziert. A) KRAB-Domäne, B) Linker-Domäne, C) Zinkfinger-Domäne (ZF), D) Teil des PAROT-Proteins ohne die KRAB-Domäne (Δ KRAB) und E) Teil des PAROT-Proteins ohne die Zinkfinger-Domäne (Δ ZF) (vgl. Abb.3.8). Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mit DRAQ5 zur Färbung der DNA inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Axiovert 200M-Mikroskop der Firma Zeiss analysiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die untere Bilderreihe zeigt die Überlagerung der Proteine und der sich im Zellkern befindlichen DNA.

In Abbildung 3.1 wurde bereits gezeigt, dass das komplette PAROT-Protein an EYFP fusioniert im Zellkern lokalisiert. Erstaunlicherweise lokalisieren auch alle GFP-PAROT

Deletionsmutanten (Abb.3.9A-E), bis auf GFP-KRAB, im Zellkern. Das GFP-KRAB Fusionsprotein ist diffus in der ganzen Zelle verteilt (Abb.3.9A). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in der Linker-Domäne, wenn auch kein offensichtliches Kernlokalisierungssignal, evtl. ein kryptisches Kernlokalisierungssignal vorhanden ist. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Linker-Domäne mit einem anderen Protein interagiert, durch welches das Protein dann in den Zellkern transportiert wird.

3.2.2.7 PAROT ist ein Repressor der Transkription

Es sind bereits zahlreiche KRAB-Domänen verschiedener Zinkfinger-Proteine auf ihre Repressoraktivität getestet und als Repressoren der Transkription beschrieben worden (Agata et al., 1999; Peng et al., 2000b; Witzgall et al., 1994). Da das PAROT-Protein ebenfalls eine klassische KRAB-Domäne enthält, war es von Interesse, ob diese ebenfalls Repressoraktivität besitzt. Dazu wurden das PAROT-Protein, die KRAB-Domäne und die Linker-ZF-Domäne, hier als Δ KRAB bezeichnet, an die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (DBD) fusioniert und auf Expression in 293T Zellen getestet. Alle drei Proteine zusammen mit der GAL4DBD alleine konnten entsprechend ihrer erwarteten molekularen Gewichte im Western Blot mit einem polyklonalen Kaninchen anti-GAL4DBD Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 3.10A). Als Transfektionskontrolle und zusätzliche Mengenkontrolle im Western Blot diente das Grün-fluoreszierende Protein (GFP).

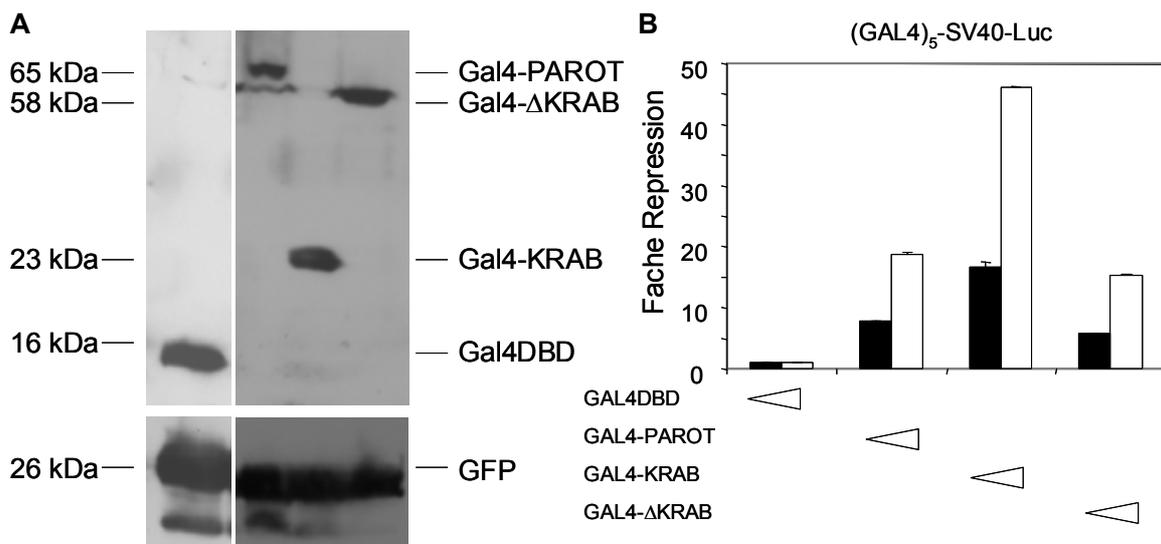


Abb.3.10: Analyse der Repressoraktivität des PAROT-Proteins. A) Das PAROT-Protein, die KRAB-Domäne und die Linker-ZF-Domäne, hier als Δ KRAB bezeichnet, wurden als GAL4-Fusionen in 293T Zellen exprimiert und zusammen mit der GAL4DBD alleine in Western Blot Analysen mit dem Kaninchen anti-GAL4DBD polyklonalen

Antikörper (1:1500) nachgewiesen. Als Expressions- und Mengenkontrolle diente das Grün-fluoreszierende Protein (GFP). Links neben dem Blot sind die erwarteten Molekulargewichte der Proteine angegeben. B) Die transkriptionelle Repressoraktivität des PAROT-Proteins und seiner Deletionen wurde anhand der Luciferase-Aktivität gemessen. 293T Zellen wurden transient mit dem Reporter-Plasmid 5xGal4-Luc (250ng) zusammen mit zwei unterschiedlichen Mengen (1µg, 4µg) der Expressionsplasmide GAL4DBD, GAL4-PAROT, GAL4-KRAB und GAL4-ΔKRAB transfiziert. Die transkriptionelle Repressoraktivität ist als „Fache Repression“ angegeben relativ zur GAL4DBD alleine. *Luc*, Luciferase.

Die Repressoraktivität der Gal4-Fusionsproteine wurde in einem Luciferase-Assay getestet (Abbildung 3.10B). Dazu wurden 293T Zellen mit GAL4DBD, GAL4-PAROT, GAL4-KRAB und GAL4-ΔKRAB transfiziert und die transkriptionelle Repressoraktivität der Proteine durch Messung der Luciferaseaktivität bestimmt. Die transkriptionelle Repressoraktivität ist als „Fache Repression“ angegeben relativ zur GAL4DBD alleine. Das Reportersystem auf der Basis der β -Galactosidase der Firma Roche diente als interne Kontrolle des Luciferase-Assays, um Schwankungen der Luciferaseaktivität auf die Aktivität der β -Galactosidase zu normalisieren. Das PAROT-Protein reprimiert die basale Transkription des 5xGAL4-SV40-Luciferase Reporters dosisabhängig. Die KRAB-Domäne alleine reprimiert die Transkription sogar besser, als das gesamte Protein. Erstaunlicherweise reprimiert sogar die Δ KRAB-Mutante die Transkription des 5xGAL4-SV40-Luciferase Reporters, was ein Hinweis darauf ist, dass über die Linker-Domäne sehr wahrscheinlich Protein-Protein Interaktionen stattfinden, die einen Repressorkomplex rekrutieren.

3.2.2.8 PAROT kolokalisiert mit dem Korepressor TIF1 β (KAP-1/KRIP-1) und Mitgliedern der HP1-Familie

KRAB-Zinkfinger Proteine reprimieren die Transkription über eine direkte Interaktion mit dem Korepressor TIF1 β (Le et al., 1996; Moosmann et al., 1996), auch KAP-1 (Krüppel-associated protein-1; (Friedman et al., 1996)) oder KRIP-1 genannt (Krüppel-interacting protein-1; (Kim et al., 1996)). TIF1 β interagiert seinerseits direkt mit allen Mitgliedern der Heterochromatin Protein 1 (HP1)-Familie, HP1 α , HP1 β und HP1 γ , über seine zentrale Repressordomäne *in vitro* (Nielsen et al., 1999; Ryan et al., 1999). Das PAROT-Protein ist ein KRAB-Zinkfinger Protein, für das gezeigt werden konnte, dass es die Transkription reprimiert (Abbildung 3.10B). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen untersucht, ob das an EYFP-fusionierte PAROT-Protein mit den Flag-markierten Proteinen

HP1 α , HP1 β , HP1 γ und TIF1 β in U2OS Zellen kolokalisiert. Die Immunfluoreszenzbilder sind in Abbildung 3.11A-D dargestellt.

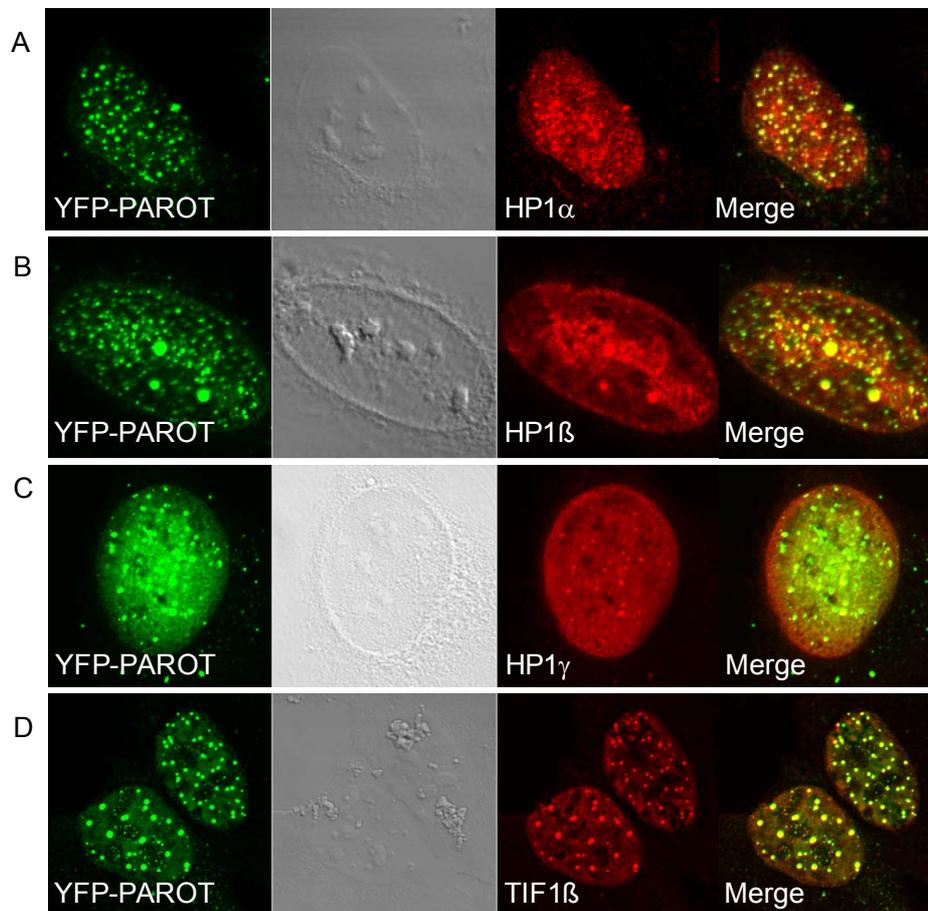


Abb.3.11: PAROT kolokalisiert mit TIF1 β und allen drei Mitgliedern der HP1-Proteinfamilie. U2OS-Zellen wurden transient mit EYFP-PAROT und A) Flag-markiertem HP1 α , B) HP1 β , C) HP1 γ oder D) TIF1 β Expressionskonstrukten transfiziert. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Maus anti-Flag Antikörper, der mit einem Ziege anti-Maus Alexa Flour α 594 (rot) Sekundärantikörper markiert wurde. Die rechten Bilder zeigen die Überlagerung der exprimierten Proteine.

Es zeigte sich, dass das EYFP-PAROT-Protein in U2OS-Zellen mit allen drei Mitgliedern der HP1-Proteinfamilie, HP1 α (Abbildung 3.11A), HP1 β (Abbildung 3.11B) und HP1 γ kolokalisiert (Abbildung 3.11C). Für HP1 α wurde gezeigt, dass es in der murinen Zelllinie NIH3T3 in Punkten im centromeren Heterochromatin lokalisiert (Nielsen et al., 1999), wohingegen HP1 β sowohl in kleinen Punkten im Euchromatin als auch im pericentromeren Heterochromatin lokalisiert (Nielsen et al., 1999; Ryan et al., 1999). HP1 γ lokalisiert in euchromatischen Regionen (Ryan et al., 1999). In der Überlagerung der exprimierten Proteine zeigt sich jedoch auch für HP1 γ eine eindeutige Kolokalisation mit dem EYFP-PAROT-Protein. In Abbildung 3.11D zeigt sich, dass das EYFP-PAROT-Protein auch mit dem Flag-

markierten TIF1 β kolokalisiert, was vermuten lässt, dass das PAROT-Protein über seine KRAB-Domäne mit TIF1 β interagieren und einen Repressorkomplex zusammen mit HP1-Proteinen ausbilden kann.

3.2.2.9 Spezifische Rekrutierung von PAROT in PML-Kerndomänen durch die PML-Protein Isoform IV (PML IV)

Wie bereits erwähnt, wurde das PAROT-Protein aufgrund seiner Domänenstruktur und Lokalisation PML-assoziiierter Repressor der Transkription genannt. Ebenso wie TIF1 β gehört PML zu einer charakteristischen Untergruppe von RING-Finger Proteinen, die zusätzlich zu dem klassischen C3HC4 RING-Finger Motiv ein bis zwei weitere Cystein/Histidin-reiche Domänen (B-Boxen) und eine potentielle „Coiled-Coil“ Domäne besitzen (RBCC Domäne). 2001 wurde von Wu et al. gezeigt, dass die PML IV-Isoform der PML-Proteinfamilie über eine Interaktion mit Histon-Deacetylasen an der transkriptionellen Repression beteiligt ist. Zunächst wurde daher getestet, ob das EYFP-PAROT-Protein mit bestimmten Isoformen der PML-Proteinfamilie in HeLa Zellen kolokalisiert (Abbildung 3.12A-B).

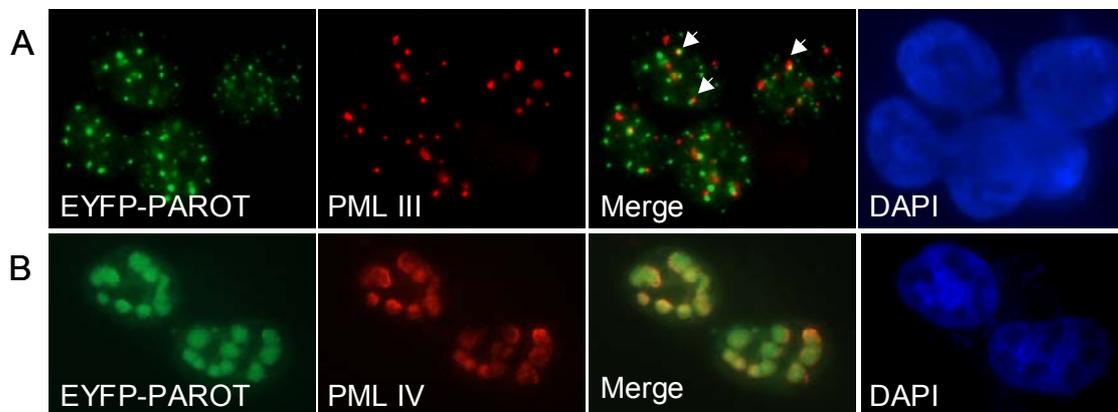


Abb.3.12: PAROT speziell durch die PML-Protein Isoform IV (PML IV) in PML-Kerndomänen rekrutiert. HeLa Zellen wurden transient mit EYFP-PAROT und PML III bzw. PML IV transfiziert. A) zeigt die Isoform PML III und B) zeigt die Isoform PML IV. Als Primärantikörper zur Erkennung von endogenem PML-Protein und transfizierten PML-Isoformen wurde ein monoklonaler Maus anti-PML Antikörper verwendet. Dieser wurde mit einem Ziege anti-Maus Alexa Flour® 594 (rot) Sekundärantikörper markiert. Die Pfeile in A) zeigen EYFP-PAROT und PML-Kernpunkte, die dicht nebeneinander liegen oder partiell überlappen. Die dritte Bilderreihe von links zeigt die Überlagerung der Proteine.

Es zeigt sich in Abbildung 3.12A, dass das PAROT-Protein nicht mit der Isoform PML III kolokalisiert. Interessanterweise ist jedoch eine eindeutig Rekrutierung von PAROT durch die

PML-Isoform PML IV festzustellen (Abb.3.12B). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PAROT durch eine spezifische PML-Isoform in PML-Kerndomänen rekrutiert werden kann.

3.2.2.10 Die PML-Isoform PML IV rekrutiert KRIM-1A, ein weiteres KRAB-Repressorprotein, in PML-Kerndomänen

Um zu untersuchen, ob die PML-Isoform PML IV auch andere KRAB-Zinkfinger Proteine in PML-Kerndomänen rekrutiert, wurde eine weitere Kolokalisationsstudie mit dem KRAB-Zinkfinger-Protein KRIM-1A (KRAB-Box-Protein interagierend mit Myc), das mit c-Myc interagiert und dessen onkogene Aktivität inhibiert, durchgeführt (Hennemann et al., 2003). GFP-KRIM-1A wurde zusammen mit PML III oder PML IV in U2OS Zellen transient transfiziert und in Immunfluoreszenzen analysiert.

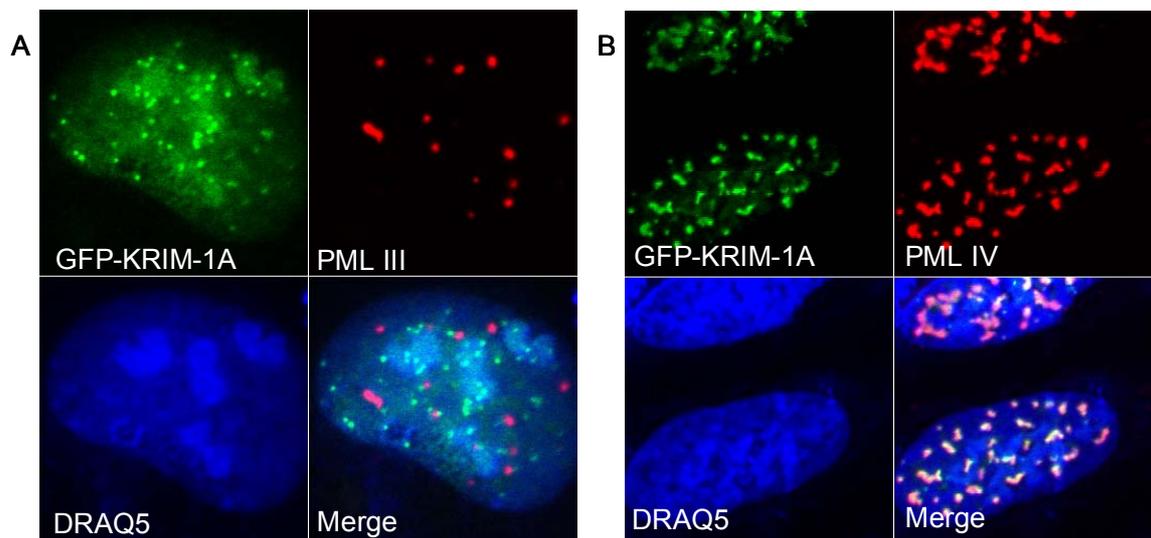


Abb.3.13: Die PML-Protein Isoform IV (PML IV) rekrutiert KRIM-1A in PML-Kerndomänen. U2OS Zellen wurden transient mit EGFP-KRIM-1A und PML III (A) bzw. PML IV (B) transfiziert. Als Primärantikörper zur Erkennung der PML-Isoformen wurde ein monoklonaler Maus anti-PML Antikörper verwendet. Dieser wurde mit einem Ziege anti-Maus Alexa Flour® 594 (rot) Sekundärantikörper markiert. Die Bilder unten rechts bei jeder Vierergruppe zeigen die Überlagerung der exprimierten Proteine.

Wie sich zeigt (Abbildung 3.12A), kolokalisiert GFP-KRIM-1A ebenfalls nicht mit der PML-Isoform PML III, jedoch ebenso wie das PAROT-Protein, mit der PML-Isoform PML IV. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass KRAB-Zinkfinger-Proteine mit TIF1 β interagieren. Auch für das PAROT-Protein konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es mit TIF1 β in U2OS Zellen kolokalisiert. Ebenso kolokalisieren sowohl das PAROT-Protein als auch ein weiteres KRAB-Zinkfinger-Protein, KRIM-1A, mit der PML-Isoform PML IV. Aus diesem

Grund war es von Interesse zu untersuchen, ob PML IV auch mit TIF1 β kolokalisiert. U2OS Zellen wurden daher mit PML III bzw. PML IV und Flag-markiertem TIF1 β transient kotransfiziert und in Immunfluoreszenzen analysiert (Abbildung 3.14 A und B).

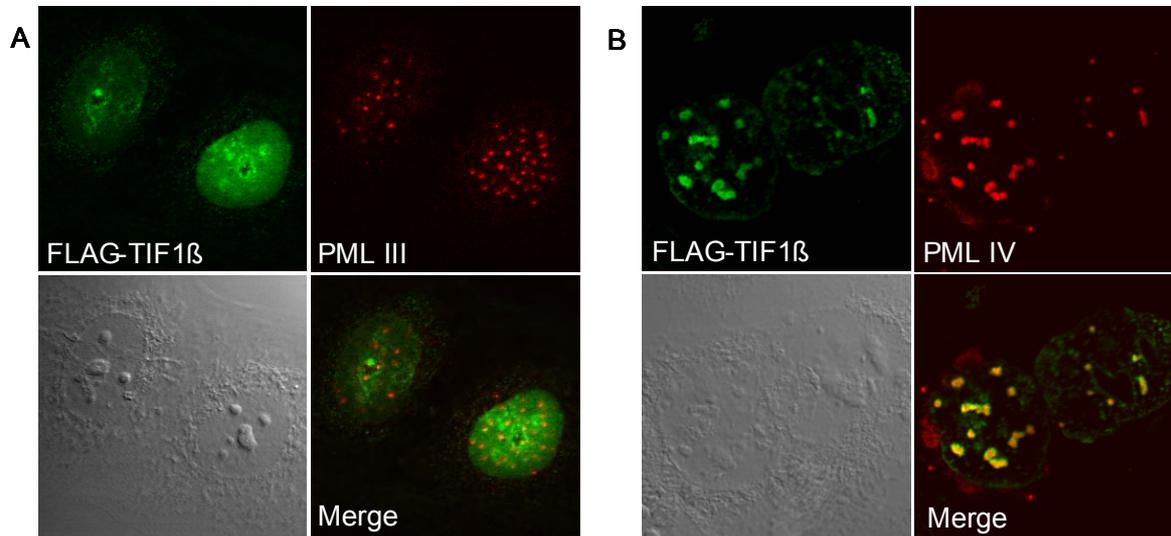


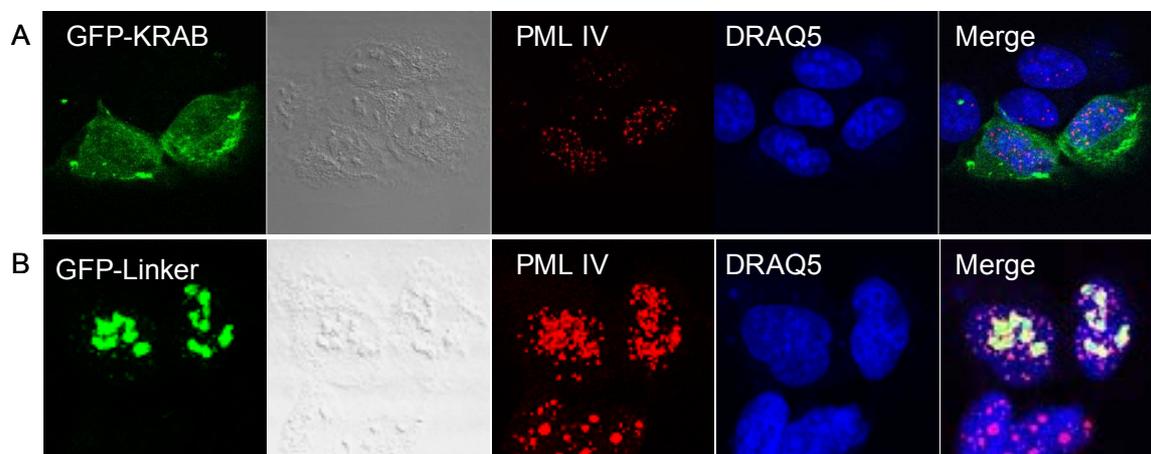
Abb.3.14: Die PML-Protein Isoform IV (PML IV) kolokalisiert mit TIF1 β . U2OS Zellen wurden transient mit Flag-TIF1 β und PML III (A) bzw. PML IV (B) transfiziert. Als Primärantikörper zur Erkennung der PML-Isoformen wurde ein Kaninchen anti-PML Antikörper verwendet, zur Erkennung des TIF1 β -Proteins wurde ein monoklonaler Maus anti-Flag Antikörper verwendet. Diese wurden mit einem Ziege anti-Kaninchen Alexa Flour[®] 594 (rot) bzw. Ziege anti-Maus Alexa Flour[®] 488 (grün) Sekundärantikörper markiert. Die Bilder unten rechts bei jeder Vierergruppe zeigen die Überlagerung der exprimierten Proteine.

Wie aus Abbildung 3.14A ersichtlich, kolokalisieren GFP-TIF1 β und die PML-Isoform PML III nicht miteinander, GFP-TIF1 β kolokalisiert jedoch mit PML IV (Abbildung 3.14B). Um die aus diesen Studien aufkommende Frage zu beantworten, ob PML generell die Lokalisation von KRAB-Zinkfinger-Proteine regulieren kann, müssten zusätzliche Interaktions- und Kolokalisationsstudien mit weiteren KRAB-Zinkfinger-Proteinen gemacht werden. Diese ersten Ergebnisse geben Grund zur Annahme, dass die PML-Isoform PML IV bei der Repression der Transkription durch KRAB-Zinkfinger-Proteine zumindest bei der durch das PAROT-Protein vermittelte, beteiligt ist.

3.2.2.11 Rolle der Linker-Domäne in der PAROT PML IV Assoziation

PML, ebenso wie TIF1 β , gehört zu einer charakteristischen Untergruppe von RING-Finger Proteinen, die eine RBCC-Domäne besitzen. Für TIF1 β wurde mehrfach gezeigt und beschrieben, dass die Anwesenheit der RBCC-Domäne für die Repression der Transkription

durch KRAB-Zinkfinger-Proteine entscheidend ist (Friedman et al., 1996; Moosmann et al., 1996; Ryan et al., 1999). Um einen Hinweis auf die Antwort der Frage zu bekommen, über welche Domäne PML IV das PAROT-Protein in PML-Kerndomänen rekrutiert, wurden verschiedene Deletionsmutanten sowie das gesamte PAROT-Protein an EGFP fusioniert und in U2OS-Zellen zusammen mit PML IV koexprimiert (Abbildung 3.15 A bis F). Bei den Fusionsproteinen handelt es sich um die gleichen Konstrukte, die bereits in Abbildung 3.8 A beschrieben wurden, nur in diesem Fall mit GFP anstelle von GST fusioniert. In Abbildung 3.12C wurde bereits gezeigt, dass das YFP-PAROT Protein mit PML IV kolokalisiert. Bei den einzelnen Deletionsmutanten zeigte sich, dass die KRAB-Domäne als GFP-Fusionsprotein diffus in der ganzen Zelle verteilt ist (siehe auch Abbildung 3.9A). Dieses Protein hat weder ein Kernlokalisierungssignal aufzuweisen, noch wird es durch ein anderes Protein in den Zellkern transportiert (Abb.3.15A). Die Linker-Domäne hat ebenfalls kein Kernlokalisierungssignal in seiner Sequenz aufzuweisen, kolokalisiert jedoch, wie sich in Abbildung 3.15B zeigt, zusammen mit PML IV zum einen in großen Proteinkomplexen oder Aggregaten und zum anderen, jedoch seltener, in punktartigen Strukturen im Nukleus. Der GFP-Zinkfinger hat 3 potentielle NLSs, (GFP-ZF; Abb.3.15C) ist diffus im Zellkern verteilt, bzw. scheint zum Teil auch in Nukleoli zu lokalisieren oder zu akkumulieren, und kolokalisiert nicht mit PML IV. Hingegen kolokalisieren die letzten beiden Deletionsmutanten GFP- Δ KRAB (Abb.3.15D) und GFP- Δ ZF (Abb.3.15E), die beide die Linker-Domäne besitzen, zusammen mit PML IV im Zellkern. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Studie einen Hinweis darauf gibt, dass das PAROT-Protein und PML IV wahrscheinlich über die Linker-Domäne miteinander interagieren. Dieses Ergebnis muss jedoch zukünftig beispielsweise durch Immunpräzipitationsstudien noch verifiziert werden.



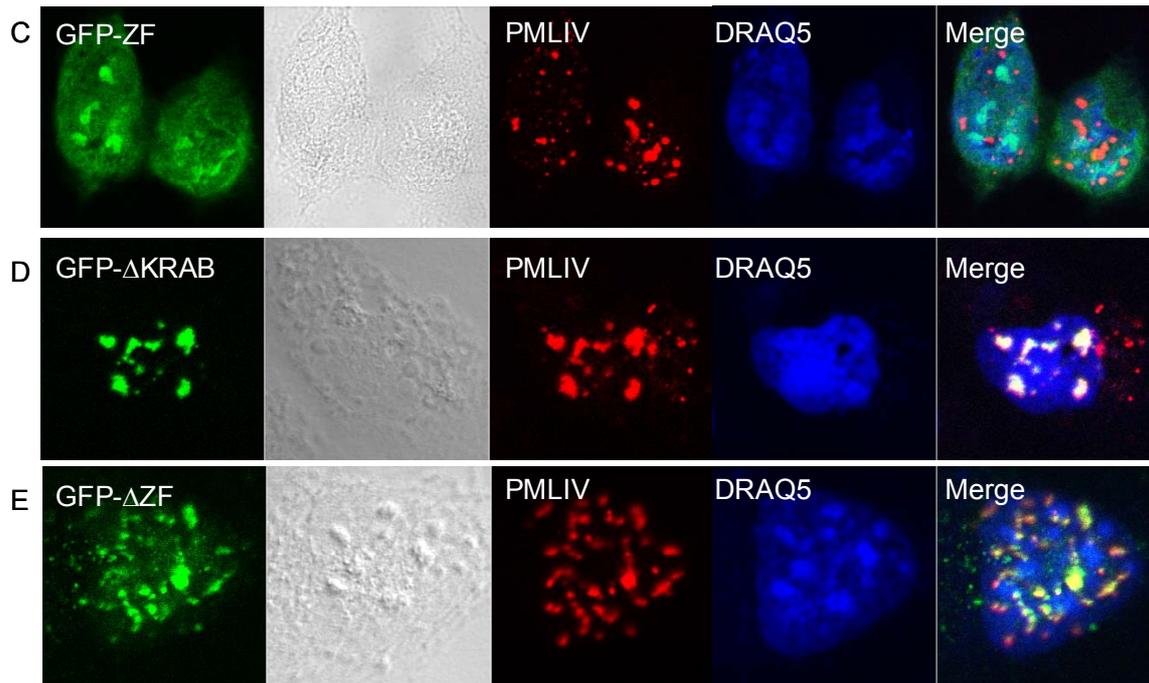


Abb.3.15: Die PAROT-PML IV Assoziation findet vermutlich über die Linker-Domäne statt. U2OS Zellen wurden transient transfiziert mit jeweils einem der fünf verschiedenen EGFP-PAROT Deletionsmutanten (GFP-KRAB, -Zinkfinger (ZF), -Linker, -ΔKRAB und -ΔZF) und PML IV. Als Primärantikörper zur Erkennung der PML-Isoform PML IV wurde ein monoklonaler Maus anti-PML Antikörper verwendet. Dieser wurde mit einem Ziege anti-Maus Alexa Flour[®] 594 (rot) Sekundärantikörper markiert. Die ganz rechts stehenden Bilder zeigen jeweils die Überlagerung der exprimierten Proteine.

3.2.2.12 Aufhebung der PAROT-vermittelten Repression der Transkription durch PML IV

In den Immunfluoreszenzstudien hat sich gezeigt, dass sowohl das YFP- als auch das GFP-PAROT Fusionsprotein mit PML IV in PML-Kerndomänen kolokalisiert (s.o.). Um einen Hinweis auf die Antwort der Frage zu bekommen, ob und welchen Einfluss die Rekrutierung des PAROT-Proteins in PML-Kerndomänen durch PML IV auf die Repressorfunktion des PAROT-Proteins hat, wurden Luciferase-Assays durchgeführt (Abb.3.16). Dazu wurden 293T Zellen mit GAL4-PAROT bzw. GAL4-DBD alleine mit steigenden Mengen PML IV kotransfiziert und die transkriptionelle Repressoraktivität der Proteine durch Messung der Luciferaseaktivität bestimmt. Die transkriptionelle Repressoraktivität ist als „Fache Repression“ angegeben relativ zur Repression von GAL4-PAROT alleine. Das Reportersystem auf der Basis der β -Galactosidase der Firma Roche diente als interne Kontrolle des Luciferase-Assays, um Schwankungen der Luciferaseaktivität auf die Aktivität

der β -Galactosidase zu normalisieren. Wie bereits in Abbildung 3.10 gezeigt, reprimiert das PAROT-Protein die basale Transkription des 5xGAL4-SV40-Luciferase Reporters im Vergleich zur GAL4-DBD alleine (Abb.3.16, Säule 1 und 6). Interessanterweise wird diese Repression durch Koexpression von steigenden Mengen PML IV dosisabhängig aufgehoben (Säulen 2 bis 5). Dies scheint ein spezifischer Effekt für Gal4-PAROT zu sein, da die Kotransfektion von Gal4-DBD und PML IV nur einen schwachen Effekt auf die Reporteraktivität zeigt (Säulen 7 und 8). Diese Daten geben einen ersten Hinweis darauf, dass die PML-Isoform PML IV die PAROT-vermittelte Repression der Transkription inhibiert.

