



**Identifizierung während der Apoptose transkriptionell
hochregulierter Gene mittels einer viralen Genfalle
und die Charakterisierung eines dieser Gene:
Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase**

Dissertation

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

am Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stephanie Schneider
aus Essen

Marburg/ Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität als Dissertation am

angenommen.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Bölker
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. von Melchner

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	1
1.	Einleitung	3
1.1	Bedeutung der Apoptose	3
1.1.1	Der Apoptosemechanismus	4
1.2	Zentrale Elemente der Apoptose	8
1.2.1	Bcl-2-Homologe	8
1.2.2	Caspasen	10
1.2.3	Todesrezeptoren	13
1.3	Apoptose und Zellzyklus	15
1.4	Wachstumsfaktor-(IL-3) Entzugsapoptose in hämatopoetischen Zellen	17
1.5	Gebfallenmutagenese, eine Methode zur Identifizierung und Analyse von Genen	19
1.5.1	Genfallen-Vektoren	19
1.5.2	Ein Genfallenansatz zur Identifizierung transient exprimierter Gene	21
1.6	Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase	23
1.7	Zielsetzung	26
2.	Experimenteller Teil	27
2.1	Allgemeines	27
2.1.1	Chemikalien	27
2.1.2	Medien zur Anzucht von Bakterien und eukaryotischen Zellen	27
2.1.3	Supplemente	27
2.1.4	Enzyme und enzymatische Reaktionssysteme	28
2.1.5	Bakterienstämme	28
2.1.6	Plasmide	28
2.1.7	Antikörper	29
2.1.8	Biochemikalien und Kits	30

2.1.9 Eukaryotische Zelllinien	31
2.1.10 Konstrukte	31
2.1.11 Synthetische Oligonukleotide	32
2.1.12 Sonstige Materialien	34
2.1.13 Geräte	35
2.1.14 Software	36
2.2 Methoden	37
<i>DNA-Technologie</i>	
2.2.1 Restriktion und Gelelektrophorese	37
2.2.2 Modifikation von DNA-Fragmenten	37
a) Dephosphorylierung	37
b) Auffüllen von überhängenden 5'-Enden	37
c) Entfernen von überhängenden 3'-Enden	38
2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
2.2.4 Ligation	38
2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien	39
2.2.6 Transformationen	40
2.2.7 Plasmidisolierung	41
a) aus 3 ml Kulturen	41
b) aus 100 ml Kulturen	41
2.2.8 Polymerasekettenreaktion	42
a) PCR	42
b) Inverse PCR	42
2.2.9 Sequenzierung von dsDNA	45
<i>RNA-Technologie</i>	
2.2.10 Präparation von gesamt-RNA	46
2.2.11 Präparation von Poly-A ⁺ -RNA aus gesamt-RNA	46
2.2.12 Transfer von RNA auf Nitrocellulose Membranen	47
2.2.13 Radioaktive Markierung von DNA	48
2.2.14 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden	49

Protein-Technologie

2.2.15 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	50
2.2.16 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.2.17 Immunopräzipitation	51
2.2.18 Western-Blot mit Immunologischem Nachweis von Proteinen	52

Zellkultur-Technologie

2.2.19 Inaktivieren von FCS	54
2.2.20 Auftauen von Zellen	54
2.2.21 Einfrieren von Zellen	54
2.2.22 Passagieren von Zellen	55
a) Zellen in Suspensionskultur	55
b) Adhärenz Zellen	55
2.2.23 Zellproliferationstest XTT	56
2.2.24 Durchflußzytometrie	56
2.2.25 Apoptoseratemessung mittels Annexin-V-FLUOS Kit	58
2.2.26 Zellzyklus Messung	59

3. Ergebnisse	60
3.1 Identifikation transient induzierter Gene während der Faktorentzugsapoptose in FDC P1-Zellen	60
3.1.1 IL-3 Entzug induziert PIP5K	62
3.2 Exogene PIP5K stimuliert den Zellzyklus in FDC p1-Zellen und reduziert deren spontane Apoptose	63
A) PIP5K überexprimierende Zellen proliferieren schneller in Gegenwart von IL-3	64
B) PIP5K stimuliert den Zellzyklus	65
C) PIP5K reduziert die spontane Apoptoserate in FDC P1-Zellen	66
3.3 PIP5K reduziert die Stressempfindlichkeit	67

3.4	Herstellung einer PIP5K-Mutante und Überexpression in FDC P1-Zellen	68
3.5	Überexpression von PIP5K in HeLa-Zellen	70
3.6	PIP5K stimuliert auch in HeLa-Zellen die Proliferation	71
3.7	PIP5K modifiziert die Expression von Zellzyklus assoziierten Proteinen	72
3.8	Apoptoseprotektion in HeLa-Zellen durch PIP5K	74
	A) TNF- α	74
	B) Doxorubicin	75
	C) UV- und γ -Strahlung	76
4.	Diskussion	78
4.1	Evaluation des Cre/loxP-Genfallensystems	78
4.2	Proliferationsstimulation und Apoptoseprotektion durch PIP5K in FDC P1-Zellen	81
4.3	Proliferationsstimulation und Apoptosemodulation durch PIP5K in HeLa-Zellen	87
5.	Literatur	93
	Abbkürzungen	
	Anhang	
	Anhang A	
	Anhang B	

Zusammenfassung

Für die Gewebemöostase eines Organismus hat die Apoptose eine grundsätzliche Bedeutung. Fehlregulation des programmierten Zelltods kann entweder zu degenerativen Erkrankungen oder Neoplasien führen. Das Verständnis der dem Phänomen Apoptose zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist sowohl für die Erklärung der Pathogenese dieser Erkrankungen von Bedeutung als auch für zukünftige rationale Therapieansätze. Besonders bei der Entwicklung neuer pharmakologischer Substanzen, die gegen Krebs oder neurodegenerative Krankheiten eingesetzt werden können, ist die Entdeckung neuer apoptoserelevanter Gene von ausschlaggebender Bedeutung.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, neue Gene zu finden, deren Expression während der Apoptose induziert wird und eines dieser Gene funktionell zu charakterisieren. IL-3 abhängige Zelllinien hören nicht auf zu proliferieren, wenn ihnen IL-3 entzogen wird, vielmehr durchlaufen sie Apoptose. IL-3 sichert also das Überleben der Zellen dadurch, daß apoptoseaktivierende Signalkaskaden reprimiert werden. Um neue Komponenten solcher regulatorischer Kaskaden ausfindig zu machen, war es nötig eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, Zellen trotz eines Apoptosestimulus am Leben zu erhalten.

Eine entsprechende Strategie zur Identifizierung eben solcher Gene, die schon erfolgreich bei einer Reihe anderer Fragestellungen eingesetzt worden war, beruht auf dem Einsatz von Genfallen. Aus der Kombination von Genfalleninsertion und dem Cre/loxP-Rekombinationssystem konnte letztendlich eine Methode entwickelt werden, die die Apoptoseinduktion durch IL-3 Entzug einer strikt IL-3 abhängigen Zelllinie erlaubt. Dabei wird nach gezielter Rekombination das Gen für den Überlebensfaktor IL-3 exprimiert. Dadurch werden die Zellen unabhängig von exogen zugeführtem Cytokin. Anders als konventionelle Genfallen-Strategien sollte der Cre/loxP-Ansatz nicht nur eine Anreicherung von Genen erlauben, die durch spezifische biologische Stimuli induziert werden, sondern auch die Identifizierung von nur transient exprimierten Genen ermöglichen. Mit Hilfe eines solchen Ansatzes konnte aus der FDC P-1 Zelllinie, das Gen Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase isoliert werden.

Die Verifikation der Induktion der Transkription des PIP5K-Gens nach IL-3 Entzug zeigte, dass die Transkriptmenge nur in einem eng begrenzten Zeitfenster ansteigt und danach wieder auf das

Ausgangsniveau absinkt. Somit erfüllt das gewählte Genfallensystem auch die Forderung nach der Detektion von nur vorübergehend transkriptionell aktivierten Genen.

Die Ergebnisse aus den Experimenten mit FDC P1-Zellen zeigen, dass PIP5K in den Zellzyklus eingreift. PIP5K überexprimierende Zellen haben neben einer erhöhten Proliferationsrate auch eine verringerte Spontanapoptose. Es konnte auch eine erhöhte Stressresistenz der Zellen beobachtet werden.

Nachdem in FDC P1-Zellen nur eine moderate Expression von exogener PIP5K erzielt werden konnte, wurden stabile PIP5K-überexprimierende HeLa-Zellpopulationen isoliert. In einer systematischen, biochemischen Analyse von Zellzyklusregulatoren wurden darüber hinaus PIP5K regulierte Zellzyklusproteine identifiziert. So führte die PIP5K Überexpression zu einer Induktion von PCNA, hsMAD2 und DNA-Polymerase ϵ , und zu einer Repression von p21/Cip1/Waf1. Schließlich wurde die Rolle von PIP5K während der, durch alternative Stimuli induzierten Apoptose in HeLa-Zellen untersucht. In unseren Experimenten zeigte sich, dass PIP5K die zytostatika- und strahleninduzierte Apoptose akzeleriert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PIP5K den Apoptoseprozess je nach Stimulus sowohl verzögern als auch beschleunigen kann. Während PIP5K bei IL-3 Entzug anti-apoptotisch wirkt, geschieht genau das Gegenteil nach zytostatischer Behandlung.

Insgesamt spiegelt dies eine subtil aufeinander abgestimmte Regulation von Zellzyklus und Apoptose wieder.

1. Einleitung

1.1 Bedeutung der Apoptose

Für die meisten mehrzelligen Organismen hat der Zelltod einen lebensrettenden Aspekt und ist mindestens genauso wichtig wie Zellteilung und Wachstum. Man unterscheidet zwei Formen von Zelltod: Apoptose und Nekrose. Der Zelltod durch Apoptose kommt in allen Vielzellern vor und erfüllt physiologische Aufgaben. Durch die Apoptose erfolgt die Eliminierung von einzelnen Zellen, wie z. B.

- Zellen, die keine Funktion mehr ausüben,
- im Überschuss gebildet werden,
- sich falsch entwickelt haben,
- bereits ihre Lebensspanne beendet haben,
- oder schädlich sind.

Das Apoptoseprogramm wird durch die verschiedensten Signale ausgelöst. So können z. B. sogenannte Todessignale von außen die Zelle dazu veranlassen Apoptose einzuleiten, das Ganze kann aber auch aus dem Inneren der Zelle heraus eingeleitet werden.

Während die Apoptose sowohl bei krankhaften als auch bei gesunden Organismen eine Rolle spielen kann, ist die Nekrose immer pathologisch und die Folge von starken und akuten, irreparablen Verletzungen. Hierzu zählen z.B. abrupte Anoxie, plötzliche Knappheit an Nährstoffen wie Glukose oder extreme physiochemikalische Verletzungen (Hitze, Detergenzien, starke Basen etc.) (Hirsch *et al.*, 1997).

Noch vor 10 Jahren wurde der Apoptose wenig Beachtung geschenkt. Seit sie mit verschiedenen Autoimmunkrankheiten, degenerativen Erkrankungen, Krebs und der erworbenen Immunschwächekrankheit AIDS in Verbindung gebracht wird, hat sich dies geändert (Carson und Ribeiro, 1993). Man hat festgestellt, dass die Balance zwischen Proliferation und Apoptose bei diesen Krankheiten gestört ist.

Heutzutage macht man sich die Erkenntnisse auf diesem Gebiet zunutze, um Therapieformen zu entwickeln, die auf die Behandlung der dysregulierten Apoptose abzielen.

1.1.1 Der Apoptosemechanismus

Die Grundlage der Entdeckung der Apoptose war die Beschreibung einer morphologisch definierten Form des Zelltodes (Kerr *et al.*, 1972). Die Apoptose (apo = ab, weg, los; ptosis = Senkung) lässt sich durch ihren geordneten Ablauf und die fehlenden entzündlichen Umgebungsreaktionen von der nekrotischen Form des Zellunterganges unterscheiden.

Ultrastrukturelle Untersuchungen ergaben eine charakteristische Abfolge der Ereignisse:

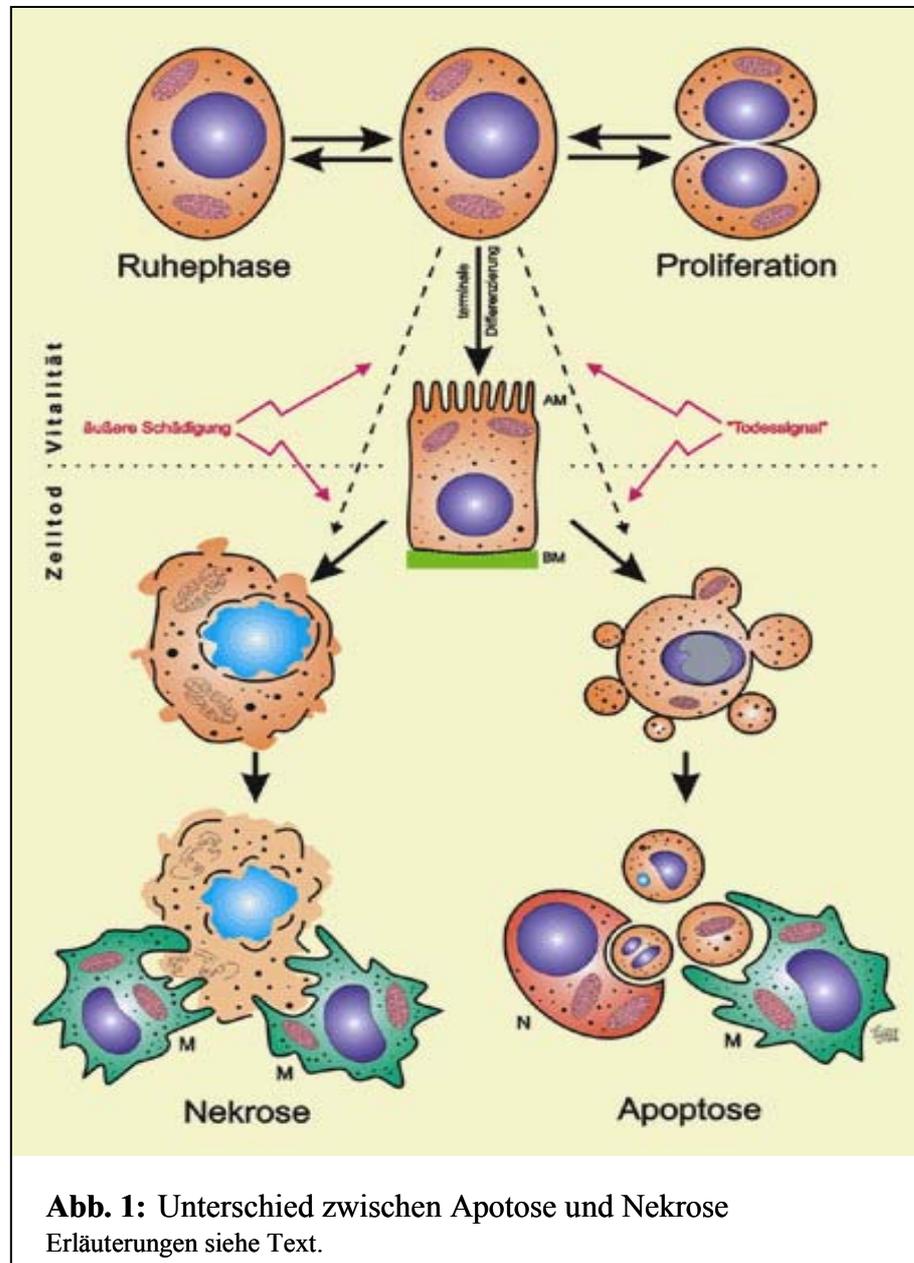
- Schrumpfung des Chromatins entlang der nukleären Membran
- Schrumpfung der Zelle und Entstehung von Protuberanzen an der Plasmamembran („membrane blebbing“),
- Spezifische, internukleosomale Fragmentierung der DNA
- Auflösung der Zelle in einzelne membranumhüllte Fragmente, die „apoptotic bodies“ (Kerr *et al.*, 1994; Majno und Joris, 1995)

Geringfügige Veränderungen in der Plasmamembran vollziehen sich bereits noch, bevor es zu einer Auflösung der Plasmamembran kommt. Die Exposition von Phosphatidylserinresten auf der Zelloberfläche, normalerweise an der zytosolischen Seite der Plasmamembran, erlaubt die Erkennung und Eliminierung apoptotischer Zellen durch Makrophagen oder benachbarte Zellen. Dies geschieht, bevor es zum Verlust der Membranintegrität mit anschließender Freisetzung von Zellinhalt in den Interzellularraum kommt, und vermeidet dadurch entzündliche Reaktionen (Savill, 1996). Die Mitochondrien zeigen keine größeren ultrastrukturellen Abnormitäten im Verlauf der Apoptose (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980).

Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Nekrose zu keinem regelmäßigen Abbau, weder von DNA noch von Proteinen. Infolge einer erhöhten Permeabilität der Plasmamembran kommt es aber zu einer Schwellung des Zytoplasmas (Onkosis) und der mitochondrialen Matrix, welche kurz vor dem Platzen der Zellmembran auftritt (Mehendale, 1994).

Auch in sehr unterschiedlichen Zellsystemen läuft die Apoptose stets stereotyp ab. Da die aktive Beteiligung der Zelle erforderlich erscheint, lag die Interpretation der Apoptose als „Suizid“ nahe, im Gegensatz zum passiven „Unfalltod“ der Nekrose.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zur Nekrose liegt in der bis zur letzten Phase erhaltenen Membranintegrität mit intakter Funktion als Permeabilitätsschranke (Abb. 1).



Die wichtigsten Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose hinsichtlich ihrer Morphologie, Biochemie und Physiologie sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose

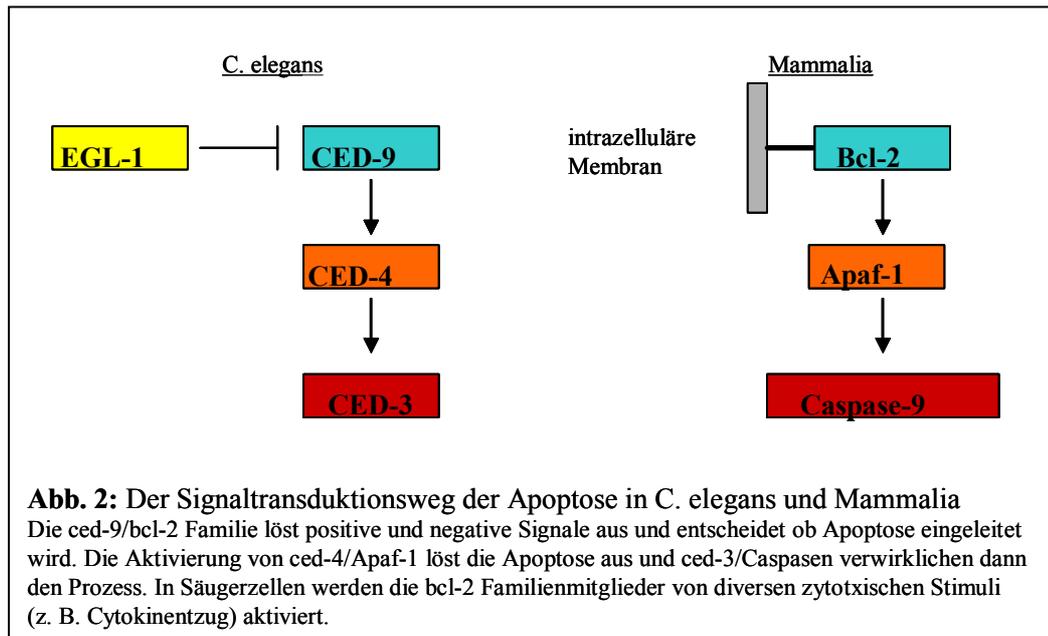
<i>Apoptose</i>	<i>Nekrose</i>
Morphologische Merkmale	
<ul style="list-style-type: none"> • Intakte Membran • Zellschrumpfung • Chromatinkondensation (Pyknose) • apoptotische Körperchen • Erhalt der Organellen • Verlust des Kontaktes zu Nachbarzellen/Basalmembran 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Membranintegrität • Schwellung des Zytoplasmas (Onkosis) Schwellung der Mitochondrien • Auflockerung des Chromatins • Keine Vesikelformation, komplette Lyse • Zerstörung der Zellstruktur (Organellen schwellen und lysieren) • Adhäsion zwischen den Zellen und zur Basalmembran bleibt bestehen
Physikalische Merkmale	
<ul style="list-style-type: none"> • Genau regulierter Prozess von Enzymfunktionen • Energie(ATP)-abhängig • Internukleosomale DNA-Fragmentierung • Prälytische DNA-Fragmentierung (frühes Ereignis des Zelltodes) 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Regulation der Ionenhomöostase • Keine Energie erforderlich • DNA-Fragmentierung an zufälliger Stelle (Karyolyse) • Postlytische DNA-Fragmentierung (Spätes Ereignis des Zelltodes)
Biochemische Merkmale	
<ul style="list-style-type: none"> • Gezielte Eliminierung von einzelnen Zellen • Zelltod durch physiologische Stimuli induziert • Phagozytose durch Makrophagen oder benachbarte Zellen ohne Entzündungsreaktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Tod von Zellgruppen • Zelltod durch nicht physiologische Einflüsse hervorgerufen • Freisetzung lysosomaler Enzyme mit konsekutiver Leukotaxie und Entzündungsreaktion

Einen großen Beitrag bei der Aufstellung eines theoretischen Grundgerüsts, das für apoptotische Prozesse auch in Vertebraten Allgemeingültigkeit besitzt, haben Apoptosestudien an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) geleistet. Genetische Analysen dieses Wurms, während dessen Entwicklung 131 Zellen in Apoptose gehen, machten es möglich, wichtige Ereignisse im Verlauf des programmierten Zelltodes zu identifizieren (Ellis und Horvitz, 1991).

Die Reproduzierbarkeit dieses programmierten Zelltodes, genauso wie die mögliche Vorhersage von Teilung und Differenzierung von Zellen, machen die starke molekulare Kontrolle von Proliferation und Zelltod deutlich.

Die ersten Beweise für ein evolutionär konserviertes Apoptoseprogramm ergaben sich aus Untersuchungen an dem Nematoden *C. elegans*. Durch Analyse von Apoptose-defizienten Mutanten des Wurms durch Ellis und Horvitz wurden Gene identifiziert, die für die Initiation und Ausführung der Apoptose und die anschließende Phagozytose verantwortlich sind (Ellis und Horvitz, 1986). Es wurden inzwischen mehr als 16 Gene entdeckt, die eine entscheidende Rolle im geregelten Ablauf der Apoptose in *C. elegans* spielen. Hierzu zählen die bekanntesten Gene *ced* (cell death abnormal)-3, *ced-4*, *ced-9* und *egl-1* (EGG laying defective-1). *Ced-9* ist ein anti-apoptotisches Protein, während *ced-3*, *ced-4* und *egl-1* eine pro-apoptotische Funktion besitzen (Hengartner, 1998). *Ced-9* bindet an die äußere Membran der Mitochondrien und auch an *ced-4* und *ced-3*. Dadurch ist *ced-3* in einem inaktiven Stadium und die Zelle lebt. Wenn *egl-1* aktiviert wird, wird der *ced-4/ced-3* Komplex von *ced-9* verdrängt. Dadurch oligomerisiert der *ced-4/ced-3* Komplex und wird aktiv und die Zelle geht in Apoptose.

Das Apoptoseprogramm ist hochkonserviert, da Homologe der *C. elegans* Gene unter anderem auch in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, der Maus *Mus musculus* und im Menschen *Homo sapiens* gefunden wurden (Abb. 2).



Im Vergleich zu *C. elegans* ist der Mechanismus des programmierten Zelltodes in evolutionär höheren Organismen wesentlich komplizierter und verzweigter aufgebaut (Aravind *et al.*, 2001). Die Grundmechanismen scheinen jedoch die gleichen zu sein. Im folgenden werden die Prozesse im humanen Organismus beschrieben, so wie sie bis jetzt verstanden sind.

1.2 Zentrale Elemente der Apoptose

1.2.1 Bcl-2-Homologe

Auf der Suche nach Homologen der *C. elegans* Gene *egl-1* und *ced-9* wurde eine humane Genfamilie gefunden, deren Mitglieder die Apoptose sowohl positiv, als auch negativ beeinflusst. Als erstes Mitglied wurde *bcl-2* (B-cell lymphoma-2) in einem humanen follikulären B-Zell-Lymphom identifiziert und als Onkogen beschrieben (Tsujiimoto *et al.*, 1984a und 1984b). Weitere Mitglieder der *bcl-2*-Familie bzw. verwandte Proteine, wurden durch Sequenzhomologien oder aufgrund ihrer Wechselwirkung mit dem *bcl-2*-Protein, identifiziert (Chao und Korsmeyer, 1998). Dabei werden die Mitglieder der *bcl-2*-Familie funktionell in zwei Gruppen

eingeteilt, die Antagonisten der Apoptose (z.B. bcl-2, bcl-x_L, mcl-1, A1) und die Agonisten der Apoptose (z.B. bax, bak, bcl-x_S, bad, bok). Die Proteine der bcl-2-Familie sind durch die konservierten Domänen BH1-4 (bcl-2 homology region) charakterisiert.

Diese Domänen sind für die biologische Aktivität und sowohl für die Homo-, als auch die Heterodimerisierung der Proteine verantwortlich (Korsmeyer *et al.*, 1993; Yin *et al.*, 1994).

Die Regulation und Funktion der verschiedenen Proteine der bcl-2-Familie ist noch weitgehend ungeklärt und wird kontrovers diskutiert. Aus der Strukturaufklärung des bcl-x_L Proteins und seiner Homologie zu anderen Proteinen ergaben sich allerdings Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen und Funktionen (Muchmore *et al.*, 1996). Dabei scheint die Bildung von Homo- und Heterodimeren, als Regulationsmechanismus, von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. Heterodimerisierung von pro- und anti-apoptotischen bcl-2 Homologen führt zu einer Hemmung der Funktion der anti-apoptotischen Homologe. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die Sensitivität einer Zelle gegenüber Apoptose, u. a. durch den relativen Gehalt von pro- und anti-apoptotischen bcl-2 Homologen bestimmt wird. Die Dimerisierung der bcl-2 Homologe wird aber zusätzlich zu dem Mengenverhältnis noch durch ihre Phosphorylierung gesteuert (Hengartner, 2000).

Die meisten bcl-2 Homologe besitzen einen hydrophoben Bereich mit dem sie in intrazellulären Membranen, vorzugsweise in Mitochondrienmembranen, verankert sind. Die Kristallstruktur von bcl-x_L zeigte strukturelle Homologien zu den Colicinen, bakteriellen Proteinen, die in der Lage sind Membranporen auszubilden (Minn *et al.*, 1997). Ob diese Kanäle jedoch in vivo überhaupt ausgebildet werden und dann noch groß genug sind, um Proteine passieren zu lassen, ist völlig ungeklärt. Alle bisherigen Erkenntnisse zu diesem Punkt basieren auf in vitro Versuchen bzw. auf Daten mit artifiziellen Membranen (Pavlov *et al.*, 2001; Roucou *et al.*, 2002).

Gesichert ist allerdings, dass verschiedenste Proteine während der Apoptose aus Mitochondrien freigesetzt werden. Cytochrom c ist unter diesen Proteinen ist das bekanntes. Weitere Beispiele für solche Proteine sind AIF (apoptosis initiating factor, ein Flavoprotein), Smac/DIABOLO (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pH) und verschiedene Procaspasen, beispielsweise Procaspase-2, -3 und -9.

Alle diese freigesetzten Proteine interagieren direkt oder indirekt mit verschiedensten bcl-2-Familienmitgliedern. Dabei spielen die Procaspasen eine besonders wichtige Rolle.