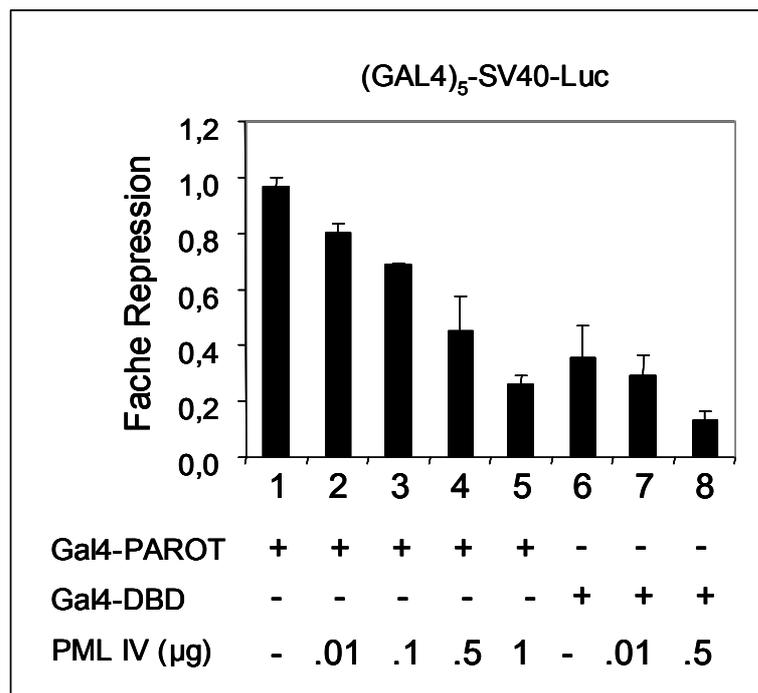


Abb.3.16: Aufhebung der PAROT-vermittelten Repression der Transkription durch PML IV. Der Einfluss des PML IV-Proteins auf die transkriptionelle Repressoraktivität des PAROT-Proteins wurde anhand der Luciferase Aktivität gemessen. 293T Zellen wurden transient mit dem Reporter Plasmid 5xGal4-Luc (1,5 µg) zusammen mit 100 ng der Expressionsplasmide GAL4-PAROT bzw. GAL4DBD und steigenden Mengen PML IV transfiziert. Die transkriptionelle Repressoraktivität ist als „Fache Repression“ angegeben relativ zu GAL4-PAROT alleine. *Luc*, Luciferase.

3.2.2.13 Herstellung von Antikörpern gegen das PAROT-Protein

Für den weiteren Verlauf des Projektes war es unerlässlich, Antikörper gegen das PAROT-Protein, in diesem Fall in Kaninchen, zu generieren, um das endogene Protein analysieren zu können. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Herstellung von Peptidantikörpern bei der Firma Eurogentec in Auftrag gegeben. Hierfür wurden zwei Peptidsequenzen aus der Linker-

Domäne des Proteins ausgewählt, in der KRAB-Zinkfinger Proteine die geringste Sequenzhomologie aufweisen. Sowohl die Peptidsequenzen als auch die Lokalisation dieser Epitope innerhalb des PAROT-Proteins sind in Abbildung 3.17 A dargestellt. Die Peptidantikörper werden im folgenden als P11 und P12 benannt gemäß ihrer Produktionsnummern. Zwei weitere Antikörper, die zur Unterstützung neuer Erkenntnisse dienen sollten, wurden aus Hühnereiern gewonnen. Zu diesem Zweck wurden die Deletionsmutanten der Linker-Domäne und der Zinkfinger-Domäne an die Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* fusioniert, in Bakterien exprimiert und aufgereinigt (siehe 2.4). Mit den aufgereinigten GST-Linker bzw. GST-Zinkfinger-Fusionsproteinen wurden je 2 Legehennen, jeweils eine braune und eine weiße, mehrfach mit den in Abbildung 3.17 B dargestellten GST-Linker bzw. GST-Zinkfinger-Fusionsprotein immunisiert (siehe 2.5).

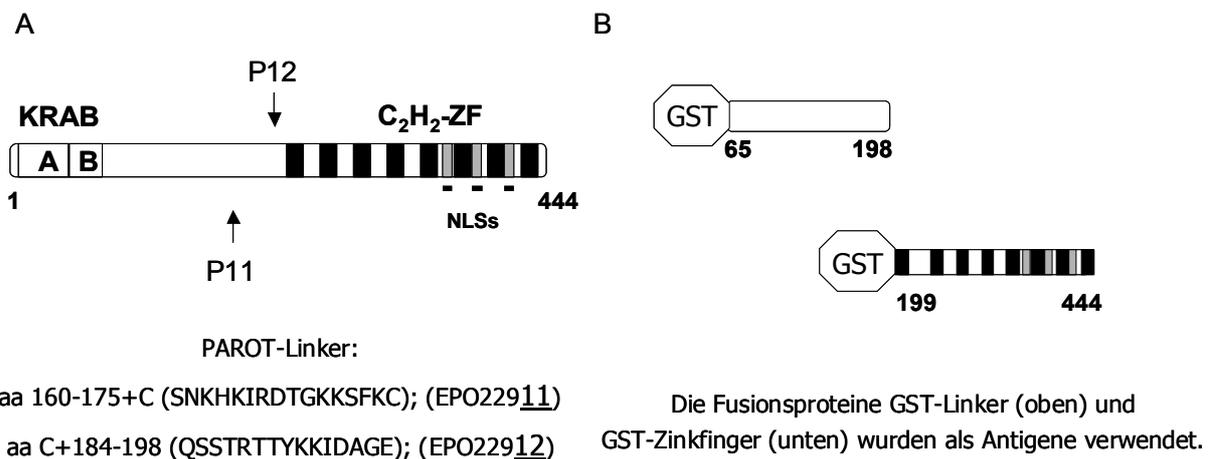


Abb.3.17: Schematische Darstellung der Peptidantigene und der GST-Linker und GST-Zinkfinger Antigene. A) angegeben sind die beiden Peptidsequenzen, die als Antigene zur Herstellung von Peptidantikörpern verwendet wurden. EPO22911 entspricht dem Peptidantikörper P11, der sein Epitop am Anfang des letzten Drittels der Linker-Domäne erkennen sollte; EPO22912 entspricht dem Peptidantikörper P12, der sein Epitop am Ende der Linker-Domäne erkennen sollte. B) zeigt eine Darstellung der GST-Linker und GST-Zinkfinger-Fusionsproteins, die als Antigen zur Immunisierung von Legehennen verwendet wurde.

3.2.2.14 Test der anti-PAROT Antikörper

Die Peptidantikörper wurden zunächst in Western Blot Analysen getestet. Zu diesem Zweck wurden 293T Zellen mit je 10 µg der Expressionsplasmide des GFP-Proteins bzw. des GFP-PAROT-Proteins transfiziert. Die Peptidantikörper P11 und P12 wurden bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml eingesetzt. Dabei hat sich der Peptidantikörper P11 als nicht brauchbar erwiesen, wohingegen der Peptidantikörper P12 das GFP-PAROT-Protein, wie in

Abbildung 3.18 A dargestellt ist, als Bande mit seinem errechneten Molekulargewicht von etwa 75 kDa erkennt. Der Antikörper erkennt eine zusätzliche Proteinbande (*), bei der es sich vermutlich um eine unspezifische Proteinbindung durch den Antikörper handelt.

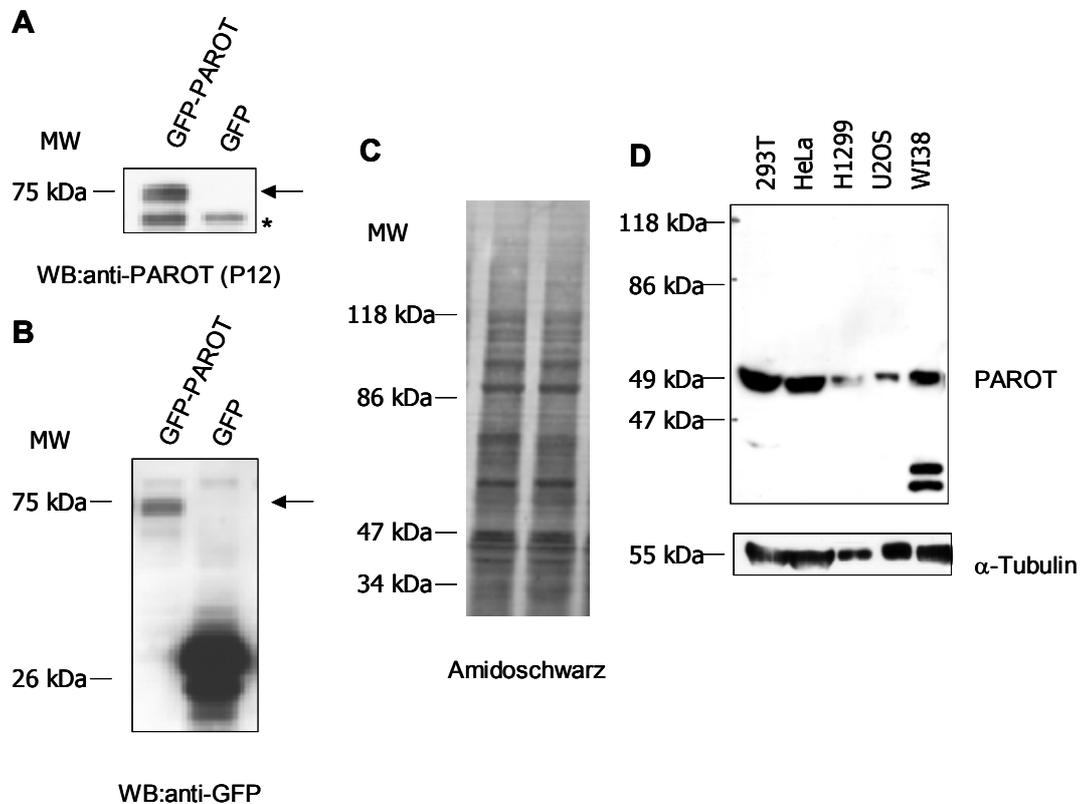


Abb.3.18: Der Peptidantikörper P12 erkennt sowohl überexprimiertes als auch endogenes PAROT-Protein. 293T Zellen wurden mit dem GFP- bzw. dem GFP-PAROT-Expressionsplasmid transfiziert. Die Zelllysate wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und das GFP-PAROT Fusionsprotein in Western Blot (WB) Analysen mit A) P12 Antikörper und B) anti-GFP Antikörper nachgewiesen. Das GFP-markierte PAROT-Protein ist mit einem Pfeil am Bildrand gekennzeichnet. C) zeigt die Western Blot-Membran nach Amidoschwarzfärbung. D) Zelllysate verschiedener Zelllinien (293T, HeLa, H1299, U2OS, WI38) verwendet, um mit dem P12 Antikörper endogenes PAROT-Protein in Western Blot Analysen nachzuweisen. Ein α -Tubulin Antikörper diente zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen. Unspezifische Bindungen (*). Molekulargewichtsmarker (MW in kDa).

Als Kontrolle wurde derselbe Blot mit einem anti-GFP Antikörper (Abb.3.18 B) inkubiert, der neben dem GFP-Protein alleine ebenfalls die 75 kDa Bande des GFP-PAROT-Proteins erkennt, und somit die Spezifität dieses Antikörpers bestätigt. Die Blot Membran wurde anschließend mit Amidoschwarz gefärbt (Abb.3.18 C), um zu zeigen, dass in beiden Spuren etwa gleiche Proteinmengen aufgetragen wurde. Abbildung 3.18 D zeigt, dass der P12 Antikörper in verschiedenen Zelllinien eine Proteinbande bei etwa 49 kDa erkennt, die dem

errechneten Molekulargewicht des endogenen PAROT-Proteins entspricht. Bei den beiden zusätzlichen Banden im WI38 Zelllysats könnte es sich um Spleißvarianten handeln. Anhand der α -Tubulin Banden zeigt sich, dass nicht von allen Zelllinien die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden. Dennoch ist hier die Schlussfolgerung zu ziehen, dass das PAROT-Protein in den getesteten Zelllinien exprimiert und durch den P12 Antikörper erkannt wird. Anschließend wurden beide Peptidantikörper in Immunfluoreszenzanalysen getestet. Zu diesem Zweck wurden U2OS Zellen mit dem YFP-PAROT-Expressionsplasmid transfiziert, und auf Glasplättchen fixiert. Die Immunfluoreszenzbilder des P12 Antikörpers sind in Abbildung 3.19 dargestellt.

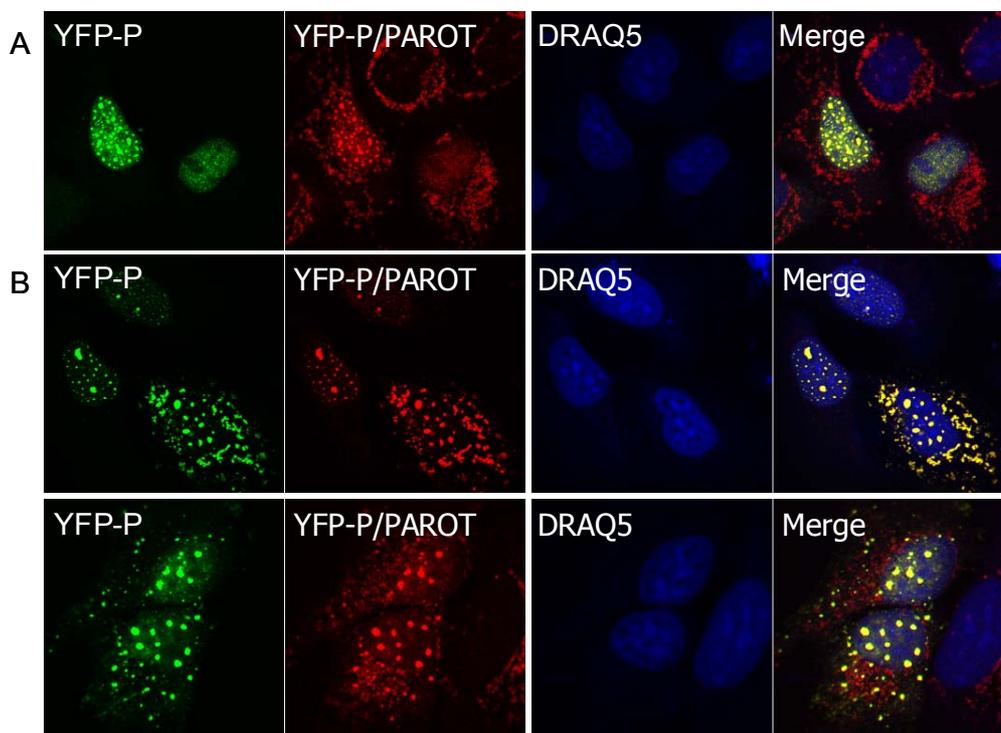


Abb.3.19: Der Peptidantikörper P12 erkennt das YFP-PAROT-Protein. U2OS Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid des YFP-PAROT-Proteins transfiziert und mit 8ng/ μ l des P12 Peptidantikörpers inkubiert. A) P12 (rot) erkennt YFP-PAROT im Zellkern, B) und im Zytoplasma. Die Zellen wurden mit einem Axiovert 200M-Mikroskop der Firma Zeiss analysiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 angefärbt. In der rechten Bilderreihe („Merge“) ist die Überlagerung der Bilder zu sehen.

Es zeigt sich (Abbildung 3.19 A), dass der Peptidantikörper P12 das im Zellkern exprimierte YFP-PAROT-Protein erkennt. Zusätzlich erkennt dieser Antikörper ein Protein, das sich in einer Struktur außerhalb des Nukleus befindet. Interessanterweise ist das YFP-PAROT Protein in einigen Zellen auch im Zytoplasma zu finden (Abbildung B) und wird dort ebenfalls vom P12 Antikörper erkannt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Strukturen, in denen das YFP-PAROT-Protein im Zytoplasma lokalisiert, denen des endogenen Proteins

sehr ähnlich sind bzw. denen entsprechen (vgl. Abb.3.25). Der P12 Peptidantikörper wurde daraufhin in verschiedenen Zelllinien getestet (Abbildung 3.20). Die zytoplasmatischen Strukturen, die von dem P12 Peptidantikörper in U2OS Zellen erkannt werden (Abb.3.20 A), werden auch in WI38 Zellen, primären humanen Fibroblasten (Abb.3.20 B), und in H1299 Zellen (Abb.3.20 C) erkannt.

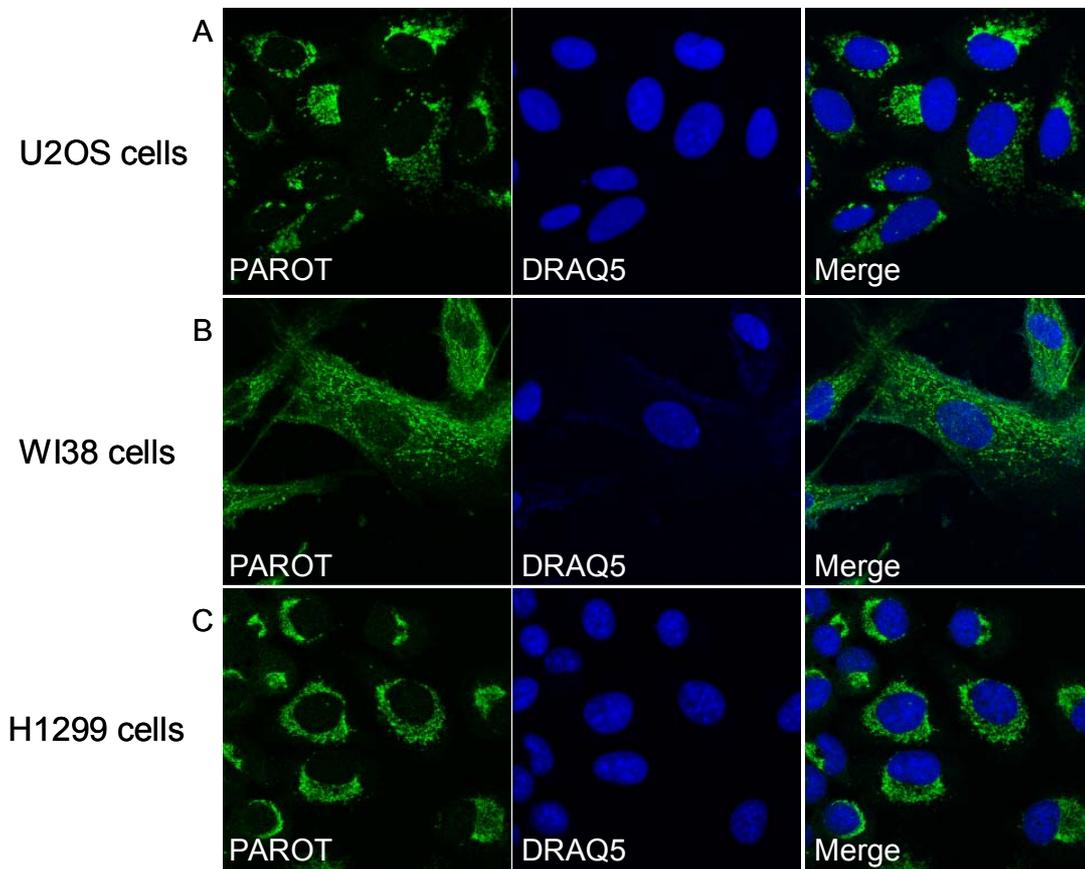


Abb.3.20: Der Peptidantikörper P12 erkennt gleiche zytoplasmatische Strukturen in verschiedenen Zelllinien. U2OS, WI38 und H1299 Zellen wurden mit 8ng/ μ l des P12 Peptidantikörpers inkubiert. A) zeigt das endogene PAROT-Protein in U2OS Zellen, B) in WI38 Zellen und C) in H1299 Zellen. Die Zellen wurden mit einem Axiovert 200M-Mikroskop der Firma Zeiss analysiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 angefärbt. In der rechten Bilderreihe („Merge“) ist die Überlagerung der Bilder zu sehen.

Wie bereits erwähnt, wurden zusätzlich Antikörper aus Hühnereiern gewonnen, die gegen die Linker- bzw. die Zinkfinger-Domäne des PAROT-Proteins gerichtet sein sollten. Sie wurden zunächst auch in Immunblot Analysen getestet. Die Antikörper aus den braunen Hühnereiern erkannten spezifisch ab einer Menge von 50 ng das jeweilige Antigen bei einer Verdünnung von 1:1000 (Daten nicht gezeigt). Um festzustellen, ob diese Antikörper das Ergebnis des P12 Peptidantikörpers bestätigen würden, wurden auch mit den Hühnerantikörpern Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (Abb.3.21). In Abbildung 3.21 A) ist zu sehen, dass auch der anti-Linker Antikörper (3b) gleiche Strukturen wie der P12 Peptidantikörper in

U2OS Zellen erkennt. Das gleiche gilt für den anti-Zinkfinger Antikörper (5b) in Abbildung 3.21 B). Somit bestätigen diese beiden Antikörper das Ergebnis des P12 Peptidantikörpers, was darauf hinweist, dass sich das endogene PAROT-Protein nicht permanent im Nukleus befindet, sondern möglicherweise nur durch einen bestimmten Stimulus in den Zellkern gelangt.

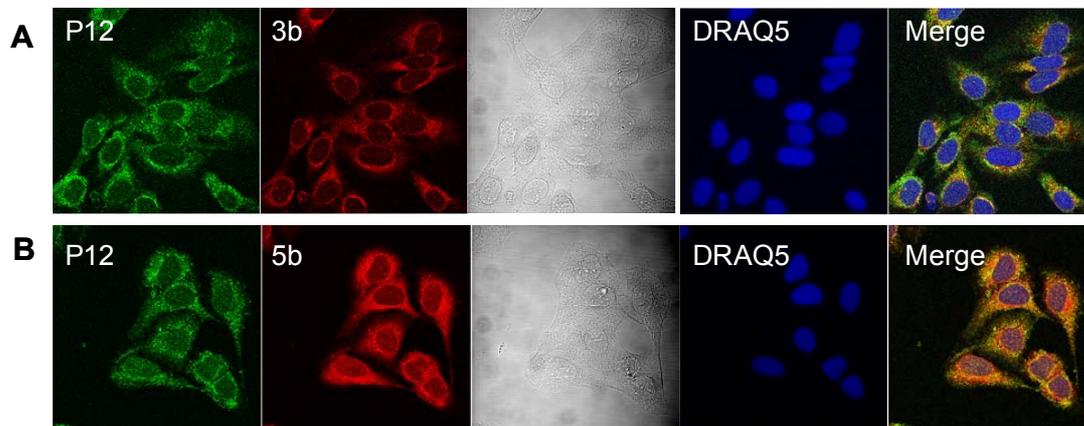


Abb.3.21: Die Hühnerantikörper erkennen ähnliche zytoplasmatische Strukturen in U2OS Zellen wie der P12 Peptidantikörper. U2OS Zellen wurden auf Glasplättchen fixiert und mit den Hühner-Antiseren gegen die Linker-Domäne bzw. gegen die Zinkfinger-Domäne bei einer Konzentration von 1:50 inkubiert. Zum Vergleich wurde der P12 Peptidantikörper mit 8ng/μl verwendet. A) endogenes PAROT-Protein analysiert mit dem anti-Linker Antikörper (gewonnen am 2/12/03 aus dem braunen Ei, 3b), B) endogenes PAROT-Protein analysiert mit dem anti-Zinkfinger Antikörper (gewonnen am 2/12/03 aus dem braunen Ei, 5b). Die Zellen wurden mit einem Axiovert 200M-Mikroskop der Firma Zeiss analysiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 angefärbt. In der rechten Bilderreihe („Merge“) ist die Überlagerung der Bilder zu sehen.

3.2.2.15 Endogenes PAROT-Protein lokalisiert in Mitochondrien

Aufgrund der Tatsache, dass das endogene PAROT-Protein kaum im Zellkern zu finden ist, sondern in einer spezifischen Struktur bzw. einem Kompartiment/Organell im Zytoplasma lokalisiert, wurde untersucht, um welche Struktur es sich dabei handelt. Zunächst wurden U2OS Zellen in Immunfluoreszenzanalysen mit dem P12 Antikörper und einem Antikörper gegen β -Aktin bzw. α -Tubulin inkubiert (Abb.3.22). Es zeigt sich, dass das endogene PAROT-Protein weder in Aktin- noch in Tubulin-Filamenten lokalisiert.

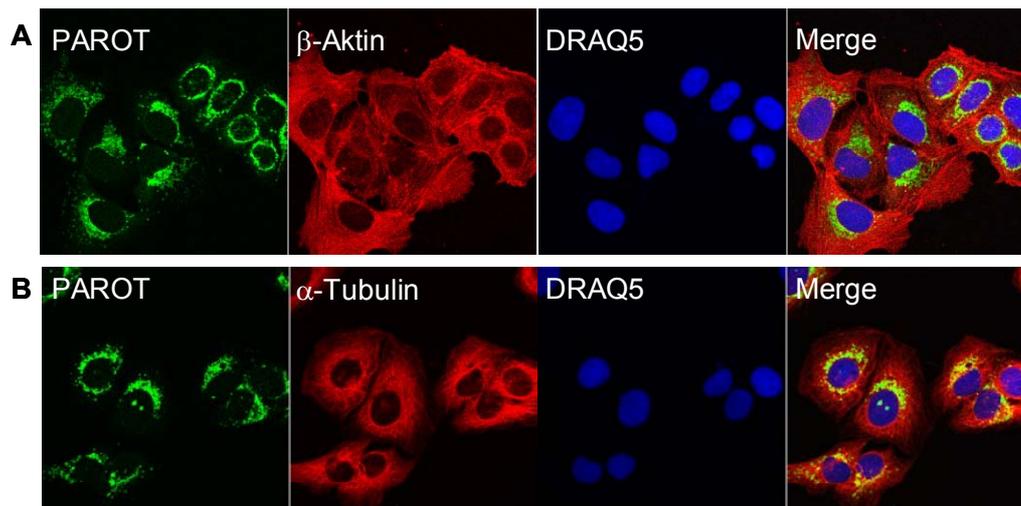


Abb.3.22: PAROT kolokalisiert weder mit β -Aktin- noch mit α -Tubulin-Filamenten. U2OS Zellen wurden auf Glasplättchen fixiert und mit dem P12 Antikörper zusammen mit einem anti- β -Aktin (A) bzw. einem anti- α -Tubulin Antikörper (B) inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Axiovert 200M-Mikroskop der Firma Zeiss analysiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 angefärbt. Im rechten Bild („Merge“) ist die Überlagerung der Bilder zu sehen.

Die zelluläre Verteilung des endogenen PAROT-Proteins ließ vermuten, dass es sich bei den gegebenen Strukturen möglicherweise um den Golgi-Apparat handelt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden U2OS Zellen sowohl mit dem P12 Antikörper als auch mit einem Antikörper gegen das p58-Protein, einem Markerprotein für den Golgi-Apparat, inkubiert.

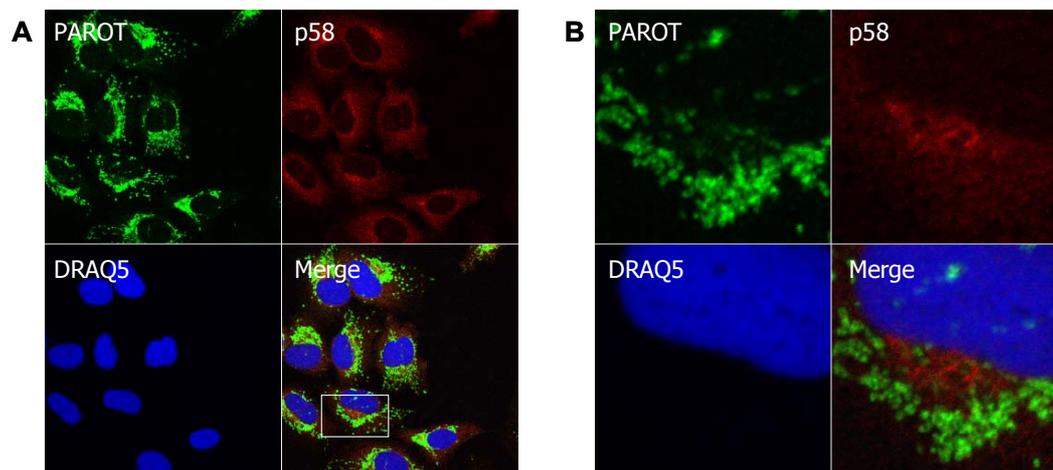


Abb.3.23: PAROT kolokalisiert nicht mit dem p58 Markerprotein für den Golgi-Apparat. U2OS Zellen wurden auf Glasplättchen fixiert und mit dem P12 Antikörper zusammen mit einem anti-p58 Antikörper inkubiert. A) zeigt eine Übersicht der Zellen. B) zeigt die Vergrößerung eines Zellenabschnittes, der in A) mit einem weißen Rahmen umgeben ist. Die Zellen wurden mit einem Axiovert 200M-Mikroskop der Firma Zeiss analysiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 angefärbt. Im unteren rechten Bild jeder Vierergruppe („Merge“) ist die Überlagerung der Bilder zu sehen.

In Abbildung 3.23 ist zu sehen, dass es sich bei den Strukturen auch nicht um den Golgi-Apparat handelt. Weiterhin bestand die Möglichkeit, dass es sich bei den zytoplasmatischen Strukturen um Mitochondrien handelt. Diese lassen sich mithilfe des zellpermeablen MitoTracker[®] Reagenzes anfärben, da respiratorisch aktive Mitochondrien dieses Reagenz aufnehmen und es dort akkumuliert. In der Abbildung 3.24 ist sowohl in der Übersicht (A) als auch in der Vergrößerung eines Zellenabschnittes (B) zu sehen, dass das endogene PAROT-Protein (grün) offensichtlich in oder an Mitochondrien lokalisiert. Vergleicht man das mitochondriale Erscheinungsbild (A,B) mit den Strukturen, in denen das überexprimierte YFP-PAROT-Protein lokalisiert, ist auch dies eine weitere Bestätigung dafür, dass es sich bei den zytoplasmatischen Strukturen um Mitochondrien handelt (vgl. Abb.3.19 für Überexpression).

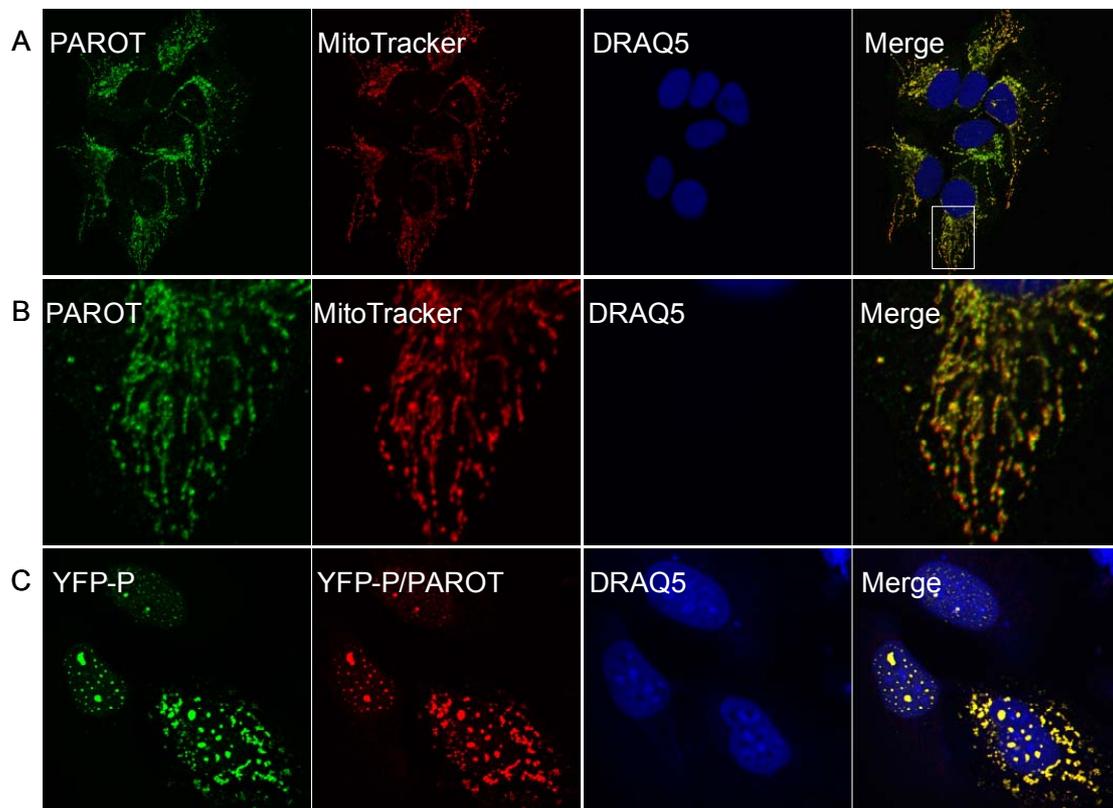


Abb.3.24: PAROT lokalisiert in oder an Mitochondrien. U2OS Zellen wurden nach einer 20-minütigen Behandlung mit MitoTracker[®] Reagenz auf Glasplättchen fixiert und mit dem P12 Antikörper inkubiert. A) zeigt eine Übersicht der Zellen. B) zeigt die Vergrößerung eines Zellenabschnittes, der in A) mit einem weißen Rahmen umgeben ist. C) zeigt U2OS Zellen, die mit dem YFP-PAROT Expressionsplasmid transfiziert und für Immunfluoreszenzanalysen mit dem P12 Antikörper behandelt wurden. Die Zellen wurden mit einem Axiovert 200M-Mikroskop der Firma Zeiss analysiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 angefärbt. In der rechten Bilderreihe („Merge“) ist die Überlagerung der Bilder zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass das endogen exprimierte PAROT-Protein wider erwarten fast ausschließlich in Assoziation mit Mitochondrien vorliegt.