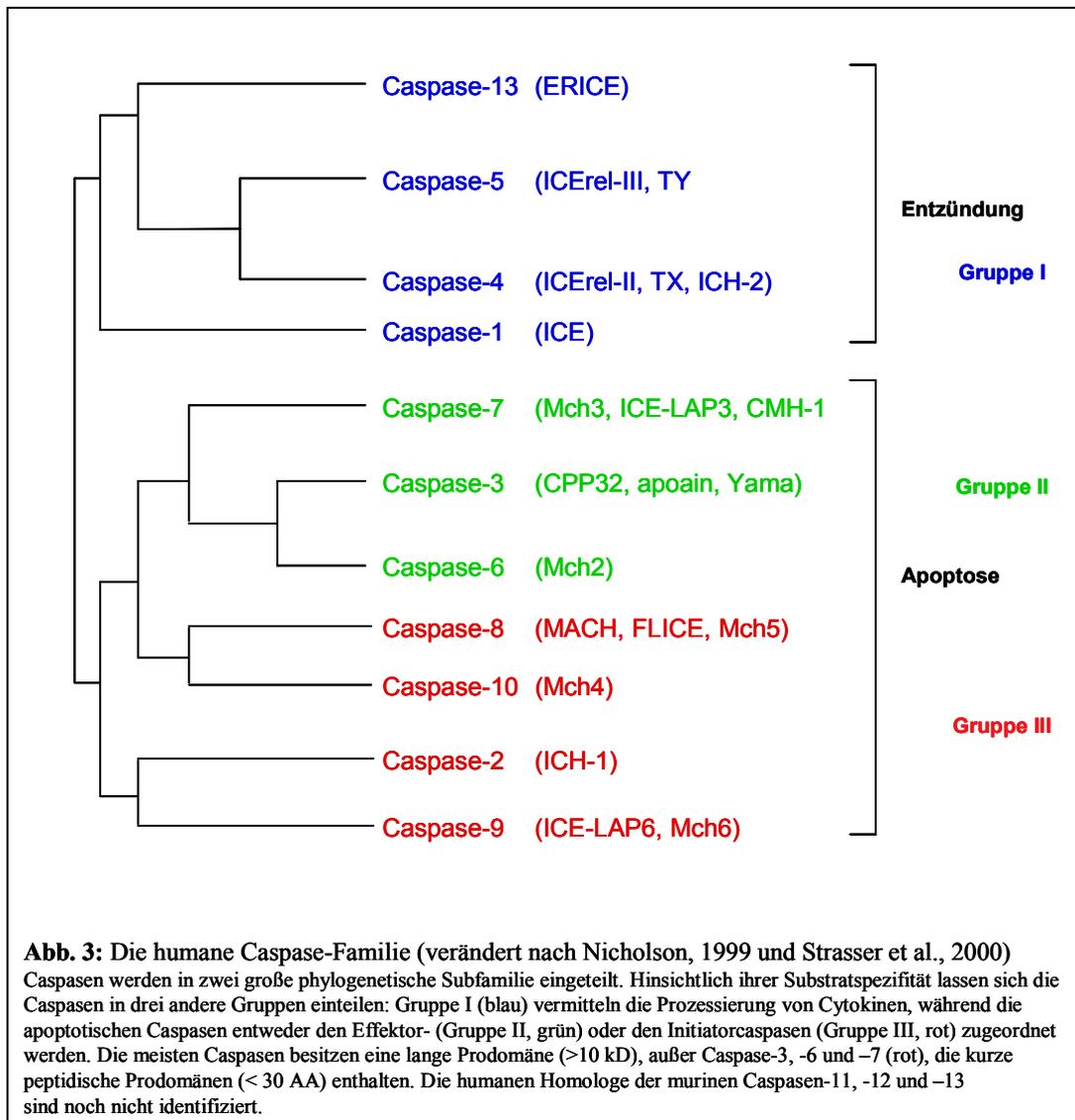
1.2.2 Caspasen

Die Sequenz des ced-3 Gens aus *C. elegans* zeigt Homologie zu der des humanen Proteins ICE (Interleukin-1 converting enzyme), einer Cysteinprotease, die aus dem Vorläuferprotein pro-IL-1 β das biologisch aktive IL-1 β freisetzt.

Damit war das erste Mitglied einer ständig wachsenden Proteasefamilie in Säugerzellen identifiziert. Beim Menschen sind bis her 14 Mitglieder dieser Familie entdeckt worden, die als Caspasen (cystein aspartate-specific proteases) bezeichnet werden. Caspasen sind eine hoch konservierte Familie aus Cystein-Proteasen, mit einer Schnittspezifität auf der Carboxylseite von Aspartatresten (Alnemri, 1997). Phylogenetisch lässt sich die humane Familie der Caspasen in zwei Gruppen einteilen (Nicholson, 1999). Andererseits lassen sich die Caspasen aber auch hinsichtlich ihrer Substratspezifität in 3 Gruppen einteilen (Abb. 4). Caspasen der Gruppe I (Caspase-13, -5, -4 und -1) vermitteln die Prozessierung von Cytokinen, die während entzündlicher Reaktionen benötigt werden. Die apoptotischen Caspasen werden entweder den Effektorcaspasen (Gruppe II: Caspase-7, -3 und -6) oder den Initiatorcaspasen (Gruppe III: Caspase-8, -10, -2 und -9) zugeordnet (Abb. 4).

Caspasen werden als Zymogene synthetisiert. Sie enthalten eine N-terminale Prodomäne, eine große (20 kDa) und eine kleine (10 kDa) Untereinheit. Die proteolytische Prozessierung zur Aktivierung der Caspasen bedarf mindestens zwei aufeinanderfolgender Spaltungen an Aspartatresten, um die große und kleine Untereinheit voneinander und von der Prodomäne zu trennen (Abb.3). Caspasen sind in ihrer aktiven Konformation heterotetramere Proteine (Casciola *et al.*, 1996). Dieser heterotetramere Komplex setzt sich aus zwei identisch großen und zwei identisch kleinen Untereinheiten zusammen.

Neben der autokatalytischen Aktivierung können sich die Proteasen auch gegenseitig aktivieren, Caspasen sind also auch Substrate von anderen Caspasen.

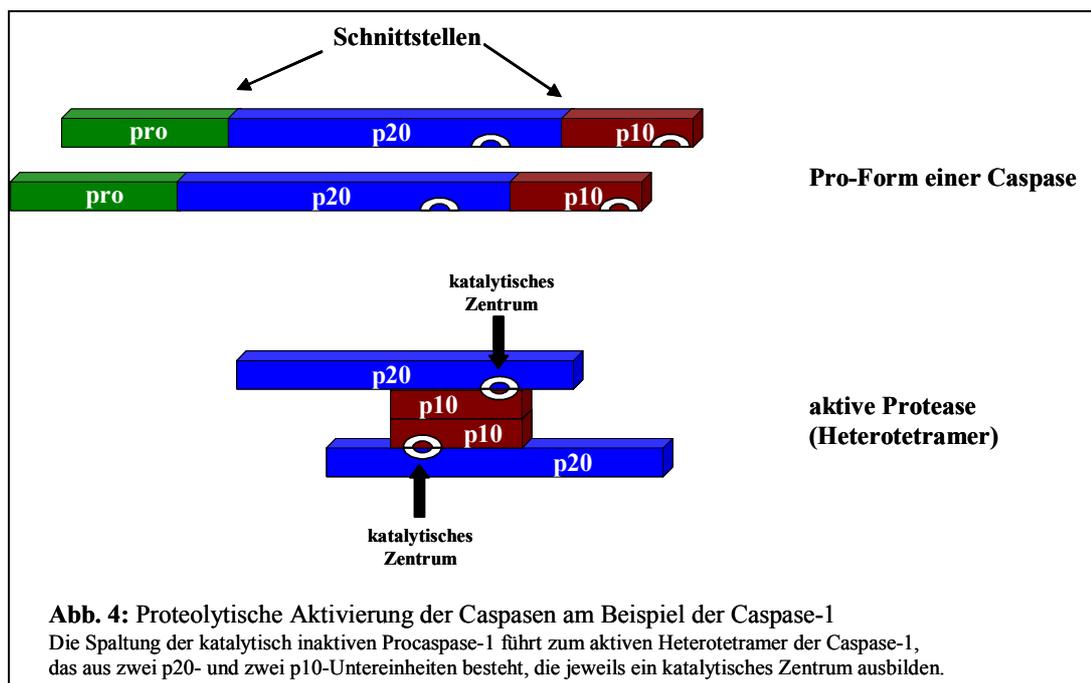


Zu den weiteren Substraten der Caspasen gehören zytoskelettale Strukturproteine wie Fodrin oder Gelsolin, deren Spaltung möglicherweise zum allgemeinen Abbau der Zellstrukturen beiträgt.

Die typische internucleosomale DNA-Fragmentation ist eine Folge der Aktivierung der Endonuclease CAD (caspase activated DNase). Diese Fragmentierung wird über die Degradation der inhibitorischen Untereinheit ICAD (inhibitor of caspase activated DNase) eingeleitet (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998; Sakahira und Nagata, 1998). ICAD liegt in der normalen Zelle im Komplex mit CAD vor, so das

die Funktion von CAD blockiert wird. Nach der Spaltung von ICAD durch Caspase-3 wird CAD freigesetzt und kann seine Funktion als Endonuklease ausführen.

Die funktionelle Verbindung zwischen den beiden zentralen Familien von Apoptoseregulatoren ist, neben möglicherweise bislang noch nicht identifizierten Molekülen, das ced-4 Homolog Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Apaf-1 bildet zusammen mit Caspase-9 (ced-3 Homolog), Cytochrom c und dATP das Apoptosom (Li *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1999). Durch diesen Komplex wird letztendlich Caspase-3 aktiviert und die Apoptose nimmt ihren Lauf.



Neben den bisher beschriebenen Apoptoseregulatoren sind auch noch weitere Apoptose modulierende Proteine bekannt. Eine weitere wichtige Familie stellen die IAP-Proteine (inhibitor of apoptosis) dar (Deveraux und Reed, 1999). IAP-Proteine binden an Caspasen und inhibieren so deren Aktivierung. Es wurden aber auch Proteine identifiziert, die wiederum an die IAP-Proteine binden und sie dadurch inhibieren. Zu diesen Inhibitoren der IAP's zählen z. B. die *D. melanogaster* Proteine Reaper, Hid und Grim (Wang *et al.*, 1999; Goyal *et al.*, 2000), auch das humane Protein Smac/DIABOLO konnte als Inhibitor von IAP's identifiziert werden. Smac/DIABOLO befindet sich in den Mitochondrien und wird während der Apoptose freigesetzt (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000).

Apoptose ist nicht in allen Fällen an die Aktivierung von Caspasen gebunden. Dem entsprechend können pharmakologische Inhibitoren von Caspasen nicht immer vor Apoptose schützen. Auch in Caspase-3 und -9 „knock-out“ Mäusen konnte keine allgemeine Apoptosedefizienz festgestellt werden (Kuida *et al.*, 1996; Kuida *et al.*, 1998).

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass das mitochondriale Flavoprotein AIF Caspase-unabhängige Apoptose auslösen kann. Während der Embryogenese von Mäusen ist AIF essentiell für die ersten Einschnürungen der Embryos, die sich durch Apoptose gezielt an bestimmten Stellen vollziehen. Darüber hinaus sind embryonale Mausfibroblasten ohne AIF *in vitro* gegen Serumentzugsapoptose resistent (Joza *et al.*, 2001). Allerdings ist der Mechanismus dieser Caspase-unabhängigen Apoptose noch völlig ungeklärt.

1.2.3 Todesrezeptoren

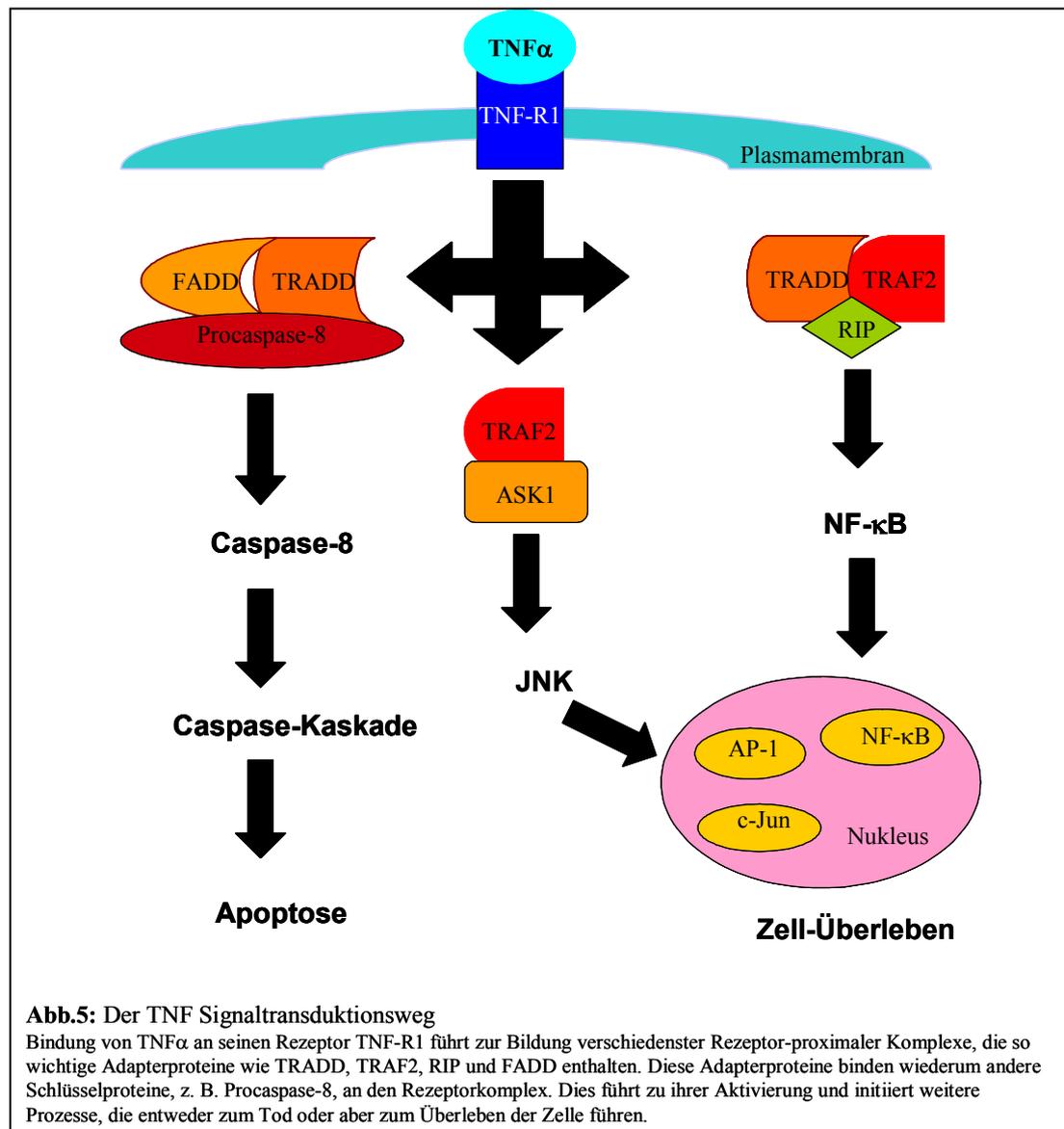
Apoptose ist ebenso wie die anderen wichtigen Signaltransduktionswege eine Konsequenz inter- und intrazellulärer Kommunikation und kann auch durch Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen vermittelt werden. Die Induktion der Apoptose ist die Hauptaufgabe von sogenannten Todesrezeptoren, die einer Unterfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie (TNF-R) angehören (Wajant, 2003). Die Mitglieder der TNF-R-Superfamilie werden unter anderem über eine homologe, 80 AA-lange, zytoplasmatische Domäne, die auch Todesdomäne, (death domain, DD) genannt wird, definiert (Fraser und Evan, 1996). Die Todesdomäne ist für die Transduktion des zytotoxischen Signals verantwortlich.

Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Familienmitglieder spielen eine wichtige Rolle in verschiedensten physiologischen und pathologischen Prozessen. Diese sind Zellproliferation, Differenzierung, Immunantwort, Induktion inflammatorischer Reaktionen und Aktivierung der Apoptose (Baud und Karin, 2001).

Todesrezeptoren sind an der äußeren Zytoplasmamembran lokalisiert und vermitteln nach Bindung durch Todesliganden ein Signal in die Zelle. Bislang sind sechs Mitglieder dieser Todesrezeptorfamilie bekannt. Zu den Prominentesten gehört der TNF α -Rezeptor.

Bei den Liganden der TNF-R handelt es sich um Zytokine, die unter anderem eine wichtige Rolle im komplexen Netzwerk der Immunreaktion spielen. Ähnlich wie ihre

Rezeptoren zeigen auch die Liganden untereinander eine strukturelle Homologie. Die Liganden werden als Transmembranproteine synthetisiert, deren lösliche Form durch spezifische Metalloproteasen abgespaltet wird. Diese Art der Liganden besteht aus drei identischen Untereinheiten und sie aktivieren ihre Rezeptoren durch Oligomerisierung (Beutler und van Huffel, 1994; Wiley *et al.*, 1995; Eck *et al.*, 1992; Banner *et al.*, 1993; Dhein *et al.*, 1992).



Die Bindung von TNF α an seine Rezeptoren führt meistens zur Aktivierung von drei wichtigen Transkriptionsfaktoren (TF), AP-1, c-Jun und NF- κ B (nuclear factor-kappaB) (Aggarwal, 2000). Die Aktivierung führt letztendlich zu einem Transduktionsweg, der zum Überleben der Zelle führt (Abb. 5).

Über die Bindung von TNF α an den TNF-R1 wird die Bildung eines Rezeptorproximalen Signalkomplexes ausgelöst, dessen Bestandteil das Adapterprotein TRADD (TNF-receptor-associated death domain) ist. TRADD ist verantwortlich für die Rekrutierung der weiteren Adapterproteine RIP (receptor-interacting factor), TRAF2 (TNF-receptor-associated factor2) und FADD (fas-associated death domain). Diese Faktoren sind wiederum ausschlaggebend für die Bindung weiterer Faktoren an TNF-R1, welche für die Aktivierung von stromabwärts gelegenen Ereignissen verantwortlich sind.

FADD bindet z. B. Procaspase-8 an den TNF-R1-Komplex und löst somit die Aktivierung von Caspase-8 aus, was über die Caspase-Kaskade letztendlich zur Apoptose führt (Hsu et al., 1995) (Abb. 5).

1.3 Apoptose und Zellzyklus

Apoptose und Zellzyklus sind eng miteinander verknüpfte und fein regulierte Prozesse, (Ellis *et al.*, 1991). Es gilt bereits seit längerem als gesichert, dass eine Dysregulation von Genen, die bei der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen, zu malignem Zellwachstum führen kann (Hartwell und Kastan, 1994). So führt beispielsweise in 80% der Fälle die Translokation t(11;14) zur konstitutionellen Überexpression von Cyclin D1 (bcl-1), einem positiven Regulator des Zellzyklus' (Yatabe *et al.*, 2000). Cyclin D1 aktiviert Cyclin-abhängige Kinasen (cdk: cyclin dependent kinases), die wiederum über die Aktivierung von Rb-(Retinoblastom) Proteinen und weiteren Kaskadeschritten die Zellzyklusprogression vorantreiben können.

In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise, dass neben der Dysregulation des Zellzyklus', verstärkte Apoptoseresistenz ein weiterer wichtiger Mechanismus für die Entwicklung maligner Tumore darstellt (Tsujiimoto *et al.*, 1984a; Tsujiimoto *et al.*, 1984b; Tsujiimoto *et al.*, 1985; Tsujiimoto and Croce, 1986; Vaux *et al.*, 1988).

Die enge regulatorische Verknüpfung von Proliferation und Apoptose wird evident anhand einer Hand einer Reihe zentraler Beobachtungen.

So konnte zum einen gezeigt werden, dass der Eintritt in die S-Phase, einem initialen Schritt der Zellzyklusprogression, auch während der Apoptose auftreten kann.

Entzieht man beispielsweise ruhenden, epithelialen Prostatazellen mit Testosteron einen wichtigen Überlebensfaktor, treten die Zellen zunächst in die S-Phase ein, bevor sie, ohne den Zellzyklus weiter zu durchlaufen, durch Apoptose absterben (Colombel *et al.*, 1992). Zum anderen zeigte sich, dass zentrale Regulatoren des Zellwachstums häufig eine zellbiologische Doppelfunktion haben und sowohl Zellzyklus, als auch Apoptose regulieren. So ist die Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin D, c-myc, Rb und p53 nicht nur mit Proliferation assoziiert, sondern auch mit dem Zelltod (Evan *et al.*, 1992; Freeman *et al.*, 1994; Haas-Kogan *et al.*, 1995; Miyashita *et al.*, 1994). Entsprechend führt die Deregulation dieser Gene zu malignem Zellwachstum.

p53 ist eines dieser Gene mit einer Doppelfunktion. p53, oft als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, wird nach Schädigung der DNA, aber auch durch andere Noxen, die nicht zwangsläufig DNA-Schäden zur Folge haben, aktiviert. Es sind zwei zelluläre Antworten infolge der Aktivierung von p53 beschrieben:

1. Zellzyklusstop, 2. Apoptose.

Bei DNA-Schäden fungiert p53 als Kontrollpunkt und löst einen Zellzyklusstop in der G1-Phase aus, damit Reparaturmechanismen eingreifen können. Ist der Schaden zu groß, geht die Zelle unweigerlich in die Apoptose.

Während viele gesicherte Hinweise dafür sprechen, dass der Wachstumsstopp durch p53 über die Induktion einer Cyklin-abhängigen Proteinkinase abläuft, ist der Mechanismus, der die Apoptose einleitet, weitgehend unklar, zumal p53 vermutlich an der Induktion einiger, aber nicht aller Formen von Apoptose beteiligt ist. Einige Befunde deuten darauf hin, dass p53 als Transkriptionsfaktor weitere Apoptose-assoziierte Gene und Proteine wie z.B. das anti-apoptotische bcl-2 und seinen Antagonisten bax (Miyashita *et al.*, 1994) sowie das Oberflächenprotein Fas (Owen-Schaub *et al.*, 1995) reguliert.

1.4 Wachstumsfaktor-(IL-3) Entzugsapoptose in hämatopoetischen Zellen

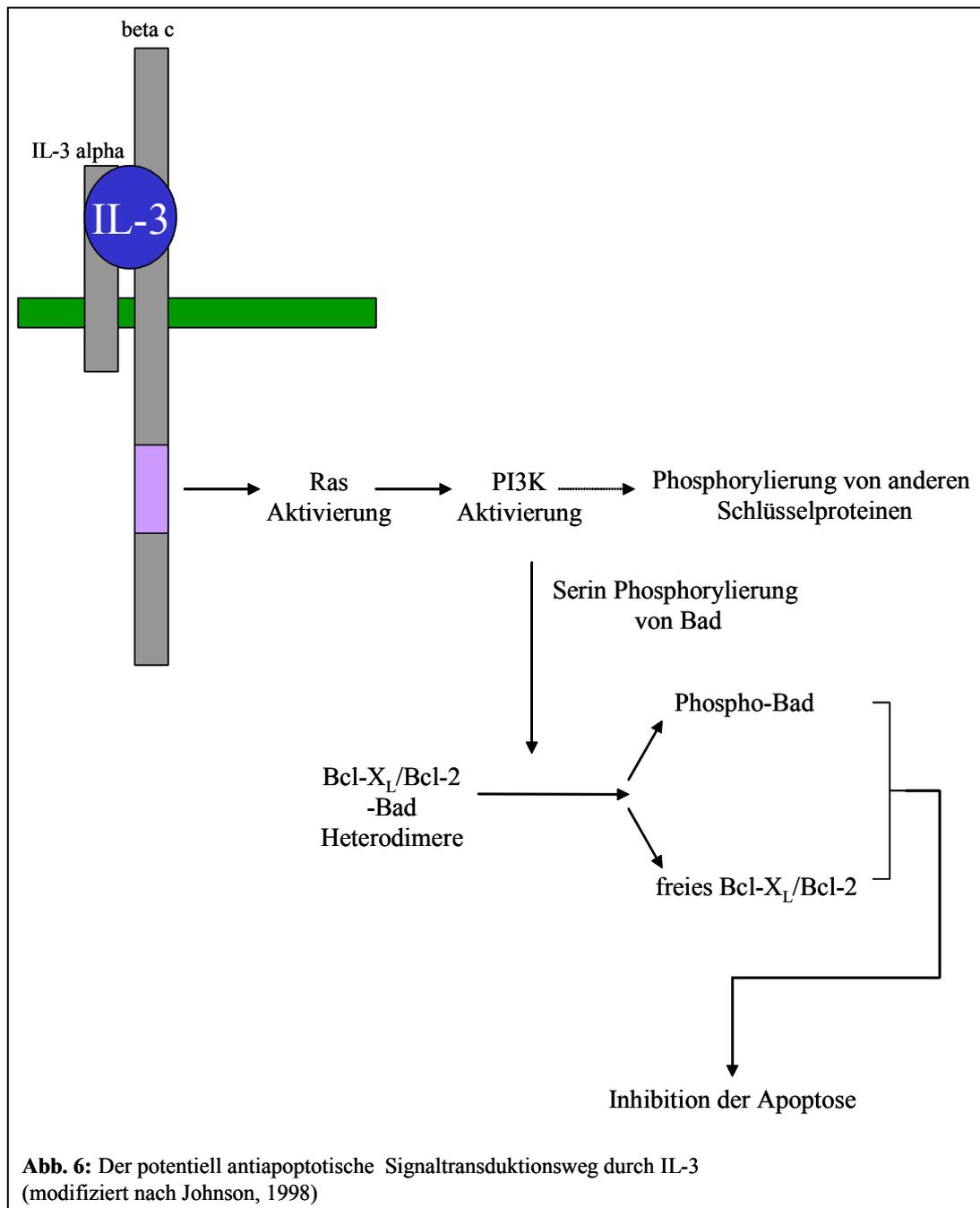
Die grundsätzliche Bedeutung von Apoptoseresistenzmechanismen für die Pathogenese maligner Erkrankungen wurde zuerst bei einem Lymphom beschrieben (Tsujimoto *et al.*, 1984a und b). Die chromosomale t(14;18)-Translokation führt hierbei zu einer konstitutiven Überexpression von bcl-2, dessen anti-apoptotische Wirkung zur Entstehung maligner Lymphome beiträgt (Tsujimoto *et al.*, 1984a; Tsujimoto *et al.*, 1985; Tsujimoto und Croce, 1986; Vaux *et al.*, 1988).

Die Bildung von hämatopoetischen Zellen wird durch Cytokine, zu denen auch IL-3 gehört reguliert. IL-3 beeinflusst das Überleben und die Proliferation von hämatopoetischen Zellen indem es über die Aktivierung intrazellulärer Kinasen die Apoptose inhibiert (Allen *et al.*, 1993a und b; Kinoshita *et al.*, 1995a). Bei dieser Inhibierung spielen die Ras- und Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signaltransduktionswege eine wesentliche Rolle (Abb.6).

Ras induziert die Aktivierung von bcl-2 und bcl-xL, nicht aber von bax, einem pro-apoptotischen bcl-2 Familienmitglied (Kinoshita *et al.*, 1995b). Dieser anti-apoptotische Effekt des Ras-Signalweges wird aber nicht nur durch den Raf/Mitogen-aktivierten Proteinkinase Signalweg vermittelt, sondern auch über den sensitiven PI3K-Signalweg (Kinoshita *et al.*, 1997)

Der IL-3 Entzug inaktiviert die Ras und PI3K Signaltransduktionswege und führt dadurch zum Zelltod (Allen *et al.*, 1993; Kinoshita *et al.*, 1995a). In den IL-3-abhängigen Zelllinien Ba/F3 und 32D konnte außerdem gezeigt werden, dass Caspase-3 nach IL-3 Entzug aktiviert wird (Ohta *et al.*, 1997).

Zur Untersuchung der Faktorentzugsapoptose in hämatopoetischen Zellen wurde von uns die IL-3 abhängige Modellzelllinie FDC P1 (factor dependent cell Paterson) gewählt (Dexter *et al.*, 1980). Die Zelllinie wurde aus einer Langzeitkultur von murinen Knochenmarkzellen isoliert und besteht aus myeloiden Progenitorzellen. In Abwesenheit von IL-3 initiieren FDC P1 Zellen prompt Apoptose (Whetton und Dexter, 1983; Roberts *et al.*, 1988).



Da die Apoptose ein zeitlich begrenzter und streng regulierter Prozess ist, können sämtliche Kontrollproteine nur transient aktiv sein. Die Regulation der zeitlich begrenzten Proteinaktivität vollzieht sich sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller/posttranslatorischer Ebene.

Um die transkriptionelle Regulationsebene näher zu untersuchen wurde eine Genfallenstrategie benutzt, die es ermöglicht, transient induzierte Gene während der Faktorenzugsapoptose Apoptose zu identifizieren (Russ *et al.*, 1996).

1.5 Genfallenmutagenese, eine Methode zur Identifizierung und Analyse von Genen

1.5.1 Genfallen-Vektoren

Die Genfallen-Mutagenese wurde ursprünglich als eine Methode zur Identifizierung transkriptionell aktiver Regionen des Genoms in kultivierten Zelllinien angewendet (Bhat *et al.*, 1988). Dabei handelt es sich um eine Art von nichtgerichteter Insertionsmutagenese, die auf der zufälligen Integration eines Reportergens in das Genom der Zelle beruht (Gossler und Zachgo, 1993; Hill und Wurst, 1993). Dieses Verfahren ist erfolgreich nicht nur in Maus (Meisler, 1992; Rossant und Hopkins, 1992; von Melchner *et al.*, 1992), sondern auch in *D. melanogaster*, in *C. elegans* (Spradling *et al.*, 1995) und im Zebrafisch (Schier *et al.*, 1996) etabliert worden. Daraus wurden im folgenden Genfallen entwickelt, die zur Untersuchung der Embryonalentwicklung (Thorey *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 1997; Bonaldo *et al.*, 1998) oder der Genregulation durch exogene Stimuli (Forrester *et al.*, 1996; Gogos *et al.*, 1997; Whitney *et al.*, 1998; Akiyama *et al.*, 2000; Komada *et al.*, 2000) herangezogen wurden. Basierend auf der endogenen Expressionregulation des Genfallen-Reportergens wurden eine Reihe von Genfallenstrategien entwickelt, die es ermöglichen spezifische Signaltransduktions-wege zu untersuchen. Dazu gehört eine Verfahren, dass basierend auf einer Kombination von Genfallenmutagenese und sequenzspezifischer Rekombination in der Lage ist, während eines biologischen Prozesses transient induzierte Gene zu identifizieren (Russ *et al.*, 1996; Thorey *et al.*, 1998).

Um mit Genfallen Gene zu identifizieren, die in apoptotischen Zellen induziert werden, und daher nur kurzfristig exprimiert werden, ist ein zusätzlicher Faktor notwendig. Es ist für diesen Fall erforderlich, den Genfalle-kontrollierenden zellulären Promotor von der Expression des Reportergens zu entkoppeln. Um dies zu erreichen wurde das sequenzspezifische Cre/loxP-Rekombinationssystem eingesetzt (Sauer und Henderson, 1988; Gu *et al.*, 1993).

Das Cre/loxP-Rekombinationssystem (Sternberg *et al.*, 1978; Sternberg und Hamilton, 1981) basiert auf einer DNA-Rekombinase, die eine spezifische DNA-

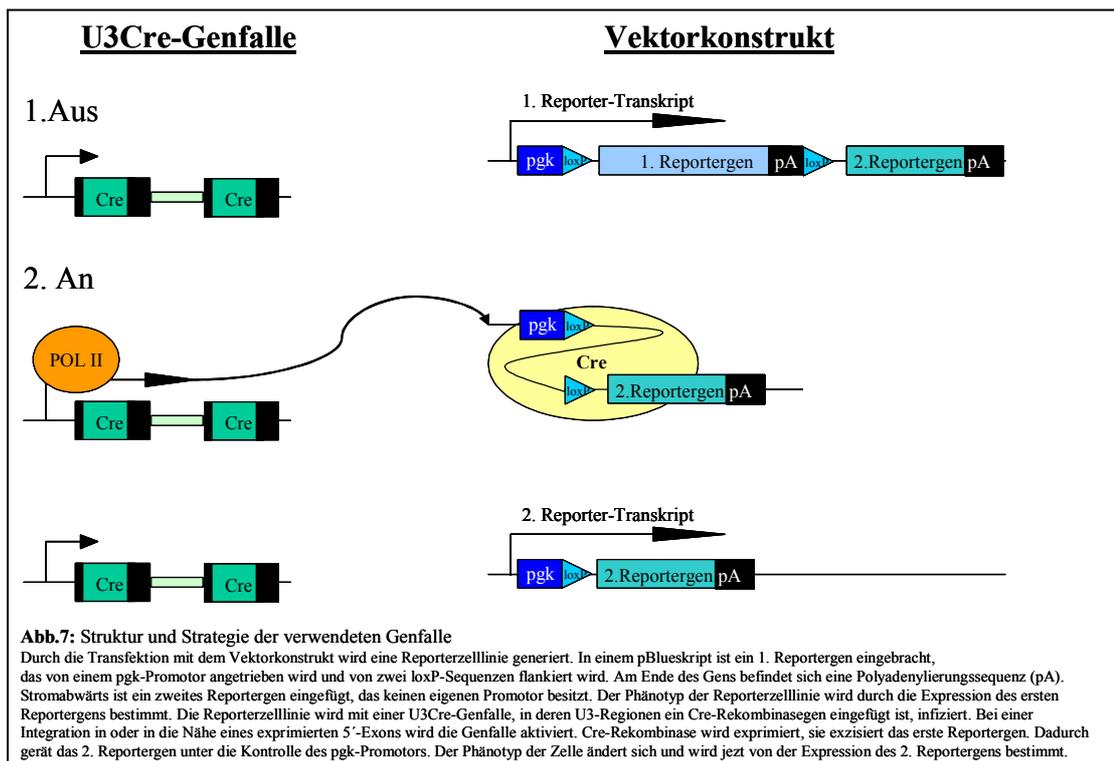
Sequenz erkennt. Derartige Enzyme und DNA-Sequenzen findet man in Bakterien und Hefen. Die sog. Cre-Rekombinase (causes recombination) ist ein 38 kDa Protein aus dem Bakteriophagen P1 (Sternberg *et al.*, 1981). Cre Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei identischen, spezifischen DNA-Sequenzen von jeweils 34 Basenpaaren, die man als loxP (locus of crossing over (x)) bezeichnet (Sternberg und Hamilton, 1981). Die von Cre-Rekombinase katalysierte Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen benötigt keine weiteren Co-Faktoren. Aufgrund dieser Eigenschaften ist das Cre/loxP-Rekombinationssystem ein nützliches Werkzeug für die Gentechnik (Kilby *et al.*, 1993). Eine loxP-Sequenz besteht aus zwei invertierten Sequenzwiederholungen von jeweils 13 Basenpaaren, die eine asymmetrische Kernregion von 8 Basenpaaren flankieren. Die asymmetrische Kernregion definiert die Orientierung der jeweiligen loxP-Sequenz. Die Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen erfolgt durch das Binden von zwei Cre- Rekombinase Untereinheiten an die invertierten Sequenzwiederholungen einer jeden loxP-Sequenz und die darauffolgende Spaltung der DNA in der Kernregion (Mack *et al.*, 1992). Die von Cre-Rekombinase katalysierte Rekombination ist reversibel, und das Ausmaß der Rekombination ist proportional der Menge an exprimierter Rekombinase. Die Orientierung der loxP- Sequenzen zueinander ermöglicht verschiedene DNA Rearrangements.

Liegen zwei loxP-Sequenzen in gleicher Orientierung, führt das zur Deletion der dazwischen liegenden DNA. Diese Art des DNA Rearrangements bietet die Möglichkeit zur induzierbaren Genexpression durch das Cre/loxP-Rekombinationssystem (Russ *et al.*, 1996; Thorey *et al.*, 1998). Die Induzierbarkeit wird dadurch erreicht, dass ein zwischen zwei loxP-Sequenzen liegendes Reportergen 1, durch ein sich direkt anschließendes Reportergen 2 ersetzt werden kann. Die Expression des Reportergens 1 kann somit vollständig unterbunden werden. Die gerichtete Induktion der Genexpression und somit die Expression des Reportergens 2 erfolgt durch die von Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination der beiden loxP-Sequenzen und der daraus resultierenden Deletion des Reportergens 1. Hierdurch gelangt das Reportergen 2 direkt unter die transkriptionelle Kontrolle des exogenen Promoters (Abb. 8). Die Genfalle transduziert in diesem Fall Cre Rekombinase, anstatt eines Reportergens. Der große Vorteil des Cre/loxP-Systems liegt darin, dass schon die transiente Induktion von Cre ein permanentes Rearrangement im zweiten Selektionssystem zur Folge hat. Darüber

hinaus reichen schon sehr geringe Mengen der Rekombinase aus um die Rekombination auszulösen, so dass auch sehr schwach exprimierte Gene mit dieser Methode identifiziert werden können.

1.5.2 Ein Genfallenansatz zur Identifizierung transient exprimierter Gene

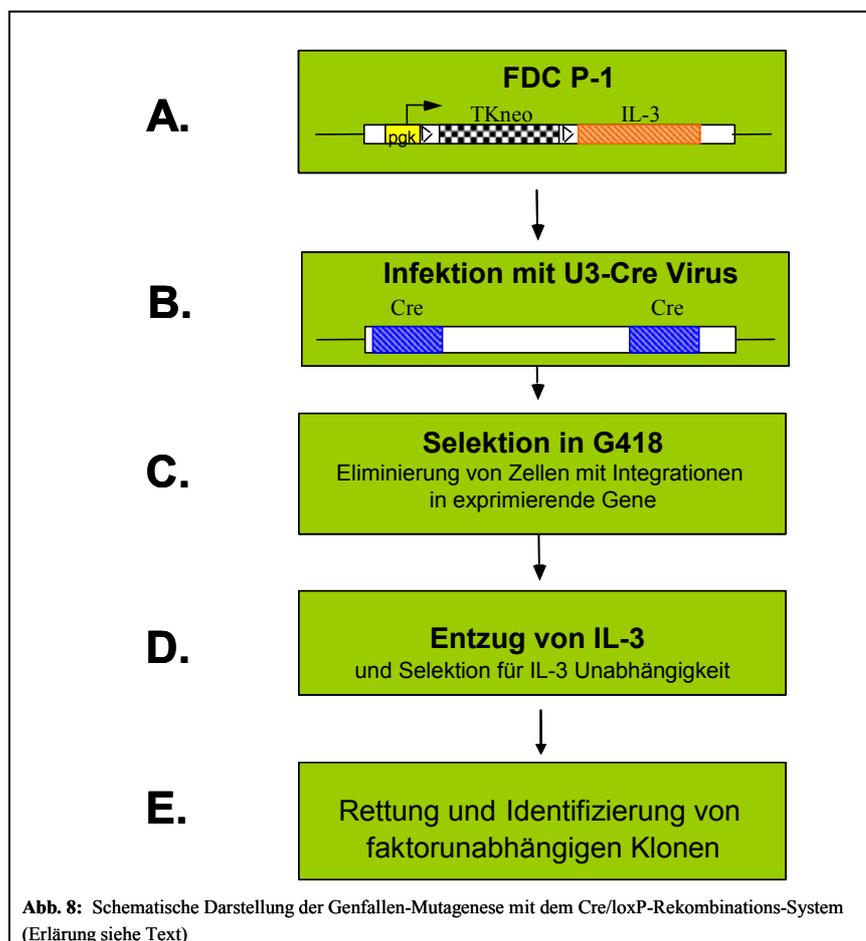
Die oben beschriebene Genfallenmutagenese hat die Identifikation exprimierter Gene zum Ziel. Es lassen sich mit Hilfe retroviraler Genfallen jedoch auch transient exprimierte Gene ermitteln, die mit auf cDNA basierenden Methoden kaum zu identifizieren sind. Dazu wird die Genfallenmutagenese mit gerichteter Rekombination durch das Cre/loxP-System kombiniert (Russ *et al.*, 1996; Thorey *et al.*, 1998).



Das Reporter-Gen der Genfalle wird durch die Cre-Rekombinase ersetzt. Ferner wird ein Vektorkonstrukt generiert, das ein selektierbares Reporter-Gen, flankiert von loxP-Sequenzen, angetrieben von einem pgk-Promotor und versehen mit einem Polyadenylierungssignal am 3'-Ende, enthält (Abb. 8). Stromabwärts des loxP-

flankierten ersten Reportergens ist ein zweites Reportergergen ohne eigenen Promotor eingefügt.

Wie bereits erwähnt, wurde als Modellsystem die FDC P-1 Zelllinie gewählt. Diese Zellen wurden zunächst mit dem molekularen Schalter ppgklxtkneoIL3 transfiziert. Das Reportergergen 1 ist dabei ein TKneo-Fusionsgen, das Reportergergen 2 eine murine IL-3 cDNA. Das Reportergergen 1 ist von zwei loxP Sequenzen flankiert. Das Reportergergen 2 kodiert für murines IL-3. Die Expression beider Gene wird von einem pgk-Promotor initiiert. Weil in nicht-rekombinierten Zellen nur das erste Reportergergen exprimiert wird, ist die resultierende Reporterzelllinie G418 resistent, Ganciclovir-sensitiv und IL-3-abhängig. Diese Reporterzelllinie wird mit einer U3Cre-Genfalle infiziert. Integrationen in aktive Gene exprimieren Cre und aktivieren den molekularen Schalter durch Eliminierung von Tkneo und Induktion von IL-3. Dadurch werden die Zellen IL-3 unabhängig, Ganciclovir (Ganc^R) und Neomycin (neo^R). Entsprechend eliminiert eine initiale Selektion in G418 sämtliche Integrationereignisse in exprimierten Genen. Bei darauffolgender Apoptoseinduktion durch IL-3 Entzug werden nur diejenigen Zellen überleben in denen U3Cre Genfallen induziert werden weil in diesen Zellen IL-3 synthetisiert wird („self-rescue“) (Abb.8).



1.6 Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase

Mit dem oben beschriebenen Versuchsansatz wurde unter anderem das Gen „Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase Typ I-beta“ (PIP5K) als eines der durch IL-3 Entzug induzierten Gene identifiziert.

PIP5K spielt eine wichtige Rolle im Phosphatidylinositol-(PI)-Metabolismus, der eine Vielzahl von zellulären Prozessen beeinflusst. Sowohl Wachstumsfaktoren als auch Onkogenprodukte greifen regulatorisch in diesen Metabolismus ein.

Eines dieser Phosphatidylinositole, Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂), dient als Substrat für die phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C. Diese Lipase generiert aus PIP₂ die sog. „second messengers“ 1,2-Diacylglycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-triphosphat (IP₃). DAG ist ein Aktivator der Protein Kinase C (PKC) (Nishizuka, 1984) und IP₃ spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des intrazellulären Kalziumhaushaltes (Rana und MacDonald, 1986).

In Säugerzellen kann PIP₂ von Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) weiter zu Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat (PIP₃) phosphoryliert werden. PIP₃ wirkt anti-apoptotisch und stimuliert das Zellwachstum (Auger *et al.*, 1989; Cantley *et al.*, 1991). Darüber hinaus moduliert PIP₂ direkt die Aktivität einer Reihe von Enzymen und Strukturproteinen, die in diverse zelluläre Prozesse, wie z.B. Exozytose (Hay *et al.*, 1995), Zytoskelett-Reorganisation (Fukami *et al.*, 1992; Janmey und Stossel, 1987; Lassing und Lindberg, 1985) und Membranumbauten (Carvajal *et al.*, 1996) eingreifen.

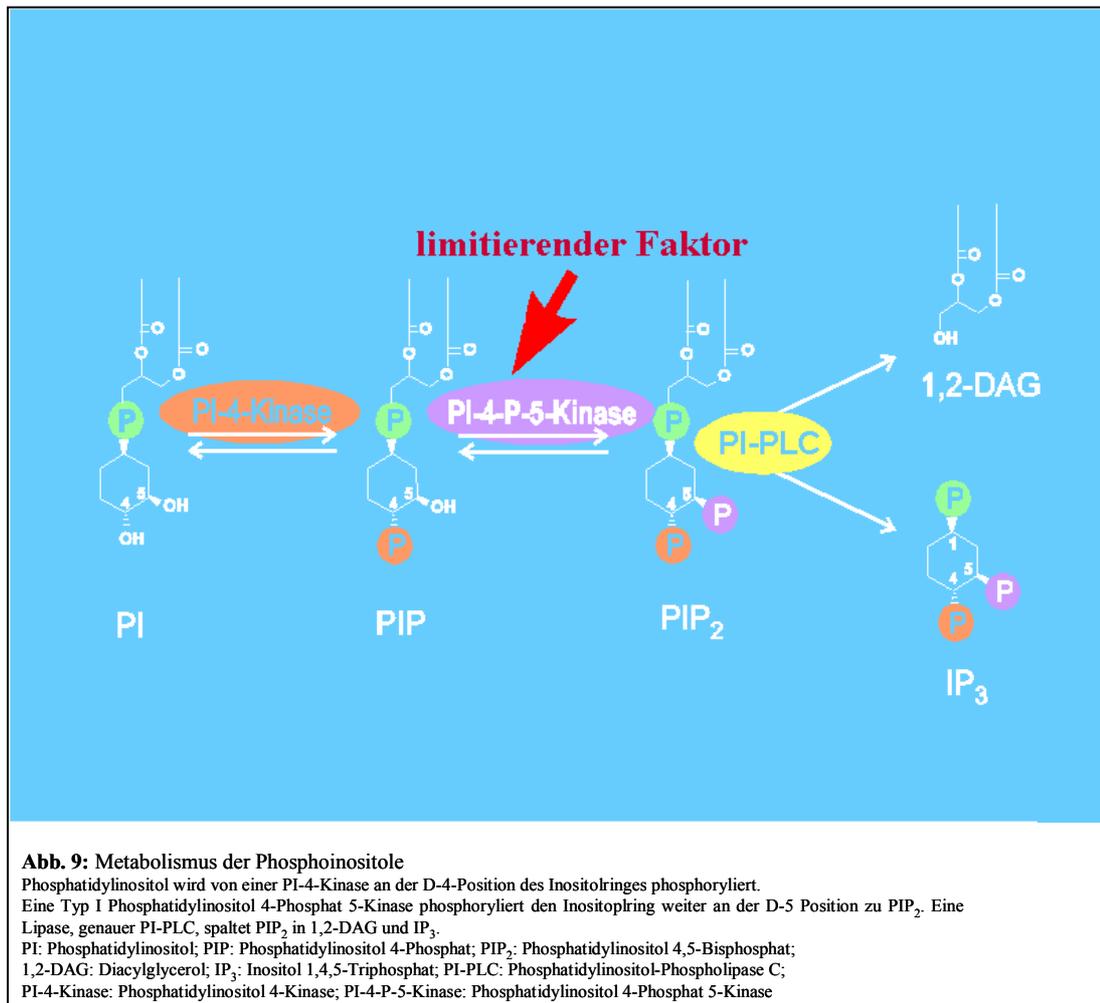
Aufgrund seiner äußerst wichtigen Rolle bei der PI-Signaltransduktion, ist PIP₂ in der Zelle streng reguliert (Hokin, 1968; Michell, 1975).

In Säugerzellen wird PIP₂ von zwei Kinasen synthetisiert (Abb. 10). Im ersten Schritt wird über eine membranständige PI-4-Kinase aus Phosphatidylinositol (PI) Phosphatidylinositol-phosphat (PIP) (Abb. 10). PI wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und an die innere Plasmamembran transferiert, in welcher PIP synthetisiert wird. PIP wird dann von Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase (PIP5K) zu PIP₂ phosphoryliert (Majerus, 1992).

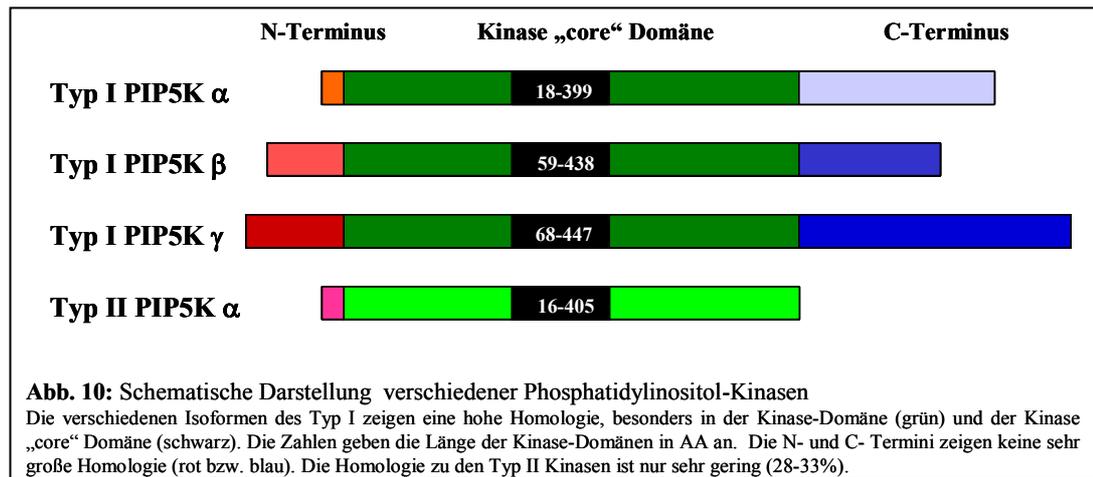
Es gibt zwei biochemisch und immunologisch unterschiedliche PIP5K-Typen (Typ I und Typ II) (Bazenet *et al.*, 1990; Loijens *et al.*, 1996a und b).

Bei näheren Untersuchungen zur Substratspezifität der PIP5K konnte gezeigt werden, dass die Typ I-Isoformen PI 4-Phosphat an der D-5 Position des

Inositolringes (Abb. 10) zu PIP_2 phosphorylieren. Die Typ II Kinasen katalysieren hingegen die Phosphorylierung eines weiteren Phosphatidylinositol 5-Phosphates an der D-4 Position (Rameh *et al.*, 1997). Deswegen wurden die Typ II Kinasen einer neuen Gruppe von Lipidkinasen zugeordnet.



Jeweils drei Isoformen für jeden PIP5K-Typ sind bisher bekannt (Typ I + II α , β und γ), (Itoh *et al.*, 1998; Castellino *et al.*, 1997; Ishihara *et al.*, 1996; Loijens *et al.*, 1996; Boronenkov und Anderson, 1995; Divecha und Irvine, 1995). Ein Vergleich der Primärsequenzen von Typ I und Typ II PIP5K zeigt, dass die Subtypen keine große Homologie aufweisen (28-33%). Im Gegensatz hierzu weisen die Isoformen des gleichen Subtyps eine relative hohe Homologie von 66-78% auf (Loijens *et al.*, 1996a und b) (Abb.9).



PIP5K werden durch saure Phospholipide, besonders Phosphatidsäure (PA) (Moritz *et al.*, 1992; Jenkins *et al.*, 1994; Ishihara *et al.*, 1996,1998) und Phosphatidylserin (PS) (Cochet *et al.*, 1986) unterschiedlich aktiviert. Im Gegensatz zu den Typ I Kinasen, werden Typ II Kinasen nicht durch PA aktiviert (Jenkins *et al.*, 1994).

In verschiedenen Studien konnte auch eine Aktivierung von PIP5K durch die GTP-bindenden Proteine RhoA (Chong *et al.*, 1994; Ren *et al.*, 1996) und Rac (Tolias *et al.*, 1995) nachgewiesen werden. Somit scheint die PIP5K ein „downstream target“ von Rho Proteinen zu sein (Weernink *et al.*, 2000).

Auch die kleinen G-Proteine der ADP-ribosylation factor (Arf)-Familie aktivieren Typ I PIP5K, sowohl in der Plasmamembran (Fensome *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1996), als auch in intrazellulären Membranen, wie der des Golgi-Apparates (Godi *et al.*, 1999). Von Arf-Proteinen ist bekannt, dass sie Phospholipasen D (PLDs) aktivieren. Die Fähigkeit von PA, dem Produkt der PLDs, Typ I PIP5K zu aktivieren, führte zu dem Schluss, dass Arf Proteine die PIP5K indirekt, über eine Erhöhung des PA Spiegels regulieren. Diese Hypothese wurde kürzlich in einer *in vivo*-Studie mit HL60-Zellen bestätigt (Skippen *et al.*, 2002).

Eine große Anzahl chemisch sehr unterschiedlicher Substanzen, wie z. B. Guanosin 5'-O-(3-Thiotriphosphat) (GTP γ S) (Smith und Chang, 1989; Urumow *et al.*, 1986), Phorbolster (Halenda *et al.*, 1984; Boon *et al.*, 1985), Tyrosin Phosphatase Inhibitoren (Payrastra *et al.*, 1992), Integrin (McNamee *et al.*, 1996) und „epidermal growth factor“ (EGF) (Pike und Eakes, 1987; Walker und Pike, 1987; Cochet *et al.*, 1991) haben sich als Regulatoren der PIP₂-Synthese herausgestellt.

Es existiert eine Anzahl von Hinweisen für eine indirekte Beteiligung von PIP₂ an der Apoptoseregulation. Ein Hinweis dafür ist, dass PIP₂ in einem Komplex mit Gelsolin Caspase-3 und -9, nicht aber Caspase-8, inhibiert (Azuma *et al.*, 2000).

Mejillano *et al.*, 2001 konnten eine direkte Beteiligung von PIP₂ an der Inhibierung von Initiator- und Exekutor-Caspasen nachweisen. Auch eine Beteiligung der humanen PIP5K Typ 1 α (entspricht der murinen Form I β) an der Inhibition der Apoptose, ausgelöst sowohl durch Todesrezeptoren (TNF α), als auch durch Cytochrom C-Ausschüttung, wurde in diesen Versuchen gezeigt. In der Sequenz der PIP5K konnte außerdem eine Caspase-3 Spaltstelle nachgewiesen werden, die von Caspase-3 erkannt und genutzt wird (Mejillano *et al.*, 2001). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Überexpression von PIP5K in bestimmten Zelllinien vor Apoptose schützt und zwar über eine PIP₂-Produktion.

1.7 Zielsetzung

Apoptose ist ein äußerst präzise kontrollierter Prozess von großer Bedeutung für jeden Organismus. Störungen in der Apoptose führen immer zu Erkrankungen. Zu viel Apoptose verursacht degenerative Erkrankungen (Parkinson, Alzheimer), zu wenig Apoptose hat fast immer eine Krebserkrankung zur Folge. Aus diesem Grund ist die Identifizierung neuer Apoptose-relevanter Gene, als ein Wesentliches dieser Arbeit, äußerst relevant. Derartige Gene können als molekulare Targets zum Screenen von pharmakologischen Substanzen eingesetzt werden, die nach Indikation entweder Apoptose stimulieren oder inhibieren.

Das spezifische Ziel dieser Arbeit ist die Validierung der der PIP5K als potentiell Target für die pharmazeutische Industrie.

2. Experimenteller Teil

2.1 Allgemeines

2.1.1 Chemikalien

Alle nicht hier extra aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham, Roche Diagnostics, Fluca, Invitrogen, Pharmacia, Serva, Sigma oder Roth bezogen.