Ventura et al. veröffentlichten Anfang des Jahres 2004 eine Studie über das Protein p46Shc, eine Spleißvariante der Shc-Proteinfamilie (Ventura et al., 2002; Ventura et al., 2004). P46Shc besitzt im N-terminalen Bereich, in den ersten 32 Aminosäuren, ein mitochondriales Zielsignal. Entscheidend für die mitochondriale Lokalisation dieses Proteins ist, dass sich vor dem N-Terminus dieses Proteins keine weiteren Aminosäuren befinden, die die mitochondriale Lokalisation des p46Shc Proteins verhindern. Aus diesem Grund lokalisieren die längeren Spleißvarianten p52Shc und p66Shc nicht in Mitochondrien. Ein einzelner Arginin-Rest im N-Terminus ist für die mitochondriale Lokalisation des Proteins essentiell. Vergleicht man nun die ersten 32 Aminosäuren des p46Shc Proteins mit den ersten 32 Aminosäuren des PAROT-Proteins (Abb.3.25), zeigt sich, dass die beiden Sequenzabschnitte nur eine Homologie von etwa 25% aufweisen, jedoch auch, dass das PAROT-Protein drei Arginin-Reste im N-Terminus besitzt. Wie mehrfach in dieser Arbeit gezeigt, lokalisiert das EYFP-PAROT Fusionsprotein nicht in Mitochondrien, sondern im Zellkern. Möglicherweise verhindert das N-terminale YFP-Protein die mitochondriale Lokalisation des EYFP-PAROT Proteins.

p46Shc	1	M	G	P	G	V	S	Y	L	V	<u>R</u>	Y	M	G	C	V	E	V	L	Q	S	M	<u>R</u>	A	L	D	F	N	T	<u>R</u>	T	Q	V	32	
PAROT	1	M	G	P	L	Q	F	<u>R</u>	D	V	A	I	E	F	S	L	E	E	W	H	C	L	D	A	A	Q	<u>R</u>	N	L	Y	<u>R</u>	D	V	32	
Konsensus- Sequenz		M	G	P				V			. .	E			. . .	A			N																

Abb.25: Aminosäuresequenzvergleich der N-terminalen 32 Aminosäuren von p46Shc und PAROT. Zur Erstellung des Vergleichs und der Konsensus-Sequenz wurde das *ClustalW*-Programm der MacVektor-7.0 Software verwendet. Die Sequenzen der ersten 32 Aminosäuren des p46Shc Proteins, in dem sich nachweislich ein mitochondriales Zielsignal befindet, und des PAROT Proteins wurden in einem Sequenzvergleich einander gegenübergestellt. Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben; Punkte in der Konsensus-Sequenz bezeichnen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften. Die unterstrichenen Aminosäuren markieren die drei Arginine in beiden Sequenzen. Die Aminosäuren, die in beiden Sequenzen übereinstimmen, sind fett gedruckt und in der Konsensus-Sequenz extra aufgeführt.

Zusätzliche Lokalisationsstudien mit C-terminal markierten und deletierten Fusionsproteinen müssten gemacht werden, um diese ersten 32 Aminosäuren auf ein potentielles mitochondriales Zielsignal zu testen.

3.2.3 Nucleostatmin, ein neues nukleoläres Protein

3.2.3.1 Das Nucleostatmin Protein

Der erste bekannte Nucleostatmin cDNA Klon vom DKFZ (Accession Nummer NCBI: AL136619) ist 1736 Basenpaare lang und enthält einen einzelnen offenen Leserahmen, der für ein Polypeptid von 360 Aminosäuren mit einer berechneten Molekularen Masse von ~ 40 kDa codiert. Der zweite bekannte Nucleostatmin cDNA Klon vom NIH (Accession Nummer NCBI: BC033651) ist 1730 Basenpaare lang und enthält einen einzelnen offenen Leserahmen, der für ein Polypeptid von 367 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von ~ 40 kDa codiert (siehe Abbildung 3.26). Im Folgenden wird der DKFZ Klon Nucleostatmin-mutC und der NIH Klon Nucleostatmin genannt.

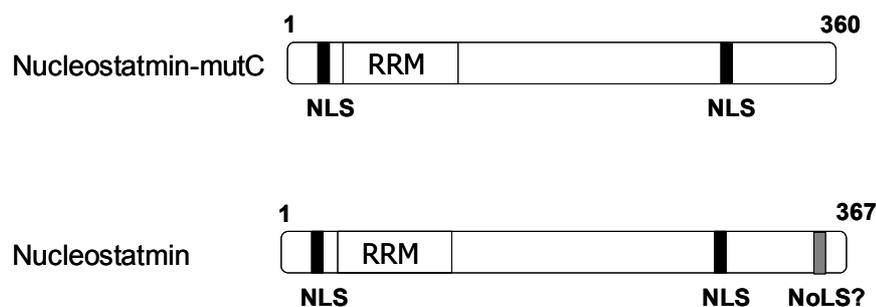


Abb. 3.26: Schematische Darstellung der Nucleostatmin Proteine.

Das Nucleostatmin-mutC Protein ist 360 Aminosäuren lang. Es enthält zwei potentielle NLS (*nuclear localization sequences*), eine N-terminal und eine C-terminal. Weiterhin befindet sich im N-terminalen Bereich (Aminosäure 46-124) ein potentielles RRM (*RNA recognition motif*). Weitere Domänen und Motive sind für dieses Protein nicht bekannt. Das Nucleostatmin Protein ist 367 Aminosäuren lang. Es enthält zwei potentielle NLS, eine N-terminal und eine C-terminal. Weiterhin befindet sich im N-terminalen Bereich (Aminosäure 46-124) ein potentielles RRM (*RNA recognition motif*). Diese Protein besitzt im C-terminalen Bereich zusätzlich eine potentielle NoLS (*nucleolar localization sequence*).

Sequenz und Datenbank Analysen (siehe 3.2.1), die in den Abschnitten 3.2.3.3 und 3.2.3.6 beschrieben sind, zeigen, dass die Sequenz des Nucleostatmin Proteins sehr wahrscheinlich die des *in vivo* existierenden Proteins ist, und die des Nucleostatmin-mutC Proteins eine C-terminal artifiziell mutierte Variante hiervon ist. Die C-terminale Sequenzvariation verändert sowohl die Lokalisation (s.u.) und in diesem Zusammenhang wahrscheinlich auch die Funktion des Proteins. Das Nucleostatmin-mutC Protein weist nach Datenbank-Analysen ein bekanntes Sequenzmotiv auf, das charakteristisch für RNA-bindende Proteine ist (RRM: *RNA*

recognition motif). Es enthält zwei potentielle NLS, eine N-terminal und eine C-terminal. Weitere Domänen oder Motive sind für dieses Protein nicht bekannt. Das Nucleostatmin Protein weist nach Datenbank Analysen ebenfalls ein RRM auf und enthält zwei mutmaßliche NLS, eine N-terminal (Aminosäuren 31-34) und eine C-terminal (Aminosäuren 284-288). Zusätzlich besitzt es eine potentielle NoLS (Aminosäuren 341-367) im C-Terminus, die darauf hinweist, dass das Protein im Nukleolus lokalisiert (siehe Abbildung 3.26, 3.27 und 3.28).

3.2.3.2 Sequenz Vergleiche der beiden Nucleostatmin Proteine

Sowohl die Nukleinsäure- als auch die Aminosäuresequenzen des Nucleostatmin-mutC DKFZ cDNA Klons und des Nucleostatmin NIH cDNA Klons wurden in einem *ClustalW-alignment* der MacVektor-7.0 *Software* einander gegenüber gestellt (Abbildung 3.27).

A Vergleich der 5'- Nukleinsäuresequenz (DKFZ) : (NIH/CELERA)

```
1 ATGGCGTCGA GCGGCGGGGA GCCAGGGAGT TTATTTGATC 40
1 ATGGCGTCGA GCGGCGGGGA GCTAGGGAGT TTATTTGATC 40
```

Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz (DKFZ) : (NIH/CELERA)

```
1 MASSGGEPGS 10
1 MASSGGELGS 10
```

B Vergleich der 3'- Nukleinsäuresequenz (DKFZ) : (NIH/CELERA)

```
1001 GGCATAAACT TAAAGAGGTA-TTTCATCTG TGCCAAAGCC TCCAGAGGAC 1050
1001 GGCATAAACT TAAAGAGGTA-ATTTCATCTG TGCCAAAGCC TCCAGAGGAC 1050
```

```
1051 AAGCCAGAAG ATGTACATAC AAGTCATCCA TTAA----- 1100
1051 AAGCCAGAAG ATGTACATAC AAGTCATCCA TTAAAACAAA GAAGAAGAAT 1100
```

```
1001 ----- 1104
1001 ATAG 1104
```

Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenz (DKFZ) : (NIH/CELERA)

```
331 NLIRHKLKEV FHLCQSLQ-- -----RTSQK MYIQVIH 367
331 NLIRHKLKEV ISSVPKPPED KPEDVHTSHP LKQRRRI 367
```

Abb.3.27: Sequenzvergleiche der beiden Nucleostatmin Proteine. Sowohl die Nukleinsäure- als auch die Aminosäuresequenzen der beiden Nucleostatmin Proteine wurden in einem *ClustalW-alignment* der MacVektor-7.0 *Software* einander gegenüber gestellt. Die oberen Sequenzen entsprechen der DKFZ Sequenz, die unteren der NIH/CELERA Sequenz. Ausgetauschte Nukleotide oder Aminosäuren sind unterstrichen dargestellt. A) Im 5'-Bereich zeigt sich ein Nukleotid-Austausch von Thymin zu Cytosin, was den Austausch der Aminosäure Leucin zu Prolin im N-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz zur Folge hat. B) Im 3'-Bereich zeigt sich, dass in der

Abb.3.28: Aminosäuresequenz-Vergleich des Nucleostatmin-RRM-Motivs mit denen anderer RNA-bindender Proteine. Die Abbildung zeigt die RRM9 verschiedener RNA-bindender Proteine im Vergleich zum Nucleostatmin-RRM. Zur Erstellung des Vergleichs und der Konsensus-Sequenz wurde das *ClustalW*-Programm der *MacVektor-7.0 Software* verwendet. Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben; Nummerierungen zeigen die Aminosäure-Positionen im jeweiligen RRM an; Punkte in der Konsensus-Sequenz bezeichnen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften. Mutmaßlich konservierte Bereiche, die für die Bindung von RNA entscheidend sind, sind unterstrichen und als RNP-1 und -2 bezeichnet. Die Accession Nummern der humanen (h) Proteine, die in dem Vergleich verwendet wurden, sind: CB20, NP_031388; CIRP, Q14011; La, P05455; MINT, Q96T58; MSSP, P29558; NUCL, P19338; PTB, P26599; RNP1, Q9H0Z9; RNP2, Q14498.

Das RNA-Erkennungsmotiv (RRM), auch bekannt als Konsensussequenz RNA-Bindungsdomäne (CS-RBD: *consensus sequence RNA binding domain*), enthält in der Regel zwei kurze Konsensus-Sequenzen, die als RNP-1 (Oktamer) und RNP-2 (Hexmer) bezeichnet werden. Diese Konsensus-Sequenzen sind in eine strukturell, aber nicht sequenziell, konservierte Region von etwa 80 Aminosäuren eingebettet (Burd and Dreyfuss, 1994; Lorkovic and Barta, 2002). Die Abbildung 3.28 zeigt einen Aminosäuresequenz-Vergleich des potentiellen Nucleostatmin-RRMs mit diversen, bereits untersuchten und veröffentlichten RRM9 anderer RNA-bindender Proteine. Sowohl das RNP-1 als auch das RNP-2 sind angegeben, und die Sequenz entspricht weitestgehend der 1993 von Birney et al. postulierten RRM Konsensus-Sequenz:

UxUxxLxxx[x₀₋₆]Z[x]xxxLxxxFxxx[x]GxUx[x]Zxxxxxx[x₀₋₂₁+]UxVxF[x]xxxxxxZxxA.

Dabei sind die Aminosäurereste wie folgt definiert: x = beliebiger Rest; U = ungeladener Rest: L,I,V,A,G,F,W,Y,C,M; Z = U+ S,T; + deutet an, dass dieser Bereich weiter ausgedehnt sein kann. Weitere Studien siehe unter 3.2.3.14.

3.2.3.4 Die genomische Organisation des humanen *Nucleostatmin*-Gens

Das gesamte *Nucleostatmin*-Gen, das in fünf Exons unterteilt ist, spannt sich über etwa 12 kb der chromosomalen DNA des Chromosoms 7 in der Zytobande q21.3 (Abb.3.29).

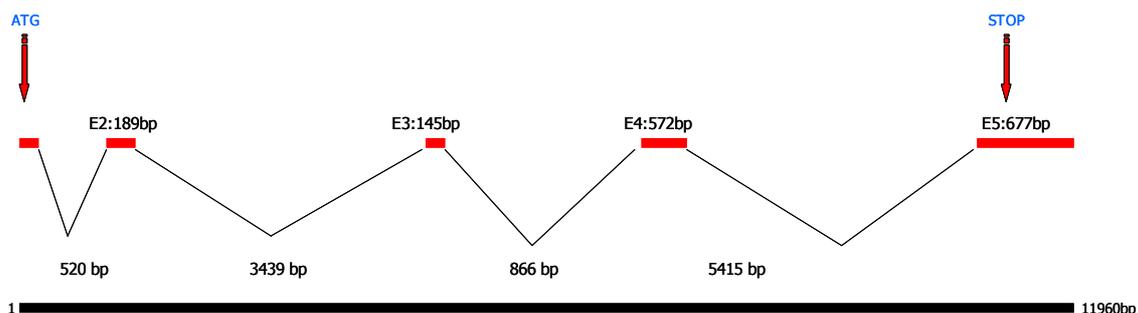


Abb.:3.29: Die genomische Organisation des humanen *Nucleostatmin*-Gens. Die genomische Organisation des *Nucleostatmin*-Gens wurde mithilfe der CELERA Datenbank erstellt. Das Gen befindet sich auf dem Chromosom 7 in der Zytobande q21.3 und umfasst 11960 Basenpaare. Es besteht vermutlich aus 5 Exons, E1-E5, deren Länge in Basenpaaren über dem jeweiligen Exon angegeben ist, und 4 Introns, deren Länge in Basenpaaren unter den Introns angegeben ist. Das Start-Kodon ATG ist am Anfang des ersten Exons und das STOP-Kodon in der vorderen Hälfte des fünften Exons zu finden.

Die kodierende Region zieht sich über die gesamten fünf Exons, wobei sich das Start-Kodon ATG am Anfang des ersten Exons befindet und das STOP-Kodon in der vorderen Hälfte des fünften Exons zu finden ist.

3.2.3.5 Das murine *Nucleostatmin* Homolog

Eine vergleichende Sequenzanalyse in der NCBI-Datenbank BLAST hat ergeben, dass es in *Mus musculus* ein Homolog zum *Nucleostatmin* cDNA Klon vom NIH gibt. Das murine *Nucleostatmin* Protein ist 371 Aminosäuren lang und weist die gleichen Domänen bzw. Motive auf wie das humane *Nucleostatmin* Protein (Abbildung 3.30).

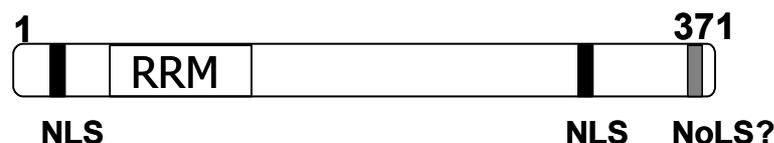


Abb3.30: Schematische Darstellung des *Nucleostatmin* Proteins aus *Mus musculus*. Das murine *Nucleostatmin* Protein ist 371 Aminosäuren lang. Es enthält zwei potentielle NLS, eine N-terminal und eine C-terminal. Weiterhin befindet sich im N-terminalen Bereich ein potentielles RRM. Dieses Protein besitzt im C-terminalen Bereich zusätzlich eine potentielle NoLS.

Auch das murine *Nucleostatmin* Protein weist das RNA-Erkennungsmotiv im N-terminalen Bereich des Proteins auf. Es besitzt zwei potentielle NLS und zusätzlich eine potentielle NoLS, die darauf hinweist, dass auch dieses Protein im Nukleolus lokalisiert. Die genomische Organisation des murinen *Nucleostatmin*-Gens entspricht der des humanen *Nucleostatmin*-Gens (Abbildung 3.31). Es ist ebenfalls in fünf Exons unterteilt und spannt sich über etwa 13 kb der chromosomalen DNA des Chromosoms 5 in der Zytobande A1-h. Die kodierende Region zieht sich über die gesamten fünf Exons, wobei sich das Start-Kodon ATG am Ende des ersten Exons befindet und das STOP-Kodon in der vorderen Hälfte des fünften Exons zu finden ist.

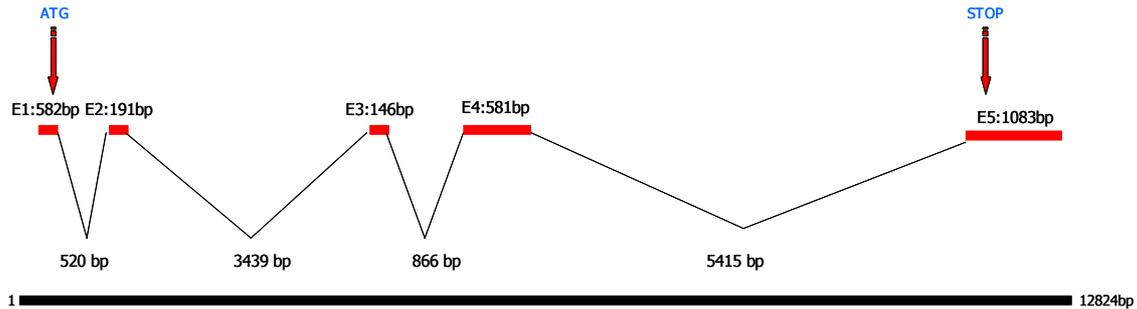


Abb.:3.31: Die genomische Organisation des murinen *Nucleostatmin*-Gens. Die genomische Organisation des murinen *Nucleostatmin*-Gens wurde mithilfe der CELERA Datenbank erstellt. Das Gen befindet sich auf dem Chromosom 5 in der Zytobande A1-h und umfasst 12824 Basenpaare. Es besteht vermutlich aus 5 Exons, E1-E5, deren Länge in Basenpaaren über dem jeweiligen Exon angegeben ist, und 4 Introns, deren Länge in Basenpaaren unter den Introns angegeben ist. Das Start-Kodon ATG ist am Ende des ersten Exons und das STOP-Kodon in der vorderen Hälfte des fünften Exons zu finden.

3.2.3.6 Das Nucleostatmin Protein weist eine speziesübergreifende Sequenzhomologie auf

Sowohl die Nukleinsäure- als auch die Aminosäuresequenzen des murinen cDNA Klons, des Nucleostatmins aus *Rattus norvegicus* und des Nucleostatmin NIH cDNA Klons wurden in einem *ClustalW*-alignment der MacVektor-7.0 Software einander gegenüber gestellt. Es ergab sich zwischen Mensch und Maus eine Sequenzkonservierung auf Nukleinsäureebene von 77% und 72% auf Aminosäureebene. Zwischen Mensch und Ratte zeigte sich, dass die Aminosäuresequenz bis zu 72,5% konserviert ist. Die drei Polypeptide unterscheiden sich nicht nur in ihrer Aminosäuresequenz, sowohl das murine Nucleostatmin als auch das aus *R. norvegicus* sind zusätzlich auch um vier Aminosäuren länger. In Abbildung 3.32 sind diese vier fehlenden Aminosäuren im humanen Nucleostatmin als vier Striche angegeben. Starke Sequenzhomologie ist besonders in dem Bereich des potentiellen RRM zu finden. Hier zeigt sich jedoch auch, dass diese Polypeptide im C-terminalen Bereich übereinstimmen, von dem vermutet wird, dass sich hier die potentielle NoLS verbirgt. Dieses Ergebnis lässt stark vermuten, dass es sich bei dem Nucleostatmin-mutC Protein (DKFZ) tatsächlich um eine Mutation handelt. Noch einmal wird bestätigt, dass die C-terminale Sequenz des NIH Nucleostatmin Proteins der *in vivo* Sequenz entspricht.

Homo sapiens	1	M A S S G G E L G S L F D H H V Q R A V C D T R A K Y R E G R R P R A V K V Y T I N L E S Q Y L L I	50
Mus musculus	1	M A S S D G K P G G V F D H H V Q T A V C D S R A K Y R E G R R P R A V K V Y T I N L E S Q Y L L I	50
Rattus norvegicus	1	M A S S D G K P G G I F D H H V Q T A V C D S R A K Y R E G R R P R A V K V Y T I N L E S Q Y L L I	50
Konsensus		M A S S D G K P G G . F D H H V Q T A V C D S R A K Y R E G R R P R A V K V Y T I N L E S Q Y L L I	
Homo sapiens	51	Q G V P A V G A M K E L V E R F A L Y G A I E Q Y N A L D E Y P A E D F T E V Y L I K F M N L Q S A	100
Mus musculus	51	Q G V P A V G A M K E L V E R F A L Y G A I E Q Y N A L D E Y P A E D F T E V Y L I K F V K L Q S A	100
Rattus norvegicus	51	Q G V P A V G A M K E L V E R F A L Y G A I E Q Y N A L D E Y P A E D F T E V Y L I K F V K L Q S A	100
Konsensus		Q G V P A V G A M K E L V E R F A L Y G A I E Q Y N A L D E Y P A E D F T E V Y L I K F V K L Q S A	
Homo sapiens	101	R T A K R K M D E Q S F F G G L L H V C Y A P E F E T V E E T R K K L Q M R K A Y V V K T T E N K D	150
Mus musculus	101	R V A K K K M D E Q S F F G G L L H V C Y A P E F E T V E E T R K K L Q E R K A Y I T R V T K N Q D	150
Rattus norvegicus	101	R I A K K K M D E Q S F F G G L L H V C Y A P E F E T V E E T R K K L E E R K A Y I S R V T K N Q D	150
Konsensus		R . A K K K M D E Q S F F G G L L H V C Y A P E F E T V E E T R K K L Q E R K A Y I . R V T K N Q D	
Homo sapiens	151	H Y V T K K K L V T E H K D T E D F R Q D F H S E M S G F C K A A L N T S A G - - - N S N P Y L P	196
Mus musculus	151	C Y M A K K K P V P E Q K G T K D S R Q G F H P P M P G F G T A A L N T S P E S P P E N S S S C L P	200
Rattus norvegicus	151	Y Y V T K K K P V P E Q K G T K D S R Q D F H A H M P G F C T P A L N T S P K N P S E N S S P C L P	200
Konsensus		Y V T K K K P V P E Q K G T K D S R Q D F H . M P G F C T A A L N T S P P E N S S P C L P	
Homo sapiens	197	Y S C E L P L C Y F S S K C M C S S G G P V D R A P D S S K D G R N H H K T M G H Y N H N D S L R K	246
Mus musculus	201	Y S C E F P L S C F A S K S T C S R G E H V D R V S D S C N S A R N H G E L S R H R D H S A F S P K	250
Rattus norvegicus	201	Y S C E F P L C Y F A S K S P C S P G E H T D K A S D S C N S A R N R G E L Q K H R D H S A F P P K	250
Konsensus		Y S C E F P L C Y F A S K S C S G E H V D R A S D S C N S A R N H G E L . H R D H S A F P K	
Homo sapiens	247	T Q I N S L K N S V A C P G A Q K A I T S S E A V D R F M P R T T Q L Q E R K R R R E D D R K L G T	296
Mus musculus	251	L Q M N T Y K N S V P C S S V Q E A I A T S Q A V G R F M P R T T Q L Q E R K R R R D C D R E L G T	300
Rattus norvegicus	251	L Q M N T Y K T S V P C S S V Q E A I A T S Q A V G R F M P R T T Q L Q E R K R R R D C D R E L G T	300
Konsensus		L Q M N T Y K N S V P C S S V Q E A I A T S Q A V G R F M P R T T Q L Q E R K R R R D C D R E L G T	
Homo sapiens	297	F L Q T N P T G N E I M I G P L L P D I S K V D M H D D S L N T T A N L I R H K L K E V I S S V P K	346
Mus musculus	301	L L E T H T S S N E V L I G P K L P G I P T V D L Q D D S L N T T A T L I R S K L K E V I S S V P K	350
Rattus norvegicus	301	F L E T N I S S N E V L I G P K L P G I P T V D L Q D D S L N T T A N L I R S K L K E V T I S S V P K	350
Konsensus		F L E T N S S N E V L I G P K L P G I P T V D L Q D D S L N T T A N L I R . K L K E V I S S V P K	
Homo sapiens	347	P P E D K P E D V H T S H P L K Q R R R I 367	
Mus musculus	351	P P E D N I K D V C T S H P G K Q R R R I 371	
Rattus norvegicus	351	P P E D N G E D V C T S H P R K Q R R R I 371	
Konsensus		P P E D N E D V C T S H P K Q R R R I	

Abb.3.32: Aminosäuresequenz-Vergleich des humanen, murinen und des Nucleostatmin Proteins aus *Rattus norvegicus*. Zur Erstellung des Vergleichs und der Konsensus-Sequenz wurde das *ClustalW*- Programm der *MacVektor-7.0 Software* verwendet. Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben; Nummerierungen zeigen die Aminosäure Positionen in den jeweiligen Proteinen an; Punkte in der Konsensus-Sequenz bezeichnen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften.

3.2.3.7 Nucleostatmin wird in unterschiedlichen Geweben exprimiert

Einen Hinweis auf die Expression der Nucleostatmin-mRNA in verschiedenen Geweben gibt der Northern Blot der Firma Ambion, auf dem polyadenylierte RNA aus zehn verschiedenen Geweben aufgetragen ist. Als Sonde wurde das gesamte Nucleostatmin cDNA-Fragment verwendet, ein PCR-Produkt hergestellt mit Hilfe des NIH-Klons als Matrize. In allen Geweben bis auf Pankreas und Leber wurde ein 2.0 kb Transkript nachgewiesen (Abbildung 3.33). Ein zusätzliches Transkript von ca. 4.0 kb wurde mit der RNA aus Gehirn nachgewiesen. Dies ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Spleißvariante zurückzuführen. Unter Berücksichtigung der β -Aktin Markierung zeigt sich, dass die aufgetragene RNA Menge nicht in allen Spuren gleich ist. Aus diesem Blot lässt sich somit nicht schließen, dass im Pankreas und in der Leber keine Nucleostatmin mRNA zu finden ist. Möglicherweise ist der Expressionspiegel unter der Nachweisgrenze. Die EST Datenbank des NCBI unterstützt die Relevanz des gefundenen Expressionsmusters und weist zusätzlich

auch auf zahlreiche weitere Gewebe hin, deren mRNAs auf diesen Blot nicht aufgetragen sind.

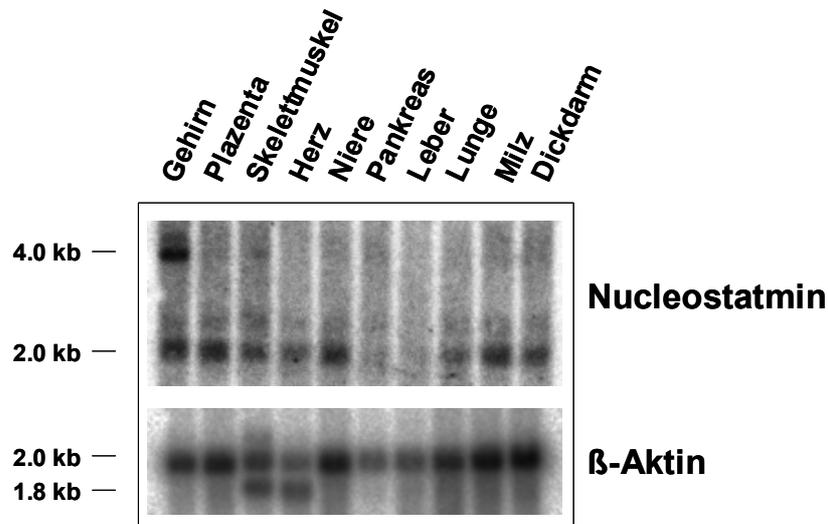


Abb.3.33: Expressionsmuster der Nucleostatmin mRNA in verschiedenen Geweben. Polyadenylierte RNA (2µg pro Spur) auf dem Northern Human Blot I (Ambion) wurden mit einer α^{32} -P-markierten Sonde hybridisiert. Als Sonde wurde ein PCR-Produkt von etwa 1100 bp der gesamten Nucleostatmin cDNA verwendet. Links neben dem Blot sind die Markerbanden in kb angegeben. Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA Menge wurde β -Aktin (Clontech) als [α^{32} -P] -markierte Sonde verwendet.

3.2.3.8 Nucleostatmin-mutC kolokalisiert mit der PML-Isoform PML IV

Für die ersten experimentellen Analysen des Nucleostatmin Proteins war zunächst erst einmal nur das Nucleostatmin-mutC Protein vorhanden. Wie eingangs unter 3.1 beschrieben, zeigte sich für dieses Protein, dass es im Zellkern in einer punktartigen Struktur lokalisiert (Abb.3.1, #1). Um nun die erste Fragestellung zu beantworten, ob es sich bei diesen Kernpunkten um PML-Kerndomänen handelt, wurden HeLa Zellen mit YFP-Nucleostatmin-mutC und jeweils einer der beiden PML-Isoformen PML III bzw. PML IV kotransfiziert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Es zeigte sich, wie in Abbildung 3.34 A dargestellt, dass das Nucleostatmin-mutC Protein nicht mit der Isoform PML III kolokalisiert. Wobei die YFP-Nucleostatmin-mutC Kernpunkte und die der PML-Isoform PML III anscheinend teilweise dicht nebeneinander liegen bzw. partiell überlappen (siehe Pfeilmarkierungen). Hingegen ist in Abbildung 3.34 B eine eindeutige Kolokalisation mit der PML-Isoform PML IV zu sehen.

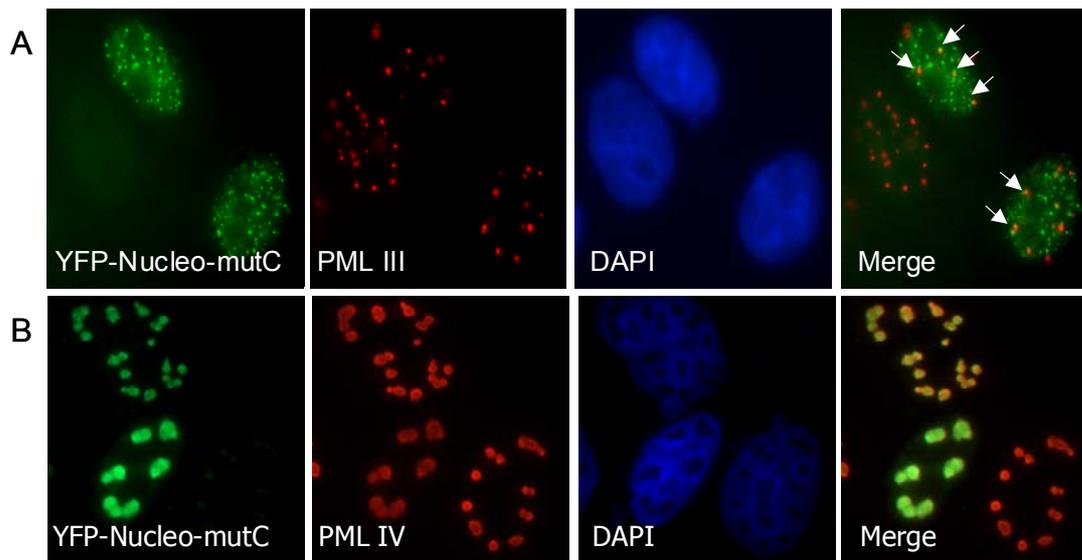


Abb.3.34: YFP-Nucleostatmin-mutC kolokalisiert mit der PML-Isoform PML IV. HeLa Zellen wurden transient mit den Expressionsplasmiden YFP-Nucleostatmin-mutC (hier: YFP-Nucleo-mutC) und PML III bzw. PML IV kotransfiziert. A) zeigt die Isoform PML III und B) zeigt die Isoform PML IV. Als Primärantikörper zur Erkennung der PML-Isoformen wurde ein monoklonaler Maus anti-PML Antikörper verwendet. Dieser wurde mit einem Ziege anti-Maus Alexa Flour® 594 (rot) Sekundärantikörper markiert. Die Pfeile in A) zeigen EYFP-Nucleostatmin-mutC und PML-Kernpunkte, die dicht nebeneinander liegen oder partiell überlappen. Die Bilderreihe ganz rechts zeigt die Überlagerung der exprimierten Proteine.

3.2.3.9 Herstellung von Antikörpern gegen Nucleostatmin

Für den weiteren Verlauf des Projektes war es unerlässlich, Antikörper gegen das Nucleostatmin Protein, in diesem Fall in Kaninchen, zu generieren, um das endogene Protein analysieren zu können. Zu diesem Zweck wurden zunächst Peptidantikörper bei der Firma Eurogentec in Auftrag gegeben. Es wurden zwei Peptidsequenzen aus dem mittleren Bereich des Proteins verwendet, in dem sich keine aus Datenbank-Analysen bekannte Domänen befinden. Sowohl die Peptidsequenzen als auch die Lokalisation dieser Epitope innerhalb des Nucleostatmin Proteins sind in Abbildung 3.35 A dargestellt. An beide Sequenzen wurde aus Synthesegründen zusätzlich ein N- bzw. C-terminales Cystein angehängt. Die Zahlenangaben (aa 217-231 und aa 272-286) beziehen sich auf den jeweiligen Sequenzabschnitt innerhalb des Nucleostatmin Proteins. Die Peptidantikörper werden im folgenden als A13 und A14 benannt, Die entsprechenden Epitope sind in Abbildung 3.35 A angegeben. Ein zweiter Antikörper, der als zusätzliches Werkzeug zur Unterstützung neuer Erkenntnisse dienen sollte, wurde im späteren Verlauf der Arbeit nach Immunisierung von Hühnern aus Hühnereiern gewonnen. Zu diesem Zweck wurde das Nucleostatmin-mutC Protein an die Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* fusioniert, in Bakterien produziert und aufgereinigt (siehe 2.4). Mit

dem aufgereinigten GST-Nucleostatmin-mutC Fusionsprotein wurden 2 Legehennen, eine braune und eine weiße, mehrfach mit dem in Abbildung 3.35 B) dargestellten GST-Nucleostatmin-mutC Fusionsprotein immunisiert (siehe 2.5).

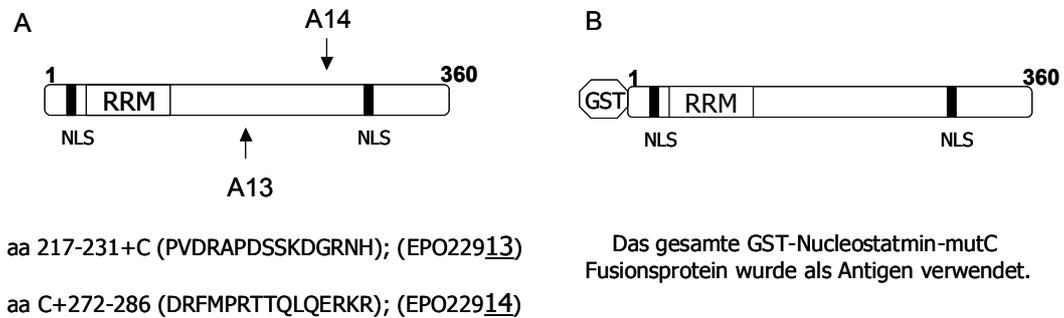


Abb.3.35: Schematische Darstellung der Peptidantigene und des GST-Nucleostatmin-mutC Antigens. A) angegeben sind die beiden Peptidsequenzen, die von der Firma Eurogentec als Antigene zur Herstellung von Peptidantikörpern verwendet wurden. EPO22913 entspricht dem Peptidantikörper A13, der sein Epitop in der Mitte des Proteins erkennen sollte; EPO22914 entspricht dem Peptidantikörper A14, der sein Epitop im C-terminalen Bereich des Proteins erkennen sollte. B) zeigt eine Darstellung des GST-Nucleostatmin-mutC Fusionsproteins, das als Antigen zur Immunisierung von Legehennen verwendet wurde.

3.2.3.10 Test der anti-Nucleostatmin Antikörper

Die Peptidantikörper wurden zunächst in Immunfluoreszenzanalysen getestet. Zu diesem Zweck wurden HeLa Zellen mit dem Expressionsvektor des YFP-Nucleostatmin-mutC Proteins transfiziert. Die Peptidantikörper A13 und A14 wurden in einer Konzentration von 8ng/μl eingesetzt.

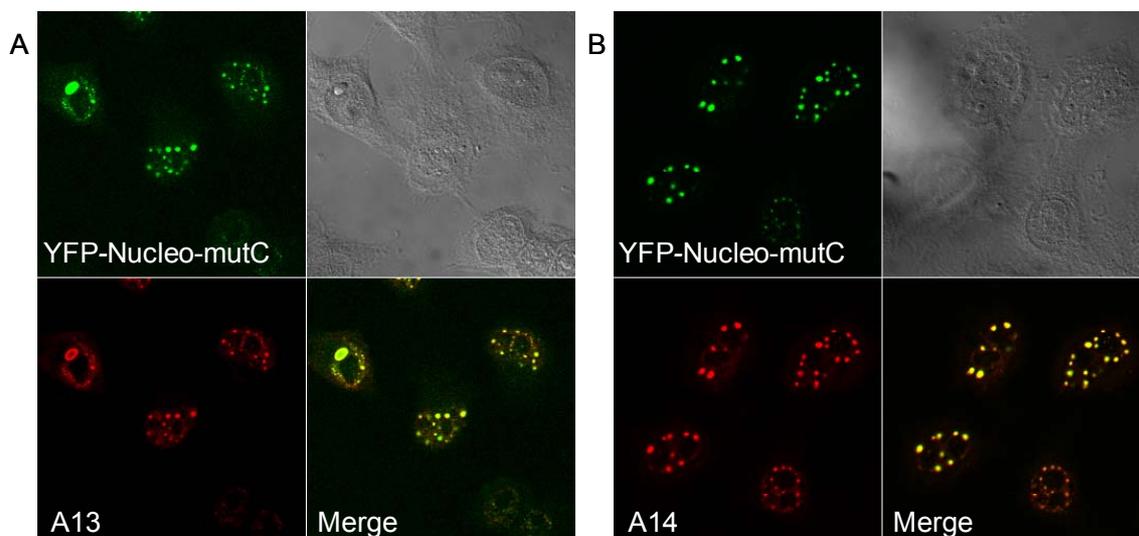


Abb.3.36: Beide Peptidantikörper erkennen das YFP-Nucleostatmin-mutC Protein. HeLa Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid des YFP-Nucleostatmin-mutC Proteins transfiziert und mit je 8ng/ μ l des jeweiligen Peptidantikörpers in A) mit A13 und in B) mit A14 inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Axiovert 200M-Mikroskop der Firma Zeiss analysiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Das jeweils rechts unten liegende Bild zeigt die Überlagerung der Antikörperfärbungen.

Wie in der Überlagerung („Merge“; jeweils unten rechts in den Abbildungen A und B) der fluoreszenzmikroskopischen Bilder zu sehen ist (Abb. 3.36), erkennen beide Peptidantikörper, d.h. sowohl A13 als auch A14 (rot), das YFP-Nucleostatmin-mutC Protein. Als nächstes stellte sich die Frage, ob die beiden Peptidantikörper auch für Western Blot Analysen einsetzbar sind. Daher wurden 293T Zellen mit je 10 μ g der Expressionsvektoren des YFP- und Flag-markierten Nucleostatmin-mutC bzw. des Flag-markierten Nucleostatmin Proteins transfiziert. Die Analyse der Lysate durch Immunblots unter Verwendung der Peptidantikörper A13 und A14 zeigte im Fall von A13 ein zufriedenstellendes Ergebnis (Abb.3.37). Der Peptidantikörper erkennt sowohl das Flag-markierte Nucleostatmin-mutC als auch das Flag-markierte Nucleostatmin Protein, die beide bei der erwarteten elektrophoretischen Mobilität im Gel laufen, wie in Abbildung 3.37 B dargestellt. Zur Bestätigung wurde derselbe Blot mit einem anti-Flag Antikörper überprüft. Die Abbildung 3.37 A zeigt, dass der Flag-Antikörper Proteine mit dem gleichen Molekulargewicht erkennt. Abbildung 3.37 C zeigt, dass der A13 Antikörper auch das YFP-Nucleostatmin-mutC Protein erkennt, das ein errechnetes Molekulargewicht von etwa 71 kDa hat. Es zeigt sich, dass der A13 Antikörper zusätzliche Banden mit niedrigerem Molekulargewicht (Abb.3.37 B und C) erkennt, die jedoch auch bei dem Flag-Antikörper auftauchen. Es handelt sich somit wohl um „Hintergrund“.

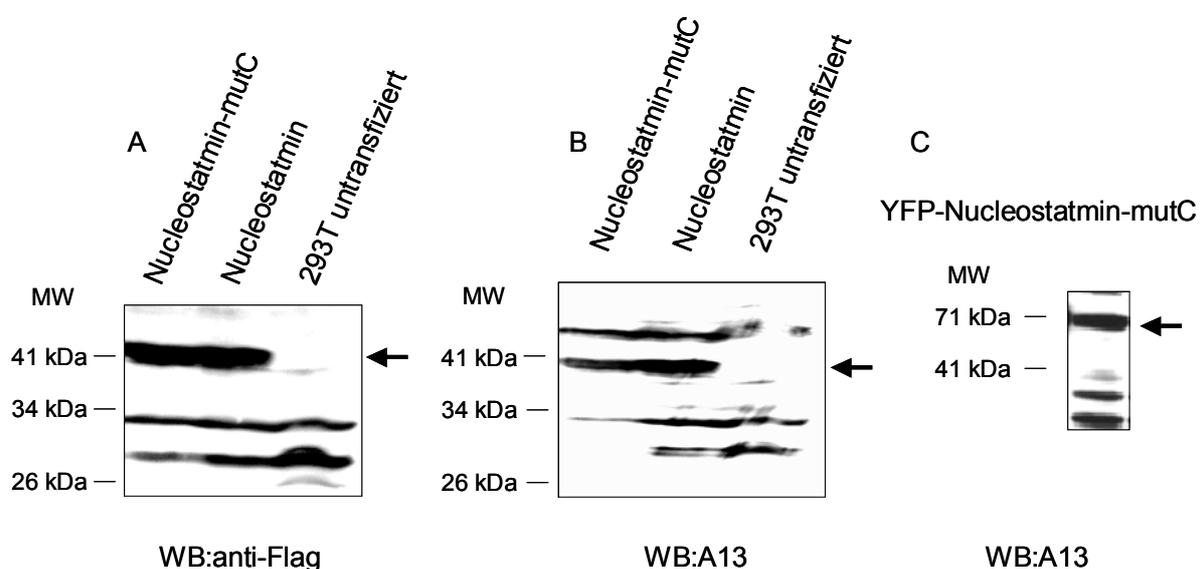


Abb.3.37: Erkennung des YFP- und Flag-markierten Nucleostatmin-mutC und des Flag-markierten Nucleostatmin Proteins durch den Peptidantikörper A13. 293T Zellen wurden mit YFP- und Flag-Nucleostatmin-mutC bzw. Flag-Nucleostatmin Expressionsplasmiden transfiziert. Die Zellysate wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und in Western Blot (WB) Analysen mit A) anti-Flag Antikörper bzw. A13 Antikörper in B) und C) nachgewiesen. Die Flag- bzw. YFP-markierten Nucleostatmin Proteine sind mit einem Pfeil am Bildrand gekennzeichnet. Molekulargewichtsmarker (MW in kDa).

Der Peptidantikörper A14 zeigte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Eine starke Hintergrundfärbung durch unspezifische Antikörperbindung machten mehrfach angefertigte Western Blot Analysen unauswertbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch die polyklonalen Hühner-Antikörper, die gegen das GST-Nucleostatmin-mutC gerichtet sein sollten, wurden in Immunblot Analysen getestet. Aufgereinigtes GST-Nucleostatmin-mutC Protein wurde in steigenden Konzentrationen zusammen mit 500 ng GST-Protein auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und in Immunblots analysiert. In den Abbildungen 3.38 A und B zeigt sich, dass sowohl das Antiserum aus dem weißen Hühnerei (im folgenden als WE bezeichnet) als auch das aus dem braunen Hühnerei die GST-Nucleostatmin-mutC Proteine mindestens ab einer Menge von 50 ng erkennen. Zur Kontrolle des Ergebnisses wurden beide Immunblots anschließend mit Amidoschwarz gefärbt, so dass auch das geladene GST-Protein zu sehen ist. Es zeigt sich, dass die Antikörper offenbar spezifisch das Nucleostatmin-mutC Protein erkennen, und nicht das GST-Protein, da in den Immunblots keine Signale in der mit GST beladenen Spur zu sehen sind.

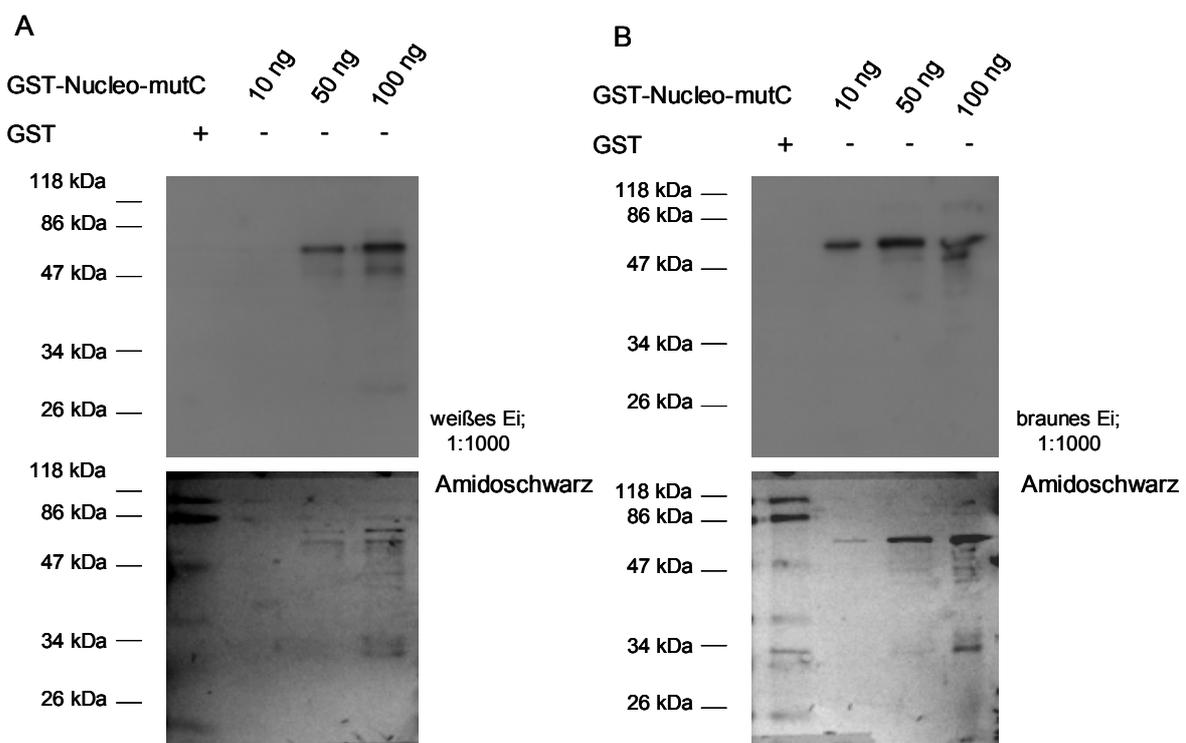


Abb.3.38: Immunblot Analysen mit Antikörpern aus Hühnereiern. Aufgereinigtes GST-Protein (500 ng; erste Spur auf beiden Blots) und GST-Nucleostatmin-mutC in steigenden Mengen (Spuren 2-4 auf beiden Blots mit je 10 ng, 50 ng und 100 ng Protein) wurde auf eine PVDF-Membran transferiert. In A) wurden das GST-Nucleostatmin-mutC Protein mit den Antikörpern aus einem weißen Hühnerei, in B) mit dem aus einem braunen Hühnerei nachgewiesen. Beide Antiseren wurden nicht affinitätsgereinigt, sondern direkt in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt; Legedatum: 2.12.03. Die Immunblots wurden anschließend mit Amidoschwarz (untere Abbildungen) gefärbt. Der Molekulargewichtsmarker ist auf der linken Seite der Blots in kDa angegeben.

Mit den beiden Peptidantikörpern wurde schließlich auch die intrazelluläre Lokalisation des endogenen Nucleostatmin Proteins durch Immunfluoreszenzanalysen analysiert. Der A14 Antikörper hat sich auch in diesem Fall als unbrauchbar herausgestellt, da er keine im Vergleich zum Präimmunserum spezifischen Signale in der Zelle ergab. Der A13 Peptidantikörper hingegen erkannte spezifische Strukturen in der Zelle, die in ähnlicher Weise auch von den Hühnerantikörpern aus dem weißen Ei erkannt wurden. Es wurden verschiedene Zelllinien (HeLa, H1299, WI38, C3a, HepG2) mit beiden Antikörpern getestet, wobei in Abbildung 3.39, stellvertretend für alle getesteten Zelllinien, U2OS Zellen abgebildet sind, da sich für alle das gleiche Bild ergab. In Abbildung 3.39 A ist eine Übersicht zu sehen, von der eine der Zellen vergrößert in B dargestellt ist, so dass die durch die Antikörper erkannten Bereiche im Zellkern zu sehen sind.

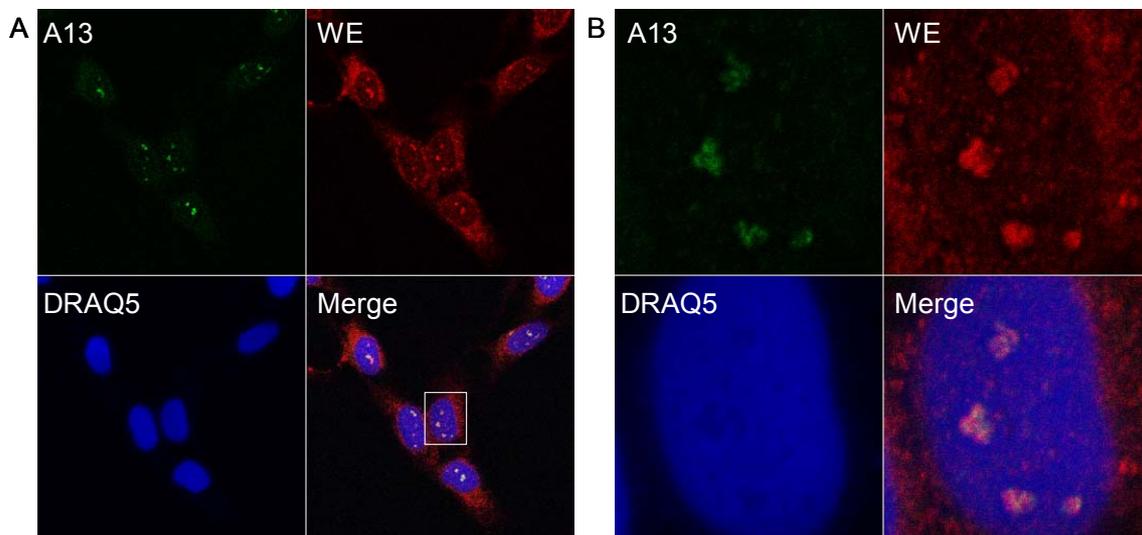


Abb.3.39: Der A13 Peptidantikörper und die Hühnerantikörper erkennen gleiche Strukturen im Zellkern. U2OS Zellen wurden sowohl mit dem A13 Peptidantikörper (8ng/ μ l) als auch mit den Hühnerantikörpern aus dem weißen Ei (WE; 1:50) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der A13 Antikörper wurde mit einem im grünen Bereich fluoreszierenden zweiten Antikörper markiert, der WE Antikörper mit einem, der im roten Bereich fluoresziert. A) zeigt eine Übersicht von Zellen, von denen die Zellen im weißen Rechteck in B) vergrößert dargestellt ist. Die DNA wurde mit DRAQ5 angefärbt. Die Überlagerung der jeweiligen Bilder ist im „Merge“ gezeigt.

Die zusätzliche Färbung des Zytoplasmas durch den WE Antikörper ist darauf zurückzuführen, dass es sich hierbei um ein Antiserum aus nicht affinitätsgereinigten Antikörpern handelt. Da es auch ein murines Homolog gibt, wie in 3.2.3.5 und 3.2.3.6 bereits beschrieben, wurde der A13 Peptidantikörper für den Nachweis des Proteins in den murinen Zelllinien NIH3T3 und Maus embryonalen Fibroblasten (MEF) eingesetzt. In der Abbildung 3.40 sind Immunfluoreszenzbilder von beiden Zelllinien zu sehen. A) zeigt eine Übersicht von NIH3T3 Zellen, in denen besonders in der vergrößerten Darstellung einer Einzelzelle zu sehen ist, dass gleiche Strukturen im Zellkern erkannt werden wie in humanen Zellen. B) zeigt eine Zelle der MEFs, die zu dem gleichen Ergebnis führt. Eine Vergrößerung dieser subnukleären Strukturen ist in den linken beiden Bildern dargestellt. Der Antikörper ist somit speziestübergreifend einsetzbar.

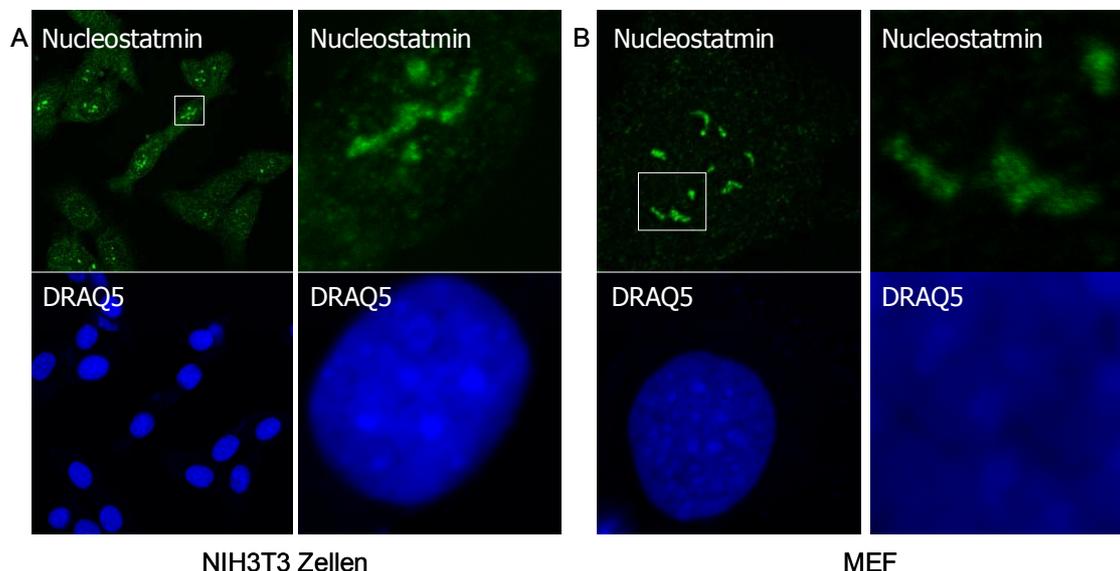


Abb.3.40: Der A13 Peptidantikörper erkennt gleiche Strukturen im Zellkern von murinen Zelllinien. NIH3T3 und MEF Zellen wurden mit dem A13 Peptidantikörper (8ng/ μ l) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der A13 Antikörper wurde mit einem im grünen Bereich fluoreszierenden zweiten Antikörper markiert. A) zeigt eine Übersicht von NIH3T3 Zellen, von denen ein subnukleärer Ausschnitt der Zellen im weißen Rechteck vergrößert dargestellt ist. B) zeigt eine MEF Zelle, von der ein subnukleärer Ausschnitt in den rechten beiden Bildern dargestellt ist. Die DNA wurde mit DRAQ5 angefärbt.

3.2.3.11 Endogenes Nucleostatmin kolokalisiert weder mit endogenem noch mit transfiziertem PML

In Abschnitt 3.2.3.8 wurde gezeigt, dass das Nucleostatmin-mutC Protein mit der PML-Isoform PML IV in PML-Kerndomänen kolokalisiert. Da nun die benötigten Antikörper

vorhanden waren, um zu sehen, ob dies auch für das endogene Protein zutrifft, wurde dies in U2OS Zellen getestet. Sowohl untransfizierte als auch mit den Expressionsplasmiden der PML-Isoformen PML III und PML IV transfizierte U2OS Zellen wurden mit dem A13 Peptidantikörper und einem anti-PML Antikörper inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder sind in Abbildung 3.41 A) bis C) dargestellt.

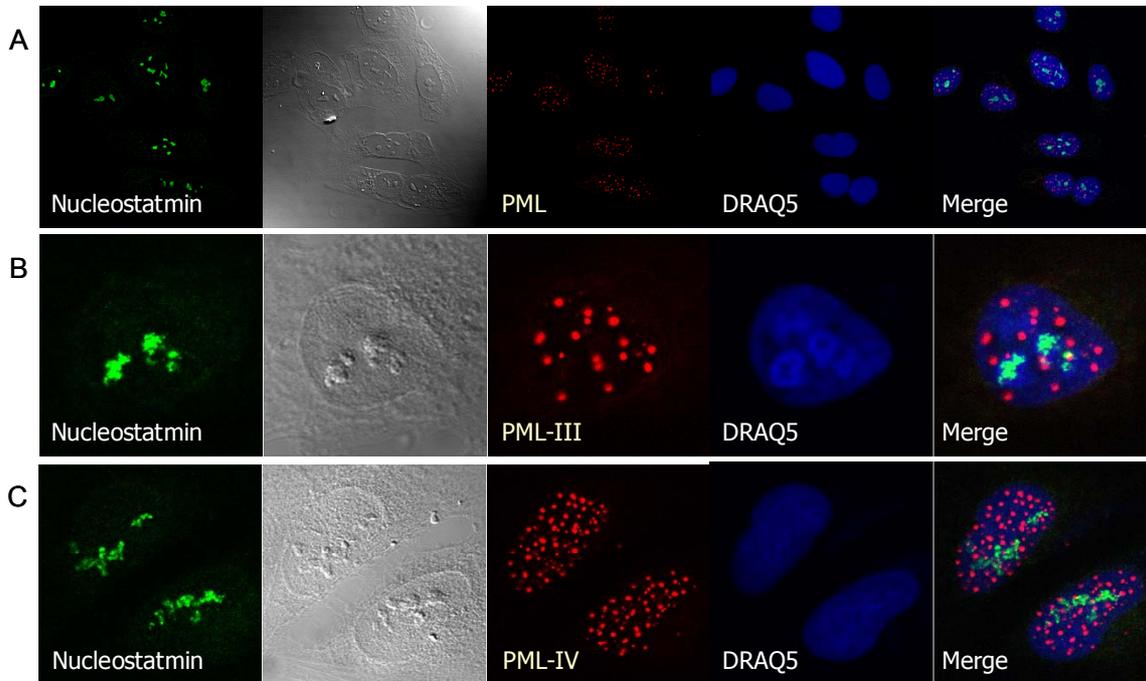


Abb.3.41: Endogenes Nucleostatmin Protein kolokalisiert nicht mit PML. Untransfizierte A) und mit den PML-Isoformen PML III B) und PML IV C) transfizierte U2OS Zellen wurden auf Glasplättchen fixiert und auf Kolokalsiation der genannten Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 sichtbar gemacht. „Merge“ (rechte Bilderreihe) zeigt die Überlagerung der Bilder.

Es zeigt sich, dass das endogene Nucleostatmin weder mit endogenem noch mit den PML-Isoformen PML III und PML IV, miteinander kolokalisieren. Dieses Ergebnis wird noch einmal durch eine weitere fluoreszenzmikroskopische Studie mit der endogenen PML-Kerndomänen Komponente Sp100 bestätigt. Wie in Abbildung 3.42 zu sehen ist, kolokalisiert auch endogenes Sp100 (Moller et al., 2003; Szostecki et al., 1990) nicht mit endogenem Nucleostatmin.

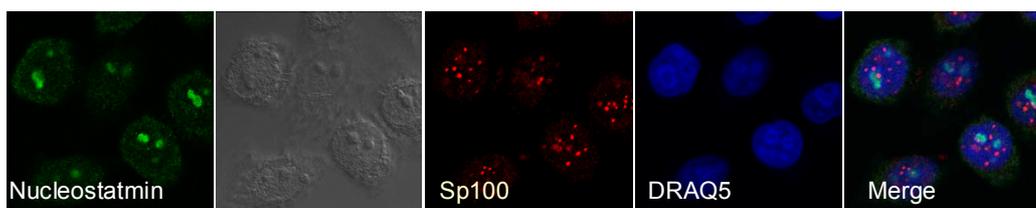


Abb.3.42: Endogenes Nucleostatmin kolokalisiert nicht mit endogenem Sp100. Untransfizierte U2OS Zellen wurden auf Glasplättchen fixiert und auf Kolokalisation von Nucleostatmin mit der PML-Kernomänen Komponente Sp100 mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 sichtbar gemacht. „Merge“ zeigt die Überlagerung der Bilder.

Aus dem Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und den Phasenkontrastbildern aller Studien lässt sich vielmehr erkennen, dass das Nucleostatmin Protein sehr wahrscheinlich im Nucleolus lokalisiert.

3.2.3.12 Nucleostatmin besitzt eine potentielle NoLS

NoLS, auch als NTS (*nucleolar targeting sequence*) bezeichnet, zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus mehreren basischen Aminosäuren bestehen. 1995 definierten Henderson et al. die NTS mit der Sequenzabfolge RRQRR (Scott et al., 2001), die sich in einigen, jedoch nicht allen bisher bekannten im Nucleolus lokalisierenden Proteine zeigt. Der Nucleolus ist kein membranumschlossenes Kompartiment wie beispielsweise das endoplasmatische Retikulum oder der Nucleus, für die definierte Signale bekannt sind, die den Eintritt der dort lokalisierenden Proteine bewirken (Macara, 2001). Wie bereits mehrfach erwähnt, wurde aufgrund von Datenbank-Analysen („Prosite“, „Motif Scan“) vermutet, dass sich im C-Terminus des Nucleostatmin Proteins eine potentielle NoLS verbirgt. Auch die bereits mehrfach gezeigten indirekten Immunfluoreszenzanalysen dieser Studie zeigen eine Lokalisation des endogenen Nucleostatmin Proteins im Nucleolus (Abbildungen 3.40 bis 3.43). Um einen Hinweis auf mögliche Gemeinsamkeiten der Nucleostatmin-NoLS mit verschiedenen anderen NoLS zu bekommen, wurde der C-terminale Sequenzbereich des Nucleostatmin Proteins, der im Nucleostatmin-mutC Protein mutiert ist (Aminosäuren 341-367), in einem *ClustalW-alignment* der MacVektor-7.0 Software mit bereits bekannten und beschriebenen NoLS anderer nukleolärer Proteine gegenüber gestellt (Annilo et al., 1998; Lohrum et al., 2000; Rizos et al., 2000; Scott et al., 2001; Thebault et al., 2000; Ueki et al., 1998; Valdez et al., 1994). In Abbildung 3.43 ist der Sequenzvergleich der bekannten NoLS dargestellt. Wie sich zeigt, ist keine eindeutige Konsensus-Sequenz definierbar, die sich aus der Primärsequenz dieser Signale ergibt. Wie sich in der Konsensus-Sequenz zeigt, gibt es jedoch in den Sequenzabschnitten ebenfalls eine relativ große Anzahl von überwiegend polaren und basischen Aminosäuren, die aufgrund ihrer räumlichen Position stark zu einer externen oder ambivalenten Orientierung neigen. Auch wenn hierdurch keine eindeutige

NoLS abzuleiten ist, so sprechen diese Ähnlichkeiten für eine funktionelle NoLS im Nucleostatmin Protein.

Nucleostatmin, 341-367	I S S V P K P P E D K P E D V H T S H P L K Q R R R I - - - - -
p14ARF, 1-13	- - - - - M V R R F L V T L R I R R - - - - -
p14ARF, 80-90	- - - - - P R R G A Q L R R P R - - - - -
hING-1, 142-159	- - - - - D K P N S K R S R R Q R N N E N R - - - - -
hING-1, 174-194	- - - - - T P K E K K A K T S K K K K R S K A K A - - - - -
hHICp40, 45-63	- - - - - R C R R L A N F P G R K R R R R R R K - - - - -
hMDM2, 466-473	- - - - - K K L K K R N K - - - - -
hNOLP,342-371	- - - - - R K R I R T Y L K S C R R M K R S G F E M S R P I P S H L T
p120, 40-57	- - - F L P A V S D E N S K R L S S R A R K R A A K R R L G - - - - -
hS7, 98-118	- - - - R R I L P K P T R K S R T K N K Q K R P R - - - - -
Konsensus R .

Abb.3.43: Aminosäuresequenz-Vergleich der putativen NoLS des Nucleostatmin Proteins mit identifizierten NoLS 7 anderer nukleolärer Proteine. Zur Erstellung des Vergleichs und der Konsensus-Sequenz wurde das *ClustalW*- Programm der MacVektor-7.0 *Software* verwendet. Verglichen wurden die bereits beschriebenen NoLS 7 verschiedener humaner Proteine (p14ARF, hING-1, hHICp40, hMDM2, hNOLP, p120, hS7; siehe Text für Referenzen). Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben; Nummerierungen zeigen die Aminosäure Positionen in den jeweiligen Proteinen an; Punkte in der Konsensus-Sequenz bezeichnen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften.

3.2.3.13 Endogenes Nucleostatmin lokalisiert im Fibrillären Zentrum des Nukleolus

Der Nukleolus ist die prominenteste Struktur innerhalb des eukaryotischen Zellkerns. Bereits 1836 wurde er das erste Mal von Gabriel Gustav Valentin beschrieben und steht seither im Mittelpunkt des Interesses. Aufbau und strukturelle Eigenschaften dieses subnukleären Kompartiments wurden bereits mehrfach beschrieben und zusammengefasst (Carmo-Fonseca et al., 2000). Im wesentlichen ist der Nukleolus in drei elektronenmikroskopisch unterscheidbare Bereiche aufgeteilt, die granulären Komponenten (GC, granular components), die dichten fibrillären Komponenten (DFC, dense fibrillar components) und die fibrillären Zentren (FC, fibrillar centre) (Carmo-Fonseca et al., 2000; Leung and Lamond, 2003). Aufgrund der Tatsache, dass in dieser Arbeit mehrere Ergebnisse darauf hinweisen, dass das Nucleostatmin Protein ein nukleoläres Protein ist, war es von Interesse festzustellen, in welchem Bereich des Nukleolus dieses Protein genau lokalisiert. Möglicherweise gibt dies

einen Hinweis darauf, in welchem Bereich dieses Protein seine Funktion ausübt. Die Zuordnung des Nucleostatmin Proteins zu einem der subnukleolären Kompartimente erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie. Im folgenden sind Kollokalisationsstudien mit Proteinen, die als Markerproteine für eines der drei Kompartimente dienten, dargestellt. Bei den Markerproteinen handelt es sich um das Nucleolin Protein, das in der Regel in den granulären Komponenten zu finden ist (Daniely et al., 2002; Ginisty et al., 1999; Mi et al., 2003). Das Fibrillarin Protein ist vorwiegend in den dichten fibrillären Komponenten, jedoch auch in den fibrillären Zentren zu finden (Ochs et al., 1985). Als Markerproteine für die fibrillären Zentren diente einerseits die DNA-abhängige RNA Polymerase I (Grummt, 2003) als auch der nukleoläre Transkriptionsfaktor *Upstream Binding Factor* UBF (Voit and Grummt, 2001; Voit et al., 1999). Diese Studien wurden in verschiedenen Zelllinien (WI38, H1299, HeLa) durchgeführt, wobei im folgenden U2OS Zellen stellvertretend für alle Zelllinien dargestellt sind. Abbildung 3.44 A) zeigt eine Kollokalisationsstudie von endogenem Nucleostatmin (rot) und endogenem Nucleolin. In der Vergrößerung der Nucleoli von einer der abgebildeten Zellen (Abbildung B) zeigt sich, dass diese beiden Proteine nicht miteinander kollokalisieren. Das heißt, dass endogenes Nucleostatmin nicht in den granulären Komponenten der Nucleoli lokalisiert.