2.1.2 Medien zur Anzucht von Bakterien und eukaryotischen Zellen

Bacto Agar	Difco
DMEM	Invitrogen; Karlsruhe
Fötales Kälberserum	Roche Diagnostics; Mannheim
LB Agar	Invitrogen; Karlsruhe
LB Broth Base	Invitrogen; Karlsruhe
PBS Dulbecco's	Invitrogen; Karlsruhe
RPMI	Invitrogen; Karlsruhe

2.1.3 Supplemente

Ampicillin	Sigma; Taufkirchen
mInterleucin-3	TEBU
L-Glutamin	Invitrogen; Karlsruhe
Penicilin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Sigma; Taufkirchen
Puromycin	Sigma; Taufkirchen
Gentamycin	Invitrogen; Karlsruhe

2.1.4 Enzyme und enzymatische Reaktionssysteme

Calv Intestine Phosphatase	Roche Diagnostics; Mannheim
Klenow-Enzym	Invitrogen; Karlsruhe
Platinum Taq DNA-Polymerase	Invitrogen; Karlsruhe
Platinum Taq DNA-Polymerase High Fidelity	Invitrogen; Karlsruhe
Proteinase K	Stratagene
Restriktions Endonucleasen	Invitrogen; Karlsruhe, Roche Diagnostics;
Reverse Transkriptase	Invitrogen; Karlsruhe
RNase A	Invitrogen; Karlsruhe
RNase H	Sigma; Taufkirchen
RNase Inhibitor	Invitrogen; Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Invitrogen; Karlsruhe
T4 DNA Polymerase	Invitrogen; Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen; Karlsruhe

2.1.5 Bakterienstämme

Epicurian Coli® XL1-Blue Supercompetent Cells	Stratagene; Amsterdam
Epicurian Coli® XL10-Gold™ Ultracompetent Cells	Stratagene; Amsterdam

2.1.6 Plasmide

pBABEpuro	Morgenstern und Land, 1990
pcDNAI-Amp	Invitrogen; Karlsruhe
pGem Teasy-Vector	Promega; Mannheim
pcDNA3.1(+/-)	Invitrogen; Karlsruhe

2.1.7 Antikörper

AKT Antibody	New England Biolabs
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Labors, Inc.; West Grove, USA
Peroxidase-conjugated Goat Anti-Mouse IgG	Dianova; Hamburg
Anti-HA (Maus-monoklonal; Klon 12CA5)	Roche Diagnostics; Mannheim
Anti-Caspase-8 (Maus-monoklonal; Klon 1C12)	Cell Signaling Technology
Anti-DNA Polymerase epsilon (Maus- monoklonal; Klon 3C5.1)	Abcam Limited
Anti-caspase-3 (H-277) (Rabbit-polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Inc
Anti-caspase-9 (H-83) (Rabbit-polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Inc
Anti-PARP p85 Fragment pAB (Rabbit- polyklonal)	Promega; Mannheim
Anti-CDC25B	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-CDC27	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-CDC34	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Chk1	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Cip1	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Cul-2	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-DNA Polymerase δ	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-DNA Polymaerase ϵ catalytic	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-hsMAD2	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Ki-67	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-p27/Kip1	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-p55Cdc	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Cdk1	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Cdk2	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Cdk4	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Cyclin A	Beckton Dickinson; Heidelberg

Anti-Cyclin B	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Cyclin D3	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-p19/Skp1	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-p36	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-PCNA	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Rb (AA 300-508)	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-Rb2	Beckton Dickinson; Heidelberg
Anti-RBBP	Beckton Dickinson; Heidelberg
Peroxidase-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG	Dianova, Hamburg
Peroxidase-conjugated Anti-Rat IgG	Dianova, Hamburg

2.1.8 Biochemikalien und Kits

[α - ³² P] dCTP	Amersham
100bp DNA-Leiter, Größenstandard	Invitrogen; Karlsruhe
1kb DNA-Leiter, Größenstandard	Invitrogen; Karlsruhe
ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit	Perkin Elmer
Annexin V-Fluos	Roche Diagnostics; Mannheim
ATP	Roche Diagnostics; Mannheim
CycleTest™ Plus DNA Reagent Kit	Becton Dickinson;
DNA Extraktions Kit	Qiagen; Hilden
DTT	Invitrogen; Karlsruhe
ExpressHyb™ Hybridization Solution	Clontech
Hexanucleotide	Invitrogen; Karlsruhe
Plasmid-Aufreinigungssysteme	Qiagen; Genomed
Proteingrößenstandard	Invitrogen; Karlsruhe
QIAEX II Gel Extraktion Kit	Qiagen; Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen; Hilden
RNA-Leiter, Größenstandard	Invitrogen; Karlsruhe

2.1.9 Eukaryotische Zelllinien

32D	ATCC: CRL-11346, http://www.atcc.org
Ba/F3	DSMZ: ACC 300, http://www.dsmz.de
FDC-P1	Dexter et al., 1980
NIH/3T3	ATCC: CRL1658, http://www.atcc.org
PheNX	Achacoso und Nolan, http://www.Leland.Stanfoed.edu/group/nolan
HeLa	ATCC: CCL-2, http://www.atcc.org

2.1.10 Konstrukte

Konstrukt	Zelllinie	Vektor	Insert
Fpip	FDC P-1	pBABEpuro-E1alpha	PIP5K-cDNA mit 5'-HA-Tag
Fpipm	FDC P-1	pBABEpuro-E1alpha	mutierte Form der PIP5K-cDNA mit 5'-HA-Tag
Fvec	FDC P-1	pBABEpuro-E1alpha	kein Insert
Hpip	HeLa	pcDNA3.1(+/-)	PIP5K-cDNA mit 5'-HA-Tag
Hpipm	HeLa	pcDNA3.1(+/-)	mutierte Form der PIP5K-cDNA mit 5'-HA-Tag
Hvec	HeLa	pcDNA3.1(+/-)	kein Insert

2.1.11 Synthetische Oligonukleotide

26-11-3nes	5'-TGCGTGAATGTTGGCAAGC- 3'
26-11-3nes2	5'-ACAGCATTTCATTGGGGC--3'
26-12-1nes	5'-AGGTGGGGTCTTTCACAAG--3'
26-12-3bw1	5'-AGTACCCTAATGGAGGCTAAC- 3'
26-12-3bw2	5'-TGAGTCCGAATCTCTGGGTC 3'
26-22-3nes2	5'-GGCAGAAATTAACAAAAGC 3'
26-22-4nes	5'-GGGGTTTGTTCAGAGA 3'
26-31-3b1	5'-TACTATCTGGGAGGTTGGGG 3'
26-32-1b4	5'-TTTATCTAGGTCATCCCGACCCCC 3'
26-32-1bw	5'-GTTTTGGAATCTCTCTCTACCCG 3'
26-32-1fw	5'-TTCTGTCCCATCCCAGAGGTCTTC 3'
26-32-2bw13	5'-TTACAGAGACTCCTCCATCTTGGG 3'
26-32-2fw11	5'-ATTTAGGGATGCCAGGGGG 3'
26-32-2nes(10)	5'-ATTCAAAGCTGTCTGGAC 3'
26-32-3nes	5'-AGGTCAACTCCAGATACCCC 3'
26-32-3nes	5'-AGGTGGGGTCTTTCAAAAGGTG 3'
26-32-4nes	5'-GGAAACAGGCTAGAACACACC 3'
26-32-6nes	5'-TACAGGTGGGGTCTTTCATTATC 3'
26-32-8nes	5'-GGGTCTTTCATAGCGAACC 3'
26-41-3nes	5'-CATCAGGTGGGGTCTTTCAGTAGG 3'
-3'Ecopip	5'-GGTCTTAATGATGAATTCATCATC 3'
30-11-1-5'bw	5'-TTGTCTTGCTCTGGGCTTGG 3'
30-11-1-5'fw	5'-GGGATGCACTACGAAAGAGCAG 3'
30-11-1nes	5'-CTACAGGTGGGGTCTTTCACAAG 3'
30-11-4nes	5'-TTACCTTTGCTTTGCCCC 3'
30-11-5bw	5'-ATTGTCCCCAGCTTGAGAG 3'
30-11-5fw	5'-CTGAAGCGATAGAACTGTCTG 3'
30-11-7bw	5'-TAGCTCCCGCATGGCAG --3'
30-11-7fw	5'-GCATTGGTGTTCCTTGC --3'

30-11-8nes	5'-GTGGGGTCTTTCAGGTTTAGC --3'
30-12-1b	5'-TACAGGTGGGGTCTTTC AACCCCTC --3'
30-21-2nes2	5'-GGATTGGTGCAGAGTATGAGAG --3'
30-21-3-5'bw	5'-AGTCAGTGAGTGGCTTATGC --3'
30-21-3-5'fw	5'-GGAACA ACTAACTGCTCAGAG -3'
30-21-5nes	5'-GTGGGGTCTTTCAGTAGTCG -3'
30-31-3bw	5'-GAAGTGCTGCACCATAAATC -3'
30-31-3bw1	5'-GATTTATGGTGCAGCACTTC -3'
30-31-3fw	5'-TTCAAAGCTCTCCAGCTCG -3'
30-32-1nes2	5'-CCAGTGCCAGGATTTAATG -3'
30-32-1nes2	5'-GACCTTAGGTTAATTCCCCTG -3'
30-32-2nes2	5'-TTCAGCGACAATGAGGCTGC -3'
30-32-2nes2	5'-CCACCTTGTTAAATCCCG -3'
30-32-3bw	5'-AAGATCGGGCATCTGGCTTAGG -3'
30-32-3fw	5'-AGCTCCCTGAAACTGCTTT -3'
30-32-3nes	5'-AGCTTCAGCAAAGCAGTG -3'
30-41-2nes	5'-ACGTGAACTTGAAGTGCCC -3'
30-42-4nes	5'-CAGGTGGHGGTCTTTCATATG -3'
5'Bampip	5'CCGCGTGGATCCCCGGGAGAGGGGGCTGCCAAGATG-3'
5B1	5'-AGCTGTTCCATCTGTTCTGACC -3'
5B2N	5'CCTGTTTCACTATCCAGGTTACG-§'
5F2N	%'-TTGTGGTCTCGCTGTTCCCTTG-§'
Anchor	5'-GTGTAGTCATGCAGTGATCGTACAG -3'
AnchorOligodT	5'GTGTAGTCATGCAGTGATCGTACAGTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTT -3'
Cre43	5'-CGGTCAGTAAATTGGACACCTTCC -3'
efpbabefw1	5'-TCTTCCATTTCAAGGTGTCG -3'
FW2	5'-TGCGAACCTCATCACTCGTTG -3'
FW3	5'-CATGTCCATCAGGTTCTTGCG -3'
FW4	5'-CGGGTCAGAAAAAATGGTGTTG -3'

gag1	5'-TCAATCGTGACCTGGGAAGC -3'
MCSbw	5'-AATTCCAAGATCTTGGCTCGAGGATCCTAC -3'
MCSfw	5'-GTAGGATCCTCGAGCCAAGATCTTGG -3'
MHAfw2	5'-TGATGTTCCAGATTACGCTG -3'
pbabe/gag	5'-TTCCACACCCTAATCGACAC -3'
PIPbw/cDNA	5'-GATGCTGTCCTCAACTGTCAAAGG -3'
PIPbw1	5'-GCATCAAGGGGATGAAAACC -3'
PIPbw2	5'-GGACATCAACAGGCTGTAGTC -3'
PIPbw3	5'-AGGAACAGGTGAACCCTCAC -3'
PIPfw/cDNA	5'-GAAGAGACGTGGGGAAGATTCG -3'
PIPfw1	5'-GGTTTTTCATCCCCTTGATG -3'
PIPfw2	5'-AGTGGTTCCTCTTCTATGTG -3'
PIPfw3	5'-AGGGTTCAACTTACAAGCG -3'
PIPfw4	5'-CGCTCTATTCCACAGCTATG -3'
PIPfw5	5'-GCCTTCTCCTACCAAAAAGTTTCG -3'
PIPfw6	5'-TGTAGTTGGACAACCTTTGC -3'
SP6	5'-CATTTAGGTGACACTATA -3'
T7	5'-ATTATGCTGAGTGATATCCCGCT -3'

2.1.12 Sonstige Materialien

Centri-Sep-Säulen	Princeton Separations
Filme	Kodak, Polaroid
Hybridisierungslösung	Clontech
Nylonmembran	Amersham
Protein-Fertiggel	Invitrogen; Karlsruhe
Zellkulturschalen	Nunc

2.1.13 Geräte

ABI Prism DNA Sequenzer	Perkin Elmer ABI
Brutschränke	Heraeus
Computer	Appel Macintosh
Elektrophoresekammern	BioRad
FACScan	Beckton Dickinson
Filmentwicklungsmaschine	Kodak
Geltrockner	Promega
Hybridisierungsöfen	Biometra
Kamera	Minolta
Kühlzentrifugen	Heraeus; Sorval
Mikroskop	Leica
Mikrowellenherd	Moulinex
Milli-Q-Anlage	Millipore
Phosphoimager	Molecular Dynamics
Proteingel Apparaturen	BioRad; Novex
Robocycler	Stratagene
Schüttelinkubator	B. Braun
Sofortbildkamera	Polaroid
Sterilbank	Milton Roy
Thermo-Cycler	Perkin Elmer;
Tischzentrifuge	Eppendorf
Transilluminator	Bachofer
Ultrazentrifuge	Beckmann
UV Stratalinker 1800	Stratagene
Vortexer, REAX 2000	Heidolph
Wasserbäder	GFL
Western-Blot Apparatur	Invitrogen
Zentrifuge	Sorval
FACS-Gerät	Becton Dickinson

2.1.14 Software

ABI Prism DNA Sequencing Software	Perkin Elmer ABI
Canvas	DENEBA Software
Datenbanken	GenBank, U.S.A.; EMBL, GB
ImageQuant	Molecular Dynamics
MacVector 6.0.1 (DNA/Proteinanalyseprogramm)	Oxford Molecular Group PLC.
Photoshop 4.0	Adobe Systems Inc.
Word für MacIntosh 6.0, Word98 für Macintosh	Microsoft GmbH

2.2 Methoden

DNA-Technologie

2.2.1 Restriktion und Gelelektrophorese

Die Nukleinsäuren (DNA) wurden mit der jeweiligen Restriktionsendonuklease unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen inkubiert. Die Inkubationszeiten betragen 2-3 Stunden bei einer Temperatur von 37°C, sofern keine anderen Empfehlungen gegeben wurden. Um die DNA vollständig zu spalten wurde die Enzymkonzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Units} = (\text{pmol DNA} \times \text{Anzahl der Schnittstellen des Enzyms}) / (0,03 \text{ pmol} \times \text{Anzahl der Schnittstellen des Enzyms in } \lambda)$$

Diese Formel basiert auf der Definition für Unit (U): 1U = die Enzymmenge, die in einer Stunde 1 γ g λ -DNA (0,03 pmol) vollständig spaltet.

2.2.2 Modifikation von DNA-Fragmenten

a) Dephosphorylierung

Zur Verhinderung der Religation von linearisierten Vektormolekülen wurden diese dephosphoryliert. Hierzu wurde der Restriktionsansatz direkt mit CIP versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation bei 75°C für 10 min gestoppt. Die dephosphorylierte DNA wurde mittels eines Agarosegels aufgetrennt und mit dem Qiagen Gelextraktions Kit (2.2.3) aufgereinigt.

b) Auffüllen von überhängenden 5'-Enden

Überhängende 5'-Enden von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des Klenow-Enzyms (C-terminales Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*) aufgefüllt. Nach der Restriktion wurde der Reaktionsansatz mit 1U Klenow pro 0,2-5 μ g DNA versetzt. Es wurden dNTPs mit einer Endkonzentration von 50 μ M je Nukleotid zugegeben. Der Ansatz wurde 30min bei RT inkubiert und das Enzym anschließend für 10min bei 75°C deaktiviert und gelelektrophoretisch gereinigt.

c) Entfernen von überhängenden 3'-Enden

Um überhängende 3'-Enden zu entfernen, wurde die T4 DNA-Polymerase mit ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität verwendet. Die Inkubation erfolgte in Anwesenheit von 50 µM dNTPs für 20min bei 12°C. Die DNA wurde mit dem PCR-Purification Kit von Qiagen aufgereinigt.

2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

(Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen)

Die mit Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA wurde zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1) und das entsprechende DNA-Fragment unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten.

Die anschließende Extraktion aus dem Agarosegelstück wurde mit Hilfe des „Qiaquick Gel Extraktion“ Kits von Qiagen nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.4 Ligation

20-100 ng restriktierte Vektor-DNA wurden mit einem drei- bis fünffachen molaren Überschuss an DNA Passagierfragment in einem Gesamtvolumen von 20µl in 1X Ligationspuffer mit 1U T4 DNA-Ligase gemischt und über Nacht bei 16 C ligiert.

1X Ligationspuffer

66 mM Tris/HCl (pH 7,5)

5 mM MgCl₂

1 mM ATP

1 mM DTT

2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien

(Hanahan, 1983)

Als Kompetenz wird die Fähigkeit eines Bakteriums bezeichnet, DNA aufzunehmen.

Die natürliche

Kompetenz von Bakterien ändert sich mit dem physiologischen Zustand der Zelle und ist in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase am höchsten, sinkt danach aber rasch auf ein Minimum ab (Schlegel, 1985). Durch CaCl_2 -Induktion wird die Fähigkeit der Bakterien, unverpackte DNA aufzunehmen, stark gesteigert. Sie bleibt für Monate bei eingefrorenen Bakterien (-70°C) erhalten (Mandel und Higa, 1970).

Der Vorgang der DNA-Aufnahme wird als Transformation bezeichnet. Um Bakterien kompetent zu machen, wurde ein Aliquot Bakterienzellen in 5 ml LB-Medium über Nacht unter Schütteln (220 UpM) bei 37°C kultiviert. Um die optimale Wachstumsphase der Zellen zur Kompetenzinduktion zu erreichen, wurde 1 ml der Bakteriensuspension anschließend mit 100 ml LB-Medium versetzt und nochmals bei 37°C für einige Zeit inkubiert. In dieser zusätzlichen Proliferationszeit der Bakterien wurden Proben entnommen, um die Dichte der Bakterienkultur durch Messung der Extinktion im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm zu bestimmen. Wurde eine OD_{600} von 0,6 bis 0,9 gemessen, hatten sich die Bakterien soweit vermehrt, dass die folgenden Schritte zur Kompetenzinduktion eingeleitet werden konnten. Zuerst wurde eine 30 min Inkubation auf Eis durchgeführt. Die gekühlte Bakteriensuspension wurde anschließend zentrifugiert ($4.000 \times g$, 15 min, 4°C) und das Bakterienpellet wurde in 30 ml eiskaltem TBF I-Puffer aufgenommen. Diese Suspension wurde für 60-90 min auf Eis inkubiert und ein weiterer Zentrifugationsschritt ($4.000 \times g$, 15 min, 4°C) schloss sich an. Das Bakteriensediment wurde in 4 ml eiskaltem TFB II-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird sofort aliquotiert ($100 \mu\text{l}/\text{Reaktionsgefäß}$) und die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die aliquotierten, kompetenten Zellen konnten dann bei -80°C für Monate gelagert werden.

TBF I-Puffer

30 mM K-Acetat

50 mM MnCl₂

100 mM RbCl

10 mM CaCl₂

15% Glycerin (v/v)

mit 0,2 N NaOH auf pH 5,8 einstellen; sterilfiltrieren; bei 4°C lagern

TBF II-Puffer

10 mM MOPS pH 7,5

75 mM CaCl₂

10 mM RbCl

15 % Glycerin (v/v)

sterilfiltrieren; bei 4°C lagern

2.2.6 Transformationen

3-10 µl eines Ligationsansatzes wurden mit 200 µl chemokompetenter Bakterien vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec und eine sofortige Abkühlung auf Eis für 2 min. Nach einer Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz für 1 Std. bei 37°C in einem Bakterienschüttler inkubiert.

Die Bakterien werden bei 3000rpm für 3 min abzentrifugiert und auf einer LB-Amp-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.7 Plasmidisolierung

- a) aus 3 ml Kulturen (Mini-Prep)
(Qiaquick Miniprep Kit; Qiagen)

3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit einer plasmidtragenden Bakterienkolonie inokuliert und über Nacht in einem Bakterienschüttler (37°C; 220 UpM) inkubiert.

Ein mL dieser Über-Nacht-Kultur wurde in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 10 min bei 3000 UpM abzentrifugiert, die sedimentierten Bakterien wurden nach den Angaben des Herstellers weiterverarbeitet.

- b) aus 100 ml Kulturen (Midi-Prep)
(Jetstar Midi-Kit; Genomed)

Die präperative Plasmidisolierung erfolgte unter Verwendung von Kartuschen der Firma Genomed.

Hierzu wurden 100 ml Übernachtskultur einer plasmidtragenden Bakteriensuspension zunächst zentrifugiert (10 min; 4°C; 3000 UpM). Die anschließende Aufarbeitung des Plasmids erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Plasmid-DNA wurde in einer adäquaten Menge destilliertem Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt ($1OD_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$).

2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

a) PCR

(Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988)

Zur Amplifikation wurde 1-10 ng DNA in 25 µl Gesamtvolumen nach folgendem Schema eingesetzt:

x µl DNA-Lösung

2,5 µl 10x PCR-Puffer

1 µl Oligonucleotid A (10 pmol)

1 µl Oligonucleotid B (10 pmol)

0,5 µl dNTP-Mix (0,2 mM je Nukleotid)

0,2 µl Taq-DNA Polymerase

x µl ddH₂O

Die Reaktionen wurden in verschiedenen PCR-Thermoblöcken durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen richteten sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA und den Schmelzpunkten der chemisch synthetisierten Oligonukleotide:

92°C 5 min Denaturierung

x°C 1 min Hybridisierung der Oligonukleotide an die DNA

72°C x min Neusynthese (1 kb/min)

25-35 Zyklen

b) Inverse PCR

(Ochman, 1988; Ochman, 1990)

5 µg genomische DNA der zu untersuchenden Probe werden mit 5 U der jeweiligen Restriktionsendonukleasen in 50 µl Endvolumen bei 37°C über Nacht inkubiert.

Die DNA im Restriktionsansatz wird durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) sowie 2,5 Volumen Ethanol 20 min bei -20 C gefällt und anschließend durch Zentrifugation (14000 UpM; 15 min; 4°C) sedimentiert. Das Sediment wurde einmal mit 75% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 l ddH₂O resuspendiert.

Die gespaltene DNA wurde nun in einem Gesamtvolumen von 300 μ l in folgendem Ligationsansatz über Nacht bei 16°C zu Zirkeln legiert:

50 μ l DNA

60 μ l 5xLigase-Puffer

1,5 μ l T4 DNA-Ligase (5U/l)

3 μ l ATP (100 mM)

286 μ l ddH₂O

Die Ligase wurde am nächsten Tag bei 65°C für 10min inaktiviert.

Die DNA-Fällung erfolgte wie oben beschrieben. Es wurden jeweils 50 μ l eines Ligationsansatzes in 0,5 ml Plastik-PCR-Reaktionsgefäßen gefällt und gewaschen.

1.PCR

Mastermix1:

2 μ l 10x PCR-Puffer

0,6 μ l MgCl₂ (50 mM)

1 μ l Oligonucleotid A (50 pmol)

1 μ l Oligonucleotid B (50 pmol)

0,4 μ l dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)

15 μ l ddH₂O

Bei der Inversen PCR zur Amplifikation von 5'-flankierenden Sequenzen wurden die Oligonukleotid-Paare FW3 und FW4 eingesetzt. Bei der Amplifikation der 3'-flankierenden Sequenzen fanden die Oligonukleotide 5F1 und 5B1 Anwendung.

Das DNA-Sediment aus der vorangegangenen Fällung wird in jeweils 20 μ l Mix 1 resuspendiert. Das DNA-Mastermix1 Gemisch wurde in einem Thermoblock für 5 min auf 94°C erhitzt. Anschließend wurde in das Reaktionsgefäß 5 μ l des Mastermixes2 pipettiert.

<u>Mastermix2:</u>	0,5 µl 10x PCR-Puffer
	0,1 µl dNTP-Mix (10 mM pro Nukleotid)
	0,15 µl MgCl ₂ (50 mM)
	4,05 µl ddH ₂ O
	0,2 µl Taq-Polymerase

Der PCR-Ansatz wurde mit 30 l Mineralöl überschichtet und eine PCR-Reaktion unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

35x 30 sec 94°C
1 min 63°C
6 min 72°C

6x 30 sec 94°C
1 min 61°C
6 min 72°C

1x 15 min 72°C

Nach Beendigung der PCR werden 5 µl der PCR-Reaktion auf einem 1%tigem Agarosegel aufgetrennt.

Vom restlichen Ansatz werden 5 µl 1:40 verdünnt.

2.PCR („nested PCR“)

In der 2. PCR, mit der eine höhere Spezifität des Amplifikates erreicht werden soll, wird jeweils 1 l der 1:40 Verdünnung aus der 1. PCR eingesetzt.

Die PCR- Mastermixe1+2 werden wie in PCR 1 eingesetzt. Für die 5'-Richtung wurden die Oligonukleotide Cre43 und FW1, für die 3'-Richtung die Oligonukleotide 5F2N und 5B2N eingesetzt.

Die Reaktionsbedingungen waren:

20x 30 sec 94°C
1 min 63°C
6 min 72°C

1x 15 min 72°C

Das PCR-Produkt wurde mit einem PCR-Aufreinigungs-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dabei wurden über eine Säule überschüssige Oligonukleotide sowie Salze abgetrennt.

2.2.9 Sequenzierung von dsDNA

(Sanger *et al.*, 1977; Big Dye Sequenzier-Kit; Perkin Elmer)

Die Sequenzierung von dsDNA erfolgte nach der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Methode der Polymerisationstermination durch Didesoxynukleotide. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem „Big Dye Sequenzier-Kit“ durchgeführt. Die terminierenden vier verschiedenen Didesoxynukleotide sind mit je einem anderen fluoreszierenden Farbstoff markiert. Die Reaktion erfolgte in einem Endvolumen von 20 l in einem Thermoblock unter folgenden Bedingungen:

25x 1 min 92°C
1 min 50°C
4 min 60°C

Anschließend wurden die Proben über Centri-Sep-Säulen aufgereinigt, um Reste des fluoreszierenden Terminator Ready Reaction Mix zu entfernen. Schließlich wurde die Sequenzreaktion auf die Gel-Matrix des DNA-Sequenzers aufgetragen. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit ABI PRISM DNA Sequencing Software.

*RNA-Technologie***2.2.10 Präparation von gesamt-RNA**

(RNAzol™ B-RNA Isolation Method, Molecular Research Center Inc.)

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und gezählt. 1×10^6 Zellen wurden in 200 l RNAzol B aufgenommen und lysiert. In diesem Stadium können die Lysate bei -70 C eingefroren werden.

Es wurden 1/10 Volumen Chloroform zugegeben und gevortext. Die Lösung nimmt eine milchig weiße Farbe an. Nun wurden 5 min auf Eis inkubiert und danach 15 min bei 14000 UpM und 4°C zentrifugiert. Beim Zentrifugieren entstehen zwei Phasen, wobei sich die RNA in der oberen Phase befindet. Diese wurde abpipettiert und die RNA mit einem gleichen Volumen Isopropanol für 15 min bei 4°C gefällt. Dann wurde wiederum 15 min, 14000 UpM und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Sediment wurde mit 80% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in DEPC-ddH₂O aufgenommen.