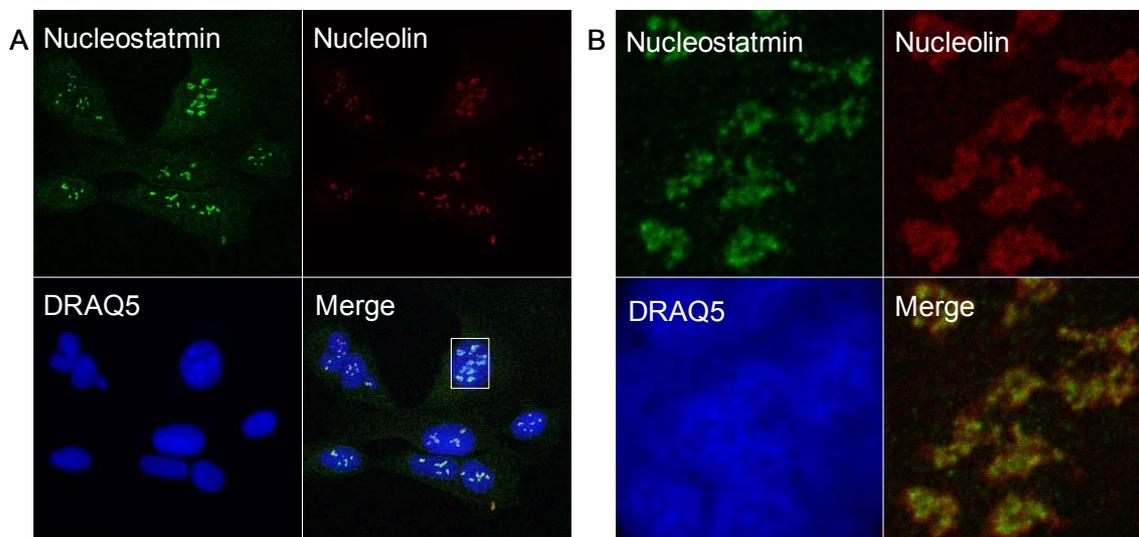


Abb.3.44: Nucleostatmin lokalisiert nicht in granulären Komponenten. A) U2OS Zellen wurden auf Glasplättchen fixiert und auf Kollokalisierung von Nucleostatmin (grün) mit dem Markerprotein für granuläre Komponenten Nucleolin (rot) mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. B) zeigt eine Vergrößerung der mit einem weißen Rahmen umgebenen Nucleoli von einer der in A) abgebildeten Zellen. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 sichtbar gemacht. „Merge“ zeigt die Überlagerung der Bilder.

Als nächstes wurde untersucht, ob das endogene Nucleostatmin Protein zusammen mit endogenem Fibrillarin in den dichten fibrillären Komponenten der Nucleoli kolokalisiert. Wie in Abbildung 3.45 A) und im Besonderen in der Vergrößerung des Nucleolus von einer der Zellen (Abb. 3.45 B) zu sehen ist, kolokalisieren diese beiden Proteine nicht miteinander. Das heißt, dass endogenes Nucleostatmin nicht in dichten fibrillären Komponenten der Nucleoli lokalisiert.

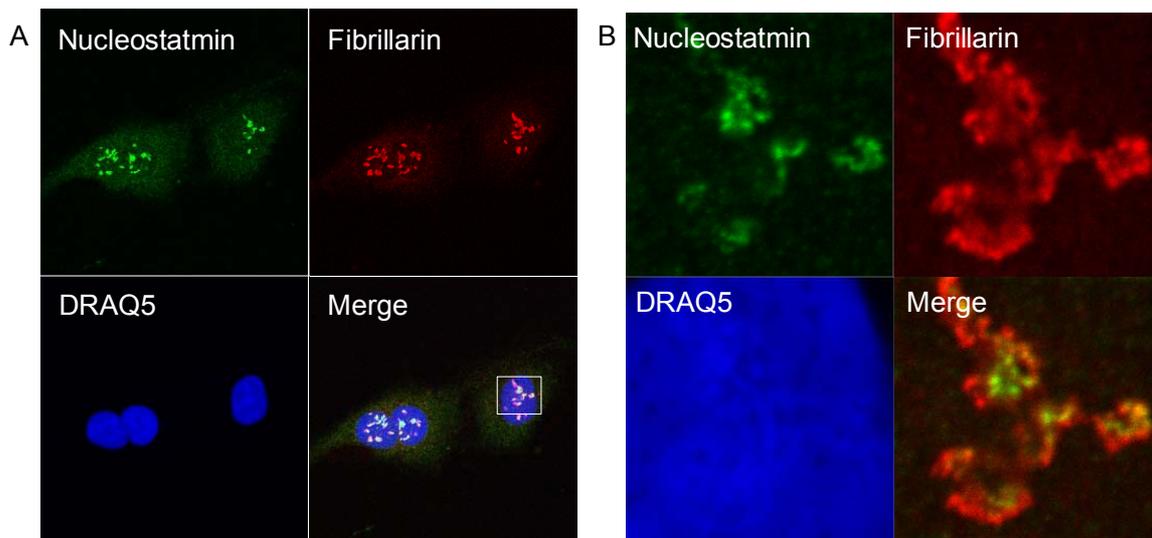
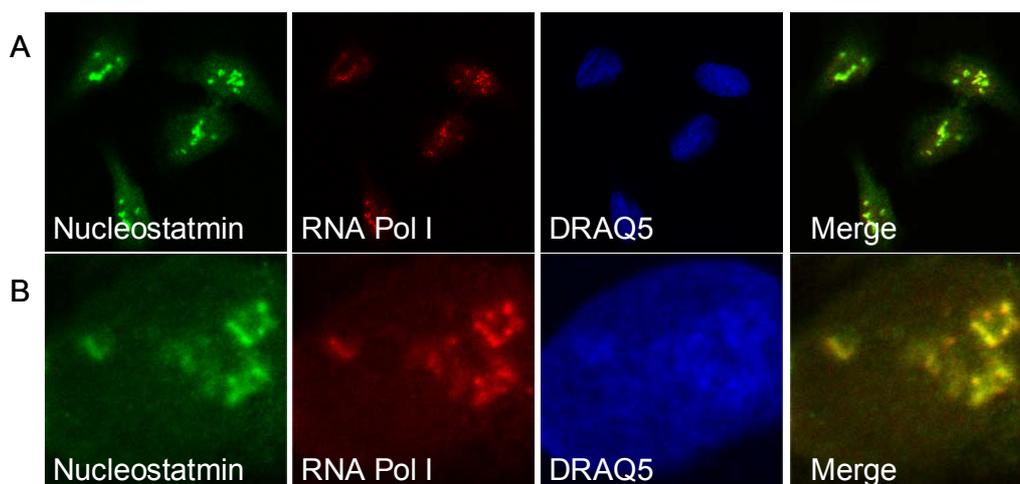


Abb.3.45: Nucleostatmin lokalisiert nicht in dichten fibrillären Komponenten. A) U2OS Zellen wurden auf Glasplättchen fixiert und auf Kolokalisation von endogenem Nucleostatmin (grün) mit dem Markerprotein für dichte fibrilläre Komponenten Fibrillarin (rot) mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. B) zeigt eine Vergrößerung der mit einem weißen Rahmen umgebenen Nucleoli von einer der in A) abgebildeten Zellen. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 sichtbar gemacht. „Merge“ zeigt die Überlagerung der Bilder.



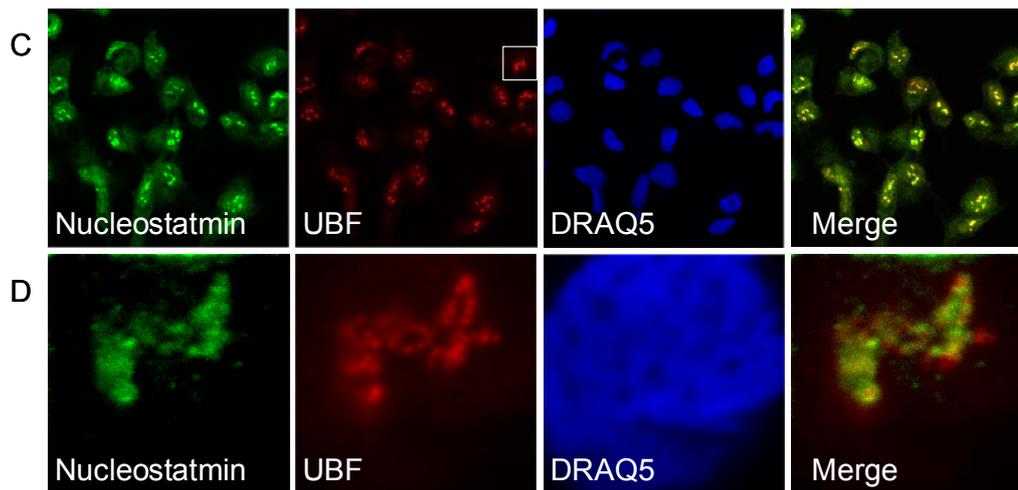


Abb.3.46: Nucleostatmin kolokalisiert zusammen mit RNA Polymerase I und UBF in fibrillären Zentren. U2OS Zellen wurden auf Glasplättchen fixiert und auf Kolokalisation von endogenem Nucleostatmin (grün) mit den Markerprotein für fibrilläre Zentren RNA Polymerase I (A und B) und UBF (C und D) (rot) mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. B) zeigt eine Vergrößerung eines Nucleolus. D) zeigt eine Vergrößerung des mit einem weißen Rahmen umgebenen Nucleolus von einer der in C) abgebildeten Zellen. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 sichtbar gemacht. „Merge“ zeigt die Überlagerung der Bilder.

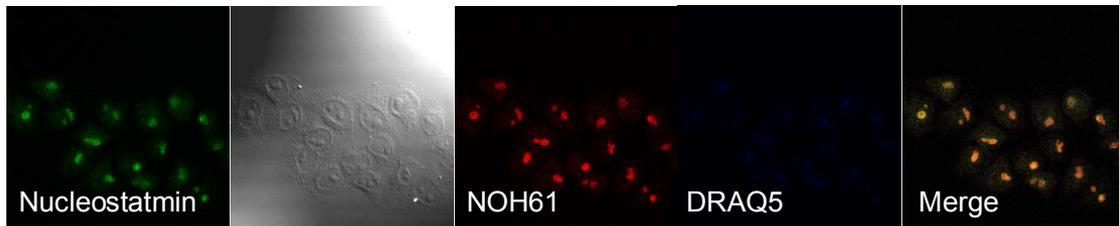
Schließlich wurden Kolokalisationsstudien von endogenem Nucleostatmin mit den Markerproteinen RNA Polymerase I bzw. UBF durchgeführt. Es stellte sich heraus (Abb.3.46), dass endogenes Nucleostatmin sowohl mit der RNA Polymerase I (Abbildungen A und B) als auch mit UBF (Abbildungen C und D) in den fibrillären Zentren der Nucleoli kolokalisiert.

3.2.3.14 Nucleostatmin ist ein RNA-bindendes Protein

Eingangs wurde bereits beschrieben (siehe vor allem Abschnitt 3.2.3.3), dass das Nucleostatmin Protein ein potentiell RNA-Erkennungsmotiv (RRM), besitzt. In diesem Zusammenhang war es von Interesse experimentell zu sehen, ob Nucleostatmin auch tatsächlich RNA bindet. Zu diesem Zweck wurden HeLa Zellen sowohl mit DNase I als auch mit RNase A behandelt, um zu sehen, ob dies einen Effekt auf die nukleoläre Lokalisation des Nucleostatmin Proteins hat. Als Kontrollprotein wurde die RNA-Helikase NOH61 verwendet, für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie nach RNase A-Behandlung nicht mehr in Nucleoli lokalisiert (Zirwes et al., 2000). In der Abbildung 3.47 A ist zu sehen, dass Nucleostatmin nach 120-minütiger DNase I-Behandlung im Nucleolus verbleibt, ebenso wie das Kontrollprotein NOH61. Die Bestätigung dafür, dass der DNase I-Verdau funktioniert hat, zeigt sich in der praktisch nicht vorhandenen DNA-Färbung mit DRAQ5. Als

Negativkontrolle dienten HeLa Zellen, die der gleichen Behandlung unterzogen wurden, jedoch ohne DNase I (Abb. 3.47 B).

A) 120 min DNase I-Behandlung



B) Negativkontrolle

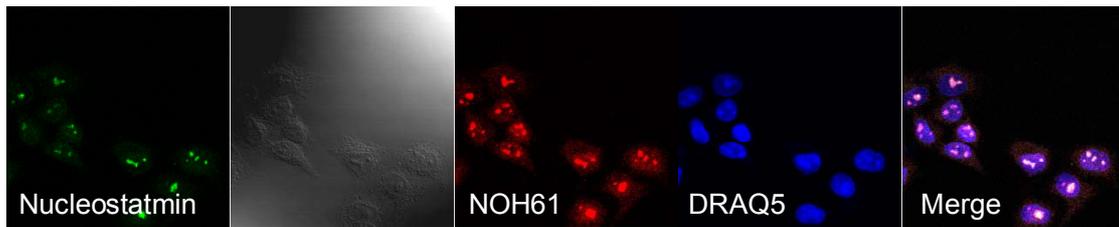


Abb3.47: Intrazelluläre Lokalisation von endogenem Nucleostatmin in HeLa Zellen nach DNase I-Behandlung. A) zeigt HeLa Zellen die 120 Minuten mit DNase I behandelt wurden. Für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Antikörper A13 und NOH61-2.1 verwendet. In B) sind die unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne DNase I behandelten Kontrollzellen zu sehen. Als Vergleichsprotein wurde die RNA-Helikase NOH61 verwendet. Zur Kontrolle des DNase I-Verdau wurde die DNA mit DRAQ5 (blau) angefärbt.

Sowohl Nucleostatmin als auch NOH61 sind in Nucleoli lokalisiert. Die DNA (blau) wurde mit DRAQ5 sichtbar gemacht. Parallel zu diesem Experiment wurden HeLa Zellen einem ebenfalls 120-minütigen RNase A-Verdau unterzogen.

A) 120 min RNase A-Behandlung



B) Negativkontrolle

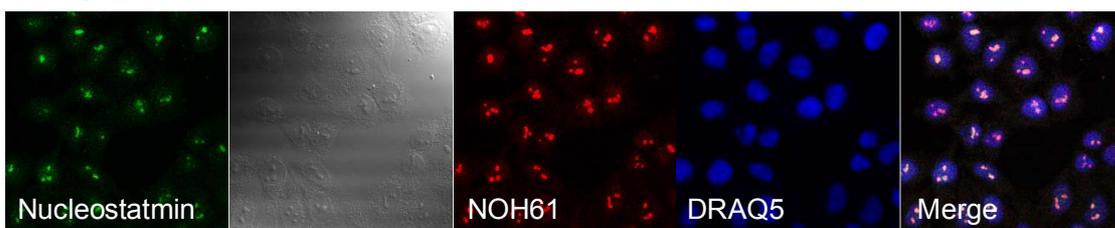


Abb3.48: Intrazelluläre Lokalisation von endogenem Nucleostatmin in HeLa Zellen nach RNase A-Behandlung. A) zeigt HeLa Zellen die 120 Minuten mit RNase A behandelt wurden. Für die indirekte

Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Antikörper A13 und NOH61-2.1 verwendet. In B) sind die unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne RNase A behandelten Kontrollzellen zu sehen. Als Vergleichsprotein wurde die RNA-Helikase NOH61 verwendet. Die DNA wurde mit DRAQ5 (blau) angefärbt.

Es zeigte sich in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie (Abb.3.48 A), dass das Nucleostatmin Protein ebenso wie NOH61 in Nucleoli praktisch nicht mehr nachweisbar ist. Hingegen zeigen Kontrollzellen (Abb.3.48 B), die der gleichen Behandlung unterzogen wurden, jedoch ohne RNase A, eine nukleoläre Lokalisation beider Proteine. Daraus lässt sich schließen, dass das Nucleostatmin Protein ebenso wie die RNA-Helikase NOH61 ein RNA-bindendes Protein ist und das RRM seine Funktion als RNA-bindende Domäne auch tatsächlich ausübt.

3.2.3.15 Flag-markiertes Nucleostatmin lokalisiert überwiegend im Nukleoplasma

Für das YFP-Nucleostatmin-mut C Protein wurde eingangs (siehe 3.1) beschrieben, dass es im Nukleoplasma in Kernpunkten lokalisiert. Es stellte sich heraus, dass es im C-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz mutiert ist, und die dort vermutete NoLS nicht besitzt, was die nicht nukleoläre Lokalisation erklärt.

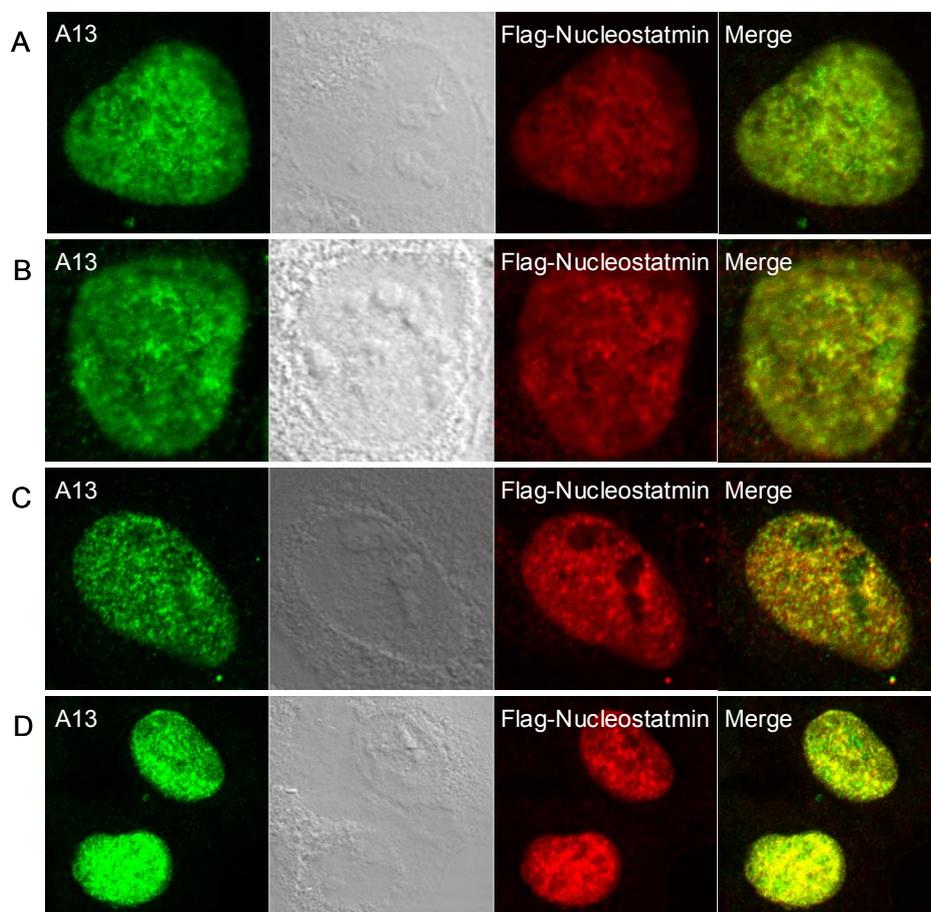


Abb3.49: Intrazelluläre Lokalisation von Flag-Nucleostatmin in U2OS Zellen. In den Abbildungen A) bis D) sind verschiedene U2OS Zellen zu sehen. Zur indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Antikörper A13 und anti-Flag verwendet. Die DNA wurde mit DRAQ5 (blau) angefärbt.

Wegen der Verwendung der mutierten Nucleostatmin cDNA wurde es notwendig, vom NIH einen nicht mutierten Nucleostatmin cDNA Klon zu erhalten. Hiermit wurde nun analysiert, wo sich dieses im Zellkern als Flag-markiertes Protein befinden würde. Zu diesem Zweck wurden U2OS Zellen mit dem Expressionsvektor des Flag-Nucleostatmin Proteins transfiziert und bezüglich Lokalisation in Immunfluoreszenzstudien analysiert (Abb.3.49). Überraschenderweise lokalisierte auch das Flag-Nucleostatmin Protein in der überwiegenden Anzahl transfizierter Zellen nicht wie das endogene Nucleostatmin im Nukleolus, sondern granulär bis diffus verteilt im Nukleoplasma. Für diese Studien wurde der anti-Flag Antikörper zur Markierung des Flag-Nucleostatmin Proteins zusammen mit dem A13 Antikörper zur Erkennung des endogenen Nucleostatmins verwendet. Der Antikörper A13 erkennt jedoch nicht nur das endogene Nucleostatmin, sondern auch das Flag-markierte Protein, so dass nicht eindeutig erkenntlich ist, ob auch das Flag-markierte Nucleostatmin im Nukleolus lokalisiert. Aus diesem Grund wurde das Flag-markierte Nucleostatmin Protein zusammen mit endogener RNA Polymerase I analysiert. Diese lokalisiert im Nukleolus (siehe auch Abb.3.46) und bietet eine Möglichkeit, das im Nukleolus lokalisierende Flag-Nucleostatmin von dem nukleoplasmatisch lokalisierenden zu unterscheiden. In Abbildung 3.50 A) und B) sind die Immunfluoreszenzstudien dargestellt, in denen sich zeigt, dass das Flag-Nucleostatmin Protein einerseits granulär bis diffus im Nukleoplasma verteilt ist, jedoch auch zusammen mit der endogenen RNA-Polymerase I im Nukleolus lokalisiert.

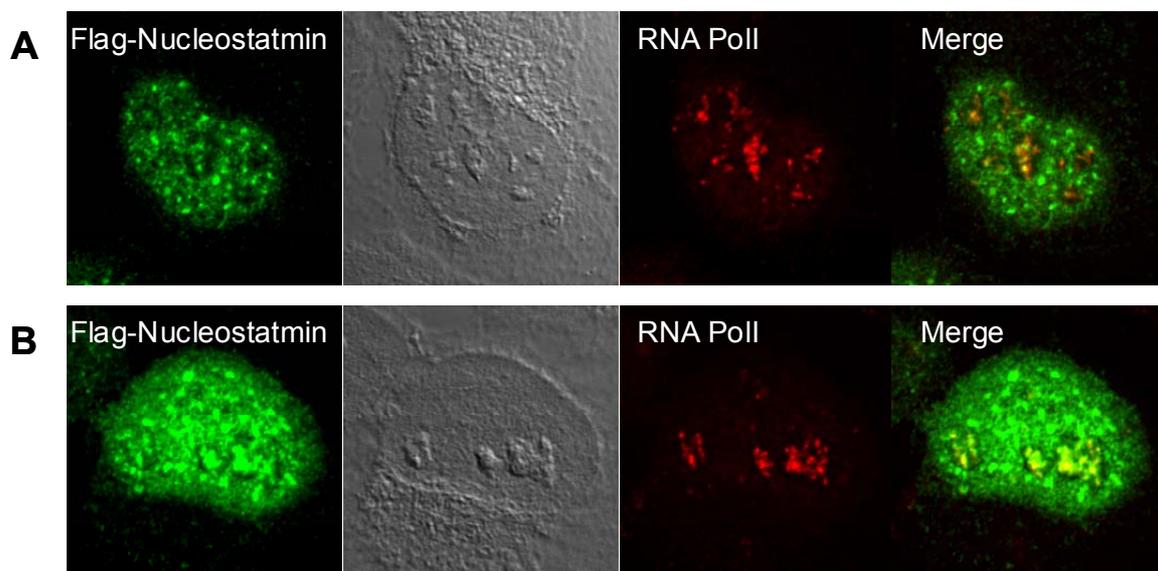


Abb.3.50: Flag-Nucleostamin lokalisiert auch im Nukleolus. In den Abbildungen A) und B) sind U2OS Zellen zu sehen, in denen Flag-Nucleostatmin und endogene RNA Polymerase I sichtbar gemacht wurden. Zur indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wurden monoklonaler anti-Flag Antikörper und anti-RNA Polymerase I Antikörper verwendet. In der rechten Bilderreihe sind die Überlagerungen (Merge) der Proteine zu sehen.

Diese Art der Lokalisation des ektopisch exprimierten Nucleostatmin-Proteins ergab die Frage, ob auch andere endogen im Nukleolus lokalisierenden Proteine überexprimiert diffus bis granulär zum Teil in das Nukleoplasma umverteilt werden. Zu diesem Zweck wurde der Expressionsvektor für Flag-markiertes UBF in U2OS Zellen transient transfiziert und die Zellen in Immunfluoreszenzstudien analysiert (Abb.3.51). Überraschenderweise zeigte sich auch für dieses Protein eine überwiegend granuläre und diffuse Lokalisation (Abb. B und C) innerhalb des Zellkerns und nur wenige Zellen, die Flag-UBF auch im Nukleolus aufwiesen (Abb.3.51 A). Weshalb diese Proteine, die endogen im Nukleolus lokalisieren, ektopisch exprimiert nicht vorzugsweise im Nukleolus zu finden sind, bleibt zu analysieren. Möglicherweise gibt es keine freien Bindungsstellen für exogen exprimierte Proteine oder können erst nach längerer Zeit sichtbar gemacht werden.

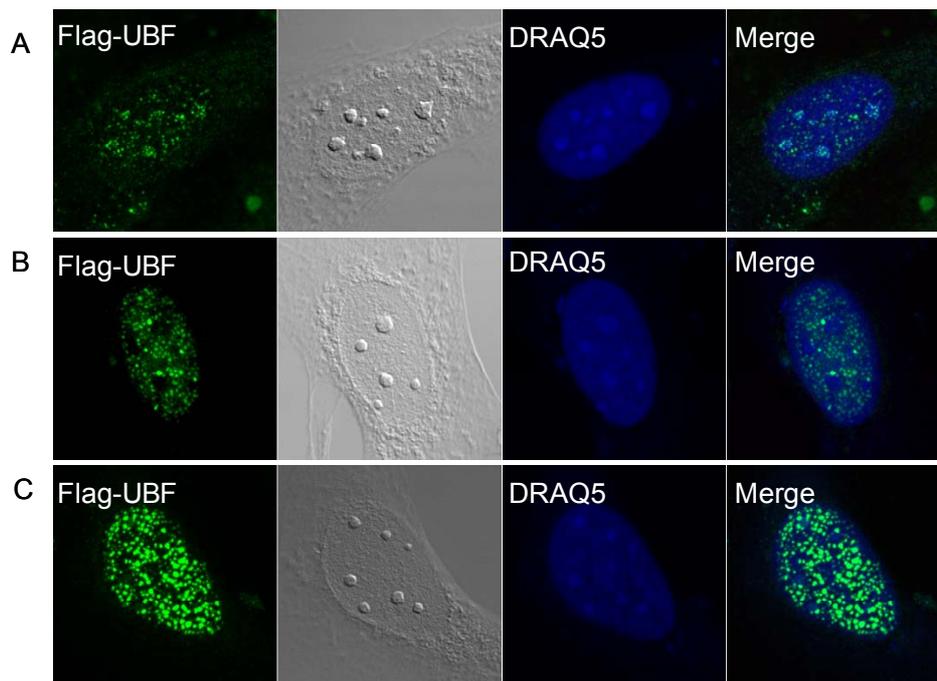


Abb3.51: Intrazelluläre Lokalisation von Flag-UBF in U2OS Zellen. In den Abbildungen A) bis C) sind verschiedene U2OS Zellen zu sehen, die Flag-UBF exprimieren. Für die indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wurde der anti-Flag Antikörper eingesetzt. Die DNA wurde mit DRAQ5 (blau) angefärbt. „Merge“ zeigt die Überlagerung der Bilder.

3.2.3.16 Wirkungsweise genotoxischer Stressoren auf endogenes Nucleostatmin

Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation des endogenen Nucleostatmins und des Flagmarkierten Nucleostatmins bzw. des YFP-Nucleostatmin-mutC Proteins, war es von Interesse zu wissen, ob und wenn ja welcher Stimulus oder Stressfaktor das endogene Nucleostatmin veranlasst, nicht mehr nukleolär, sondern nucleoplasmatisch zu lokalisieren. In diesem Zusammenhang wurden mehrere genotoxische Stressoren auf ihre Wirkungsweise in Bezug auf das Nucleostatmin Protein getestet. Am Beispiel einiger Proteine wurde von Rockel und von Mikecz 2002 bereits gezeigt, dass die Proteasom-abhängige Prozessierung von nukleären Proteinen zu Veränderungen in ihrer subnukleären Lokalisation führen kann. PML z. B. akkumuliert nach Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren im Nucleoplasma, wohingegen die beiden nukleolären Proteine Fibrillarin und UBF keine Veränderung in ihrer Lokalisation nach einer 24-stündigen Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor Lactacystin erfahren. In Abbildung 3.52 ist dargestellt, dass dies auch auf Nucleostatmin zutrifft. Selbst nach 24-stündiger Behandlung mit Lactacystin verbleibt das Nucleostatmin Protein im Nucleolus, wohingegen das Kontrollprotein PML im Nucleoplasma z.T. sogar am Rand von Nucleoli akkumuliert.

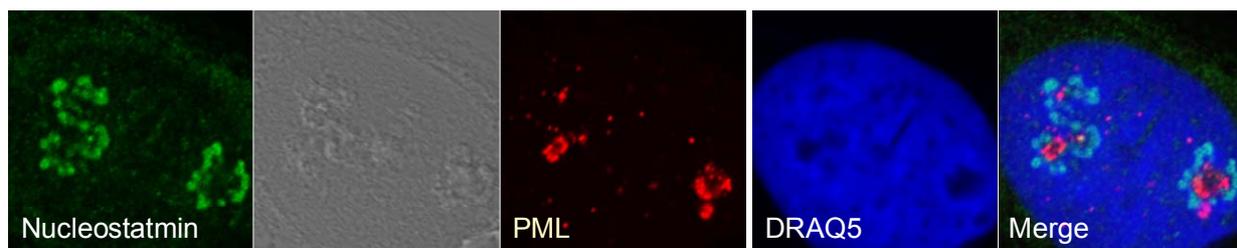


Abb.3.52: Nucleostatmin-Lokalisation nach Proteasominhibition. U2OS Zellen wurden 24 Stunden mit 5 μ M Lactacystin behandelt. Für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurden der A13 Antikörper zur Erkennung des endogenen Nucleostatmin Proteins und der PG-M3 Antikörper zur Erkennung des endogenen PML Proteins eingesetzt. Die DNA wurde mit DRAQ5 (blau) angefärbt. „Merge“ zeigt die Überlagerung der Bilder.

Adriamycin, das dem Adenosin-Analog Doxorubicin entspricht, ist eine Substanz, die sowohl die DNA Replikation als auch DNA und RNA Polymerasen blockiert. Es wird vermutet, dass der zytotoxische Effekt auf der Interkalation von Adriamycin zwischen Nukleotide basiert.

Die Behandlung von Zellen mit Adriamycin (Doxorubicin) führt zum Zerfall des Nukleolus (Granick, 1975a; Granick, 1975b; Scheer et al., 1984).

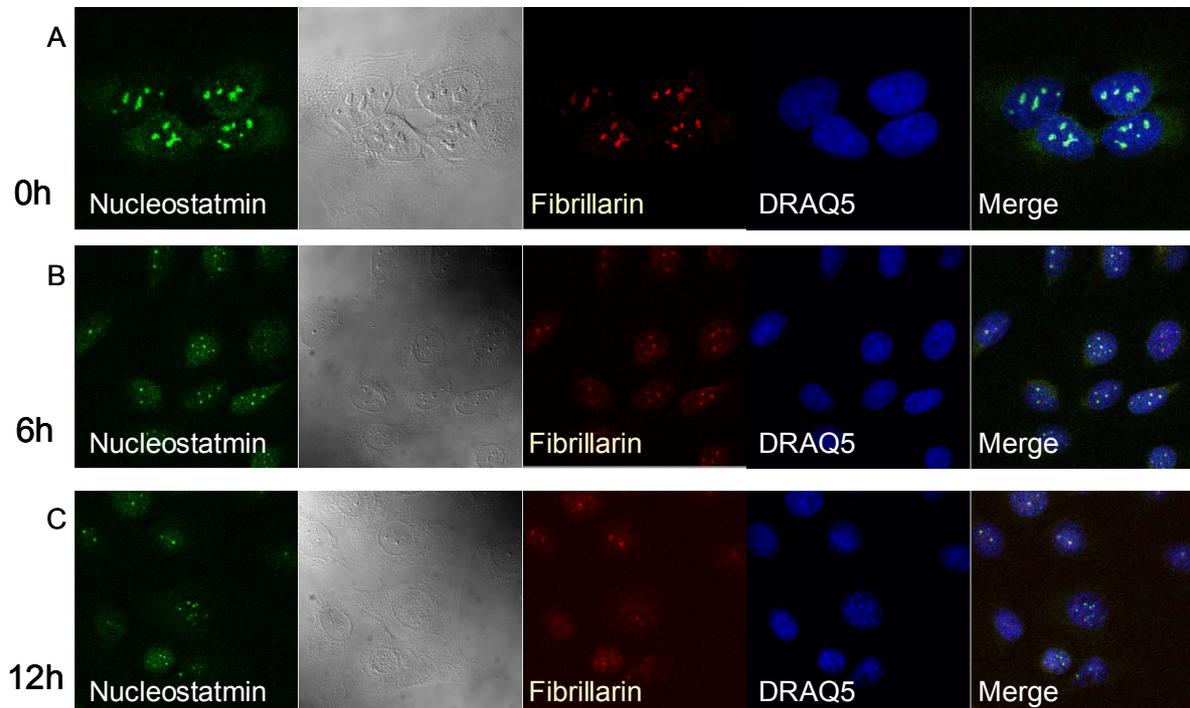


Abb.3.53: Nucleostatmin verbleibt bei Zerfall des Nukleolus in dessen Bruchstücken. U2OS Zellen wurden A) 0, B) 6 und C) 12 Stunden mit Adriamycin (1:2000; Stocklösung: 1µg/µl) behandelt. Für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurden der A13 Antikörper zur Erkennung des endogenen Nucleostatmins und ein Antikörper zur Erkennung des endogenen Fibrillarin-Proteins eingesetzt. Die DNA wurde mit DRAQ5 (blau) angefärbt. „Merge“ zeigt die Überlagerung der Bilder.

In Abbildung 3.53 ist dargestellt, wie der Nukleolus unter Adriamycin-Behandlung innerhalb von 12 Stunden (Zeitpunkt Null (Abb. A: 0h), nach 6 Stunden (Abb. B:6h) und nach 12 Stunden (Abb. C: 12h) zerfällt. Zu jedem der Zeitpunkte verbleibt Nucleostatmin in den Bruchstücken des Nukleolus, und dies ist auch im Phasenkontrast zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigt Fibrillarin, das hier als Kontrollprotein diente, eine immer diffuser werdende Verteilung (Kill, 1996). Cis-Diamminedichloroplatinum(II) (Cisplatin oder cis-DDP) ist eine Substanz, die DNA schädigt, indem sie diese quervernetzt. Die Cisplatin-DNA Komplexe binden irreversibel an DNA-Reparaturproteine. Cisplatin inhibiert die Synthese ribosomaler RNA (Jordan and Carmo-Fonseca, 1998). In Abbildung 3.54 ist dargestellt, wie der Nukleolus unter Cisplatin-Behandlung innerhalb von 12 Stunden (Zeitpunkt Null (Abb. A: 0h) und nach 12 Stunden (Abb. B: 12h) sein Erscheinungsbild verändert und

möglicherweise zerfällt. Jedoch verbleibt Nucleostatmin auch hier in den abgerundeten Nucleoli (siehe auch das Phasenkontrastbild), während Fibrillarin, das hier als Kontrollprotein diente, sich wie ein Ring am Rand der abgerundeten Nucleoli sammelt und auch außerhalb der Nucleoli-Strukturen zu sehen ist.

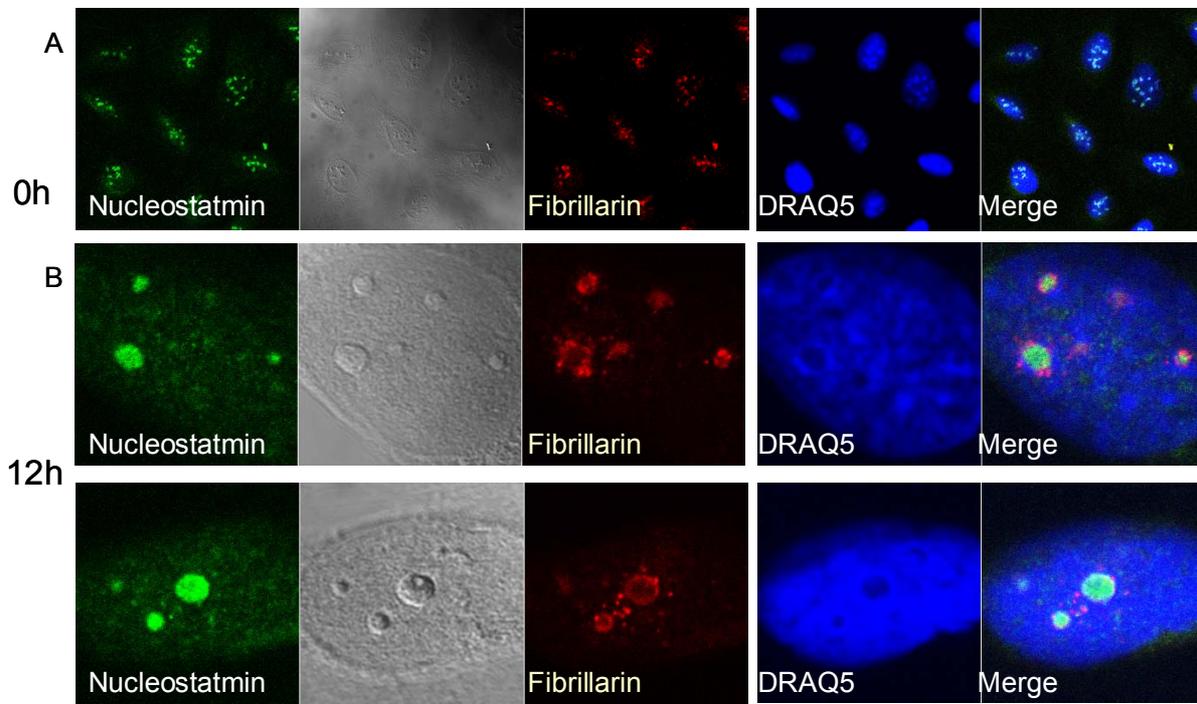


Abb.3.54: Nucleostatmin verbleibt unter Cisplatin-Behandlung in den sich abrundenden Nucleoli. U2OS Zellen wurden A) 0 und B) 12 Stunden mit Cisplatin (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) behandelt. Für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurden der A13 Antikörper zur Erkennung des endogenen Nucleostatmin Proteins und ein Antikörper zur Erkennung des endogenen Fibrillarin Proteins eingesetzt. Die DNA wurde mit DRAQ5 (blau) angefärbt. „Merge“ zeigt die Überlagerung der Bilder.

Als in diesem Zusammenhang letzte Substanz wurde Actinomycin D (AMD) verwendet, das in geringen Konzentrationen bevorzugt die DNA-abhängige RNA-Synthese der RNA-Polymerase I inhibiert, ab 5 mg/ml die Transkription aller RNA-Polymerasen. U2OS Zellen wurden 6 Stunden mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AMD behandelt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb.3.55). Abbildung 3.55 A zeigt eine Übersicht der AMD-behandelten U2OS Zellen, von denen 2 in Abschnitt B vergrößert dargestellt sind. Es zeigt sich, dass nach einer 6-stündigen AMD-Behandlung, die RNA Polymerase I in den Bruchstücken des Nucleolus verbleibt, wie im Phasenkontrast zu sehen ist. Das Nucleostatmin Protein hingegen ist diffus im Zellkern verteilt. Zusammenfassend kann in diesem Zusammenhang gesagt werden, dass Nucleostatmin eine mögliche Funktion in der rRNA Transkription ausübt, die in direktem Zusammenhang mit einer RNA-Bindung steht.

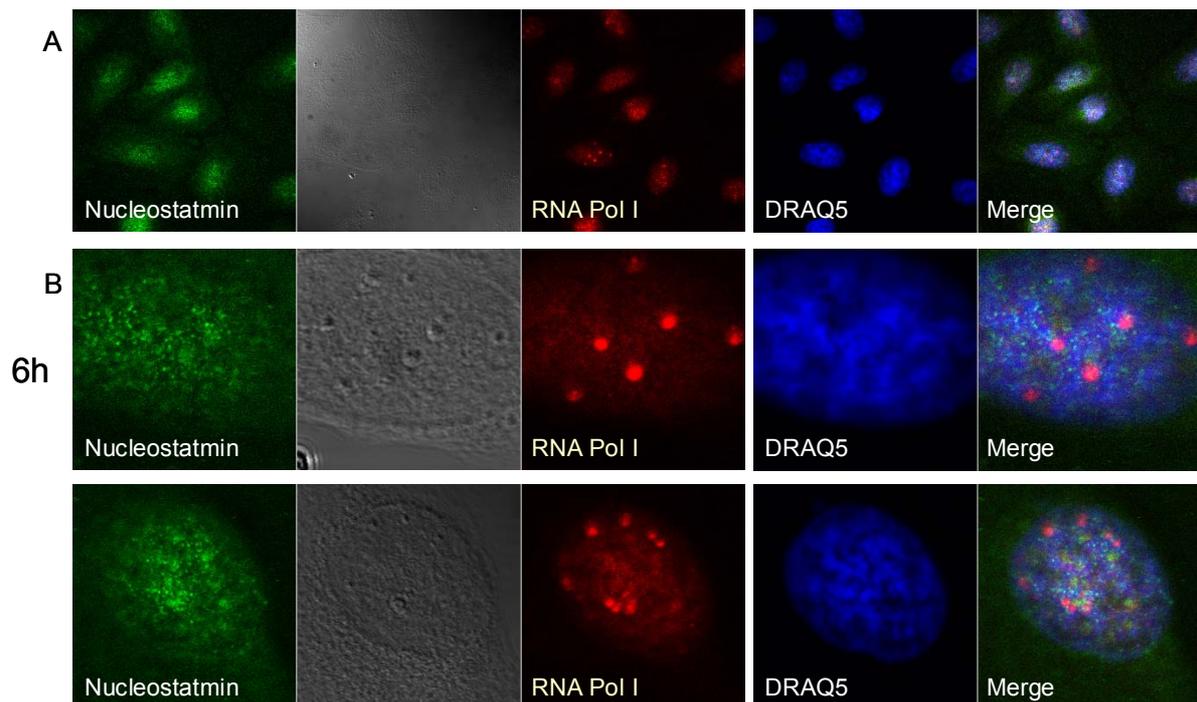


Abb.3.55: Nach Inhibierung der RNA Polymerase I lokalisiert Nucleostatmin diffus im Nukleoplasma. U2OS Zellen wurden 6 Stunden mit Actinomycin D (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) behandelt. A) zeigt eine Übersicht der behandelten Zellen, B) zeigt die Vergrößerung von zwei Einzelzellen. Für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurden der A13 Antikörper zur Erkennung des endogenen Nucleostatmin Proteins und ein humanes Antiserum zur Erkennung der RNA Polymerase I eingesetzt. Die DNA wurde mit DRAQ5 (blau) angefärbt. „Merge“ zeigt die Überlagerung der Bilder.

IV. Diskussion

Der Zellkern eukaryotischer Zellen zeichnet sich durch zahlreiche, morphologisch unterschiedliche Strukturen aus, die als nukleäre Kompartimente bezeichnet werden (Dandl, 2001). Zu ihnen gehören u. a. auch verschiedene nukleäre Domänen, wie der Nukleolus und die PML-(Promyelozytische Leukämie) Kerndomänen.

Die seit langem bekannte Hauptaufgabe des Nukleolus liegt in der Biogenese der Ribosomen (Birnstiel and Hyde, 1963; Brown and Gurdon, 1964; Kumar and Warner, 1972; Pederson and Kumar, 1971; Ritossa and Spiegelman, 1965; Warner and Soeiro, 1967). Ergebnisse aktueller Studien weisen jedoch immer mehr darauf hin, dass auch diese subnukleären Kompartimente dynamisch sind und mit anderen Kerndomänen, wie beispielsweise mit Cajal Kernkörpern, in Kontakt stehen (Chen and Huang, 2001; Lyon et al., 1997).

PML-Kerndomänen stellen ebenfalls dynamische subnukleäre Strukturen dar, die bei der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose, der Transkriptionskontrolle sowie der Tumorsuppression und der zellulären, antiviralen Antwort eine wichtige Rolle spielen. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass das PML-Protein integraler Bestandteil dieser Strukturen und für deren Existenz essentiell ist ((Jensen et al., 2001), und zitierte Referenzen). Von den über 40 bisher gefundenen Proteinen, die sich zeitweise oder auch dauerhaft in den dynamischen PML-Kernkörpern aufhalten, haben viele, wie z.B. p53, Daxx, HIPK2 und CBP, eine wichtige Funktion bei den oben genannten zellulären Prozessen, welche durch die Assoziation mit den PML-Kerndomänen moduliert werden können (Salomoni and Pandolfi, 2002). Eine große Anzahl dieser Proteine sind Regulatoren der Transkription, d.h. Koaktivatoren, Korepressoren und Transkriptionsfaktoren (Alcalay et al., 1998; Boisvert et al., 2001; Khan et al., 2001a; Khan et al., 2001b; von Mikecz et al., 2000; Wu et al., 2001).

Das Ziel dieser Dissertation war es, zwei neue Kerndomänen assoziierte Komponenten zu charakterisieren und zu prüfen, ob diese mit PML-Kerndomänen oder anderen Kerndomänen assoziiert sind. Diese Studien sollten einen Beitrag zu einem besseren Verständnis und zur Aufdeckung von Signalwegen, die anscheinend von diesen subnukleären Kompartimenten ausgehen, leisten.

4.1 Identifizierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine

Zur Identifizierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine stehen verschiedene methodische Lösungsansätze zur Verfügung. Diese reichen von der gezielten Suche nach direkten Interaktionspartnern von bereits identifizierten Kerndomänen Proteinen bis hin zu dem methodischen Lösungsansatz, der für diese Arbeit gewählt wurde. Neue, bisher nicht charakterisierte proteinkodierende Abschnitte, von in Sequenzdatenbanken bis zu diesem Zeitpunkt nicht annotierten cDNAs, wurden mit EYFP fusioniert, in humanen Zelllinien exprimiert und im Hinblick auf ihre subzelluläre Lokalisation analysiert (Simpson et al., 2000). Durch diesen einfachen und direkten Lösungsansatz konnten am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg zwei neue Kerndomänen assoziierte Proteine, (DKFZphfbr2_2305 (Nr.1;Nucleostatmin genannt) und DKFZphamy2_1 21g18 (Nr.9; PAROT genannt), identifiziert werden, die im Verlauf dieser Arbeit genauer charakterisiert und analysiert wurden.

4.2 Charakterisierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine

Bei der Charakterisierung neuer, unbekannter Proteine wurde mit der Computer-basierten Analyse ihrer Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz begonnen, da durch mögliche Sequenzhomologien in der Regel Hinweise auf die zelluläre Funktion dieser Proteine erhalten werden können. Durch zahlreiche Datenbankanalysen hat sich dabei gezeigt, dass es sich bei einem der beiden Proteine, dem sog. PAROT-Protein, sehr wahrscheinlich um einen Repressor der Transkription und bei dem anderen Protein, vorläufig mit Nucleostatmin bezeichnet, um ein potentiell RNA-bindendes Protein handelt.

4.2.1 Das PAROT-Protein und seine Domänen

In dieser Arbeit konnte zunächst anhand von Datenbankanalysen ermittelt werden, dass es sich bei dem PAROT-(PML-assoziierter Repressor der Transkription) Protein aufgrund seiner Domänenstruktur sehr wahrscheinlich um einen Repressor der Transkription handelt (Abb.3.2 bis 3.5), der im N-terminalen Bereich eine sog. KRAB-(*Krüppel associated Box*) Box aufweist und zu der „multiple-adjacent“-C2H2-Zinkfinger Proteinfamilie gehört (Bellefroid et al., 1991; Iuchi, 2001). Des weiteren befinden sich im C-terminalen Bereich innerhalb der Zinkfinger-Domäne drei mögliche Kernlokalisierungssignale (NLS; Abb.3.3). Die C2H2-Zinkfinger Proteinfamilie ist eine der größten, von der jedes Mitglied mehrere hintereinander

geschaltete Zinkfinger motive aufweist, die durch die Komplexierung eines Zink-Ions durch zwei Cystein- und zwei Histidinreste eine fingerartige Struktur ausbilden (Abb.1.4; (Iuchi, 2001; Jacobs, 1992)). Etwa ein Drittel dieser Familie sind Transkriptionsregulatoren, die eine KRAB-Box aufweisen und eine große Rolle beispielsweise in der Differenzierung, der embryonalen Entwicklung und der Hämatopoese spielen (Han et al., 1999; Nakamura et al., 2004).

Die in der Literatur zahlreich beschriebenen Eigenschaften sowohl der KRAB- als auch der C2H2-Zinkfinger-Domäne, konnten anhand der Datenbankanalysen und durch Sequenzvergleiche für das PAROT-Protein sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Aminosäureebene belegt werden. So weist das PAROT-Protein in der KRAB-A Box der zweigeteilten KRAB-Domäne (Abb.3.4) spezifische Aminosäureabfolgen (DV und MLE) auf, die für die Interaktion von KRAB-Proteinen mit dem Korepressor TIF1 β essentiell sind (Abrink et al., 2001; Peng et al., 2000; Witzgall et al., 1994). Ebenso enthält es zwei Sequenzabschnitte innerhalb der KRAB-A und KRAB-B Boxen, die nach Strukturvoraussage-Programmen je eine geladene, amphipatische, α -helikale Struktur ausbilden (Collins et al., 2001).

Die Linker-Domäne, die sich zwischen der KRAB-Domäne und dem ersten Zinkfingermotiv befindet, ist der Teil der Zinkfinger-Proteine, der den höchsten Grad an Sequenzvariation aufweist. Sequenzähnlichkeiten in dieser Region werden daher als weiteres Kriterium verwendet, um die KRAB-Zinkfinger Proteine ihrerseits in Subfamilien einzuteilen (Mark et al., 2001). Die ZNF91-Proteinfamilie bildet bisher die größte bekannte Subfamilie mit bis zu 80 Mitgliedern (Bellefroid et al., 1993). Auch das PAROT-Protein ist aufgrund seiner Sequenzhomologie zu dem Zinkfinger-Protein 85 der ZNF91-Proteinfamilie zuzuordnen.

Die Analyse der Zinkfinger-Domäne des PAROT-Proteins zeigte, dass diese aus 8, im gleichen Abstand nebeneinander liegenden C2H2-Zinkfinger motiven besteht, die alle bisher bekannten und in der Literatur beschriebenen Eigenschaften aufweisen (Abb.3.5). Bindungsstudien in einem sog. SAAB-(*selection and amplification of binding sites*) Assay wurden jedoch abgebrochen, da wegen der Vielzahl an Zinkfingern mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten die Chance, mit dieser Methode die Konsensussequenz für die DNA-Bindung zu erhalten, als zu gering erachtet wurde.

Mit Hilfe der CELERA Datenbank konnte das *PAROT*-Gen auf Chromosom 19 in der Zytobande p13.11 kartiert werden (Abb.3.6). Das Chromosom 19 ist bekannt dafür, dass es eine Vielzahl an Genen trägt, die für Krüppel-Zinkfinger Proteine kodieren (Ashworth et al.,

1995; Hoovers et al., 1992; Lichter et al., 1992; Rousseau-Merck et al., 1993; Tommerup and Vissing, 1995). So wurden bisher auch die Gene der meisten Mitglieder der ZNF91-Proteinfamilie in großen Bereichen hintereinander liegend auf dem Chromosom 19 gefunden (Bellefroid et al., 1993). Zusätzlich zu der chromosomalen Lokalisation konnte auch die genomische Organisation des *PAROT*-Gens bestimmt werden. Die kodierende Region ist auf vier Exons verteilt, wobei das Start-Kodon am Ende des ersten Exons liegt, Exon 2 und 3 die beiden KRAB-Boxen und das vierte Exon sowohl die Linker- als auch die Zinkfinger-Domäne kodiert. Diese Anordnung korrespondiert sehr gut mit den genomischen Organisationen anderer KRAB-Zinkfinger Proteine (Lange et al., 1995; Mark et al., 2001; Odeberg et al., 1998; Rippe et al., 1999; Shannon et al., 1998; Watson et al., 2000).

Northern Blot Analysen gaben einen Hinweis darauf, dass die *PAROT*-mRNA als ein 4.4 kb Transkript in verschiedenen Geweben wie Gehirn, Skelettmuskel, Niere und Dickdarm exprimiert wird. Zwei zusätzliche Transkripte von ca. 6.0 kb im Gehirn und in der Plazenta bzw. 1.9 kb in der Plazenta wurden markiert, was auf die Existenz und Expression unterschiedlicher Spleißvarianten hindeutet (Abb.3.7). Diese Studien schließen jedoch nicht aus, dass die *PAROT*-mRNA auch in weiteren Geweben exprimiert wird, zumal EST-Datenbank Analysen darauf hinweisen. In dieser Hinsicht sind zusätzliche Experimente in Form von Northern Blot Analysen und RT-PCR notwendig, um die Expression des *PAROT*-Gens in weiteren Geweben auszuschließen bzw. bestätigen zu können.

Wie sich bereits in ersten Immunfluoreszenzstudien gezeigt hat, lokalisiert das EYFP-*PAROT* Fusionsprotein im Nukleus (Abb.3.1). Anhand verschiedener Deletionsmutanten, die als GFP-Fusionsproteine in 293T Zellen exprimiert wurden (Abb.3.8), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die nukleäre Lokalisation des *PAROT*-Proteins sowohl durch die Zinkfinger-Domäne, in der sich auch die drei potentiellen NLSs befinden, als auch durch die Linker-Domäne bestimmt wird (Abb.3.9). Dabei wurden alle Deletionen, die entweder die Linker-Domäne, die Zinkfinger-Domäne oder beide enthalten, in den Zellkern transportiert. Ausgeschlossen davon ist allein die KRAB-Domäne, die keine NLS enthält. Die Linker-Domäne enthält ebenfalls keine offensichtlichen Kernlokalisierungssignale, gelangt jedoch trotzdem in den Zellkern. Das lässt auf ein mögliches kryptisches Kernlokalisierungssignal schließen, oder wird durch eine Interaktion mit einem anderen Protein vermittelt, durch das die Linker-Domäne in den Zellkern gelangt. Generelle Interaktionspartner für diese Domäne sind bisher nicht bekannt, zumal es sich bei der Linker-Domäne auch um die Region mit der größten Variabilität innerhalb dieser Proteinfamilie handelt. Einen möglichen Aufschluss

könnte beispielsweise ein Hefe 2-Hybrid-Assay liefern, in dem die Linker-Domäne als Lockvogel einzusetzen wäre.

Die transkriptionelle Repressoraktivität des PAROT-Proteins, der KRAB-Domäne alleine und einer Δ KRAB-Deletionsmutante wurde in einem Luciferase-Assay in dieser Arbeit getestet (Abb.3.10). Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem PAROT-Protein tatsächlich um einen Repressor der Transkription handelt, der dosisabhängig die Transkription des *Luciferase*-Gens reprimiert. Das gleiche zeigte sich für die KRAB-Domäne alleine, wobei diese sogar eine fast doppelt so starke Repression des *Luciferase*-Gens zur Folge hatte in Vergleich zum PAROT-Protein mit voller Länge. Interessanterweise reprimiert auch die Δ KRAB-Deletionsmutante, was ein Hinweis darauf ist, dass über die Linker-Domäne sehr wahrscheinlich Protein-Protein Interaktionen stattfinden, die einen Repressorkomplex rekrutieren.

Wie an anderer Stelle bereits erwähnt, wurde in der Literatur mehrfach die direkte Interaktion von KRAB-Zinkfinger Proteinen mit dem Korepressor TIF1 β beschrieben. Peng et al. (2000) konnten zeigen, dass die KRAB-Domäne vermutlich einen tetrameren Komplex mit drei TIF1 β -Proteinen ausbildet, was die Rekrutierung von verschiedenen Proteinen, u. a. aus der Heterochromatin Protein 1-(HP1) Proteinfamilie, zur Folge hat. Ein überarbeitetes Modell dieses Repressorkomplexes wurde 2003 von Raul Urrutia veröffentlicht (siehe Abschnitt 1.2.4). In dieser Arbeit konnte nun in Immunfluoreszenzstudien gezeigt werden (Abb.3.11), dass auch das PAROT-Protein als EYFP-Fusionsprotein mit den Flag-markierten Proteinen der HP1-Proteinfamilie HP1 α , HP1 β , HP1 γ und TIF1 β in U2OS Zellen kolokalisiert. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass auch das PAROT-Protein mit TIF1 β über die KRAB-Domäne interagiert, so dass sich ein Repressorkomplex aufbaut, der die Transkription bestimmter Gene reprimiert. Welche(s) Gen(e) durch das PAROT-Protein reprimiert wird/werden und auch die Art der Interaktion der verschiedenen Proteine, die in den Repressorkomplex rekrutiert werden, muss jedoch durch weitere Experimente wie beispielsweise Immunpräzipitationen und Bindungsstudien verifiziert werden, um den Mechanismus der Repression im Detail verstehen zu können.

4.2.2 Die Assoziation von PAROT an PML-Kerndomänen

Das ektopisch exprimierte PAROT-Protein lokalisiert in Kerndomänen, bei denen es sich um PML-Kerndomänen handelt. Dies konnte anhand von Immunfluoreszenzstudien in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Rekrutierung erfolgt dabei offensichtlich durch eine spezifische

Interaktion mit der PML-Isoform PML IV, denn die PML-Isoform PML III rekrutierte das PAROT-Protein nicht in PML-Kerndomänen (Abb.3.12). Auch wenn das PML-Protein, ebenso wie TIF1 β zu der RBCC/TRIM-Proteinfamilie gehört (siehe dazu Abschnitt 1.2.1 und zitierte Referenzen), ist es sehr wahrscheinlich, dass die PAROT-PML IV Interaktion nicht über die gleiche Protein-Protein Interaktion stattfindet, die der TIF1 β -KRAB-Zinkfinger Protein Interaktion zugrunde liegt. Zum Einen konnte bereits gezeigt werden, dass diese Interaktion spezifisch für den Korepressor TIF1 β und KRAB-Zinkfinger Proteine ist (siehe dazu Abschnitte 1.2.3 und 1.2.4 und zitierte Referenzen). Zum Anderen besitzen alle Mitglieder der PML-Proteinfamilie die RBCC-Domäne, so dass auch die PML-Isoform PML III das PAROT-Protein in PML-Kerndomänen rekrutieren müsste, fände die Interaktion dieser Proteine über die KRAB- und RBCC-Domänen statt. Eine weitere Immunfluoreszenzstudie mit einem anderen KRAB-Zinkfinger Protein, KRIM-1A, unterstützen die Interpretation dieser Ergebnisse. So wird auch KRIM-1A durch PML IV, jedoch nicht durch PML III in PML-Kerndomänen rekrutiert (Abb.3.13). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PML IV, nicht jedoch PML III, mit TIF1 β kolokalisiert (Abb.3.14). Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass PML generell die Lokalisation von KRAB-Zinkfinger-Proteine regulieren kann, wobei diese These durch zusätzliche Interaktions- und Kolokalisationsstudien mit weiteren KRAB-Zinkfinger-Proteinen belegt werden müsste. Diese ersten Ergebnisse geben jedoch Grund zur Annahme, dass die PML-Isoform PML IV bei der Repression der Transkription durch KRAB-Zinkfinger-Proteine zumindest bei der durch das PAROT-Protein vermittelten, beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde zunächst der Frage nachgegangen, über welche Domäne PML IV das PAROT-Protein in PML-Kerndomänen rekrutiert. Zumindest einen Hinweis darauf, dass die PAROT-PML IV Interaktion sehr wahrscheinlich über die Linker-Domäne stattfindet, geben die zur Beantwortung dieser Frage angefertigten Immunfluoreszenzbilder in Abbildung 3.15. Von den verschiedenen Deletionsmutanten (siehe auch Abb.3.8), die als GFP-Fusionen zusammen mit PML IV in U2OS Zellen koexprimiert wurden, kolokalisieren alle Deletionsmutanten, welche die Linker-Domäne enthalten, mit PML IV. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die bereits an anderer Stelle mehrfach erwähnten Tatsachen, dass die KRAB-Domäne spezifisch mit der RBCC-Domäne von TIF1 β interagiert und die hintereinandergeschalteten Zinkfinger-Motive in erster Linie eine DNA-Bindedomäne darstellen (Abschnitt 1.2.4). Weitere Studien wie beispielsweise Immunpräzipitationen der einzelnen Deletionsmutanten und PML IV sollten einen eindeutigen Aufschluss dieser Interaktion liefern.

All diese Studien weisen darauf hin, dass das PML-Protein einen Einfluss auf die Funktion des PAROT-Proteins hat. Wie in dieser Arbeit bereits belegt werden konnte, handelt es sich bei dem PAROT-Protein um einen Repressor der Transkription, der mit PML-Kerndomänen assoziiert ist. Daraus ist zu schließen, dass das PML-Protein möglicherweise einen Einfluss auf die Repressorfunktion des PAROT-Proteins ausübt. Für das Daxx-Protein, bei dem es sich ebenfalls um einen Repressor der Transkription handelt, konnte gezeigt werden, dass es mit PML interagiert und PML die Daxx-vermittelte Repression der Transkription dosisabhängig aufhebt (Li et al., 2000). In dieser Arbeit gaben erste Messung der Luciferaseaktivität einen Hinweis darauf, dass die Koexpression von steigenden Mengen PML IV ebenfalls die PAROT-vermittelte Repression der Transkription aufhebt. Auch dieser Effekt ist offensichtlich spezifisch, da eine Koexpression von PML IV mit Gal4-DBD alleine nur einen schwachen Effekt auf die Reporteraktivität zeigte (Abb.3.16). Diese Ergebnisse stellen weitere Hinweise dar, dass die PML-Kerndomänen eine Rolle bei der Genregulation spielen. So ist es durchaus denkbar, dass die PML-Kerndomänen die Transkription verschiedener Gene nicht nur durch die Rekrutierung von Aktivatoren, sondern auch durch die Inaktivierung von Repressoren wie Daxx oder PAROT und möglicherweise auch andere KRAB-Zinkfinger Proteine durch Rekrutierung über PML begünstigen. Um eine generelle Aussage in diesem Zusammenhang für KRAB-Zinkfinger Proteine zu machen, müssten weitere Experimente mit verschiedenen anderen KRAB-Zinkfinger Proteinen, wie z. B. KRIM-1A, durchgeführt werden.

4.2.3 Das endogene PAROT-Protein

Die ersten und entscheidenden Studien dieser Arbeit wurden mit ektoptisch exprimierten PAROT-Protein durchgeführt. Für den weiteren Verlauf war es jedoch unerlässlich, Antikörper gegen das endogene PAROT-Protein zu generieren, um dieses zunächst im Hinblick auf seine Lokalisation und weiterhin auch auf mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen analysieren zu können. So wurden zunächst Peptidantikörper gegen zwei verschiedene Epitope innerhalb der Linker-Domäne, welche die höchste Sequenzvariation innerhalb der KRAB-Zinkfinger Proteine aufweist, in Kaninchen generiert (Abb.3.17 A). Von diesen beiden erwies sich nur der Antikörper P12 als brauchbar, da dieser sowohl ektoptisch exprimiertes als auch endogenes PAROT-Protein in verschiedenen Zelllinien in Western Blot Analysen erkannte (Abb.3.18). Wie sich in Immunfluoreszenzanalysen zeigte, erkennt dieser Antikörper auch ektoptisch exprimiertes YFP-PAROT Protein in U2OS Zellen sowohl im Nukleus in Kerndomänen als auch in zytoplasmatischen Strukturen. Überraschenderweise

erkannte dieser Antikörper sowohl in transfizierten als auch untransfizierten Zellen zusätzlich zytoplasmatische Strukturen, die denen des ektoptisch exprimierten sehr ähnlich waren (Abb.3.19). Wie sich in weiteren Immunfluoreszenzstudien zeigte, erkannte der Peptidantikörper P12 auch in verschiedenen anderen Zelllinien (WI38, H1299) diese zytoplasmatischen Strukturen (Abb.3.20). Sowohl β -Aktinfilamente, α -Tubulinfilamente und der Golgi-Apparat konnten mithilfe von Antikörpern, die für diese Strukturen spezifische Proteine erkennen, ausgeschlossen und schließlich gezeigt werden, dass es sich bei den zytoplasmatischen Strukturen um Mitochondrien handelt (Abb.3.24). Um einen von dem P12 Antikörper unabhängigen Nachweis für diese unerwartete Lokalisation des endogenen PAROT-Proteins zu erhalten, war es unerlässlich, mindestens einen weiteren Antikörper gegen das PAROT-Protein zu erhalten. Eine zunächst geplante Immunisierung von Hühnern mit dem gesamten PAROT-Protein fusioniert an GST konnte nicht durchgeführt werden, da es nicht gelang, dieses in Bakterien zu exprimieren. Zwei weitere Antikörper gegen nicht überlappende Regionen des PAROT-Proteins wurden aus Hühnereiern von zuvor mit aufgereinigten GST-Linker- bzw. GST-Zinkfinger-Proteinen immunisierten Hühnern isoliert. Diese sollten die Erkenntnisse, die mit Hilfe des Peptidantikörpers gewonnen wurden, unterstützen (Abb.3.17 B). Nachdem beide Antikörper (3b und 5b) in Western Blot Analysen sowohl für GST-Linker als auch für GST-Zinkfinger spezifische Signale erkannten, wurden diese in Immunfluoreszenzstudien eingesetzt. Wie sich herausstellte, erkannten auch diese beiden voneinander unabhängigen Antikörpern das endogene Protein in Mitochondrien in U2OS Zellen (Abb.3.21). Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem von den drei unabhängigen Antikörpern erkannten endogenen Protein um das PAROT-Protein handelt. An dieser Stelle wäre es von Interesse gewesen zu sehen, ob sich die Expression des endogenen PAROT-Proteins durch die Verwendung von siRNA herunterregulieren lässt. Abgesehen davon wäre dies auch ein weiterer Nachweis dafür gewesen, dass das endogene PAROT-Protein tatsächlich ausschließlich oder vorwiegend in Mitochondrien lokalisiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass für den „Knock-down“ in der PAROT-Sequenz nur eine spezifische siRNA in Frage kam, bei der die Wahrscheinlichkeit, dass die PAROT-mRNA abgebaut wird, am größten war. Diese siRNA zeigte jedoch in den ersten Testexperimenten keinen Effekt auf die Expression des ektoptisch exprimierten YFP-PAROT-Proteins. Möglicherweise sind weitere Experimente mit einem anderen siRNA System erfolgreicher. Auch die Überexpression des unmarkierten PAROT-Proteins blieb erfolglos, wobei Mutationen im Expressionsplasmid durch Sequenzierung ausgeschlossen werden konnten. Es

ist denkbar, dass das Protein eine sehr kurze Halbwertszeit hat und proteolytisch sehr schnell nach Synthese abgebaut wird.

Aufgrund der Ergebnisse, dass das ektopisch exprimierte PAROT-Protein hauptsächlich in Kerndomänen und das endogene sehr wahrscheinlich vorwiegend in Mitochondrien lokalisiert, stellte sich die Frage, ob sich in der PAROT-Sequenz möglicherweise ein mitochondriales Signalpeptid verbirgt. Diesbezüglich durchgeführte Datenbankenanalysen führten zu keinem positiven Ergebnis. Einen möglichen Hinweis auf ein kryptisches mitochondriales Zielsignal lieferte jedoch eine von Ventura et al. Anfang des Jahres 2004 veröffentlichte Studie (siehe Abschnitt 3.2.2.14). Das kryptische mitochondriale Zielsignal im N-Terminus (aa 1-32) des p46Shc-Proteins wurde mit dem N-terminalen Bereich (aa 1-32) des PAROT-Proteins verglichen (Abb.3.25). In dem Zielsignal des p46Shc-Proteins sind drei Arginin (R)-Reste zu finden, von denen einer für die mitochondriale Lokalisation dieses Proteins essentiell ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass weitere Aminosäuren, die sich vor dieser Zielsequenz befinden, die mitochondriale Lokalisation dieses Proteins verhindern. In dem Sequenzvergleich in Abbildung 3.25 zeigte sich, dass auch das PAROT-Protein drei Arginin-Reste im N-Terminus vorzuweisen hat. Bisher ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei ebenfalls um ein kryptisches mitochondriales Zielsignal handelt und durch die N-terminale Fusion von YFP/GFP die mitochondriale Lokalisation des PAROT-Proteins verhindert wird. Diese Möglichkeit konnte jedoch anhand von Lokalisationsstudien mit C-terminal markierten Proteinen bzw. mit Fusionsproteinen, die dieses Zielsignal enthalten, in dieser Arbeit nicht mehr analysiert werden. Immerhin wäre es denkbar, dass sich in der Lokalisation des ektopisch exprimierten PAROT-Proteins eine Situation widerspiegelt, die für das endogene Protein nur durch einen bisher unbekanntem Stimulus zu erreichen ist. Dieser muss bewirken, dass das PAROT-Protein von den Mitochondrien in den Zellkern transportiert wird, um dort die Transkription bestimmter Gene zu reprimieren.