2.2.11 Präparation von Poly-A⁺-RNA aus gesamt-RNA

(Hartmann *et al.*, 1990)

0,5 mg gesamt-RNA wurden mit Proteinase K (Endkonzentration 0,3 mg/ml) auf ein Volumen von 50 ml gebracht und 3 h bei 37°C inkubiert. Oligo(dt) Cellulose wurde über Nacht bei 4°C in OE-Puffer resuspendiert (250 mg/50 ml Puffer). Die Oligo(dt) Cellulose wurde 3x mit 50 ml OB-Puffer gewaschen (2 min, 500 UpM). Die Oligo(dt) Cellulose wurde dann in der RNA-Lösung aufgenommen und für mindestens 18 Stunden auf einem Rollinkubator inkubiert. Nach der Bindung der Poly-A⁺-RNA an die Oligo(dt) Cellulose wird diese für 2 min bei 1000 UpM und 4°C abzentrifugiert und 3x in OB-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 10 ml OB-Puffer aufgenommen und in eine Econo-Säule überführt. An ihrer Spitz befanden sich ein Dreiweghahn und eine gelbe Kanüle trägt. Die Säule wurde mit 30 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution der RNA erfolgte mit 10 ml OE-Puffer. Dabei werden ca. 10 Fraktionen von 0,5 ml Eluat in Reaktionsgefäßen gesammelt. Um die

RNA-haltigen Fraktionen zu bestimmen wurden Aliquots aller Fraktionen in die Taschen eines ethidiumbromidhaltigen Agarosegels pipettiert und unter UV-Licht kontrolliert. Die RNA-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und der RNA-Gehalt spektralphotometrisch bestimmt. Die RNA wurden in Aliquots zu 5 µl bei -80°C aufbewahrt. Die RNA kann gegebenenfalls mit Natriumacetat gefällt werden.

OB-Puffer

0,5 M	NaCl
10 mM	Tris/HCl pH 7,2
0,1mM	EDTA
0,2%	SDS

OE-Puffer

10 mM	Tris/HCl pH 7,2
0,1 mM	EDTA
0,2%	SDS

Waschpuffer

0,1 M	NaCl
10 mM	Tris/HCl pH 7,2
0,1 mM	EDTA
0,2%	SDS

2.2.12 Transfer von RNA auf Nitrocellulose Membranen

(Northern Blot)

Gelkammer, Käme und Schlitten wurden mit Ethanol gereinigt (oder 0,2N NaOH, dann aber gründlich mit autoklaviertem A. bidest spülen). Am besten über Nacht inkubieren. Für das Formaldehydgel (1,2 %; 150 ml) benötigt man, 1,8 g Agarose in 108,5 ml H₂O (DEPC) aufkochen (Erlenmeyer vor Kochen abwiegen und verdampftes Wasser wieder auffüllen), 15 ml 10x MOPS zugeben und Gel auf ca. 60°C abkühlen lassen. Danach 26,8 ml Formaldehyd zugeben, mischen und Gel sofort gießen. Das Gel für max. 30 min. bei 4 W vorlaufen lassen.

Parallel zum Vorlauf Proben vorbereiten:

RNA (bis zu 20 µg) mit 10 µl Formamid, 3,5 µl Formaldehyd und 2 µl 5x Laufpuffer mischen (Gesamtvolumen max. 20 µl; RNA gegebenenfalls fällen). Das RNA-Gemisch 5 min. bei 65°C denaturieren, anschließend sofort auf Eis stellen. Zur Überprüfung der RNA sollte vorher ein Probegel (normales Agarosegel) gemacht werden, da Ethidiumbromid eventuell zu Störungen beim Blotting-Verfahren führen kann.

Die Laufdauer ist individuell unterschiedlich, abhängig von der erwarteten RNA-Länge. Als Laufpuffer dient 1x MOPS.

Gel anschließend direkt auf Nitrocellulose transferieren (nicht entfärben, spülen etc.). Transfer auf Nylonmembran (HybondN oder HybondN+) mit 20x SSC Über-Nacht bei RT (Transferaufbau siehe Abbildung). Gefäße und Glasplatten mit Ethanol reinigen und/oder gut spülen; 20x SSC mit DEPC-Wasser ansetzen). Nach dem Transfer sollte man die Membran sofort crosslinken (nicht spülen).

10x MOPS

42 g	MOPS
6,5 g	Na-Acetat
10 ml	0,5 M EDTA

2.2.13 Radioaktive Markierung von DNA

(Feinberger und Vogelstein, 1983 und 1984)

Die Markierung von DNA mit [α -³²P] dCTP erfolgte mit dem Rediprime™II „random prime labelling kit“ der Firma Amersham-Pharmacia.

Es wurden etwa 10 ng DNA in 26 µl dH₂O aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Der lyophilisierte labelling Mix wird in 20 µl dH₂O aufgenommen und mit 25 µl der denaturierten Sonde gemischt. Es werden nun 5 µl radioaktives [α -³²P]dCTP hinzugefügt und für 15 min bei 37°C inkubiert.

Nach der Reaktion wurden die nicht eingebauten, freien Nukleotide mittels einer Schleudersäule (Bio-Gel P10) abgetrennt. 1 µl der markierten DNA wurde in einem

β -Counter gemessen und zeigte somit die Effizienz der Markierung an. Die markierte Sonde ist für einige Tage bei 4 °C stabil.

2.2.14 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden

Die Nitrocellulosemembran, die hybridisiert werden soll wird in ExpressHyb™ Hybridization Solution der Firma Clontech 30 min, bei 65°C vorhybridisiert. Dazu wird die Membran entweder in einem Hybridisierungsbeutel eingeschweißt oder in eine Hybridisierungsröhre aus Glas verbracht. die Sonde wird vor der Zugabe für 5 min bei 95°C denaturiert, und 75 min mit der Membran wiederum bei 65°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Membran 2x für je 15 min in Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschen wird die Membran erneut in einen Beutel eingeschweißt und entweder in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm über Nacht bei -80°C, oder in einer Phosphoimagerkassette über Nacht inkubiert.

Waschpuffer

2x	SSC
0,1 %	SDS

*Protein-Technologie***2.2.15 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

(Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BioRad)

Die verwendete Methode beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau, nach dessen Bindung an Proteine von 465 nm (rot) auf 595 nm (blau).

1-10 µl eines Proteinlysates wurden mit 1 ml Farbreagenz („Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate“) vermischt, und die Extinktion bei 595nm gegen einen Leerwert gemessen. Mit verschiedenen BSA-Konzentrationen in Lysispuffer wurde eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe die Proteinkonzentrationen abgeleitet wurden.

2.2.16 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli,1970; Invitrogen)

Mittels einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese lassen sich Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht auftrennen und charakterisieren.

Es wurden SDS-Bis-Tris Fertiggele der Fa. Invitrogen mit den jeweils angegebenen Konzentrationen verwendet. Als Laufpuffer wurde der von der Firma jeweils angegebene Puffer verwendet.

Für die Lysate wurden die Zellen in eiskaltem PBS gewaschen (1200 UpM, 4 C) und in einer der Zellzahl entsprechenden Menge Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (50 µl pro 1×10^6 Zellen) aufgenommen. Nach einer vollständigen Lyse wurde zentrifugiert um Zelltrümmer und DNA zu entfernen (14000 UpM, 10 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Lysispuffer

20 mM	Tris-HCl pH8,0
137 mM	NaCl
10%	Glycerol
1%	NP-40 (Nonidet P-40)
10 mM	EDTA
100 mM	NaF

Zu 1 ml Lysispuffer kommen immer frisch

10 µl	PMSF 100 mM
5 µl	Aprotinin
10 µl	Na-Orthovanadat 2M
2 µl	Leupeptin 5 mM

2.2.17 Immunopräzipitation

(Schraven *et al.*, 1991)

Für die Immunopräzipitation wurde der monoklonale Anti-HA Antikörper (Roche Diagnostics) eingesetzt. Zunächst wurden 4×10^6 Zellen (Suspension oder adhären) mit kaltem PBS gewaschen. Dieser Waschschrift erfolgte bei 4°C. Die Zellen wurden in 400 µl Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (siehe 2.2.15) lysiert und pelletiert, 1200 UpM, 5 min. Zu dem Überstand wurde 10 µl gewaschene Protein-G-Sepharose(3x in 0,1% BSA in PBS; 13000 Um, 30 sec) gegeben, für eine unspezifische Adsorption (3- 4 h, 4°C, rotieren). Dann wurde die Protein-G-Sepharose abzentrifugiert (13000 UpM; 4°C; 10 min) und zu dem Überstand wurde 5 µg Anti-HA Antikörper (Klon 12C5A) gegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Am nächsten morgen wurde 10 µl gewaschene Protein-G-Sepharose (s.o.) hinzugefügt und wiederum bei 4°C für 2-3 h rotierend inkubiert.

Nun wurde das Lysat 6x mit je 1 ml Lysispuffer gewaschen (14000 UpM, 30 sec). Zum Eluieren der präzipitierten Proteine werden 20 µl PBS, 10 µl Sampel-Puffer (Invitrogen) und 4 µl Mercaptoethanol hinzugefügt und für 10 min gekocht. Das Lysat wird abzentrifugiert (14000 UpM, 10 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat kann bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.18 Western-Blot mit immunologischem Nachweis von Proteinen

(Harlow und Lane, 1988)

Der Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf Nitrocellulose wurde durch ein elektrisches Feld zwischen zwei Graphitelektroden als Gel-Membran-Transfer nach dem Nass-Verfahren in 1x Transferpuffer vermittelt. Der Gel-Membran-Transfer wurde wie folgt aufgebaut:

Graphitelektrode (Kathode)

1 Transferpapier in Transferpuffer

SDS-Polyacrylamidgel

Nitrocellulose

1 Transferpapier in Transferpuffer

Graphitelektrode (Anode)

Der Transfer erfolgte bei 35 mA für 90-120 min. Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Transfer für 1-2 min in Ponceau S angefärbt um die Qualität des Transfers zu überprüfen. Entfärbt wurde die Membran durch mehrmaliges waschen in PBS.

Um unspezifische Bindungen bei der späteren Immundetektion (Ogata *et al.*, 1983) zu vermeiden, wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 5% fettarmer Trockenmilch in TBS-T geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper für 1 h bei RT. Vor Zugabe des zweiten Antikörpers wurde dreimal in TPS-T gewaschen. Bei den zweiten Antikörpern handelte es sich um Peroxidase gekoppeltes IgG. Die Zweit-Antikörper wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Nach 45 min Inkubation bei RT wurde erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der Immunreaktion (unter Lichtausschluss) erfolgte durch Zugabe einer Chemilumineszenz- Substratlösung.

Zur Wiederbenutzung der Western Blots können die Membranen „gestrippt“ werden, die gekoppelten Antikörper werden mit Hilfe von Mercaptoethanol und Wärme von den Proteinen gelöst. Dazu wurden die Membranen für 15 min in TBS-T gewaschen. Danach wurden sie für 30 min in 55°C warmen Stripping-Puffer inkubiert und

anschließend mehrmals in TBS-T gewaschen, um das β -Mercaptoethanol zu eliminieren.

Laufpuffer:

1x MOPS SDS Laufpuffer der Firma Invitrogen

Transferpuffer:

12 mM	Tris Base (1,45g)
96 mM	Glycin (7,2g)
20 %	Methanol
ad 1000 ml	ddH ₂ O

TBS-T:

10 mM	Tris HCl pH 8,2
150 mM	NaCl
0,5 ml	Tween 20
ad 1000 ml	ddH ₂ O

Als Größenmarker diente MultiMark™ multi-colored Standard der Firma Invitrogen.

ECL I-Lösung:

1,0 ml	Luminol (250 mM in DMSO)
0,44 ml	Coumarinsäure (90 mM in DMSO)
10 ml 1 M	Tris HCl pH 8,5
ad 100 ml	ddH ₂ O

ECL II-Lösung:

64 μ l	30% H ₂ O ₂
10 ml 1 M	Tris HCl pH 8,5
ad 100 ml	ddH ₂ O

Stripping Puffer:

100 mM	β -Mercaptoethanol
62,6 mM	Tris HCl pH 6,8
2 %	SDS
ad 100 ml	ddH ₂ O

*Zellkultur***2.2.19 Inaktivieren von FCS**

Die bei -20°C gelagerten Fötalen Kälberseren (FCS) wurden über Nacht bei 4°C aufgetaut, im Wasserbad bei 56°C für 45 min inaktiviert, steril aliquotiert und bei -20°C bis kurz vor Gebrauch gelagert. Im Kühlschrank gelagertes FCS lässt sich bis zu etwa einer Woche verwenden, komplettiertes Medium bis etwa vier Wochen.

2.2.20 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff in 0,5 ml Kryoröhrchen eingefrorenen und gelagerten Zellen konnten nach Abspülen mit Methanol (100%) zur Verhinderung etwaiger Mykoplasmen-Kontamination - durch schnelles Auftauen bei 37°C in einem Wasserbad revitalisiert werden und wurden danach sofort in 10 ml frisches Kulturmedium überführt. Durch Zentrifugation bei $300 \times g$ für 5 min und Abnahme des Überstands wurde das im Einfriermedium enthaltene DMSO entfernt. Nachfolgend wurden die Zellen in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml bei Suspensionszellen bzw. $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm bei adhärennten Zellen in geeignete Kulturgefäße ausgesät.

2.2.21 Einfrieren von Zellen

Zur Gefrierkonservierung wurden logarithmisch wachsende Zellen sedimentiert und in Kulturmedium mit auf 20% erhöhten FCS-Gehalt und 10% DMSO-Anteil in einer Dichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Nach einer Lagerung bei -70°C für 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und konnten so über Jahre gelagert werden.

2.2.22 Passagiere von Zellen

a) Zellen in Suspensionskultur

Zur Teilung der Suspensions-Zellkulturen wurden diese bei 300 x g für 7 min sedimentiert und in einem zehnfachen des Kulturvolumens (minimale Dichte nach Teilung: 100.000 Zellen/ml) vor der Teilung aufgenommen. Nach einer Passagenzahl von ca. 20 Passagen wurden die Zellen verworfen und neue aus der Gefrierkultur herangezogen.

Die Suspensions-Zelllinien FDC P1, Ba/F3 und 32D werden in DMEM, 10% fetales Kälberserum und 1% Gentamycin, sowie 5 ng/ml (FDC P1), bzw. 10 ng/ml (32D, BaF3) Interleukin-3 gehalten. Die Kulturbedingungen betragen 37°C und 5% CO₂.

b) Adhärenente Zellen

Nach 2 bis 3 Tagen waren die Zellen zu 80 bis 90% konfluent und wurden durch Abschaben mit einem Zellkulturschaber oder Trypsinbehandlung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und mit frischem Medium 1:3 bis 1:5 verdünnt.

Zur Teilung der Zellen durch Trypsinbehandlung wurde das Kulturmedium abgesaugt, anhaftende Serumreste durch Waschen mit PBS beseitigt und die Zellen mit einem geringen Volumen Trypsin-EDTA- Lösung vollständig überschichtet. Nach 1 bis 2 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen von der Kunststoffoberfläche abgeklopft und \ominus nach mikroskopischer Überprüfung der Vollständigkeit der Ablösung - in 20 ml frischem Kulturmedium aufgenommen. In der erhaltenen Lösung wurde die Zelldichte bestimmt und die Zellen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in 20 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden bei 1200 UpM, 5 min sedimentiert, der Überstand verworfen und der Zelniederschlag in frischem Kulturmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf neue Kulturbehälter mit der vier- bis fünffachen Oberfläche verteilt oder in entsprechend geringerer Zellzahl in den ursprünglichen Behälter überführt und auf 10 ml Kulturvolumen verdünnt.

Die adhärenzte Zelllinie HeLa wird in RPMI, 10% fetales Kälberserum, 1% Penizillin, 1% Streptomycin und 1% Glucose gehalten. Die Kulturbedingungen betragen 37°C und 5% CO₂.

2.2.23 Zellproliferationstest XTT

(Scudiero *et al.*, 1988)

Dieser Test wird benutzt um die Zellviabilität und -proliferation zu untersuchen. Dieser colorimetrische Test kann einerseits benutzt werden zur Quantifizierung des Zellwachstums und der Viabilität, andererseits auch zum Nachweis der Cytotoxizität verschiedener Substanzen.

Der Test basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes XTT (Natrium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) Benzen-Sulfonsäure Hydrat) zu orangenem Formazan. Diese Umsetzung findet nur durch lebende Zellen statt. Das Formazan ist wasserlöslich und mit einem Spektralphotometer zwischen 450 und 500 nm messbar. Die Zellen werden 4-24 Stunden mit der XTT-Lösung (Endkonz. 0,3 mg/ml) inkubiert und dann gemessen. Ein Anstieg in der Lebendzellzahl resultiert in einem Anstieg der Aktivität von mitochondrialer Dehydrogenase und somit in einem Anstieg des Gehaltes an Formazan.

Die Zellen werden an Tag 0 $0,5 \times 10^6$ ausgesät und für 2 Tage wachsen gelassen. An Tag 2 werden die Zellen 4×10^3 in 96well Platten ausgesät.

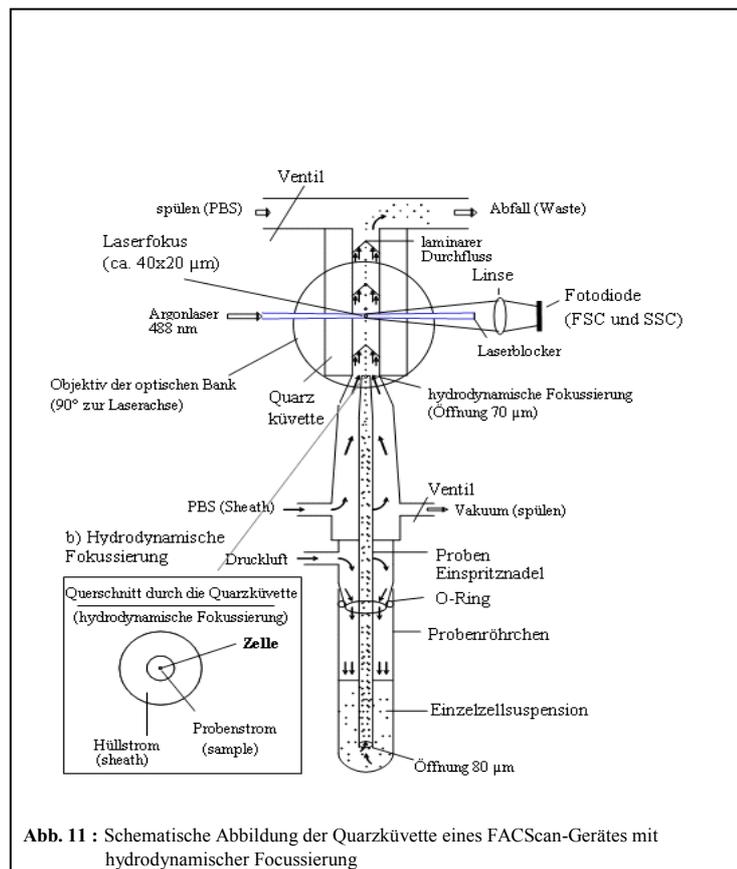
Die Zellen werden in limitierenden Konzentrationen IL-3 ausgesät. Die XTT Messungen finden über 5 Tage statt.

2.2.24 Durchflusszytometrie

(Longobardi-Givan, 1992)

In der durchflusszytometrischen Analyse von Zellen im Fluoreszenz-aktivierten-Zellsortierer (FACS) wird das Fluoreszenz- und Streulichtverhalten einzelner Zellen aufgezeichnet, die einen Laserstrahl definierter Wellenlänge passieren. Dadurch können biochemische und biophysikalische Eigenschaften von lebenden und toten

Zellen ermittelt und Zellpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften quantitativ getrennt werden. Die Messung des Streulichtverhaltens im 180° Winkel (Forward scatter, FSC) gibt Aufschluss über die Größe der Zellen, während das Streulicht im 90° Winkel (Sideward scatter, SSC) von der Granularität der Zellen bestimmt wird. Die Streu- und Fluoreszenzstrahlungen werden über Spiegelsysteme auf verschiedene, gefilterte Photodetektoren gelenkt und die Signale von Photoverstärkern aufgenommen. Dabei wird die Fluoreszenzstrahlung logarithmisch verstärkt. Jedes Signal wird digitalisiert (A/D-Wandler) und getrennt von den anderen als binärer Wert elektronisch gespeichert. In entsprechenden Computergraphiken lassen sich alle Parameter beliebig gegeneinander auftragen. In der Praxis bedeutet dies, dass es möglich ist, in einer inhomogenen Zellpopulation diejenigen Zellen gezielt herauszusuchen, die bestimmte Eigenschaften besitzen. Sie können statistisch innerhalb der Gesamtpopulation abgegrenzt werden. Die Anregungswellenlänge des hier benutzten Durchflußzytometers (FACScan TM der Firma Becton Dickinson) lag bei 488 nm. Damit konnten emittierte Fluoreszenzen, z. B. die Rotfluoreszenz von PI bei 585 nm, detektiert werden. Die durchflusszytometrische Analyse von Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu benutzt, den Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation der Zellen zu ermitteln.



2.2.25 Apoptoseratemessung mittels Annexin-V-FLUOS Kit

(Annexin-V-Fluos Staining Kit, Roche-Diagnostics)

In frühen Apoptose Stadien finden Änderungen in der Zellmembran statt. Eine dieser Änderungen der Plasmamembran ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS), welches normalerweise nur auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, auf die Außenseite der Membran. Makrophagen erkennen PS und phagozytieren so die apoptotischen Zellen, bevor es zu Entzündungen führen kann.

Annexin V ist ein Ca^{2+} abhängiges, Phospholipid bindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS. Dieses Protein kann somit als empfindliche Sonde für die PS-Exposition auf der Membranaußenseite apoptotischer Zellen eingesetzt werden. Da nekrotische Zellen durch den Verlust der Membranintegrität ebenfalls Annexin binden, muss eine Differenzierung der apoptotischen von nekrotischen Zellen durch die Anwendung von DNA Farbstoffen, die nur permeabilisierte Membranen nekrotischer Zellen passieren kann. Die simultane Anwendung von Propidiumjodid und Annexin V gestattet die Diskriminierung nekrotischer Zellen im Annexin gefärbten Zellcluster.

Testprinzip

Die Analyse von Phosphatidylserin auf dem äußeren Membranlayer apoptotischer Zellmembranen wird unter Verwendung von Annexin-V-FLUOS durchgeführt. Zur Abgrenzung von nekrotischen Zellen wird mit Propidiumjodid (PI) gegengefärbt.

Färbeprozedur

maximal 1×10^6 Zellen werden mit PBS gewaschen und die Zellen bei $200 \times g$ (ca. 1200 UpM) für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 100 μl Markierungslösung (20 μl Annexin-V-Fluorescein in 1000 μl HEPES-Puffer vorverdünnen und 20 μl Propidiumjodid zugeben) resuspendieren und für 10 –15 min bei RT inkubieren. Entsprechend der Zelldichte 0,4-0,8 ml HEPES-Puffer hinzufügen und mittels Durchflusszytometer analysieren. Es wird ein Bandpassfilter mit 515 nm zur Fluorescein-Detektion, sowie ein Filter >600 nm zur PI-Detektion benötigt. Weiterhin ist eine elektronische Kompensation des Gerätes erforderlich, um ein Überlappen der beiden Emissionsspektren auszuschließen.

2.2.26 Zellzyklus Messung

(CycleTest™ Plus DNA Reagent Kit, Beckton Dickinson)

Der DNA-Gehalt ist ein entscheidender Marker für die Position einer Zelle in einem Stadium des Zellzyklus. In diploiden Zellen indiziert dabei ein DNA-Gehalt, der einem doppelten Chromosomensatz entspricht ($2n$), die Positionierung der Zelle in der G1-Phase. Eine Verdoppelung des DNA-Gehaltes ($4n$) weisen Zellen auf, die sich in der G2- oder M-Phase befinden. Ein DNA-Gehalt, der zwischen diesen Werten liegt ($2n < x < 4n$), ist auf einen in der Zelle ablaufenden DNA-Synthesevorgang während der S-Phase zurückzuführen. Nach Anfärbung der Nukleinsäure mit der fluoreszierenden Substanz Propidiumjodid (PI) ist die Signalintensität der angefärbten Kerne proportional zu ihrem DNA-Gehalt. Mit einem Durchflusszytometer lässt sich die Signalintensität jedes einzelnen Kerns quantifizieren und in Form eines DNA-Histogramms die Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation graphisch darstellen.

Testprinzip

Der Methode liegt eine Auflösung der Membranlipide mit einem nicht ionischen Detergenz, die Eliminierung des Zytoskeletts und der nukleären Proteine mittels Trypsin, Spaltung der zellulären RNA mit einem Enzym und die Stabilisierung des nukleären Chromatins mit Spermidin zugrunde.

Propidiumjodid (PI) bindet an die DNA der isolierten Kerne und diese werden mit einem Durchflusszytometer gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Identifikation transient induzierter Gene während der Faktorentzugsapoptose in FDC P1-Zellen

In vielen Zellen induzieren Transkriptions- und Proteinsyntheseinhibitoren Apoptose. Diese Tatsache legt nahe, dass die transkriptionelle Aktivität in der Zelle Apoptose verhindern kann (Chinnaiyan und Dixit, 1996; White, 1996). Um transkriptionell induzierte Genprodukte zu identifizieren, die mit den Apoptosegenprodukten interferieren, wurde eine Kombination aus Genfallen-Mutagenese und sequenzspezifischer Rekombination (Cre/loxP) entwickelt (siehe Einleitung).

Als Studiensystem wurden IL-3-abhängige Zellen benutzt, da die Existenz eines schnell aktivierbaren Apoptose-Signalweges in verschiedensten Zellen zu dem Schluss geführt hatte, dass Überlebensfaktoren diesen Signalweg reprimieren. Dies bedeutet, dass in Zellen in Abwesenheit dieser Faktoren Apoptose ausgelöst wird (Evan und Littelwood, 1998; Jacobson *et al.*, 1997; Raff, 1992).

Mit der in Kapitel 1.5 beschriebenen Genfallenstrategie wurden 120 Klone, die IL-3-unabhängig wuchsen generiert, um mit deren Hilfe Gene zu isolieren, die nach IL-3 Entzug der Zellen transkriptionell reguliert werden (Russ *et al.*, 1996; Wempe *et al.*, 2001).

Für 65 dieser Einzelklone wurden die Genfallen-flankierenden Sequenzen mittels inverser PCR und nachfolgender 5'RACE amplifiziert und sequenziert. Davon waren 18% informativ, wovon 11% bekannte Gene, 2% ESTs und 5% contig EST, KIA oder fis in den GenBank/ENSEMBL Datenbanken entsprachen. Für weitere 46% der Sequenzen konnte keine Homologie nachgewiesen werden.

Bei einem der identifizierten Gene handelte es sich um das der Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase Typ I beta (PIP5K).

Diese Kinase wurde zur detaillierteren funktionellen Untersuchung ausgewählt, da ihr Signaltransduktionsweg (Kapitel 1.6), bereits mit einem Apoptose-Signalweg in Verbindung gebracht wurde. Die murine Isoform der Phosphatidylinositol 4-

Phosphat 5-Kinase Typ I β (PIP5K) ist das Homolog der humanen Isoform Typ I α . Diese Phosphatidylinositol-Kinasen wurden auch schon mit anti-apoptotischen Molekülen (z.B. PKB/Akt und Bax) in Verbindung gebracht (Nicholson und Anderson, 2002). PIP5K katalysiert die Synthese des Phospholipids Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP₂), ein Molekül, das eine Vielzahl von Funktionen in der Zelle ausübt (Kapitel 1.6). Unter anderem konnte nachgewiesen werden, dass von der katalytischen p110 Untereinheit der PI3K PIP₂ in der Zellmembran zu PIP₃ phosphoryliert wird (Toker und Cantley, 1997). Von PIP₃ wird dann wiederum eine Phosphatgruppe auf PKB/Akt übertragen, und Akt so aktiviert. Aktivierte Akt-Kinase kann eine Reihe von Substraten phosphorylieren und so die Apoptose hemmen (Dudek *et al.*, 1997). Zu diesen Substraten gehört z.B. Bad, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie. Akt phosphoryliert Bad an einem Serinrest (S136), was letztendlich dazu führt, das Bad durch die 14-3-3 Proteine sequestriert wird und somit seine Funktion als proapoptotisches Protein nicht mehr ausführen kann (Datta *et al.*, 1997; del Peso *et al.*, 1997).