4.2.4 Das Nucleostatmin Protein und seine Eigenschaften

Wie an anderer Stelle bereits erwähnt, konnte für den vom DKFZ zur Verfügung gestellten cDNA Klon, der als Nucleostatmin-mutC bezeichnet wurde, anhand der ersten Datenbankanalysen zunächst nur ermittelt werden, dass es sich um ein potentiell RNA-bindendes Protein handelt, das zwei mutmaßliche NLS besitzt (Abb.3.26). Im Verlauf dieser Arbeit zeigten jedoch weitere Datenbankanalysen und Sequenzvergleiche, dass der C-terminale Bereich des Nucleostatmin-mutC Proteins durch eine Leserahmenverschiebung in seiner Aminosäuresequenz artifiziell vermutlich bei der cDNA-Synthese entscheidend

verändert wurde (Abb.3.27). Aus diesem Grund wurde ein zweiter cDNA Klon vom NIH hinzugezogen, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um die *in vivo* existierende Sequenz des Nucleostatmin Proteins handelt, was spätere spezieübergreifende Sequenzvergleiche bestätigten (Abb.3.32). Das von der NIH-cDNA abgeleitete Protein besitzt, ebenso wie das von der DKFZ-cDNA abgeleitete Protein, das RRM und zwei potentielle NLS, zusätzlich jedoch im C-terminalen Bereich eine mutmaßliche NoLS, die darauf hinweist, dass das Protein im Nukleolus lokalisiert (Abb.3.26).

Die in der Literatur ausführlich beschriebenen Eigenschaften des RRM konnten auch für das Nucleostatmin Protein anhand von Datenbankanalysen und Sequenzvergleichen auf Aminosäureebene weitestgehend bestätigt werden (siehe dazu Abschnitt 1.3.4 und zitierte Referenzen). So weist Nucleostatmin sowohl das RNP-1 Oktamer als auch das RNP-2 Hexamer auf, die in die etwa 80 Aminosäuren umfassende strukturell konservierte Region des RRM eingebettet sind, in der sich die 1993 von Berney et al. postulierte RRM Konsensussequenz widerspiegelt (Abb.3.28). Dies ist zumindest ein Hinweis darauf, dass das Nucleostatmin Protein möglicherweise eine Rolle bei der Regulation der rRNA Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene spielt. EMSA Assays mit verschiedenen RNAs wären ein möglicher experimenteller Ansatz, um die Bindungseigenschaften und Wechselwirkungen des Nucleostatmin-RRMs zu analysieren.

Mit Hilfe der CELERA Datenbank konnte das *Nucleostatmin*-Gen auf Chromosom 7 in der Zytobande q21.3 kartiert werden (Abb.3.29). Bisher sind für das Chromosom 7 in dem Bereich dieser Zytobande nicht besonders viele Gene in bezug auf ihre Genprodukte charakterisiert, analysiert und publiziert worden, so dass aus der Lage und den benachbarten Genen des *Nucleostatmin*-Gens kein bedeutender Schluss gezogen werden kann. Wie sich jedoch im weiteren Verlauf der Arbeit herausstellte, entspricht die chromosomale Anordnung des humanen *Nucleostatmin*-Gens der des murinen (Abb.3.31). Auch dieses Gen ist in fünf Exons unterteilt, wobei das Start-Kodon im ersten und das Stop-Kodon im fünften Exon zu finden und das murine *Nucleostatmin*-Gen auf Chromosom 5 in der Zytobande A1-h kartiert ist.

Auch das murine Nucleostatmin-Protein weist ein N-terminales RRM auf, enthält zwei mögliche NLS und im C-terminalen Bereich eine mögliche NoLS, die auf die Lokalisation dieses Proteins im Nukleolus hinweist (Abb.3.30). Diese Daten und zusätzliche Sequenzvergleiche zwischen dem humanen, murinen und dem Nucleostatmin Protein aus *Rattus norvegicus* sowohl auf Nuklein- als auch auf Aminosäureebene unterstützen die

Vermutung, dass es sich bei dem Nucleostatmin-mutC Protein (DKFZ) um eine mutierte Variante des Nucleostatmin Proteins (NIH) handelt (Abb.3.32). Die stärksten Sequenzhomologien zwischen diesen drei Proteinen zeigen sich im N-Terminus im Bereich des RRM und im C-Terminus im Bereich des potentiellen NoLS. Dies unterstützt, wie bereits erwähnt, die Vermutung, dass es sich bei der NIH Sequenz um die *in vivo* existierende Sequenz des Nucleostatmin Proteins handelt.

Northern Blot Analysen gaben einen Hinweis darauf, dass die Nucleostatmin mRNA als ein 2.0 kb Transkript in allen analysierten Geweben bis auf Pankreas und Leber exprimiert wird (Abb.3.33). Ein zusätzliches Transkript wurde im Gehirn markiert, was auf eine mögliche Spleißvariante hindeutet (Abb.3.33). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Nucleostatmin-mRNA auch in Pankreas und Leber exprimiert wird, da die aufgetragene RNA Menge unter Berücksichtigung der β -Aktin Kontrolle offensichtlich nicht in allen Spuren gleich ist. Möglicherweise wird sie auch in weiteren Geweben, d. h. ubiquitär exprimiert, zumal EST-Datenbank Analysen darauf hinweisen. In dieser Hinsicht sind zusätzliche Experimente in Form von Northern Blot Analysen und RT-PCR notwendig, um die Expression in weiteren Geweben evtl. bestätigen bzw. ausschließen zu können.

4.2.5 Endogenes Nucleostatmin Protein lokalisiert im Nukleolus

Für den weiteren Verlauf dieser Arbeit war es unerlässlich, Antikörper gegen das endogene Nucleostatmin Protein zu generieren, um dieses zunächst im Hinblick auf seine Lokalisation und weiterhin auch auf mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen analysieren zu können. Aus diesem Grund wurden Peptidantikörper gegen zwei verschiedene Epitope zwischen dem RRM und der C-terminalen NLS generiert (Abb.3.35 A). Sowohl der A13 als auch der A14 Antikörper erkannten in Immunfluoreszenzanalysen ektopisch exprimiertes Nucleostatmin-mutC Protein in HeLa Zellen (Abb.3.36). In Western Blot Analysen zeigte sich jedoch nur der A13 Antikörper als brauchbar, da dieser sowohl das YFP-markierte (Abb.3.37 C) als auch das Flag-markierte Nucleostatmin-mutC Protein ebenso wie das Flag-markierte Nucleostatmin Protein erkannte (Abb.3.37 B). Um einen von dem A13 Antikörper unabhängigen Nachweis für alle weiteren Ergebnisse, die mithilfe des A13 Antikörpers auch in Bezug auf das endogene Nucleostatmin Protein gewonnen wurden, zu erhalten, war es unerlässlich, mindestens einen weiteren Antikörper gegen Nucleostatmin zu generieren. Dieser wurde aus Hühnereiern von zuvor mit aufgereinigtem GST-Nucleostatmin-mutC Proteinen immunisierten Hühnern isoliert (Abb.3.35 B). Zu diesem Zeitpunkt stand nur das GST-Nucleostatmin-mutC Protein zur Verfügung, so dass nur dieses für die Immunisierungen

eingesetzt werden konnte. Die Antikörper aus zwei verschiedenen Hühnereiern (weißes Ei und braunes Ei) wurden in Western Blot Analysen gegen aufgereinigtes GST-Nucleostatmin-mutC Protein getestet. Es zeigte sich, dass beide Antikörper spezifisch das aufgereinigte Nucleostatmin-mutC Protein erkennen und nicht das GST-Protein wie die Färbung der Blotmembran mit Amidoschwarz belegt (Abb.3.38).

Als nächstes ergab sich die Frage nach der intrazellulären Lokalisation des endogenen Nucleostatmin Proteins. Von den Peptidantikörpern erwies sich diesbezüglich nur der A13 Antikörper als brauchbar. Dieser erkannte sowohl in humanen als auch murinen Zelllinien spezifische Signale, die durch die Antikörper aus Hühnereiern bestätigt werden konnten (Abb.3.39 und 3.40). Der Antikörper ist somit spezifisch und speziesübergreifend einsetzbar.

Wie bereits mehrfach erwähnt, unterscheiden sich das Nucleostatmin-mutC und das Nucleostatmin Protein in ihren C-terminalen Bereich. Für das Nucleostatmin Protein wird laut Datenbankanalysen eine potentielle NoLS vorausgesagt, die das Nucleostatmin-mutC Protein nicht besitzt. Sequenzvergleiche mit bereits experimentell nachgewiesenen NoLS anderer nukleolärer Proteine zeigen zwar keine eindeutige Konsensus-Sequenz, jedoch bestimmte Eigenschaften der Aminosäuren, die auf eine funktionelle NoLS im C-Terminus des Nucleostatmin Proteins hinweisen (Abb.3.43). Die genaue Analyse des endogenen Nucleostatmin Proteins in Immunfluoreszenzstudien zeigte schließlich auch eindeutig, dass dieses Protein in Nukleoli lokalisiert. Kolokalisationsstudien auf endogener Ebene mit Markerproteinen für die drei zu unterscheidenden nukleolären Bereiche zeigten, dass das Nucleostatmin Protein zusammen mit der RNA Pol I und UBF in fibrillären Zentren kolokalisiert (Abb.3.44 bis 3.46). Wie an anderer Stelle bereits beschrieben, ist die RNA Polymerase I verantwortlich für die Transkription der rRNA Gene. Das UBF Protein ist ein wesentlicher Faktor bei der Initiation der Transkription von rRNA Genen. In diesem Zusammenhang und unter Berücksichtigung sowohl der Eigenschaften als auch der Lokalisation des Nucleostatmin Proteins ist es denkbar, dass dieses auf posttranskriptioneller Ebene eine Rolle bei der Transkription von rRNA Genen spielt (siehe dazu Abschnitt 1.3 und zitierte Referenzen). Ob das Nucleostatmin Protein möglicherweise als ein Teil eines Proteinkomplexes eine Rolle bei der Transkription von rRNA Genen spielt, bleibt experimentell anhand von Immunpräzipitation und Protein-Protein Interaktionsstudien zu analysieren. Diese ersten Ergebnisse können jedoch als ein weiterer Hinweis darauf gesehen werden, dass es sich bei der C-terminalen NoLS tatsächlich um ein funktionelles Signal handelt, was ebenfalls beispielsweise anhand von Fusionsproteinen zu analysieren bleibt.

Bisher kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein über die Interaktion mit einem anderen Protein in den Nukleolus gelangt.

Das Nucleostatmin Protein besitzt nach Datenbankanalysen und Sequenzvergleichen ein RRM. In einem experimentellen Ansatz sollte nun auch bestätigt werden, dass es sich hierbei tatsächlich um ein RNA-bindendes Motiv handelt. Zu diesem Zweck wurden HeLa Zellen sowohl einem zweistündigen DNase I- als auch einem RNase A-Verdau unterzogen und in Immunfluoreszenzstudien analysiert. Es zeigte sich, dass sich die Lokalisation des Nucleostatmin Proteins nach dem DNase I-Verdau ebenso wie die des Kontrollproteins NOH61 nicht veränderte (Zirwes et al., 2000). Beide Proteine waren wie in den Kontrollzellen im Nukleolus nachweisbar (Abb.3.47). Demnach bindet auch das Nucleostatmin Protein ebenso wie NOH61 nicht an DNA, zumal hier auch kein DNA-bindendes Motiv gefunden wurde. Im Gegensatz dazu waren sowohl das Nucleostatmin Protein als auch das Kontrollprotein NOH61 nach der RNase A-Behandlung der Zellen nicht mehr im Nukleolus nachweisbar. Im Phasenkontrastbild ist jedoch zu sehen, dass die Nukleoli aller Zellen auch nach der RNase A-Behandlung noch vorhanden waren (Abb.3.48). Dieses Ergebnis ist ein starker Hinweis darauf, dass das Nucleostatmin Protein tatsächlich ein funktionelles RNA-bindendes Motiv besitzt und die Bindung an RNA bewirkt, dass dieses Protein im Nukleolus lokalisiert.

4.2.6 Nucleostatmin und PML-Kerndomänen

Wie an anderer Stelle bereits erwähnt, wurden die ersten experimentellen Analysen mit dem Nucleostatmin-mutC Protein durchgeführt. Dieses Protein lokalisiert in Kerndomänen, bei denen es sich um PML-Kerndomänen handelt. Dies konnte anhand von Immunfluoreszenzstudien in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Rekrutierung erfolgt dabei offensichtlich durch eine spezifische Interaktion mit der PML-Isoform PML IV, wobei die PML-Isoform PML III das Nucleostatmin-mutC Protein nicht in PML-Kerndomänen rekrutiert (Abb.3.34). Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass das endogene Nucleostatmin Protein im Nukleolus und nicht in PML-Kerndomänen lokalisiert (s. o.). Dies konnte eindeutig durch Immunfluoreszenzanalysen in U2OS Zellen (und auch in anderen Zelllinien) sowohl mit endogenem PML Protein als auch mit den ektopisch exprimierten PML-Isoformen PML III und PML IV belegt werden (Abb.3.41). Unterstützt wird dieses Ergebnis durch eine zusätzliche Immunfluoreszenzstudie mit einer weiteren PML-Kerndomänen-Komponente. Endogenes Nucleostatmin Protein kolokalisiert eindeutig nicht mit endogenem Sp100 (Abb.3.42). Dies ließ die Vermutung zu, dass die Lokalisation des

Nucleostatmin-mutC Proteins im Nukleolus möglicherweise dadurch verhindert wird, dass die potentielle NoLS durch die Mutation im C-terminalen Bereich dieses Proteins nicht vorhanden ist. Es ist denkbar, dass die andersartige Lokalisation des Nucleostatmin-mutC Proteins auf eine nukleoplasmatische Funktion des Nucleostatmin Proteins hinweist. Später zeigte sich jedoch zusätzlich noch, dass das dem *in vivo* entsprechenden Nucleostatmin Protein (NIH), sowohl als Flag-markiertes als auch als unmarkiertes Protein ebenfalls nicht vorzugsweise im Nukleolus lokalisiert (Abb.3.49 und 3.50). So lassen die immunfluoreszenzmikroskopischen Bilder in Abbildung 3.49 vermuten, dass die Lokalisation des Nucleostatmin Proteins im Nukleolus möglicherweise von der in der Zelle vorhandenen Menge des Proteins abhängig ist. Es ist denkbar, dass die vorhandenen Bindungsstellen für dieses Protein bereits abgesättigt sind. Dennoch ist das Flag-markierte Nucleostatmin-Protein, wenn auch in einer geringen Anzahl transfizierter Zellen und auch nur partiell, eindeutig im Nukleolus nachweisbar. Dies zeigt sich in der Überlagerung der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Flag-Nucleostatmin und endogener RNA Pol I (Abb.3.50). Die andersartige Lokalisation von ektopisch exprimiertem Nucleostatmin scheint nicht nur dieses Protein zu betreffen. Wird das Flag-markierte UBF Protein, das endogen eindeutig im Nukleolus lokalisiert (siehe Abschnitt 1.3 und zitierte Referenzen), in U2OS Zellen überexprimiert, lokalisiert auch dieses in den wenigsten Zellen im Nukleolus, sondern vorzugsweise granulär bis diffus im Nukleoplasma (Abb.3.51). Möglicherweise ist auch das auf eine Absättigung der Bindungsstellen für UBF zurückzuführen. Daraus ergeben sich mehrere Fragen: (I.) worauf genau ist die nukleoplasmatische Lokalisation des überwiegenden Anteils exogen exprimierter Nucleostatmin und auch UBF Proteine zurückzuführen? (II.) Handelt es sich dabei möglicherweise z. T. auch um PML-Kerndomänen? (III.) Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit dem proteasomalen Abbau von im Übermaß in der Zelle vorhandenen Proteinen? (IV.) Oder hat das Nucleostatmin Protein, was in jedem Fall denkbar ist, auch eine Funktion außerhalb des Nukleolus? Diese und weitere Fragen bleiben zu analysieren.

4.2.7 Nucleostatmin – ein rein nukleoläres Protein?

Zur Beantwortung der zahlreichen Fragen, die sich bezüglich der veränderten Lokalisation der ektopisch exprimierten Nucleostatmin Proteine (Flag-Nucleostatmin/ YFP-Nucleostatmin-mutC) ergaben, wurde das endogene Protein anhand von verschiedenen Stressoren analysiert. Es ist denkbar, dass diese Proteine in nukleoplasmatischen Strukturen akkumulieren, um dem proteasomalen Abbau zugeführt zu werden. Für YFP-Nucleostatmin-mutC konnte gezeigt

werden, dass es mit PML IV kolokalisiert, wobei dies für Flag-Nucleostatmin zu analysieren bleibt. Für PML und einige andere nukleäre Proteine konnte gezeigt werden, dass diese nach der Inhibierung des Proteasoms durch Lactacystin in nukleoplasmatischen Strukturen zusammen mit dem 20S Proteasom akkumulieren. Bisher analysierte nukleoläre Proteine wie Fibrillarin und UBF bleiben davon unbeeinflusst (Chen et al., 2002; Dino Rockel and von Mikecz, 2002). Dies bestätigte sich auch für endogenes Nucleostatmin, das zumindest unter normalen Zellkulturkonditionen scheinbar nicht proteasomal abgebaut wird (Abb.3.52). Möglicherweise ändert sich diese Begebenheit unter veränderten Zellkulturbedingungen wie beispielsweise Virusinfektionen oder Drogenbehandlung. So konnte z. B. für die im Nukleolus lokalisierte Topoisomerase I gezeigt werden, dass diese nach Behandlung mit Camptothecin (eine anti-Tumormedikament) bereits nach etwa 2 Stunden Ubiquitin-abhängig abgebaut wird und nicht erst nach etwa 16 Stunden (Desai et al., 1997).

Der Zerfall des Nukleolus, der mit einer Adriamycin-Behandlung von Zellen einhergeht (Granick, 1975a; Granick, 1975b; Scheer et al., 1984), hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation des Nucleostatmin Proteins. Nucleostatmin verbleibt im Gegensatz zu dem Kontrollprotein Fibrillarin in den Bruchstücken des Nukleolus. Dies zeigt sich besonders in den Phasenkontrastaufnahmen (Abb.3.53). Möglicherweise ist Nucleostatmin an keinem der durch Adriamycin beeinflussten zellulären Prozesse beteiligt. Dies beinhaltet neben der DNA Replikation auch die Funktion von RNA Polymerasen, die ebenfalls durch die Interkalation von Adriamycin als Nukleotid-Analog blockiert werden. Oder die eingesetzte Menge von Adriamycin war nicht ausreichend für einen möglichen Effekt. Das ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, da eindeutig zu sehen ist, dass die Nukleoli durch die Behandlung beeinflusst sind.

Es konnte gezeigt werden, dass endogenes Nucleostatmin mit der RNA Pol I kolokalisiert. Eine Möglichkeit, die Synthese der ribosomalen RNA zu blockieren besteht darin, die DNA durch Cisplatin quervernetzen. Dies führt dazu, dass die RNA Polymerase I Transkriptionsmaschinerie nicht zusammengesetzt werden kann und bereits die Initiation der Transkription von rRNA Genen blockiert ist (Jordan and Carmo-Fonseca, 1998; Jordan et al., 1996). In Abbildung 3.54 zeigt sich, dass Nucleostatmin von dieser Behandlung unbeeinflusst bleibt. Auch wenn sich ein Effekt auf Fibrillarin zeigt, ist es denkbar, dass die eingesetzte Konzentration von Cisplatin (0,5 µg/ml) zu gering war, um einen eindeutigen Effekt auf Nucleostatmin zu erhalten. In der oben erwähnten Publikation wurde eine Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Nucleostatmin entweder keine Funktion in der Initiation der Transkription der RNA Pol I ausübt, bzw. die Funktion des

Nucleostatmin Proteins von den zellulären Folgen der Behandlung durch Cisplatin unbeeinflusst bleibt, oder aber der vermutete Effekt aufgrund der zu geringen Cisplatin-Konzentration/zu kurzer Inkubationszeiten nicht nachweisbar ist.

Die Behandlung von Zellen mit AMD resultierte in der Segregation der fibrillären Komponenten von den granulären Komponenten des Nukleolus (Reimer et al., 1988). Die AMD-Behandlung zeigte einen eindeutigen Effekt auf die Lokalisation von Nucleostatmin. Dabei nahm Nucleostatmin eine diffuse Verteilung im Zellkern ein. Die RNA Pol I verblieb jedoch, wie bereits publiziert, in den Überresten des Nukleolus (Kill, 1996). Zusammenfassend ist zu vermuten, dass Nucleostatmin eine Funktion bei der rRNA Transkription auf post-transkriptioneller Ebene ausübt, die in direktem Zusammenhang mit einer RNA-Bindung steht. Es ist denkbar, dass diese Funktion mit einer zumindest zeitweiligen Lokalisation des Nucleostatmin Proteins außerhalb des Nukleolus einhergeht.

V. Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acid(s)</i> = Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
APL	Akute promyelozytische Leukämie
A. dest.	destilliertes Wasser
A. bidest.	doppeltdestilliertes Wasser
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ATRA	<i>all trans retinoic acid</i> = trans-Retinsäure
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CTP	Cytosintriphosphat
cpm	<i>counts per minute</i> = gezählte Signale pro Minute
Da	Dal ton
DKFZ	Deutsches Krebs Forschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure bzw. Deoxyribonucleicacid
DNase	Desoxyribonuclease
d.h.	das heißt
dNTP	2'Desoxyribonukleosid-5' - triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	“enhanced chemiluminescence”
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GFP	<i>green fluorescent protein</i> = Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl β -D Thiogalactosid

kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth Medium
M	Mol pro Liter (molar)
mA	Milliampere
MCS	Multiple cloning site (multiple Klonierungsstelle)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	millimolar
N	Normal
NaAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
NIH	<i>National Institut of Health</i>
NLS	Nukleuslokalisierungssignal
NoLS	Nukleoluslokalisierungssignal
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	picomol
PML	Promyelozytisches Leukämie Protein
PP	Polypropylen
R. norvegicus	Rattus norvegicus
RNase	Ribonuclease
RRM	<i>RNA recognition motif</i> = RNA Erkennungsmotiv
RT	Raumtemperatur
Pol I	DNA-abhängige RNA Polymerase I
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde(n)
sog.	sogenannt

s. u.	siehe unten
TAE	Trisacetatessigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit (enzymatische Wirkungseinheit)
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
upm	Umdrehungen pro Minute
UBF	<i>upstream binding factor</i>
V	Volt
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> = Gewicht pro Volumen
w/w	<i>weight per weight</i> = Gewicht pro Gewicht
v/v	<i>volume per volume</i> = Volumen pro Volumen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> = Gelb-fluoreszierendes Protein
z.B.	zum Beispiel

VI. Literaturverzeichnis

- Abrink, M., Ortiz, J.A., Mark, C., Sanchez, C., Looman, C., Hellman, L., Chambon, P. and Losson, R. (2001) Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1422-1426.
- Agata, Y., Matsuda, E. and Shimizu, A. (1999) Two novel Kruppel-associated box-containing zinc-finger proteins, KRAZ1 and KRAZ2, repress transcription through functional interaction with the corepressor KAP-1 (TIF1beta/KRIP-1). *J Biol Chem*, **274**, 16412-16422.
- Aitchison, J.D. and Rout, M.P. (2000) The road to ribosomes. Filling potholes in the export pathway. *J Cell Biol*, **151**, F23-26.
- Alcalay, M., Tomassoni, L., Colombo, E., Stoldt, S., Grignani, F., Fagioli, M., Szekely, L., Helin, K. and Pelicci, P.G. (1998) The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **18**, 1084-1093.
- Alcalay, M., Zangrilli, D., Pandolfi, P.P., Longo, L., Mencarelli, A., Giacomucci, A., Rocchi, M., Biondi, A., Rambaldi, A., Lo Coco, F. and et al. (1991) Translocation breakpoint of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor alpha locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1977-1981.
- Andersen, J.S., Lyon, C.E., Fox, A.H., Leung, A.K., Lam, Y.W., Steen, H., Mann, M. and Lamond, A.I. (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol*, **12**, 1-11.
- Annilo, T., Karis, A., Hoth, S., Rikk, T., Kruppa, J. and Metspalu, A. (1998) Nuclear import and nucleolar accumulation of the human ribosomal protein S7 depends on both a minimal nuclear localization sequence and an adjacent basic region. *Biochem Biophys Res Commun*, **249**, 759-766.
- Ariumi, Y., Ego, T., Kaida, A., Matsumoto, M., Pandolfi, P.P. and Shimotohno, K. (2003) Distinct nuclear body components, PML and SMRT, regulate the trans-acting function of HTLV-1 Tax oncoprotein. *Oncogene*, **22**, 1611-1619.
- Ascoli, C.A. and Maul, G.G. (1991) Identification of a novel nuclear domain. *J Cell Biol*, **112**, 785-795.
- Ashworth, L.K., Batzer, M.A., Brandriff, B., Branscomb, E., de Jong, P., Garcia, E., Garnes, J.A., Gordon, L.A., Lamerdin, J.E., Lennon, G. and et al. (1995) An integrated metric physical map of human chromosome 19. *Nat Genet*, **11**, 422-427.
- Bandziulis, R.J., Swanson, M.S. and Dreyfuss, G. (1989) RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev*, **3**, 431-437.
- Barlow, P.N., Luisi, B., Milner, A., Elliott, M. and Everett, R. (1994) Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger. *J Mol Biol*, **237**, 201-211.
- Bazett-Jones, D.P., Leblanc, B., Herfort, M. and Moss, T. (1994) Short-range DNA looping by the Xenopus HMG-box transcription factor, xUBF. *Science*, **264**, 1134-1137.
- Bellefroid, E.J., Marine, J.C., Ried, T., Lecocq, P.J., Riviere, M., Amemiya, C., Poncelet, D.A., Coulie, P.G., de Jong, P., Szpirer, C. and et al. (1993) Clustered organization of homologous KRAB zinc-finger genes with enhanced expression in human T lymphoid cells. *Embo J*, **12**, 1363-1374.
- Bellefroid, E.J., Poncelet, D.A., Lecocq, P.J., Revelant, O. and Martial, J.A. (1991) The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3608-3612.

- Bellon, S.F., Rodgers, K.K., Schatz, D.G., Coleman, J.E. and Steitz, T.A. (1997) Crystal structure of the RAG1 dimerization domain reveals multiple zinc-binding motifs including a novel zinc binuclear cluster. *Nat Struct Biol*, **4**, 586-591.
- Benoit, G., Roussel, M., Pendino, F., Segal-Bendirdjian, E. and Lanotte, M. (2001a) Orchestration of multiple arrays of signal cross-talk and combinatorial interactions for maturation and cell death: another vision of t(15;17) preleukemic blast and APL-cell maturation. *Oncogene*, **20**, 7161-7177.
- Benoit, G.R., Tong, J.H., Balajthy, Z. and Lanotte, M. (2001b) Exploring (novel) gene expression during retinoid-induced maturation and cell death of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol*, **38**, 71-85.
- Birney, E., Kumar, S. and Krainer, A.R. (1993) Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5803-5816.
- Birnstiel, M.L., Chipchase, M. and Speirs, J. (1971) The ribosomal RNA cistrons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **11**, 351-389.
- Birnstiel, M.L. and Hyde, B.B. (1963) Protein synthesis by isolated pea nucleoli. *J Cell Biol*, **18**, 41-50.
- Bischof, O., Kim, S.H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N.A. and Campisi, J. (2001) Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J Cell Biol*, **153**, 367-380.
- Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G. and Dejean, A. (2002) Deconstructing PML-induced premature senescence. *Embo J*, **21**, 3358-3369.
- Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E. and Freemont, P.S. (1996) PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene*, **13**, 971-982.
- Boisvert, F.M., Kruhlik, M.J., Box, A.K., Hendzel, M.J. and Bazett-Jones, D.P. (2001) The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol*, **152**, 1099-1106.
- Bond, V.C. and Wold, B. (1993) Nucleolar localization of myc transcripts. *Mol Cell Biol*, **13**, 3221-3230.
- Borden, K.L. (1998) RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem Cell Biol*, **76**, 351-358.
- Borden, K.L. (2002) Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol*, **22**, 5259-5269.
- Borden, K.L., Boddy, M.N., Lally, J., O'Reilly, N.J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E. and Freemont, P.S. (1995) The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *Embo J*, **14**, 1532-1541.
- Borden, K.L., CampbellDwyer, E.J. and Salvato, M.S. (1997) The promyelocytic leukemia protein PML has a pro-apoptotic activity mediated through its RING domain. *FEBS Lett*, **418**, 30-34.
- Borden, K.L., Lally, J.M., Martin, S.R., O'Reilly, N.J., Solomon, E. and Freemont, P.S. (1996) In vivo and in vitro characterization of the B1 and B2 zinc-binding domains from the acute promyelocytic leukemia proto-oncoprotein PML. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1601-1606.
- Bornfleth, H., Edelmann, P., Zink, D., Cremer, T. and Cremer, C. (1999) Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy. *Biophys J*, **77**, 2871-2886.
- Brasch, K. and Ochs, R.L. (1992) Nuclear bodies (NBs): a newly "rediscovered" organelle. *Exp Cell Res*, **202**, 211-223.
- Brown, D.D. and Gurdon, J.B. (1964) Absence of Ribosomal Rna Synthesis in the Anucleolate Mutant of *Xenopus Laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**, 139-146.

- Budde, A. and Grummt, I. (1999) p53 represses ribosomal gene transcription. *Oncogene*, **18**, 1119-1124.
- Burd, C.G. and Dreyfuss, G. (1994a) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, **265**, 615-621.
- Burd, C.G. and Dreyfuss, G. (1994b) RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *Embo J*, **13**, 1197-1204.
- Cao, T., Borden, K.L., Freemont, P.S. and Etkin, L.D. (1997) Involvement of the rfp tripartite motif in protein-protein interactions and subcellular distribution. *J Cell Sci*, **110 (Pt 14)**, 1563-1571.
- Carbone, R., Pearson, M., Minucci, S. and Pelicci, P.G. (2002) PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene*, **21**, 1633-1640.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L. and Campos, I. (2000) To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol*, **2**, E107-112.
- Cavanaugh, A.H., Hempel, W.M., Taylor, L.J., Rogalsky, V., Todorov, G. and Rothblum, L.I. (1995) Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF blocked by Rb gene product. *Nature*, **374**, 177-180.
- Chang, K.S., Lu, J.F., Wang, G., Trujillo, J.M., Estey, E., Cork, A., Chu, D.T., Freireich, E.J. and Stass, S.A. (1992) The t(15;17) breakpoint in acute promyelocytic leukemia cluster within two different sites of the myl gene: targets for the detection of minimal residual disease by the polymerase chain reaction. *Blood*, **79**, 554-558.
- Chen, D. and Huang, S. (2001) Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol*, **153**, 169-176.
- Chen, G.Q., Zhu, J., Shi, X.G., Ni, J.H., Zhong, H.J., Si, G.Y., Jin, X.L., Tang, W., Li, X.S., Xong, S.M., Shen, Z.X., Sun, G.L., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Gazin, C., Naoe, T., Chen, S.J., Wang, Z.Y. and Chen, Z. (1996) In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood*, **88**, 1052-1061.
- Chen, M., Rockel, T., Steinweger, G., Hemmerich, P., Risch, J. and von Mikecz, A. (2002) Subcellular recruitment of fibrillarin to nucleoplasmic proteasomes: implications for processing of a nucleolar autoantigen. *Mol Biol Cell*, **13**, 3576-3587.
- Chipchase, M.I. and Birnstiel, M.L. (1963) On the Nature of Nucleolar Rna. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **50**, 1101-1107.
- Ciarmatori, S., Scott, P.H., Sutcliffe, J.E., McLees, A., Alzuherri, H.M., Dannenberg, J.H., te Riele, H., Grummt, I., Voit, R. and White, R.J. (2001) Overlapping functions of the pRb family in the regulation of rRNA synthesis. *Mol Cell Biol*, **21**, 5806-5814.
- Cohen, N., Sharma, M., Kentsis, A., Perez, J.M., Strudwick, S. and Borden, K.L. (2001) PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *Embo J*, **20**, 4547-4559.
- Collins, T., Stone, J.R. and Williams, A.J. (2001) All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol Cell Biol*, **21**, 3609-3615.
- Comai, L., Tanese, N. and Tjian, R. (1992) The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell*, **68**, 965-976.
- Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T. and Sogo, J.M. (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell*, **57**, 753-761.

- Copenhaver, G.P., Putnam, C.D., Denton, M.L. and Pikaard, C.S. (1994) The RNA polymerase I transcription factor UBF is a sequence-tolerant HMG-box protein that can recognize structured nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2651-2657.
- Cremer, T. and Cremer, C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*, **2**, 292-301.
- Daniely, Y., Dimitrova, D.D. and Borowiec, J.A. (2002) Stress-dependent nucleolin mobilization mediated by p53-nucleolin complex formation. *Mol Cell Biol*, **22**, 6014-6022.
- de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R.V., Pandolfi, P.P., Ferbeyre, G. and Lowe, S.W. (2004) PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell*, **13**, 523-535.
- de The, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L. and Dejean, A. (1990) The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*, **347**, 558-561.
- de, T.H.E., Riviere, M. and Bernhard, W. (1960) [Examination by electron microscope of the VX2 tumor of the domestic rabbit derived from the Shope papilloma]. *Bull Assoc Fr Etud Cancer*, **47**, 570-584.
- Degos, L. and Wang, Z.Y. (2001) All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, **20**, 7140-7145.
- Desai, S.D., Liu, L.F., Vazquez-Abad, D. and D'Arpa, P. (1997) Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin. *J Biol Chem*, **272**, 24159-24164.
- Dino Rockel, T. and von Mikecz, A. (2002) Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. *J Struct Biol*, **140**, 189-199.
- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E. and Soddu, S. (2002) Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*, **4**, 11-19.
- Doucas, V., Tini, M., Egan, D.A. and Evans, R.M. (1999) Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2627-2632.
- Dundr, M., Hoffmann-Rohrer, U., Hu, Q., Grummt, I., Rothblum, L.I., Phair, R.D. and Misteli, T. (2002) A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. *Science*, **298**, 1623-1626.
- Dundr, M. and Misteli, T. (2001) Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J*, **356**, 297-310.
- Dyck, J.A., Maul, G.G., Miller, W.H., Jr., Chen, J.D., Kakizuka, A. and Evans, R.M. (1994) A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell*, **76**, 333-343.
- Eberhard, D., Tora, L., Egly, J.M. and Grummt, I. (1993) A TBP-containing multiprotein complex (TIF-IB) mediates transcription specificity of murine RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res*, **21**, 4180-4186.
- Elrod-Erickson, M., Rould, M.A., Nekludova, L. and Pabo, C.O. (1996) Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. *Structure*, **4**, 1171-1180.
- Eskiw, C.H., Dellaire, G., Mymryk, J.S. and Bazett-Jones, D.P. (2003) Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J Cell Sci*, **116**, 4455-4466.
- Etheridge, K.T., Banik, S.S., Armbruster, B.N., Zhu, Y., Terns, R.M., Terns, M.P. and Counter, C.M. (2002) The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase. *J Biol Chem*, **277**, 24764-24770.

- Everett, R.D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Kathoria, M. and Parkinson, J. (1998) The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol*, **72**, 6581-6591.
- Fagioli, M., Alcalay, M., Tomassoni, L., Ferrucci, P.F., Mencarelli, A., Riganelli, D., Grignani, F., Pozzan, T., Nicoletti, I. and Pelicci, P.G. (1998) Cooperation between the RING + B1-B2 and coiled-coil domains of PML is necessary for its effects on cell survival. *Oncogene*, **16**, 2905-2913.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C. and Lowe, S.W. (2000) PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev*, **14**, 2015-2027.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., Will, H., Schneider, C. and Del Sal, G. (2000) Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *Embo J*, **19**, 6185-6195.
- French, S.L., Osheim, Y.N., Cioci, F., Nomura, M. and Beyer, A.L. (2003) In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol*, **23**, 1558-1568.
- Friedman, J.R., Fredericks, W.J., Jensen, D.E., Speicher, D.W., Huang, X.P., Neilson, E.G. and Rauscher, F.J., 3rd. (1996) KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev*, **10**, 2067-2078.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. and Bouvet, P. (1999) Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci*, **112 (Pt 6)**, 761-772.
- Goddard, A.D., Borrow, J., Freemont, P.S. and Solomon, E. (1991) Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science*, **254**, 1371-1374.
- Gorlich, D. and Mattaj, I.W. (1996) Nucleocytoplasmic transport. *Science*, **271**, 1513-1518.
- Granick, D. (1975a) Nucleolar necklaces in chick embryo fibroblast cells. I. Formation of necklaces by dichlororibobenzimidazole and other adenosine analogues that decrease RNA synthesis and degrade preribosomes. *J Cell Biol*, **65**, 398-417.
- Granick, D. (1975b) Nucleolar necklaces in chick embryo fibroblast cells. II. Microscope observations of the effect of adenosine analogues on nucleolar necklace formation. *J Cell Biol*, **65**, 418-427.
- Grimwade, D. and Solomon, E. (1997) Characterisation of the PML/RAR alpha rearrangement associated with t(15;17) acute promyelocytic leukaemia. *Curr Top Microbiol Immunol*, **220**, 81-112.
- Grotzinger, T., Jensen, K. and Will, H. (1996a) The interferon (IFN)-stimulated gene Sp100 promoter contains an IFN-gamma activation site and an imperfect IFN-stimulated response element which mediate type I IFN inducibility. *J Biol Chem*, **271**, 25253-25260.
- Grotzinger, T., Sternsdorf, T., Jensen, K. and Will, H. (1996b) Interferon-modulated expression of genes encoding the nuclear-dot-associated proteins Sp100 and promyelocytic leukemia protein (PML). *Eur J Biochem*, **238**, 554-560.
- Grummt, I. (1999) Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **62**, 109-154.
- Grummt, I. (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev*, **17**, 1691-1702.
- Guiochon-Mantel, A., Savouret, J.F., Quignon, F., Delabre, K., Milgrom, E. and De The, H. (1995) Effect of PML and PML-RAR on the transactivation properties and subcellular distribution of steroid hormone receptors. *Mol Endocrinol*, **9**, 1791-1803.

- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W. and Paolo Pandolfi, P. (2000) The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*, **2**, 730-736.
- Hadjiolov, A.A. (1980) Biogenesis of ribosomes in eukaryotes. *Subcell Biochem*, **7**, 1-80.
- Han, Z.G., Zhang, Q.H., Ye, M., Kan, L.X., Gu, B.W., He, K.L., Shi, S.L., Zhou, J., Fu, G., Mao, M., Chen, S.J., Yu, L. and Chen, Z. (1999) Molecular cloning of six novel Kruppel-like zinc finger genes from hematopoietic cells and identification of a novel transregulatory domain KRNB. *J Biol Chem*, **274**, 35741-35748.
- Hanada, K., Song, C.Z., Yamamoto, K., Yano, K., Maeda, Y., Yamaguchi, K. and Muramatsu, M. (1996) RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *Embo J*, **15**, 2217-2226.
- Haynes, S.R. (1992) The RNP motif protein family. *New Biol*, **4**, 421-429.
- Heitz, E. (1931) Nucleolen und Chromosomen in der Gattung *Vicia*. *Planta*, **15**, 495-505.
- Hennemann, H., Vassen, L., Geisen, C., Eilers, M. and Moroy, T. (2003) Identification of a novel Kruppel-associated box domain protein, Krim-1, that interacts with c-Myc and inhibits its oncogenic activity. *J Biol Chem*, **278**, 28799-28811.
- Hirschler-Laszkiwicz, I., Cavanaugh, A., Hu, Q., Catania, J., Avantaggiati, M.L. and Rothblum, L.I. (2001) The role of acetylation in rDNA transcription. *Nucleic Acids Res*, **29**, 4114-4124.
- Hiscox, J.A. (2002) The nucleolus--a gateway to viral infection? *Arch Virol*, **147**, 1077-1089.
- Hodges, M., Tissot, C., Howe, K., Grimwade, D. and Freemont, P.S. (1998) Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am J Hum Genet*, **63**, 297-304.
- Hofmann, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H. and Schmitz, M.L. (2002) Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol*, **4**, 1-10.
- Hofmann, T.G. and Will, H. (2003) Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death Differ*, **10**, 1290-1299.
- Hoovers, J.M., Mannens, M., John, R., Blik, J., van Heyningen, V., Porteous, D.J., Leschot, N.J., Westerveld, A. and Little, P.F. (1992) High-resolution localization of 69 potential human zinc finger protein genes: a number are clustered. *Genomics*, **12**, 254-263.
- Horke, S., Reumann, K., Schweizer, M., Will, H. and Heise, T. (2004) Nuclear trafficking of La protein depends on a newly identified NoLS and the ability to bind RNA. *J Biol Chem*.
- Hyttel, P., Laurincik, J., Rosenkranz, C., Rath, D., Niemann, H., Ochs, R.L. and Schellander, K. (2000) Nucleolar proteins and ultrastructure in preimplantation porcine embryos developed in vivo. *Biol Reprod*, **63**, 1848-1856.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., 3rd and Maul, G.G. (1999) PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol*, **147**, 221-234.
- Iuchi, S. (2001) Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 625-635.
- Jacobs, G.H. (1992) Determination of the base recognition positions of zinc fingers from sequence analysis. *Embo J*, **11**, 4507-4517.
- Jantzen, H.M., Admon, A., Bell, S.P. and Tjian, R. (1990) Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature*, **344**, 830-836.
- Jensen, K., Shiels, C. and Freemont, P.S. (2001) PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene*, **20**, 7223-7233.

- Jessen, T.H., Oubridge, C., Teo, C.H., Pritchard, C. and Nagai, K. (1991) Identification of molecular contacts between the U1 A small nuclear ribonucleoprotein and U1 RNA. *Embo J*, **10**, 3447-3456.
- Jordan, P. and Carmo-Fonseca, M. (1998) Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2831-2836.
- Jordan, P., Mannervik, M., Tora, L. and Carmo-Fonseca, M. (1996) In vivo evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive. *J Cell Biol*, **133**, 225-234.
- Kakizuka, A., Miller, W.H., Jr., Umesono, K., Warrell, R.P., Jr., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E. and Evans, R.M. (1991) Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*, **66**, 663-674.
- Kanda, T., Sullivan, K.F. and Wahl, G.M. (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol*, **8**, 377-385.
- Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette-Egly, C., Gaub, M.P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R. and Chambon, P. (1992) Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *Embo J*, **11**, 629-642.
- Kenan, D.J., Query, C.C. and Keene, J.D. (1991) RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci*, **16**, 214-220.
- Kermekchiev, M., Workman, J.L. and Pikaard, C.S. (1997) Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1. *Mol Cell Biol*, **17**, 5833-5842.
- Khan, M.M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Shinagawa, T., Ichikawa-Iwata, E., Zhong, S., Pandolfi, P.P. and Ishii, S. (2001a) Role of PML and PML-RARalpha in Mad-mediated transcriptional repression. *Mol Cell*, **7**, 1233-1243.
- Khan, M.M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Zhong, S., Pandolfi, P.P. and Ishii, S. (2001b) PML-RARalpha alleviates the transcriptional repression mediated by tumor suppressor Rb. *J Biol Chem*, **276**, 43491-43494.
- Kill, I.R. (1996) Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*, **109 (Pt 6)**, 1253-1263.
- Kim, S.S., Chen, Y.M., O'Leary, E., Witzgall, R., Vidal, M. and Bonventre, J.V. (1996) A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15299-15304.
- Kohlhase, J., Schuh, R., Dowe, G., Kuhnlein, R.P., Jackle, H., Schroeder, B., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H.A., Kohler, A., Muller, U., Raab-Vetter, M., Burkhardt, E., Engel, W. and Stick, R. (1996) Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the Drosophila gene spalt. *Genomics*, **38**, 291-298.
- Koken, M.H., Saib, A. and de The, H. (1995) A C4HC3 zinc finger motif. *C R Acad Sci III*, **318**, 733-739.
- Krishna, S.S., Majumdar, I. and Grishin, N.V. (2003) Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res*, **31**, 532-550.
- Kubbutat, M.H. and Vousden, K.H. (1998) Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today*, **4**, 250-256.
- Kuhn, A. and Grummt, I. (1992) Dual role of the nucleolar transcription factor UBF: transactivator and antirepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7340-7344.

- Kuhn, A., Stefanovsky, V. and Grummt, I. (1993) The nucleolar transcription activator UBF relieves Ku antigen-mediated repression of mouse ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Res*, **21**, 2057-2063.
- Kumar, A. and Warner, J.R. (1972) Characterization of ribosomal precursor particles from HeLa cell nucleoli. *J Mol Biol*, **63**, 233-246.
- Lai, H.K. and Borden, K.L. (2000) The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene*, **19**, 1623-1634.
- Laity, J.H., Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2000) DNA-induced alpha-helix capping in conserved linker sequences is a determinant of binding affinity in Cys(2)-His(2) zinc fingers. *J Mol Biol*, **295**, 719-727.
- Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P.P., Puvion, E., Freemont, P. and de The, H. (2001) Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med*, **193**, 1361-1371.
- LaMorte, V.J., Dyck, J.A., Ochs, R.L. and Evans, R.M. (1998) Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4991-4996.
- Lange, R., Christoph, A., Thiesen, H.J., Vopper, G., Johnson, K.R., Lemaire, L., Plomann, M., Cremer, H., Barthels, D. and Heinlein, U.A. (1995) Developmentally regulated mouse gene NK10 encodes a zinc finger repressor protein with differential DNA-binding domains. *DNA Cell Biol*, **14**, 971-981.
- Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.M., Frye, R.A., Minucci, S., Pelicci, P.G. and Kouzarides, T. (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *Embo J*, **21**, 2383-2396.
- Lavau, C., Marchio, A., Fagioli, M., Jansen, J., Falini, B., Lebon, P., Grosveld, F., Pandolfi, P.P., Pelicci, P.G. and Dejean, A. (1995) The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene*, **11**, 871-876.
- Le, X.F., Yang, P. and Chang, K.S. (1996) Analysis of the growth and transformation suppressor domains of promyelocytic leukemia gene, PML. *J Biol Chem*, **271**, 130-135.
- Leung, A.K., Andersen, J.S., Mann, M. and Lamond, A.I. (2003) Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem J*, **376**, 553-569.
- Leung, A.K. and Lamond, A.I. (2003) The dynamics of the nucleolus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **13**, 39-54.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E.J. and Chen, J.D. (2000) Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol*, **20**, 1784-1796.
- Lichter, P., Bray, P., Ried, T., Dawid, I.B. and Ward, D.C. (1992) Clustering of C2-H2 zinc finger motif sequences within telomeric and fragile site regions of human chromosomes. *Genomics*, **13**, 999-1007.
- Lohrum, M.A., Ashcroft, M., Kubbutat, M.H. and Vousden, K.H. (2000) Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat Cell Biol*, **2**, 179-181.
- Looman, C., Abrink, M., Mark, C. and Hellman, L. (2002) KRAB Zinc Finger Proteins: An Analysis of the Molecular Mechanisms Governing Their Increase in Numbers and Complexity During Evolution. *Mol Biol Evol*, **19**, 2118-2130.
- Lorkovic, Z.J. and Barta, A. (2002) Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*, **30**, 623-635.

- Lovering, R. and Trowsdale, J. (1991) A gene encoding 22 highly related zinc fingers is expressed in lymphoid cell lines. *Nucleic Acids Res*, **19**, 2921-2928.
- Lupas, A. (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci*, **21**, 375-382.
- Lyon, C.E., Bohmann, K., Sleeman, J. and Lamond, A.I. (1997) Inhibition of protein dephosphorylation results in the accumulation of splicing snRNPs and coiled bodies within the nucleolus. *Exp Cell Res*, **230**, 84-93.
- Macara, I.G. (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 570-594, table of contents.
- Majello, B., De Luca, P. and Lania, L. (1997) Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J Biol Chem*, **272**, 4021-4026.
- Manders, E.M., Kimura, H. and Cook, P.R. (1999) Direct imaging of DNA in living cells reveals the dynamics of chromosome formation. *J Cell Biol*, **144**, 813-821.
- Margolin, J.F., Friedman, J.R., Meyer, W.K., Vissing, H., Thiesen, H.J. and Rauscher, F.J., 3rd. (1994) Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4509-4513.
- Mark, C., Abrink, M. and Hellman, L. (1999) Comparative analysis of KRAB zinc finger proteins in rodents and man: evidence for several evolutionarily distinct subfamilies of KRAB zinc finger genes. *DNA Cell Biol*, **18**, 381-396.
- Mark, C., Looman, C., Abrink, M. and Hellman, L. (2001) Molecular cloning and preliminary functional analysis of two novel human KRAB zinc finger proteins, HKr18 and HKr19. *DNA Cell Biol*, **20**, 275-286.
- Mattaj, I.W. (1993) RNA recognition: a family matter? *Cell*, **73**, 837-840.
- Maul, G.G., Negorev, D., Bell, P. and Ishov, A.M. (2000) Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol*, **129**, 278-287.
- Maul, G.G., Yu, E., Ishov, A.M. and Epstein, A.L. (1995) Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J Cell Biochem*, **59**, 498-513.
- Maxwell, E.S. and Fournier, M.J. (1995) The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem*, **64**, 897-934.
- McClintock, B. (1934) The relation of a particular chromosomal element to the development of nucleoli in *Zea mays*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **21**, 294-328.
- Melnick, A. and Licht, J.D. (1999) Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, **93**, 3167-3215.
- Mi, Y., Thomas, S.D., Xu, X., Casson, L.K., Miller, D.M. and Bates, P.J. (2003) Apoptosis in leukemia cells is accompanied by alterations in the levels and localization of nucleolin. *J Biol Chem*, **278**, 8572-8579.
- Misteli, T. (2001) The concept of self-organization in cellular architecture. *J Cell Biol*, **155**, 181-185.
- Moller, A., Sirma, H., Hofmann, T.G., Staeger, H., Gresko, E., Ludi, K.S., Klimczak, E., Droge, W., Will, H. and Schmitz, M.L. (2003) Sp100 is important for the stimulatory effect of homeodomain-interacting protein kinase-2 on p53-dependent gene expression. *Oncogene*, **22**, 8731-8737.
- Moosmann, P., Georgiev, O., Le Douarin, B., Bourquin, J.P. and Schaffner, W. (1996) Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4859-4867.
- Muller, S., Matunis, M.J. and Dejean, A. (1998) Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J*, **17**, 61-70.

- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T.H., Li, J. and Evans, P.R. (1990) Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature*, **348**, 515-520.
- Nakamura, T., Unda, F., de-Vega, S., Vilaxa, A., Fukumoto, S., Yamada, K.M. and Yamada, Y. (2004) The Kruppel-like factor epiprofin is expressed by epithelium of developing teeth, hair follicles, and limb buds and promotes cell proliferation. *J Biol Chem*, **279**, 626-634.
- Nayler, O., Stratling, W., Bourquin, J.P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A.M., Fackelmayer, F.O., Ullrich, A. and Stamm, S. (1998) SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3542-3549.
- Nickerson, J. (2001) Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci*, **114**, 463-474.
- Nielsen, A.L., Ortiz, J.A., You, J., Oulad-Abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., Chambon, P. and Losson, R. (1999) Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *Embo J*, **18**, 6385-6395.
- Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Spohn, W.H. and Busch, H. (1985) Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell*, **54**, 123-133.
- Odeberg, J., Rosok, O., Gudmundsson, G.H., Ahmadian, A., Roshani, L., Williams, C., Larsson, C., Ponten, F., Uhlen, M., Asheim, H.C. and Lundeberg, J. (1998) Cloning and characterization of ZNF189, a novel human Kruppel-like zinc finger gene localized to chromosome 9q22-q31. *Genomics*, **50**, 213-221.
- Olson, M.O., Dundr, M. and Szebeni, A. (2000) The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol*, **10**, 189-196.
- O'Mahony, D.J., Smith, S.D., Xie, W. and Rothblum, L.I. (1992) Analysis of the phosphorylation, DNA-binding and dimerization properties of the RNA polymerase I transcription factors UBF1 and UBF2. *Nucleic Acids Res*, **20**, 1301-1308.
- Pandolfi, P.P., Grignani, F., Alcalay, M., Mencarelli, A., Biondi, A., LoCoco, F. and Pelicci, P.G. (1991) Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene*, **6**, 1285-1292.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P. and Pelicci, P.G. (2000) PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*, **406**, 207-210.
- Pederson, T. (1998a) Growth factors in the nucleolus? *J Cell Biol*, **143**, 279-281.
- Pederson, T. (1998b) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3871-3876.
- Pederson, T. (2000) Diffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium. *Nat Cell Biol*, **2**, E73-74.
- Pederson, T. and Kumar, A. (1971) Relationship between protein synthesis and ribosome assembly in HeLa cells. *J Mol Biol*, **61**, 655-668.
- Pederson, T. and Politz, J.C. (2000) The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *J Cell Biol*, **148**, 1091-1095.
- Peng, H., Begg, G.E., Harper, S.L., Friedman, J.R., Speicher, D.W. and Rauscher, F.J., 3rd. (2000a) Biochemical analysis of the Kruppel-associated box (KRAB) transcriptional repression domain. *J Biol Chem*, **275**, 18000-18010.
- Peng, H., Begg, G.E., Schultz, D.C., Friedman, J.R., Jensen, D.E., Speicher, D.W. and Rauscher, F.J., 3rd. (2000b) Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J Mol Biol*, **295**, 1139-1162.

- Pengue, G., Calabro, V., Bartoli, P.C., Pagliuca, A. and Lania, L. (1994) Repression of transcriptional activity at a distance by the evolutionarily conserved KRAB domain present in a subfamily of zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2908-2914.
- Politz, J.C., Tuft, R.A., Pederson, T. and Singer, R.H. (1999) Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr Biol*, **9**, 285-291.
- Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E. and van der Merwe, K.J. (1985) Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol Invest*, **14**, 323-327.
- Polson, A., von Wechmar, M.B. and Fazakerley, G. (1980a) Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. *Immunol Commun*, **9**, 495-514.
- Polson, A., von Wechmar, M.B. and van Regenmortel, M.H. (1980b) Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun*, **9**, 475-493.
- Putnam, C.D., Copenhaver, G.P., Denton, M.L. and Pikaard, C.S. (1994) The RNA polymerase I transactivator upstream binding factor requires its dimerization domain and high-mobility-group (HMG) box 1 to bend, wrap, and positively supercoil enhancer DNA. *Mol Cell Biol*, **14**, 6476-6488.
- Quignon, F., De Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J.C. and de The, H. (1998) PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat Genet*, **20**, 259-265.
- Reddy, B.A. and Etkin, L.D. (1991) A unique bipartite cysteine-histidine motif defines a subfamily of potential zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res*, **19**, 6330.
- Reimer, G., Raska, I., Scheer, U. and Tan, E.M. (1988) Immunolocalization of 7-2-ribonucleoprotein in the granular component of the nucleolus. *Exp Cell Res*, **176**, 117-128.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P.G. and Ballabio, A. (2001) The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo J*, **20**, 2140-2151.
- Rippe, V., Belge, G., Meiboom, M., Kazmierczak, B., Fusco, A. and Bullerdiek, J. (1999) A KRAB zinc finger protein gene is the potential target of 19q13 translocation in benign thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, **26**, 229-236.
- Ritossa, F.M. and Spiegelman, S. (1965) Localization of DNA Complementary to Ribosomal Rna in the Nucleolus Organizer Region of Drosophila Melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **53**, 737-745.
- Rizos, H., Darmanian, A.P., Mann, G.J. and Kefford, R.F. (2000) Two arginine rich domains in the p14ARF tumour suppressor mediate nucleolar localization. *Oncogene*, **19**, 2978-2985.
- Rosati, M., Marino, M., Franze, A., Tramontano, A. and Grimaldi, G. (1991) Members of the zinc finger protein gene family sharing a conserved N-terminal module. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5661-5667.
- Rousseau-Merck, M.F., Hillion, J., Jonveaux, P., Couillin, P., Seite, P., Thiesen, H.J. and Berger, R. (1993) Chromosomal localization of 9 KOX zinc finger genes: physical linkages suggest clustering of KOX genes on chromosomes 12, 16, and 19. *Hum Genet*, **92**, 583-587.
- Rousseau-Merck, M.F., Koczan, D., Legrand, I., Moller, S., Autran, S. and Thiesen, H.J. (2002) The KOX zinc finger genes: genome wide mapping of 368 ZNF PAC clones with zinc finger gene clusters predominantly in 23 chromosomal loci are confirmed by human sequences annotated in Ensembl. *Cytogenet Genome Res*, **98**, 147-153.
- Roussel, M.J. and Lanotte, M. (2001) Maturation sensitive and resistant t(15;17) NB4 cell lines as tools for APL physiopathology: nomenclature of cells and repertory of their known genetic alterations and phenotypes. *Oncogene*, **20**, 7287-7291.

- Rowley, J.D., Golomb, H.M., Vardiman, J., Fukuhara, S., Dougherty, C. and Potter, D. (1977) Further evidence for a non-random chromosomal abnormality in acute promyelocytic leukemia. *Int J Cancer*, **20**, 869-872.
- Ryan, R.F., Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Singh, P.B., Friedman, J.R., Fredericks, W.J. and Rauscher, F.J., 3rd. (1999) KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, **19**, 4366-4378.
- Sadowski, I., Bell, B., Broad, P. and Hollis, M. (1992) GAL4 fusion vectors for expression in yeast or mammalian cells. *Gene*, **118**, 137-141.
- Saha, V., Young, B.D. and Freemont, P.S. (1998) Translocations, fusion genes, and acute leukemia. *J Cell Biochem Suppl*, **30-31**, 264-276.
- Sahlas, D.J., Milankov, K., Park, P.C. and De Boni, U. (1993) Distribution of snRNPs, splicing factor SC-35 and actin in interphase nuclei: immunocytochemical evidence for differential distribution during changes in functional states. *J Cell Sci*, **105 (Pt 2)**, 347-357.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Salomoni, P. and Pandolfi, P.P. (2002) The role of PML in tumor suppression. *Cell*, **108**, 165-170.
- Scheer, U. and Hock, R. (1999) Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 385-390.
- Scheer, U., Hugle, B., Hazan, R. and Rose, K.M. (1984) Drug-induced dispersal of transcribed rRNA genes and transcriptional products: immunolocalization and silver staining of different nucleolar components in rat cells treated with 5,6-dichloro-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole. *J Cell Biol*, **99**, 672-679.
- Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J.C., Greco, A., Hochstrasser, D. and Diaz, J.J. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell*, **13**, 4100-4109.
- Scherly, D., Boelens, W., Dathan, N.A., van Venrooij, W.J. and Mattaj, I.W. (1990) Major determinants of the specificity of interaction between small nuclear ribonucleoproteins U1A and U2B" and their cognate RNAs. *Nature*, **345**, 502-506.
- Scherly, D., Kambach, C., Boelens, W., van Venrooij, W.J. and Mattaj, I.W. (1991) Conserved amino acid residues within and outside of the N-terminal ribonucleoprotein motif of U1A small nuclear ribonucleoprotein involved in U1 RNA binding. *J Mol Biol*, **219**, 577-584.
- Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G. and Rauscher, F.J., 3rd. (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev*, **16**, 919-932.
- Scott, M., Boisvert, F.M., Vieyra, D., Johnston, R.N., Bazett-Jones, D.P. and Riabowol, K. (2001) UV induces nucleolar translocation of ING1 through two distinct nucleolar targeting sequences. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2052-2058.
- Seither, P., Zatssepina, O., Hoffmann, M. and Grummt, I. (1997) Constitutive and strong association of PAF53 with RNA polymerase I. *Chromosoma*, **106**, 216-225.
- Shannon, M., Kim, J., Ashworth, L., Branscomb, E. and Stubbs, L. (1998) Tandem zinc-finger gene families in mammals: insights and unanswered questions. *DNA Seq*, **8**, 303-315.
- Shaw, P.J. and Jordan, E.G. (1995) The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 93-121.

- Simpson, J.C., Wellenreuther, R., Poustka, A., Pepperkok, R. and Wiemann, S. (2000) Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Rep*, **1**, 287-292.
- Spector, D.L. (2001) Nuclear domains. *J Cell Sci*, **114**, 2891-2893.
- Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemain, M.C., Schindler, C. and et al. (1995) Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene*, **11**, 2565-2573.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B. and Aebi, U. (1999) The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 391-401.
- Stuurman, N., de Graaf, A., Floore, A., Josso, A., Humbel, B., de Jong, L. and van Driel, R. (1992) A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J Cell Sci*, **101 (Pt 4)**, 773-784.
- Szostecki, C., Guldner, H.H., Netter, H.J. and Will, H. (1990) Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. *J Immunol*, **145**, 4338-4347.
- Szostecki, C., Guldner, H.H. and Will, H. (1997) Autoantibodies against "nuclear dots" in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis*, **17**, 71-78.
- Takashima, H., Nishio, H., Wakao, H., Nishio, M., Koizumi, K., Oda, A., Koike, T. and Sawada, K. (2001) Molecular cloning and characterization of a KRAB-containing zinc finger protein, ZNF317, and its isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, **288**, 771-779.
- Thebault, S., Basbous, J., Gay, B., Devaux, C. and Mesnard, J.M. (2000) Sequence requirement for the nucleolar localization of human I-mfa domain-containing protein (HIC p40). *Eur J Cell Biol*, **79**, 834-838.
- Tollervey, D. and Kiss, T. (1997) Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 337-342.
- Tommerup, N. and Vissing, H. (1995) Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders. *Genomics*, **27**, 259-264.
- Tuan, J.C., Zhai, W. and Comai, L. (1999) Recruitment of TATA-binding protein-TAFI complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **19**, 2872-2879.
- Ueki, N., Kondo, M., Seki, N., Yano, K., Oda, T., Masuho, Y. and Muramatsu, M. (1998) NOLP: identification of a novel human nucleolar protein and determination of sequence requirements for its nucleolar localization. *Biochem Biophys Res Commun*, **252**, 97-102.
- Urrutia, R. (2003) KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol*, **4**, 231.
- Valdez, B.C., Perlaky, L., Henning, D., Saijo, Y., Chan, P.K. and Busch, H. (1994) Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the protein p120. Interaction with translocation protein B23. *J Biol Chem*, **269**, 23776-23783.
- Vallian, S., Gaken, J.A., Trayner, I.D., Gingold, E.B., Kouzarides, T., Chang, K.S. and Farzaneh, F. (1997) Transcriptional repression by the promyelocytic leukemia protein, PML. *Exp Cell Res*, **237**, 371-382.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J.,

- Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nuskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yoosheph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A. and Zhu, X. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351.
- Ventura, A., Luzi, L., Pacini, S., Baldari, C.T. and Pelicci, P.G. (2002) The p66Shc longevity gene is silenced through epigenetic modifications of an alternative promoter. *J Biol Chem*, **277**, 22370-22376.
- Ventura, A., Maccarana, M., Raker, V.A. and Pelicci, P.G. (2004) A cryptic targeting signal induces isoform-specific localization of p46Shc to mitochondria. *J Biol Chem*, **279**, 2299-2306.
- Visintin, R. and Amon, A. (2000) The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 372-377.
- Vissing, H., Meyer, W.K., Aagaard, L., Tommerup, N. and Thiesen, H.J. (1995) Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins. *FEBS Lett*, **369**, 153-157.
- Voit, R. and Grummt, I. (2001) Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13631-13636.

- Voit, R., Hoffmann, M. and Grummt, I. (1999) Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *Embo J*, **18**, 1891-1899.
- Voit, R., Kuhn, A., Sander, E.E. and Grummt, I. (1995) Activation of mammalian ribosomal gene transcription requires phosphorylation of the nucleolar transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res*, **23**, 2593-2599.
- Voit, R., Schafer, K. and Grummt, I. (1997) Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 4230-4237.
- Voit, R., Schnapp, A., Kuhn, A., Rosenbauer, H., Hirschmann, P., Stunnenberg, H.G. and Grummt, I. (1992) The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *Embo J*, **11**, 2211-2218.
- von Mikecz, A., Zhang, S., Montminy, M., Tan, E.M. and Hemmerich, P. (2000) CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus. *J Cell Biol*, **150**, 265-273.
- Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R. and Pandolfi, P.P. (1998) PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet*, **20**, 266-272.
- Warner, J.R. (1990) The nucleolus and ribosome formation. *Curr Opin Cell Biol*, **2**, 521-527.
- Warner, J.R. and Soeiro, R. (1967) Nascent ribosomes from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **58**, 1984-1990.
- Watson, R.P., Tekki-Kessarlis, N. and Boulter, C.A. (2000) Characterisation, chromosomal localisation and expression of the mouse Kid3 gene. *Biochim Biophys Acta*, **1490**, 153-158.
- Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvalho, T., Carmo-Fonseca, M., Lamond, A. and Dejean, A. (1994) Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell*, **76**, 345-356.
- Wiesmeijer, K., Molenaar, C., Bekeker, I.M., Tanke, H.J. and Dirks, R.W. (2002) Mobile foci of Sp100 do not contain PML: PML bodies are immobile but PML and Sp100 proteins are not. *J Struct Biol*, **140**, 180-188.
- Witzgall, R., O'Leary, E., Leaf, A., Onaldi, D. and Bonventre, J.V. (1994) The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4514-4518.
- Wolfe, S.A., Nekludova, L. and Pabo, C.O. (2000) DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **29**, 183-212.
- Wu, W.S., Vallian, S., Seto, E., Yang, W.M., Edmondson, D., Roth, S. and Chang, K.S. (2001) The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases. *Mol Cell Biol*, **21**, 2259-2268.
- Zatsepina, O.V., Voit, R., Grummt, I., Spring, H., Semenov, M.V. and Trendelenburg, M.F. (1993) The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor UBF is associated with transcriptionally active and inactive ribosomal genes. *Chromosoma*, **102**, 599-611.
- Zbarskii, I.B. and Debov, S.S. (1951) [Protein fractions in the cell nuclei.]. *Biokhimiia*, **16**, 390-395.
- Zhai, W. and Comai, L. (2000) Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol*, **20**, 5930-5938.
- Zhong, S., Salomoni, P. and Pandolfi, P.P. (2000a) The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol*, **2**, E85-90.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D. and Pandolfi, P.P. (2000b) Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med*, **191**, 631-640.
- Zhu, J., Koken, M.H., Quignon, F., Chelbi-Alix, M.K., Degos, L., Wang, Z.Y., Chen, Z. and de The, H. (1997) Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications

- for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3978-3983.
- Zink, D., Cremer, T., Saffrich, R., Fischer, R., Trendelenburg, M.F., Ansorge, W. and Stelzer, E.H. (1998) Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum Genet*, **102**, 241-251.
- Zirwes, R.F., Eilbracht, J., Kneissel, S. and Schmidt-Zachmann, M.S. (2000) A novel helicase-type protein in the nucleolus: protein NOH61. *Mol Biol Cell*, **11**, 1153-1167.
- Zuchner, D., Sternsdorf, T., Szostecki, C., Heathcote, E.J., Cauch-Dudek, K. and Will, H. (1997) Prevalence, kinetics, and therapeutic modulation of autoantibodies against Sp100 and promyelocytic leukemia protein in a large cohort of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, **26**, 1123-1130.

Erklärung

ich versichere hiermit, die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Identifizierung neuer Kerndomänen assoziierter Proteine“ eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Hamburg, den 1. Juni 2004

Sandra Fleischer

Gutachter der Arbeit waren:
Erstgutachter: Prof. Dr. K. Lingelbach
Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Will