Weil eine Hochregulation von Überlebensgenen wie PIP5K zur Entwicklung von Tumoren führen kann, werden diese Gene häufig als Targets für die Entwicklung von antionkogenen Substanzen herangezogen. Hierbei sind Kinasen besonders interessant, weil sich diese durch niedermolekulare Substanzen relativ leicht inaktivieren lassen. So ist zum Beispiel der Wirkstoff STI-571 (Imatinib-Mesylat oder Gleevec) zu einem erfolgreichen Therapeutikum bei der CML (chronisch-myeloische Leukämie) entwickelt worden, weil er die in CML-Zellen exprimierte BCR/ABL Kinase selektiv inhibiert (Ricci *et al.*, 2002).

3.1.1 IL-3 Entzug induziert PIP5K

Um den Nachweis einer IL-3 entzugsbedingten Induktion von PIP5K in Wildtypzellen zu erbringen, wurde polyA⁺RNA aus IL-3 entzogenen FDC P1-Zellen mit einer radioaktiv markierten PIP5K-cDNA Sonde auf Northern blots hybridisiert. Die PIP5K Sonde wurde aus FDC P1-Zellen mit Hilfe von RT-PCR- und PIP5K spezifischen Primern isoliert.

Ein Vergleich der Bandenintensitäten auf der Nylonmembran (Abb. 12A) ergab nach der Hybridisierung kein eindeutiges Ergebnis. Die Normalisierung des Messsignals mit der L32-Probe (Abb. 12A) zeigte allerdings große Unterschiede in den aufgetragenen RNA Mengen. Zur Quantifizierung wurde deshalb das Autoradiogramm densitometrisch ausgewertet und die Signalstärke der L32 Probe zur Normalisierung herangezogen. Abb. 12B zeigt eindeutig eine transiente Induktion der PIP5K Expression, wobei diese nach zwei Stunden IL-3 Entzug am höchsten ist.

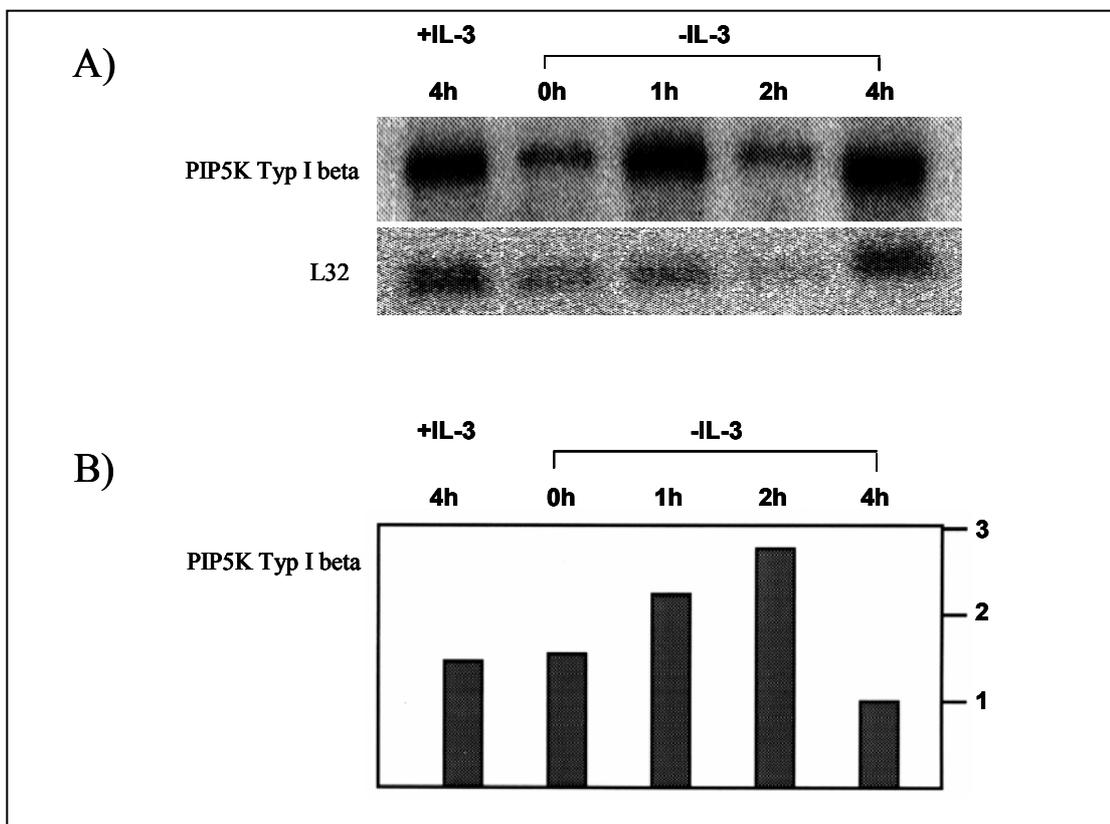
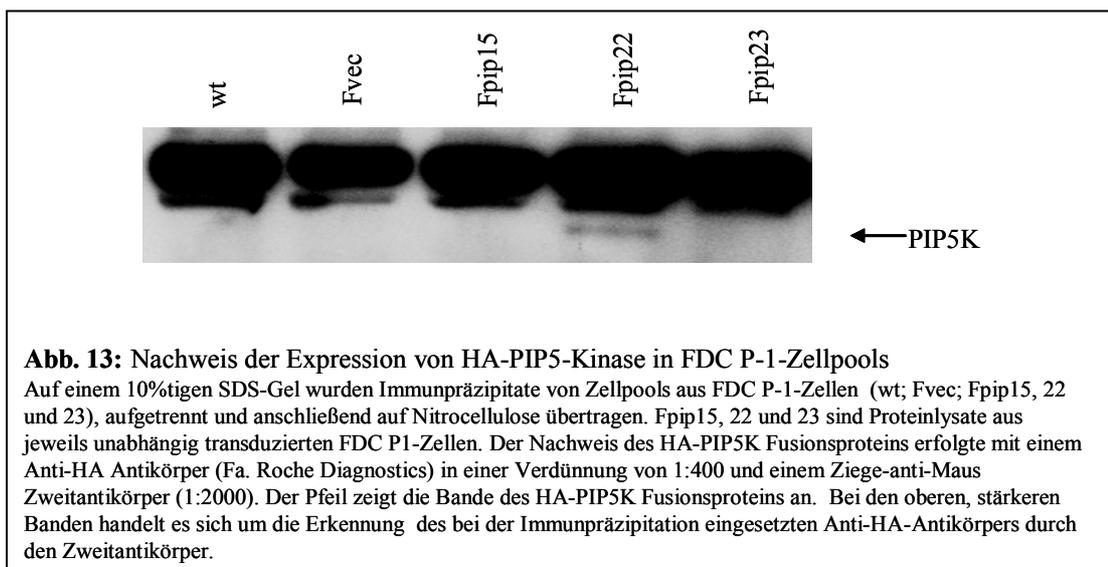


Abb. 12: Regulation des PIP5K Typ I beta Transkriptes nach IL-3 Entzug

A) Radiographien eines Northern-Blots. Es wurden 5µg mRNA aus FDC P1-Wildtypzellen aufgetragen. Die Zellen wurden nach dem Auswaschen des IL-3 aus dem Medium wie folgt behandelt: (Spur1) 4h mit IL-3 behandelt, (Spur2) nicht IL-3 entzogenen, (Spur3) für 1h, (Spur4) für 2h und (Spur4) für 4h IL-3 entzogen. Der Northern-Blot wurde jeweils mit Sonden aus den oben angeführten Genen hybridisiert. Die unterste Leiste zeigt die Normalisierung des Northern-Blots mit einer mittels RT-PCR generierten L32-Probe. B) Densitometrische Messung der in A) gezeigten Radiographien. Die Intensitäten der einzelnen Banden wurde von den Phosphoimager-Audiographien mit einem Computer ermittelt. Die Intensitäten der L32-Normalisierung wurde verrechnet. Die Skala gibt die Stärke der Intensitäten der Banden nach Abzug der Intensitäten der Normalisierung an.

3.2 Exogene PIP5K stimuliert den Zellzyklus in FDC P1-Zellen und reduziert deren spontane Apoptoserate

Um den Einfluss der PIP5K auf die Faktorentzugsapoptose in hämatopoetischen Zellen näher zu untersuchen, wurde die PIP5K cDNA und eine potentiell dominant negative PIP5K Mutante in einer Reihe von IL-3 abhängigen Zelllinien überexprimiert. Hierfür wurde zunächst die vollständige cDNA über RT-PCR aus FDC P1-Zellen amplifiziert. Da für dieses Protein kein kommerzieller Antikörper erhältlich war, wurde an das 5'-Ende der cDNA ein Hämagglutinin-(HA-Tag) angehängt (pGemHAPIP; Abb. 13). Das Fusionsgen aus HA-Tag und PIP5K (HAPIP) wurde dann in einen retroviralen Vektor (pBABEpuro-Derivat) stromabwärts eines humanen EF1alpha Promotors kloniert.



Danach wurden FDC P1-Zellen mit diesem Virus infiziert (pBABE-E1alpha-HAPIP = Fpip). Als Kontrolle wurden FDC P1-Zellen mit einem pBABE-E1alpha-Virus ohne HA-Tag und PIP5K infiziert (pBABE-E1alpha = Fvec).

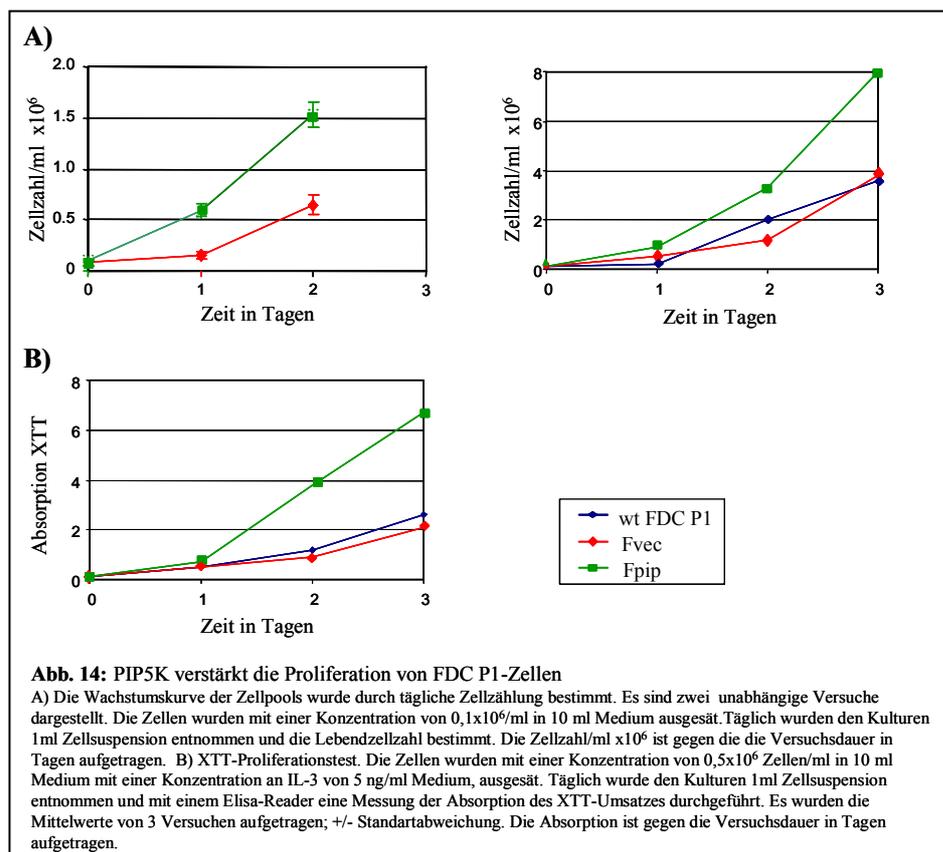
Die Expression von HAPIP in den infizierten Zellen wurde auf Western Blots- nach vorgeschalteter Immunpräzipitation mit anti-HA Antikörper nachgewiesen. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, konnte in einem (Fpip22) der drei mit PIP5K-Expressionsvirus transduzierten Pools ein Signal detektiert werden. Dieser Pool wurde für weitere Untersuchungen herangezogen.

A) PIP5K überexprimierende Zellen proliferieren schneller in Gegenwart von IL-3

Sowohl Lebendzellzahl-Bestimmungen als auch der XTT Test (siehe Methoden) wurden zur Untersuchung der PIP5K-überexprimierenden FDC P1-Zellen (Fpip) eingesetzt. Zellzählungen zeigten, dass die Fpip-Zellen signifikant schneller proliferieren als die entsprechenden Kontrollen (Fvec-Zellen und Wildtypzellen) (Abb. 14A). Dies läßt sich insbesondere während der logarithmischen Wachstumsphase beobachten (Abb 14A).

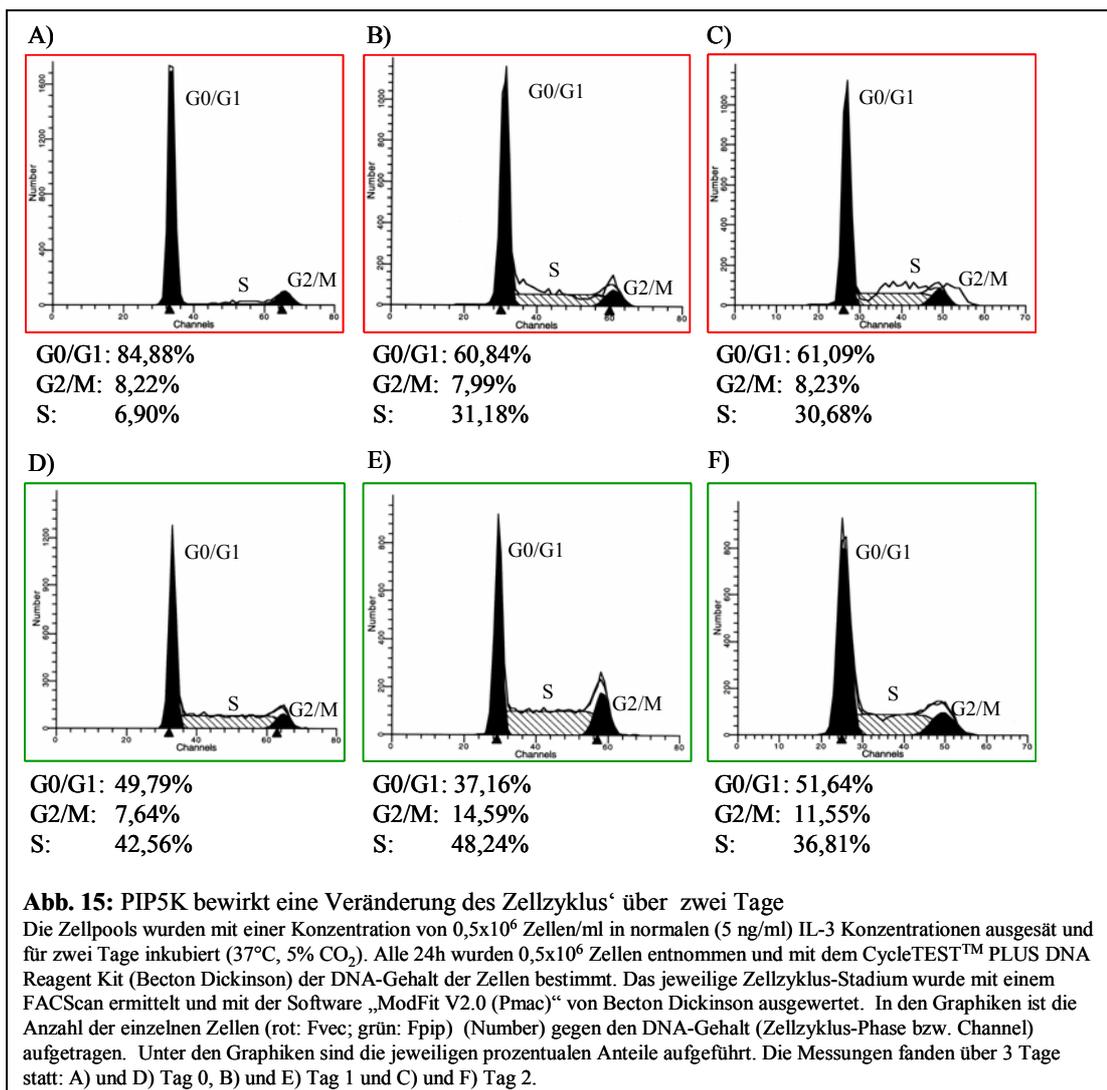
Ähnliche Ergebnisse wurden im XTT Test erzielt. Auch hier proliferieren Fpip-Zellen wesentlich schneller als die entsprechenden Kontrollen (Abb 14B). Insgesamt wird die Proliferationsrate von FDCP-1 Zellen durch PIP5K nahezu verdoppelt. Dies geschieht nicht nur unter normalen IL-3 Bedingungen sondern auch in Gegenwart von suboptimalen IL-3 Konzentrationen wobei sich hier die Unterschiede vervierfachen.

Da bei den PIP5K-überexprimierenden FDC P1-Zellen ein Wachstumsvorteil gefunden wurde, sollte ermittelt werden, auf welcher Grundlage dieser Vorteil beruht. Zwei mögliche Hypothesen wurden verfolgt. Zum einen könnte die PIP5K den Zellzyklus akzelerieren, zum anderen eine verminderte, spontane Apoptoserate bewirken.



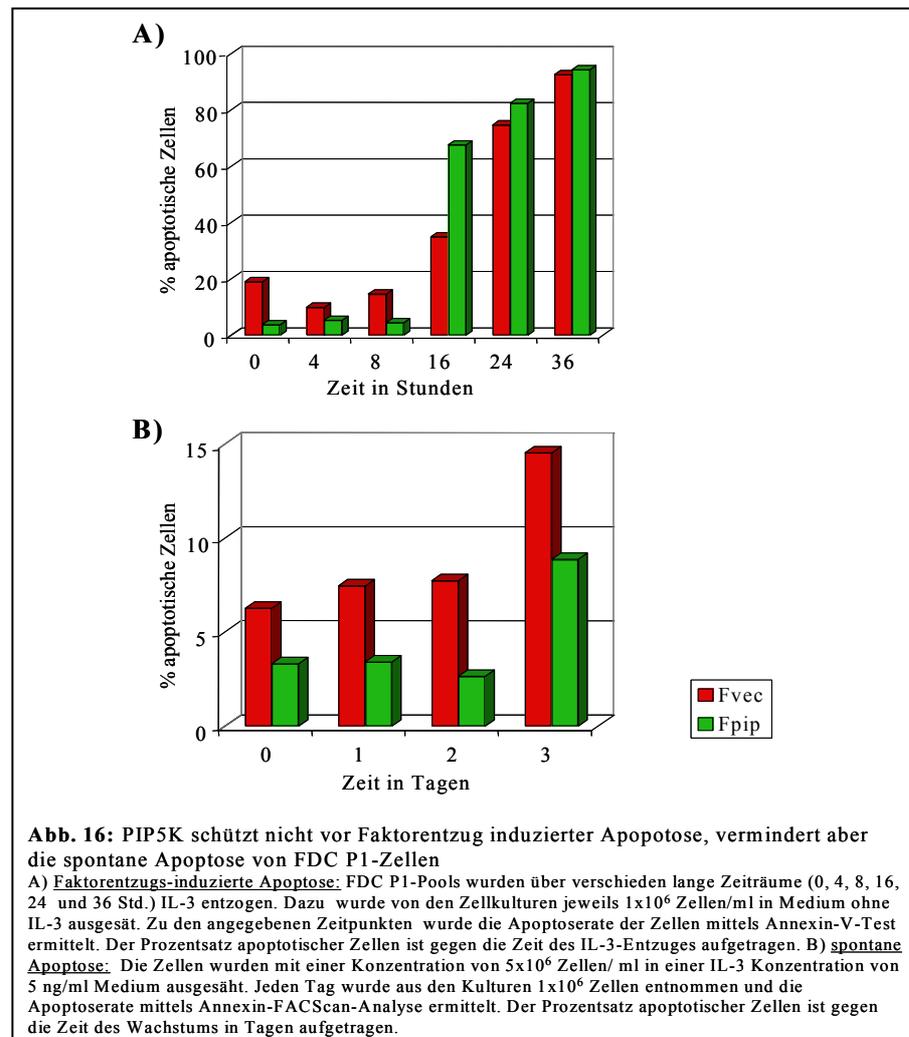
B) PIP5K stimuliert den Zellzyklus

Um die Verteilung der Zellen über die Phasen des Zellzyklus zu messen wurde deren DNA Gehalt nach mehreren Tagen in Gewebekultur im FACScan gemessen. Damit sollte überprüft werden, ob die Fpip-Zellen den Zellzyklus schneller durchlaufen als die entsprechenden Kontrollzellen, oder sie in einer bestimmten Phase des Zellzyklus arretieren. Im Gegensatz zu Fpip Zellen, die gleich zu Beginn des Versuchs in den Zellzyklus eintreten, war dieser Eintritt für Fvec Zellen signifikant verzögert (84,88 % der Zellen in G0/G1-Phase, Abb 15). Vergleicht man im weiteren Verlauf die beiden Zellpopulationen, so befinden sich insbesondere nach 24 Stunden eindeutig mehr Fpip Zellen in den S- und G2M Phasen, was für die Induktion einer erhöhten Zellzyklusaktivität durch PI5K spricht (Abb 15). Darüber hinaus scheint die PIP5K die Fpip Zellen gegen experimentelle Manipulation (Stress) resistenter zu machen weil diese sich, anders als die Kontrollen, bereits zu Beginn im Zellzyklus befinden.



C) PIP5K reduziert die spontane Apoptoserate in FDC P1-Zellen

In einem weiteren Versuchansatz wurde überprüft, inwieweit eine verminderte Apoptoserate der Fpip Zellen an deren erhöhter Proliferationsrate beteiligt ist. Mit Hilfe des Annexin-Tests wurde die Apoptoserate nach IL-3-Entzug über einen Zeitraum von 36 Stunden bestimmt. Diese Methode erlaubt neben der Detektion und Quantifizierung von Apoptose auch die Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen auf Einzelzellbasis. Obwohl nach IL-3 Entzug Fpip Zellen ähnlich den Fvec Kontrollen nach 12-16 Stunden apoptotisch absterben, ist die spontane Apoptoserate von Fpip Zellen in Gegenwart von IL-3 über 50% reduziert. Am eindeutigsten wird dies nach 48 Stunden sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt sterben in Fpip Kulturen 70% weniger Zellen als in den Fvec Kontrollkulturen (Abb. 16).

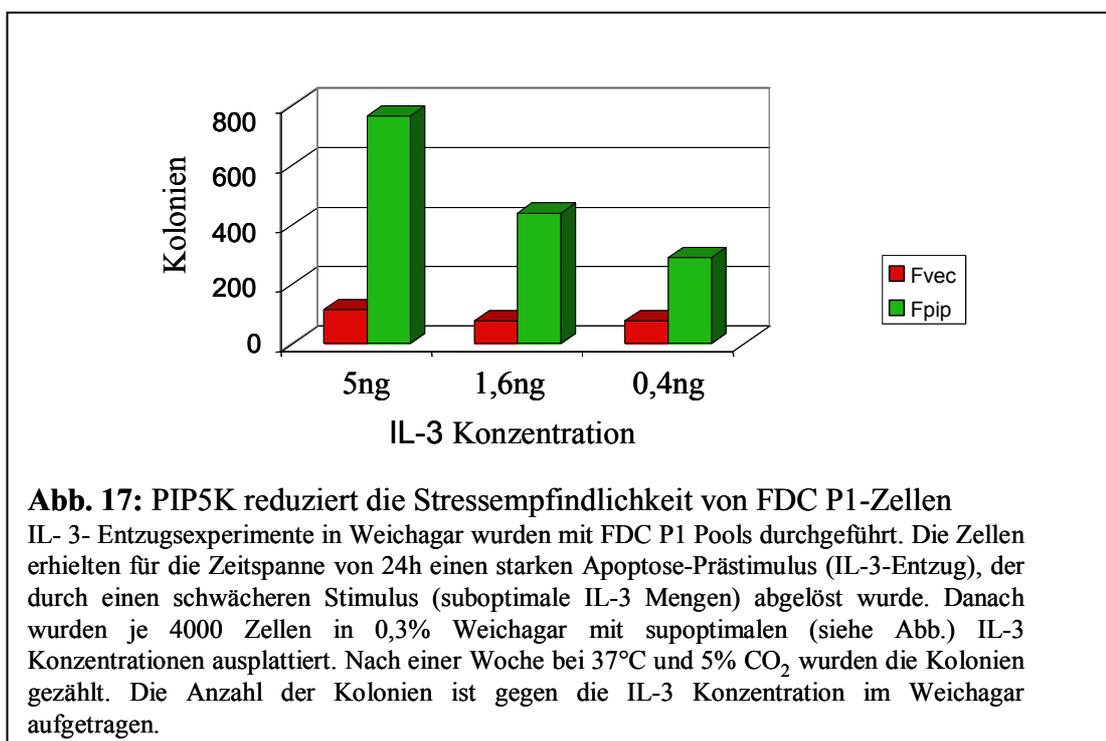


Ähnliche Ergebnisse konnten auch unter suboptimalen IL-3 Bedingungen erbracht werden.

3.3 PIP5K reduziert die Stressempfindlichkeit

Die vorangegangenen Versuche suggerieren, dass PIP5K die Toleranz von FDC P1-Zellen gegenüber exogenen Stressfaktoren wie z.B. suboptimalen Kulturbedingungen erhöht. Um dies genauer zu quantifizieren, wurden die Zellen in semisolidem Medium (Agar) kultiviert. Semisolidem Medium ist eines der wirksamsten Stressfaktoren für das *in vitro* Zellwachstum und häufig zur Quantifizierung von transformierten Zellen benutzt, die bekanntlich viel weniger empfindlich als normale Zellen sind (Tordaro und Green, 1964).

Um das klonale Wachstum von FDC P1-Zellen nach kurzfristigem Faktorentzug zu untersuchen, wurde den Zellen für 24 Stunden IL-3 entzogen. Danach wurden die Zellen in Weichagar in Gegenwart von optimalen (5 ng/ml) und suboptimalen (1,6 und 0,4 ng/ml) IL-3 Konzentrationen ausplattiert und für weitere 7 Tage inkubiert. Abbildung 17 zeigt, dass die PIP5K exprimierenden Fpip Zellen sowohl in optimalen als auch in suboptimalen IL-3 Konzentrationen eindeutig mehr Kolonien bilden als die Fvec Kontrollen, wobei dies unter optimalen Bedingungen am eindrucksvollsten ist. Insgesamt sind diese Ergebnisse dahingehend zu interpretieren, dass PIP5K die Apoptoseresistenz von FDC P1-Zellen signifikant erhöht.



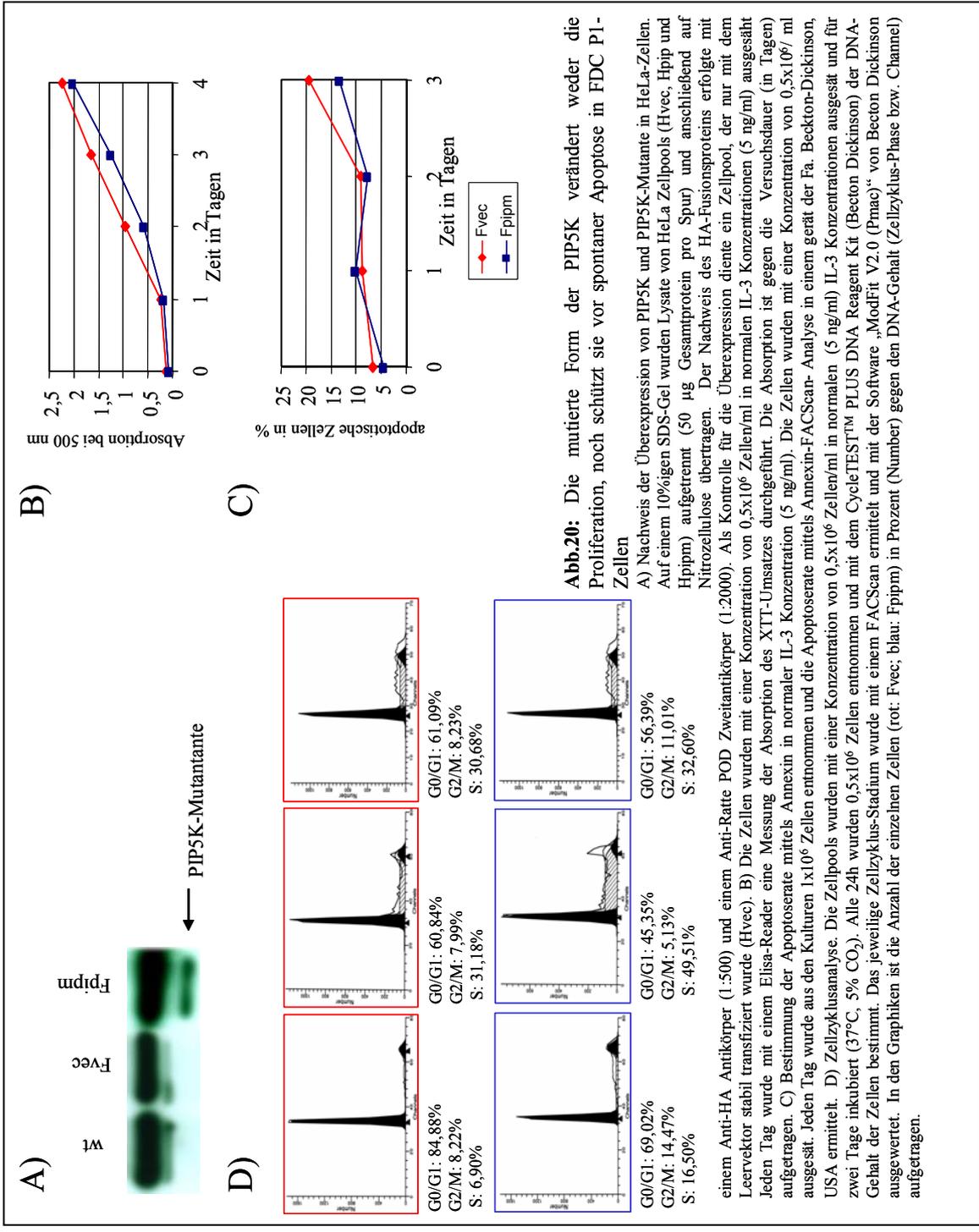
3.4 Herstellung einer PIP5K-Mutante und Überexpression in FDC P1- Zellen

Eine dominant-negative Mutante eines Proteins interferiert mit der Funktion des entstehenden Wildtyp Proteins, indem sie diesem funktionswichtige Kofaktoren entzieht. Dies können Aktivatoren, Regulatoren, Substrate oder strukturelle Komponenten sein, die mit dem Protein interagieren. Bei Überexpression entzieht die Mutante dem Wildtyp Protein diese Faktoren und führt zu einem spezifischen Funktionsverlust.

		K138A ↓	
Iα	PAHHYPDFRFKTYAPLAFRYFRELFGIKPDDYLYSIC-SEPLIELSNPGASGSLFFLTSDDEFIIKTVQH		142
Iβ	PAHHYNDFRFKTYAPVAFRYFRELFGIRPDDYLYSIC-SEPLIELNSGASASLFYVSSDDEFIIKTVQH		183
Iγ	PAHHFQDFRFKTYAPVAFRYFRELFGIRPDDYLYSIC-NEPLIELSNPGASGSVFYVTSDEFIIKTVMH		192
IIα	PA----HFKFKEYCPMVFRLRERFGIDDQDFQNSLTRSAPLPNDSQ-ARSGARFHTSYDKRYVIKTIITS		149

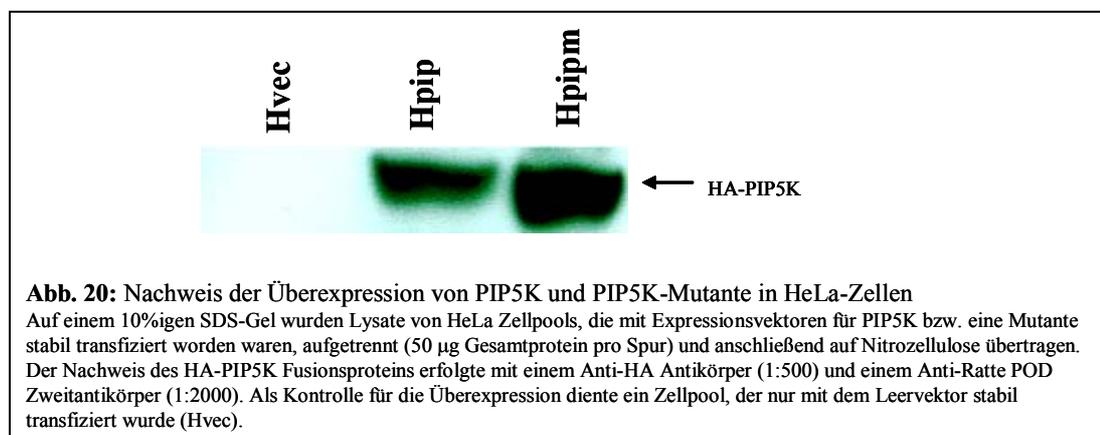
Abb. 18: Vergleich einer Teilsequenz der drei murinen TypI PIP5K-Isoformen und der murinen TypII PIP5Kα. Vergleich verschiedener PIP5K-Isoformen. Identische AS-Reste zwischen drei oder vier Kinasen sind durch rote Buchstaben hervorgehoben. Lücken sind durch Striche angegeben. Der Pfeil gibt die mutierte Aminosäuren an. Trotz der allgemein geringen Homologie zwischen TypI- und TypII-Kinasen, weist die ATP-Bindetasche AS 136-140 (Unterstrichen), eine hohe Homologie auf.

In Analogie zu einer dominant-negativen Mutante des PKB/Akt-Proteins (Bellacosa *et al.*, 1998), wurde eine Mutante der PIP5K hergestellt (PIPmut). Im Fall der Akt-Mutante wurde eine Mutation in die Kinase-Domäne eingeführt, wobei ein Lysinrest gegen Methionin ausgetauscht (K179M) wurde. Bei der PIP5K wurde hier mittels PCR in der Kinasedomäne (Ishihara *et al.*, 1998) ein Austausch des Lysinrests 138, gegen die Aminosäure Alanin vorgenommen (K138A; Abb. 18). Ähnlich wie bei PKB/Akt befindet sich die Mutation in der putativen ATP- Bindetasche von PIP5K. Es wurde angenommen, dass dadurch von der Tasche gebundenes ATP nicht mehr abgegeben wird und deswegen eine Substratphosphorylierung nicht mehr stattfinden kann. Eine ähnliche K138A Mutation führte im humanen PIP5K Isotyp Iα zu einen Funktionsverlust bezüglich deren Kinaseaktivität (Ishihara *et al.*, 1998). Die PIP5K-Mutante (PIPmut) wurde in den pcDNA3.1- Expressionsvektor kloniert und in FDC P1-Zellen exprimiert. Obwohl sich PIPmut in FDCP-1 sehr gut exprimieren ließ schien dies weder auf den Zellzyklus noch auf die Proliferation einen wesentlichen Einfluss zu haben. Insgesamt verhielten sich die PIPmut exprimierenden Zellen (Fpipm) in sämtlichen Ansätzen nicht anders als die Kontrollen (Fvec). Daraus kann geschlossen werden, dass anders als bei PKB/Akt eine Mutation in der ATP-Bindetasche zu keiner dominant negativen Variante führt.



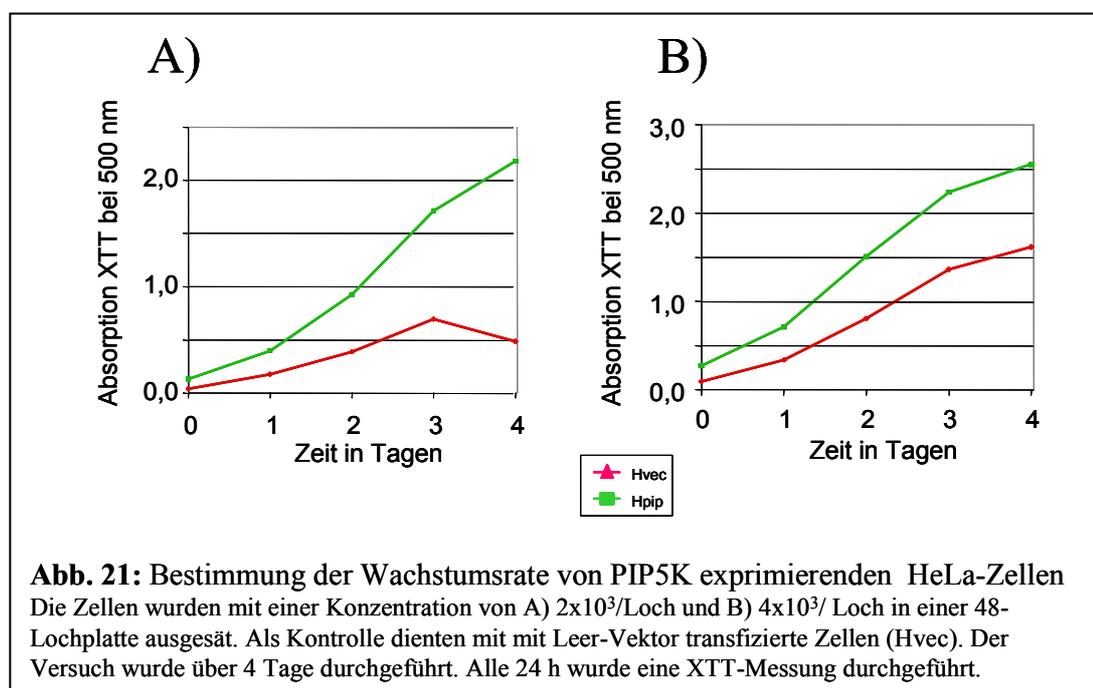
3.5 Überexpression von PIP5K in HeLa-Zellen

Eine relativ geringe Expression von exogener PIP3K in Fpip Zellen, trotz nachweislich gut funktionierender Expressionvektoren, gab den Anlass dazu, weitere, insbesondere biochemische Untersuchungen in der humanen Cervixcarcinomzelllinie HeLa (Gey *et al.*, 1952) durchzuführen. HeLa Zellen wurden wiederholt zur Klärung molekularer Apoptosemechanismen eingesetzt. Entsprechend wurden HeLa Zellen mit den Plasmid-basierten Expressionvektoren pcDNA-leer (Hvec) und pcDNA-HAPIP (Hpip) transfiziert, wobei Hvec Zellen nur den leeren Vektor und Hpip Zellen die PIP5K cDNA exprimieren (Abb. 20). Abbildung 20 zeigt, dass die in G418 isolierten Hpip-Zellen exogene PIP5K sehr stark exprimieren. Dabei ist wesentlich, dass anders als in FDCP1 Zellen eine vorgeschaltete Immunpräzipitation zum Nachweis von PIP5K in HeLa Zellen mit Anti-HA-Antikörpern nicht notwendig war (Abb. 20). Dies zeigt an, dass in HeLa Zellen eine wesentlich höhere PIP5K Expression erreicht werden konnte als in FDCP1 Zellen.



3.6 PIP5K stimuliert auch in HeLa-Zellen die Proliferation

Um die Wachstumsrate der PIP5K exprimierenden HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden wie auch mit FDC P-1 Zellen XTT-Tests durchgeführt. Abb. 21 zeigt, dass auch PIP5K überexprimierende HeLa-Zellen deutlich besser proliferieren als die entsprechende Kontrolle. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass der Proliferationsstimulierende Effekt von PIP5K nicht auf FDC P-1 Zellen beschränkt ist sondern sich auch in anderen Zellsystemen einstellt.



3.7 PIP5K modifiziert die Expression von Zellzyklus-assoziierten Proteinen

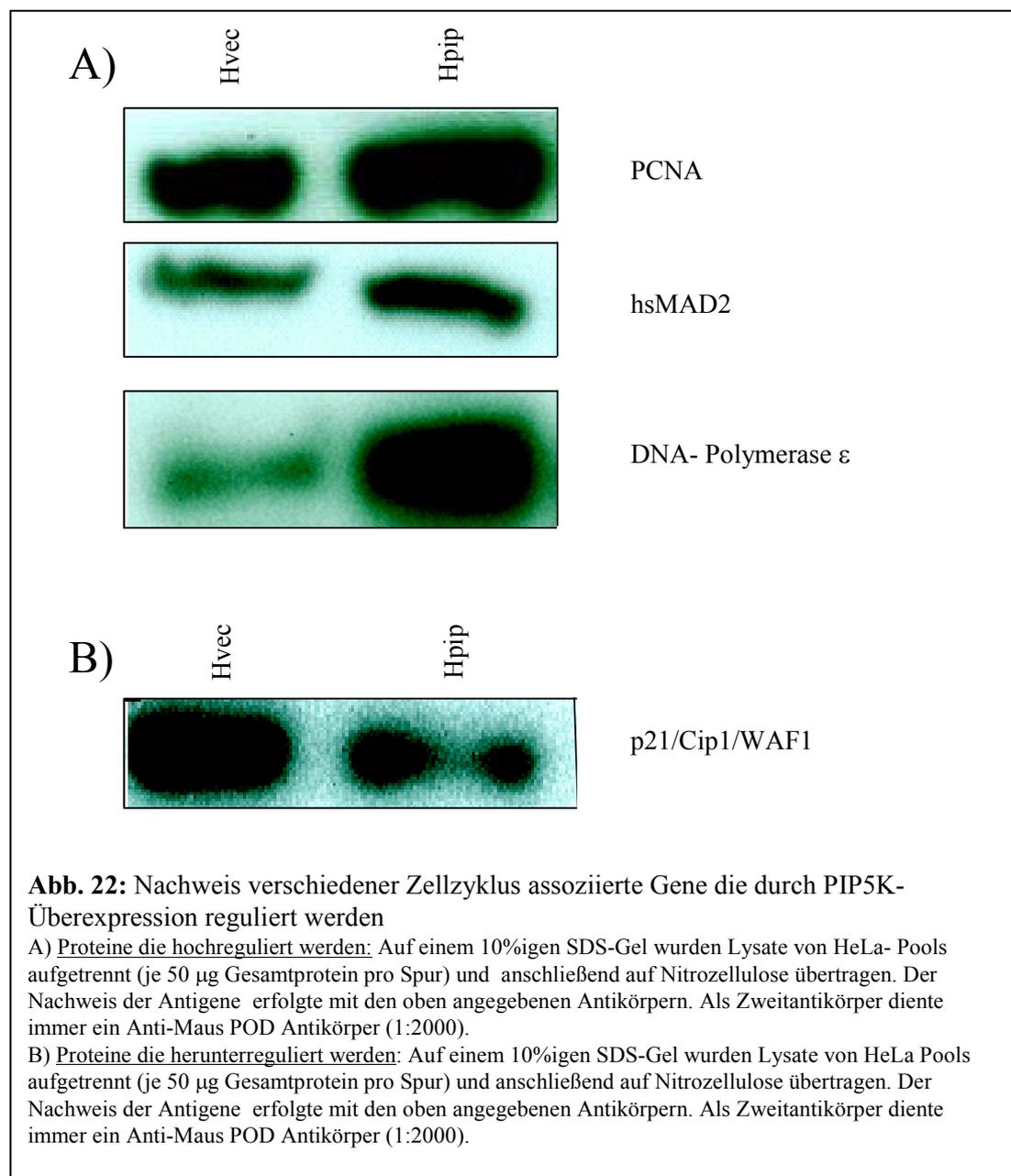
Um zu überprüfen, worauf der Wachstumsvorteil der PIP5K-überexprimierenden Zellen basiert, wurde die Expression von 22 unterschiedlichen, Zellzyklus assoziierten Proteinen (Tab. 2) in Hpip Zellen untersucht.

Tabelle 2: Regulation von 22 Zellzyklus-Proteinen durch PIP5K

(↑ = Hochregulation; → = keine Regulation; ↓ = Herabregulation; nd = nicht detektierbar)

Antigen	Regulation durch PIP5K	Größe	Zitat
CDC25B	nd	63 kDa	Sadu <i>et al.</i> , 1990; Girard <i>et al.</i> , 1992
CDC27	→	97 kDa	King <i>et al.</i> , 1995
CDC34	→	40 kDa	Plon <i>et al.</i> , 1995
Cdk1/Cdc2	→	34 kDa	Draetta <i>et al.</i> , 1987
Cdk2	→	33 kDa	Elledge <i>et al.</i> , 1992
Chk1	→	54 kDa	O'Connell <i>et al.</i> , 1997
CUL-2	nd	76 kDa	Kipreos <i>et al.</i> , 1996 ; Yu <i>et al.</i> , 1998
Cyclin A	→	60 kDa	Pines und Hunter, 1990; Wang <i>et al.</i> , 1990
Cyclin B	→	62 kDa	Draetta <i>et al.</i> , 1989; Gautier <i>et al.</i> , 1990
Cyclin D3	→	33 kDa	Motokura <i>et al.</i> , 1992 ; Inaba <i>et al.</i> , 1992
DNA-Polymerase ϵ	↑	261 kDa	Hamatake <i>et al.</i> , 1990; Morrison <i>et al.</i> , 1990
E2F1	nd	60 kDa	Helin, 1998 ; Dyson, 1998
hsMAD2	↑	24 kDa	Li und Benezra, 1996
Ki-67	nd	67 kDa	Schluter <i>et al.</i> , 1993
p21Cip1/WAF1	↓	21 kDa	Harper <i>et al.</i> , 1993 ; El-Deiry <i>et al.</i> , 1994
p27Kip1	→	27 kDa	Polyak <i>et al.</i> , 1994
p36	→	36 kDa	Yee <i>et al.</i> , 1995 ; Tassan <i>et al.</i> , 1995
p55CDC	nd	55 kDa	Weinstein <i>et al.</i> , 1994
PCNA	↑	36 kDa	Waseem und Lane, 1990; Bravo <i>et al.</i> , 1987
Rb	nd	110 kDa	Helin <i>et al.</i> , 1992
Rb2	→	130 kDa	Mayol <i>et al.</i> , 1993
RBBP	→	48 kDa	Saijo <i>et al.</i> , 1995

Abbildung 22 zeigt eine signifikante, PIP5K induzierte Hochregulation der Zellzyklus-stimulierenden Proteine PCNA, hsMAD2 und DNA-Polymerase ϵ (Waseem und Lane, 1990; Bravo *et al.*, 1987; Li und Benezra, 1996; Hamatake *et al.*, 1990; Morrison *et al.*, 1990). Gleichzeitig wird die Expression des Zellzyklusprogression-inhibierenden Cyclin A-Cdk2-Komplex Inhibitors p21/Cip1/WAF1 reprimiert (Harper *et al.*, 1993; El-Deiry *et al.*, 1993) (Abb. 22). Insgesamt wird dadurch der Zellzyklus stimuliert und als Folge davon die Prolifiration (Abb. 22). Interessanterweise sind hsMAD2 und DNA-Polymerase ϵ auch DNA-Reparaturgene, deren Hochregulation in PIP5K transduzierten FDC P1-Zellen deren erhöhte Stresstoleranz erklären könnte (siehe Kapitel 3.3).



3.8 Apoptoseprotektion in HeLa-Zellen durch PIP5K

Um der Frage nachzugehen, ob PIP5K-Überexpression die Apoptose in HeLa-Zellen beeinflusst, wurden die Hvec- und Hpip-Zellen alternativen, apoptoseauslösenden Stimuli ausgesetzt. Apoptose wurde biochemisch entweder anhand der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)- oder Procaspase-3-Spaltung quantifiziert. In der Literatur ist die Spaltung von PARP, einem DNA-Reparaturenzym, als guter Apoptoseindikator beschrieben (Duriez und Shah, 1997). PARP ist ein 116 kDa großes Protein, das durch Caspase-3 in zwei charakteristische Fragmente von 85 kDa und 25 kDa gespalten wird (Deas *et al.*, 1998; Lazebnik *et al.*, 1994).

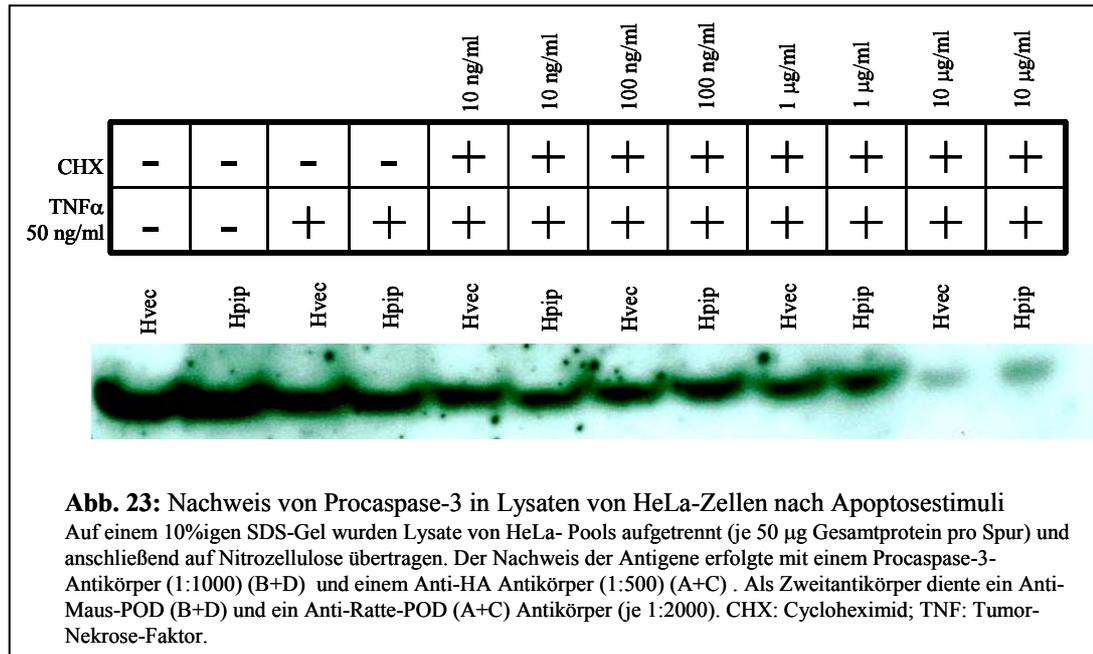
Die Procaspase-3 wird über zwei apoptoseauslösende Mechanismen gespalten, entweder über die Aktivierung von Caspase-8 durch Aktivierung der Todesrezeptoren, oder durch die Schädigung von DNA durch z.B. UV-Licht und die daraus folgende Aktivierung von Caspase-9.

Die eingesetzten Stimuli waren TNF α , Doxorubicin, UV- und γ -Strahlung.

A) TNF- α

TNF α löst nur in transformierten Zellen Apoptose aus und wirkt in normalen Zellen als Mitogen. In HeLa-Zellen bedarf es zur Apoptoseauslösung einer zusätzlichen Blockade der Proteinbiosynthese durch Cycloheximid (CHX) (Miura *et al.*, 1995).

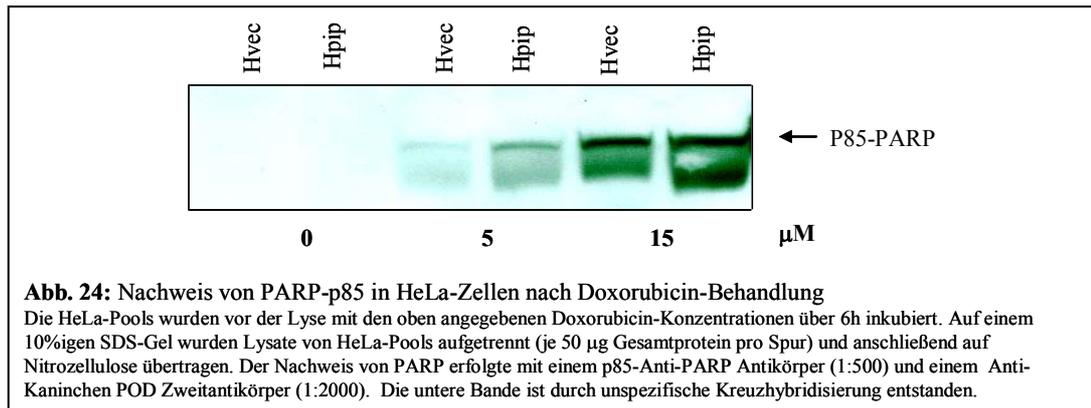
Stimuliert man die Zellen mit TNF α (50 ng/ml) und in Gegenwart von ansteigenden CHX Konzentrationen, so kommt es zu einem konzentrationsbedingten Abfall der Procaspase-3 (Abb. 23). Da Procaspase-3 als eine der späteren Caspasen erst während der Endphase der Apoptose gespalten wird, verhält sich deren Abfall umgekehrt proportional zur Apoptoserate. Allerdings scheint PIP5K keinen Einfluss auf die TNF α induzierte Apoptose zu nehmen. Abbildung 23 zeigt, dass der Procaspase-3 Abbau in Hpip und Hvec Zellen nahezu identisch ist.



B) Doxorubicin

Doxorubicin (DXR) ist ein Zytostatikum aus der Klasse der Anthracycline, das ein breites klinisches Anwendungsspektrum aufweist und für die Behandlung verschiedener Krebsarten eingesetzt wird. Unter anderem induziert DXR die Expression des Fas-Liganden der, sofern der FAS- Signaltransduktionsweg nicht gestört ist, Apoptose auslöst (Cappello *et al.*, 2002; Wajant, 2002).

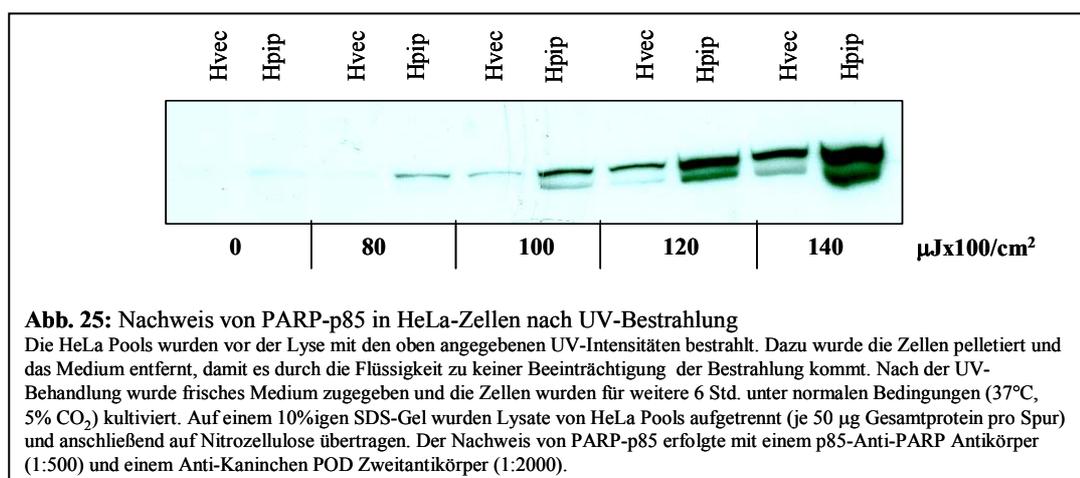
Ähnlich wie bei der TNF α induzierten Apoptose, wirkt PIP5K während der DXR induzierten Apoptose nicht protektiv, im Gegenteil, PARP wird in Hpip Zellen in Gegenwart von DXR vermehrt gespalten was in dieser Konstellation für eine proapoptische Wirkung von PIP5K spricht (Abb. 24). Da DXR bekanntlich schnell proliferierende Zellen effizienter abtötet als ruhende Zellen, liegt die Annahme nahe, dass die PIP5K vermittelte Akzelleration des Zellzyklus (siehe Kapitel 3.7) für die erhöhte Apoptoserate von Hpip Zellen verantwortlich ist.



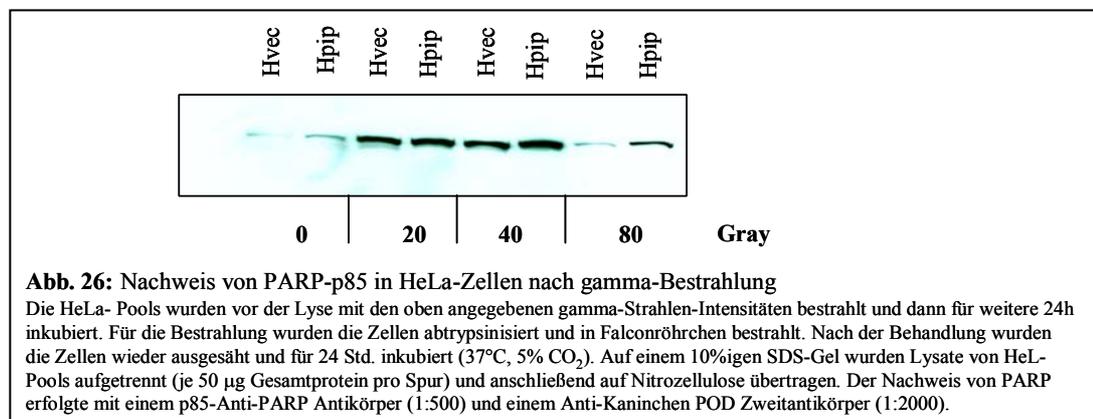
C) UV- und γ -Strahlung

UV-Strahlen schädigen die DNA und induzieren Apoptose über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. Hält sich der Schaden in Grenzen induziert p53 nur einen Zellzyklusarrest, um der Zelle eine Reparatur der Schäden zu ermöglichen bevor diese an Tochterzellen vererbt werden. Ist der Schaden irreparabel, induziert p53 Apoptose (Levine, 1997).

Abb. 25 zeigt, dass PIP5K HeLa-Zellen eindeutig gegen UV-Strahlung sensibilisiert. Bereits bei einer UV Dosis von $80 \mu\text{Jx}100/\text{cm}^2$ findet in Hpip-Zellen wesentlich mehr Apoptose als in den Hvec Kontrollen statt. Bei höheren UV-Dosen steigt auch die Apoptoserate.



In wesentlich geringerem Maße sensibilisiert PIP5K die HeLa Zellen auch gegen ionisierende γ -Strahlen (Abb. 26). In beiden Fällen könnte dies, wie auch bei DXR, durch die erhöhte Proliferationsrate von Hpip Zellen erklärt werden, da sowohl UV- als auch γ -Strahlen proliferierende Zellen effizienter abtöten. Unklar bleibt jedoch, warum die Sensibilisierung gegen UV-Strahlen soviel stärker ist. Denkbar wäre, dass die beiden nach UV-Bestrahlung entstehenden Abbauprodukte Cyclo-Thymin und das (6-4)-Photoprodukt (Balajee *et al.*, 1999) in hoher Konzentration kurzfristig toxischer für HeLa Zellen sind, als die durch ionisierende Strahlen induzierten DNA Doppelstrangbrüche, deren Gravität während des p53 induzierten Zellzyklusarrestes zunächst überprüft werden muß.



4. Diskussion

Für die Gewebekomöostase eines Organismus hat die Apoptose eine grundsätzliche Bedeutung. Fehlregulation des programmierten Zelltods kann entweder zu degenerativen Erkrankungen oder Neoplasien führen. Das Verständnis der dem Phänomen Apoptose zugrunde liegenden molekularen Mechanismen ist sowohl für die Erklärung der Pathogenese dieser Erkrankungen von Bedeutung als auch für zukünftige rationale Therapieansätze. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, neue Gene zu finden, deren Expression während der Apoptose induziert wird und eines dieser Gene funktionell zu charakterisieren.

4.1 Evaluation des Cre/loxP-Genfallensystems

Die Eliminierung defekter T- und B- Lymphozytenvorläuferzellen durch Apoptose ist essentiell für die normale Entwicklung des Immunsystems. Fehlgeleitete Apoptoseregulation kann zur malignen Transformation und somit zu Leukämien und Lymphomen führen (Thompson, 1995; Strasser, 1995; Yang und Korsmeyer, 1996). Diese Prozesse werden durch Cytokine wie IL-3 beeinflusst, welche die Proliferation und das Überleben lymphoider und hämatopoetischer Vorläuferzellen steuern (Schrader, 1986). Wenn IL-3 abhängigen Zelllinien IL-3 entzogen wird, hören sie nicht auf zu proliferieren, vielmehr durchlaufen sie den programmierten Zelltod. Dies bedeutet, dass IL-3 das Überleben der Zellen dadurch sichert, dass Signalkaskaden reprimiert werden, die die Apoptosemaschinerie aktivieren (Palacios *et al.*, 1984; Rodriguez-Tarduchy *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Um neue Komponenten dieser regulatorischen Kaskaden zu finden, war es nötig, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, die Zellen trotz eines Apoptosestimulus am Leben zu halten.

Eine Strategie zur Identifizierung der entsprechenden Gene, die schon erfolgreich für eine Reihe anderer Fragestellungen eingesetzt worden war, beruht auf dem Einsatz von Genfallen. Aus der Kombination von Genfalleninsertion und dem Cre/loxP-Rekombinationssystem konnte letztendlich eine Methode entwickelt werden, die die Apoptoseinduktion durch IL-3 Entzug in strikt IL-3 abhängigen Zellen erlaubt. Dabei

wird nach gezielter Rekombination das Gen für den Überlebensfaktor IL-3 exprimiert, was die Zellen unabhängig von exogen zugeführtem Cytokin macht.

Im Gegensatz zu DNA-Microarray-Analysen (Duggan *et al.*, 1999) lieferte die Anwendung des in Kapitel 1.5 beschriebenen Genfallensystems nur eine geringe Anzahl von Genen, was eine weitergehende Validierung vereinfachte. Eine Ausbeute von 84% (86 von 102) informativer Genfallenintegrationen zeigt deutlich, dass die Methode gut zur Identifizierung von Genen geeignet ist. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass zum Zeitpunkt der Ermittlung der Genfallenintegrationsorte der größte Teil der ermittelten Sequenzen keinem bekannten Gen zugeordnet werden konnte, sich aber nach Abschluss der Sequenzierung des Mausgenoms (Waterston *et al.*, 2002) als Integration in transkribierten Bereichen herausstellte, was zusätzlich die Effizienz der Methode unterstreicht.

Anders als konventionelle Genfallen-Strategien sollte der Cre/loxP-Ansatz nicht nur eine Anreicherung von Genen erlauben, die durch spezifische biologische Stimuli induziert werden, sondern auch die Identifizierung von nur transient exprimierten Genen ermöglichen. Um Gleiches mit DNA-Microarrays zu erreichen müssten relativ viele Messpunkte in die Analysen einbezogen werden, was unter ökonomischen Gesichtspunkten nicht immer durchführbar ist. Die Verifikation der Induktion der Transkription des PIP5K-Gens nach IL-3 Entzug zeigte, dass die Transkriptmenge nur in einem eng begrenzten Zeitfenster ansteigt und danach wieder auf das Ausgangsniveau zurückgeht. Somit erfüllt das gewählte Genfallensystem auch die Forderung nach der Detektion von nur vorübergehend transkriptionell aktivierten Genen.

Zur Validierung der transkriptionellen Induktion der identifizierten Gene wurden Northern-Blot Experimente durchgeführt. In diesen Experimenten bestätigte sich, dass die Transkriptmenge aller untersuchten Gene nach IL-3 Entzug ansteigt.

Diese Korrelation legt einen Zusammenhang dieser Gene mit der Apoptoseinduktion nahe. Wie dieser Zusammenhang allerdings aussieht ist noch nicht geklärt. Interessanterweise wird die Transkription dieser Loci relativ schnell nach der Apoptoseinduktion hochreguliert, was als ein Hinweis darauf gewertet werden könnte, dass die entsprechenden Genprodukte dazu dienen, in der Zelle anti-apoptotische Signalwege zu aktivieren, um so das Überleben der Zelle zu gewährleisten, falls der Wachstumsfaktorentzug nur vorübergehend ist. Tatsächlich

gibt es bei einigen der Genprodukte zudem Indizien für eine Rolle in der Apoptosesuppression.

So zeigte sich zum Beispiel, dass es nach IL-3 Entzug zu einer verstärkten Expression des Hexokinase Typ I β Gens (Acc. Nr.: JO5277) in FDC P1-Zellen kommt. Dabei handelt es sich um ein Protein, welches Glukose zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert und so den Energiehaushalt der Zelle reguliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PKB/Akt über einen bisher unbekanntem Transduktionsweg Hexokinase in Mitochondrien aktiviert, und damit deren Membranintegrität stabilisiert (Nicholson und Anderson, 2002).

Auch das Gen für das Protein VMAT 2 (Acc Nr.: L23205), einen vesiculären Monoamintransporter wird hochreguliert. Dieses für den Transport zellulärer Monoamine in sekretorische Vesikel wichtige Protein, verpackt auch proapoptische Giftstoffe, wie z. B. MPP⁺ und Histamin und sorgt dadurch für eine Entgiftung der Zelle (Liu *et al.*, 1992; Prinz *et al.*, 1999).

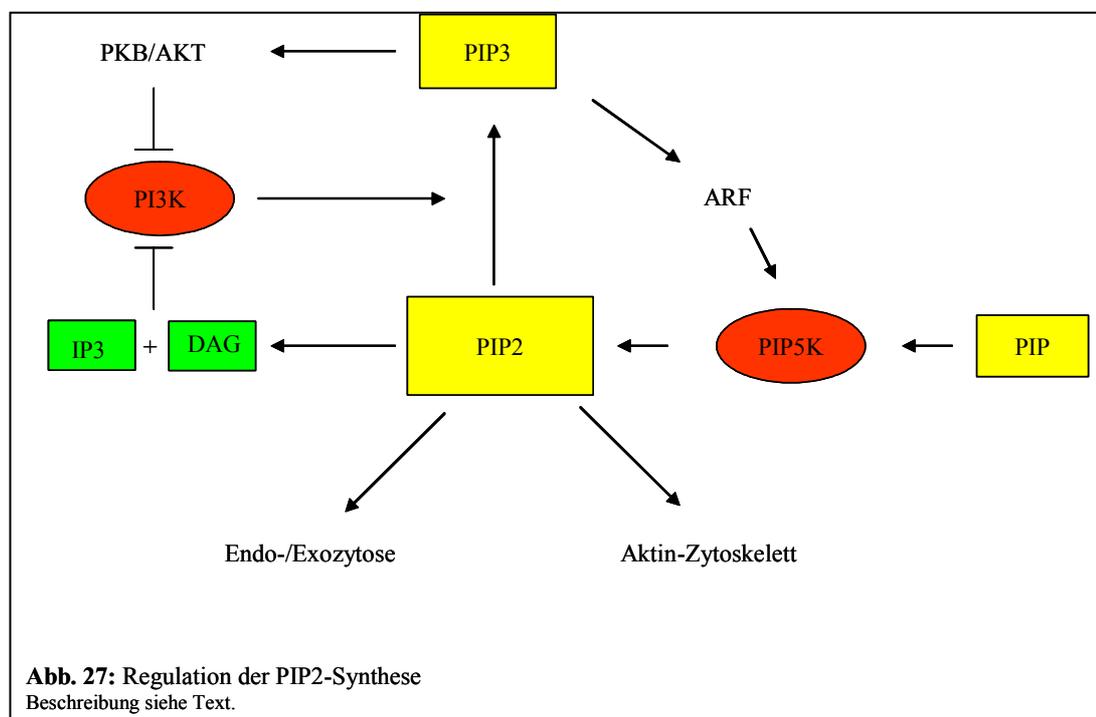
Durch den Entzug von IL-3 wird auch die Transkription von verschiedenen DNA-Reparaturgenen aktiviert. Dies sind z. B. das Maushomolog des bakteriellen Gens *alkB*, wobei AlkB (Acc. Nr.: NM006020) vor DNA-Schäden durch alkylierende Agentien schützt (Wei *et al.*, 1996).

Für Myosin I β (Acc. Nr.: Y007255, X99638), einem Protein das neben seinem Einfluss auf die Zellbewegung auch eine Rolle bei der Bewegung der Vesikel entlang des Zytoskeletts spielt, war die Aktivierung der Expression durch Apoptose nicht vorauszusagen. Da es aber während der Apoptose zu massiven Umbauten der Zytoplasmamembran kommt (Zell-blebbing und Ausbildung der apoptotischen Körperchen), ist die Beteiligung dieses Proteins nicht überraschend.

Die retrospektive Betrachtung der erzielten Ergebnisse unterstreicht die Nutzbarkeit der Rekombinase-basierten Genfallenstrategie zur Identifizierung Stimulus-abhängiger Transkripte als Methode, die andere experimentelle Ansätze sinnvoll komplementiert.

4.2 Proliferationsstimulation und Apoptoseprotektion durch PIP5K in FDC P1-Zellen

Um auch weiterführend zu ermitteln, inwieweit die Regulation der in unserem Projekt identifizierten Gene Einfluss auf die Apoptose nimmt, wurde eines der bekannten Gene zur detaillierteren funktionellen Analyse ausgewählt. Dieses Gen kodiert für Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase (PIP5K) ein Enzym, das Phosphatidylinositolphosphat (PIP) zu Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP2) phosphoryliert. Dieses Lipid spielt eine zentrale Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen (Abb. 27).



Während der Apoptose und der sich anschließenden Phagozytose stellen Rearrangements des Zytoskeletts die zentralen morphologischen Veränderungen dar (Coleman und Olson, 2002, Nebl *et al.*, 2000; Maruta *et al.*, 1999). PIP2 ist an der Regulation des Zytoskeletts direkt beteiligt (Martin, 2001). Weiter spielt das Zytoskelett zusätzlich eine entscheidende Rolle in zellulären Prozessen wie Zellbewegung, Chemotaxis und Zellteilung (Salmon 1989; Luna und Hitt, 1992; Bretscher, 1993; Stossel, 1993).

Die Rearrangements des Zytoskeletts während der Apoptose werden von den Proteinen der Rho-GTPase-Familie, hauptsächlich durch RhoA, ausgelöst (Mills *et al.*, 1999). Das durch RhoA aktivierte Enzym Rho-Kinase (ROCK) erhöht den Gehalt an Phosphat-Gruppen im Protein Myosin, wodurch es aktiviert wird. Myosin bindet an Aktin-Fibrillen und kontrahiert diese (Niggli, 1999). Weiter konnte durch die Inhibierung der Rho-Kinase ROCK I mit Y-27632 gezeigt werden, dass alle Membranausstülpungen, die während der Apoptose auftreten, unterdrückt werden (Shiratsuchi *et al.*, 2002). Myosin I β ist eines der in diesem Projekt identifizierten Gene, was andeutet, dass anscheinend nicht nur einzelne, zentrale Moleküle, sondern mehrere Komponenten, die an einer zellulären Antwort auf den IL-3 Entzug beteiligt sind, parallel durch Erhöhung der Transkriptionsrate ihrer Gene aktiviert werden.

Rho aktiviert aber nicht nur Rho-Kinase, sondern auch PIP5K in einer GTP-abhängigen Weise. Diese Aktivierung findet über eine direkte Bindung von Rho an PIP5K statt, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Tolias *et al.*, 1995; Ren *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1996).

Aus Blutplättchen ist bekannt, dass PIP5K zur Plasmamembran transportiert wird, um dort PIP₂ zu synthetisieren, sofern ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, wie z. B. der Thrombinrezeptor aktiviert wird (Chatah und Abrams, 2001). Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPRs) sind in fünf funktionelle und phylogenetische Gruppen unterteilt. Von den Rezeptoren der Gruppe V, zu denen auch der Thrombinrezeptor zählt, ist bekannt, dass sie ihre Signale über die Stimulation von Phospholipase C (PLC) weiterleiten. PLC katalysiert die Spaltung von PIP₂ in Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Diese Gruppe von GPRs beinhaltet Rezeptoren für autokrine, parakrine und endokrine Faktoren, wie z. B. den „platelet activating factor“ (PAF), der unter anderem in die Regulation der Blutgerinnung und der immunologischen Chemotaxis involviert ist. Somit reguliert PIP5K mit einiger Wahrscheinlichkeit die Änderungen des Zytoskeletts auch während der immunologischen Chemotaxis (Katanaev, 2001).

Ein anderer wichtiger Signalweg, in dem PIP₂ eine essentielle Rolle spielt, wird durch die Aktivität des Enzyms Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) stimuliert, welches die weitere Phosphorylierung von PIP₂ zu Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat (PIP₃) katalysiert. Die Aktivierung der PI3K ist normalerweise eine Antwort auf die Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren und Hormonen. Zentral im weiteren Geschehen ist die Serin/Threonin-Kinase Akt (PKB/Akt), ein

Molekül mit einer Pleckstrin-Homologie-(PH)-Domäne. Proteine mit derartigen PH-Domänen akkumulieren an Stellen mit hoher PI3K Aktivität durch die direkte Bindung an PIP3. Die Bindung an PIP3 bringt PKB/Akt in räumliche Nähe zu der Phosphatidylinositol-abhängigen Kinase 1 (PDK1), und es kommt zur Phosphorylierung von PKB/Akt durch PDK 1 (Lawlor und Alessi, 2001). Dadurch wird PKB/Akt stimuliert, was zur Phosphorylierung einer Fülle weiterer Proteine führt, die das Zellwachstum, den Eintritt in den Zellzyklus und das Zellüberleben regulieren.

Die zentrale Stellung der Produkte des Inositolphosphat-Stoffwechsels war ein Grund, die Funktion des für die Synthese des Intermediats PIP₂ verantwortlichen Enzyms PIP5K genauer zu untersuchen. Dazu wurde die PIP5K cDNA mit Hilfe eines retroviralen Vektors in FDC P1-Zellen überexprimiert und die zellbiologischen Konsequenzen analysiert. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von PIP5K einen deutlichen Einfluss auf das Zellwachstum und auch auf die Apoptose ausübt.

Die Ergebnisse aus den Wachstums-Experimenten mit FDC P1-Zellen zeigen, dass PIP5K in den Zellzyklus eingreift. Die Zellen wachsen schneller und zeigen einen veränderten Zellzyklus. In PIP5K überexprimierenden FDC P1-Zellen sind nach 24 h mehr Zellen sowohl in der G2/M-Phase als auch in der S-Phase. Diese Veränderungen im Zellzyklusprofil lassen sich wahrscheinlich auf die Aktivierung von PKB/Akt durch die Erhöhung des PIP₂ Spiegels zurückführen.

Neben einer erhöhten Proliferationsrate war in den PIPK überexprimierenden Zellen auch eine verringerte Spontanapoptose und erhöhte Stressresistenz beobachtet worden. Auch diese Effekte gehen höchstwahrscheinlich auf die Aktivierung von PKB/Akt zurück. In beiden Fällen kommt es dabei wahrscheinlich zum Zusammenspiel mehrerer Effektorsysteme (Nicholson und Anderson, 2002).

Die proliferationsfördernden und antiapoptotischen Effekte von PKB/Akt können entweder über die direkte Phosphorylierung von Zellzyklusregulatoren und Komponenten apoptotischer Signalwege oder indirekt durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren vermittelt werden.

PKB/Akt phosphoryliert mit Caspase-9 nicht nur direkt eine Initiator-Caspase, sondern kann auch an anderen Punkten in die Apoptose-Regulation eingreifen. So erzeugt die Phosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins Bad in diesem eine Andockstelle für Proteine der 14-3-3 Familie (del Peso *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*,

1997). Durch die Bindung von 14-3-3 Proteinen kann Bad nicht mehr mit Bcl-2 und Bcl-xL assoziieren. Die Freisetzung dieser anti-apoptotischen Proteine sichert dann das Überleben der Zelle (Nicholson und Anderson, 2002; Abb.28).

Tabelle 3: Die Substrate der PKB/Akt-Kinase

(modifiziert nach Nicholson und Anderson, 2002)

Substrate	Effekt	Referenz
<i>Anti-apoptotisch</i>		
ASK1	Inhibition von stressaktivierten Kinasen	Kim <i>et al.</i> , 2001
BAD	Assoziation von Bad mit 14-3-3 Proteinen; Suppression Bad induzierten Zelltodes	del Peso <i>et al.</i> , 1997; Datta <i>et al.</i> , 1997;
CREB	Transkriptionsanstieg der CREB-regulierten Überlebensgene	Du <i>et al.</i> , 1998
Forkhead Familie	Transkriptionsstopp von pro-apoptotischen Genen	Biggs, <i>et al.</i> , 1999; Jackson <i>et al.</i> , 2000
I κ -B Kinase	Induktion der transkriptionellen NF- κ B Aktivität	Ozes <i>et al.</i> , 1999
Procaspase-9	Suppression von Caspase-9 induziertem Zelltod	Cardone <i>et al.</i> , 1998
<i>Zellzyklus-Progression</i>		
GSK-3- α , - β	Inhibition der katalytischen GSK-3 Aktivität	Cross <i>et al.</i> , 1995
mTOR/FRAP	Modulation der mRNA Translation?	Nave <i>et al.</i> , 1999
p21WAF1/CIP1	Zellzyklus Progression	Rossig <i>et al.</i> , 2001

Ein weiteres direktes Zielmolekül von Akt ist die Apoptose-Signal-regulierende Kinase (ASK-1), eine über Mitogen aktivierte Proteinkinase (Kim *et al.*, 2001). Durch die Phosphorylierung von ASK-1 wird die Aktivierung von Stress-aktivierten Kinasen verhindert, was auch die erhöhte Stresstoleranz der PIP5K-transduzierten FDC P1-Zellen erklären könnte (Abb. 28).

Akt kann Transkriptionsfaktoren entweder über direkte Phosphorylierung, wie im Fall von CREB (cyclic AMP (cAMP)-response element binding factor) (Du und Montminy, 1998) und Faktoren der Forkhead-(FKHR) Familie (Biggs *et al.*, 1999;

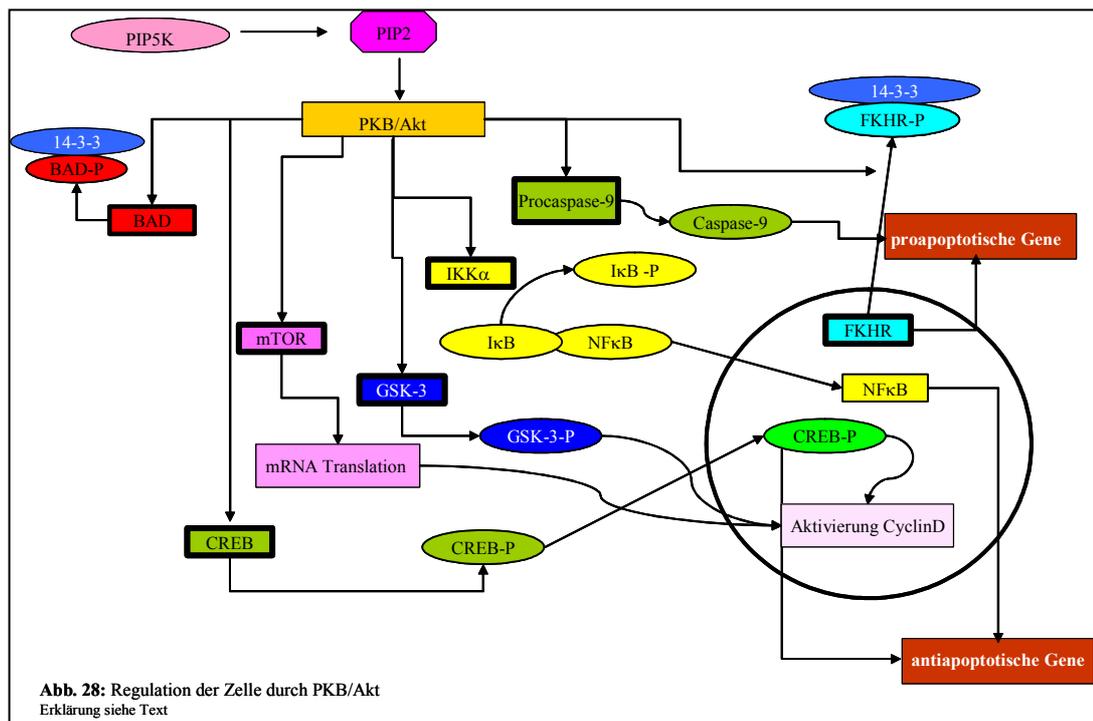
Brunet *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1999; Rena *et al.*, 1999) phosphorylieren oder durch Phosphorylierung von Regulatoren dieser Proteine, wie bei NF- κ B (Romashkova und Makarov, 1999; Ozes *et al.*, 1999). CREB und NF- κ B werden aktiviert und können dann anti-apoptotische Gene transkribieren. Die FKHR-Proteine dagegen binden nach ihrer Phosphorylierung wie Bad an 14-3-3 Proteine und werden dadurch im Zytosol zurückgehalten. Durch die Blockade ihrer Translokation in den Zellkern wird die Aktivierung von FKHR-Proteinregulierten, pro-apoptotischen Genen verhindert (Abb.28).

Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Aktivierung von PI3K nur gegen Apoptose schützt, wenn sie durch IL-3 Entzug ausgelöst wird. Wurden bei Zellen, in diesem Fall die murine hämatopoetischen Zelllinie Ba/F3, Apoptose durch Gamma-Strahlung ausgelöst, konnte eine Aktivierung von PI3K die Apoptose nicht verhindern (Mathieu *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte experimentell belegt werden, dass eine Überexpression von PIP5K in Ba/F3-Zellen keinen Schutz vor Apoptose bietet, wenn diese durch IL-3 Entzug ausgelöst wurde. Dies zeigt einerseits, dass unterschiedliche Apoptosestimuli unterschiedliche Signalwege anschalten, andererseits aber auch, dass verschiedene Zelltypen unterschiedlich auf die gleichen Stimuli reagieren.

Ein weiteres Zielmolekül von PKB/Akt ist das Enzym Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3). Diese Proteinkinase ist konstitutiv aktiv und phosphoryliert etliche Proteine, darunter auch das Zellzyklusregulator-Protein CyclinD1 (Abb. 28). Das bewirkt dessen Export aus dem Kern und fördert dadurch den darauf folgenden proteolytischen Abbau von CyclinD1 (Ryves *et al.*, 2003). Damit blockiert GSK-3 den Eintritt in den Zellzyklus. Die Phosphorylierung von GSK-3 durch PKB/Akt führt zur Inaktivierung und daraus resultierend zu einer Aktivierung der Signalwege, die normalerweise durch GSK-3 reprimiert werden. Daneben wird eine Rolle von GSK-3 in der Phosphorylierung von β -Catenin diskutiert, was sich indirekt über den Transkriptionsfaktor LEF auf die Transkription von CyclinD1 auswirkt. Anscheinend wird aber nicht nur die Transkription von CyclinD, sondern auch seine Translation von Akt via mTOR/FRAP, eine PI3K verwandte Proteinkinase, verstärkt (Muisel-Helmericks *et al.*, 1998). Unterstützende Indizien für diese Annahme liefert der Befund, dass mTOR/FRAP eine verstärkte Phosphorylierung in vielen Prostatakarzinomzelllinien zeigt, in denen Akt konstitutiv aktiviert ist (Sekulic *et al.*, 2000).

Ein weiteres Substrat für Akt ist p21/Cip1/WAF1, ein Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), der die Progression der Zellen durch die G1 Phase des Zellzyklus' verhindert. Neben seiner Bindung an CDKs im Zellkern hat p21 scheinbar auch eine Funktion im Zytosol, nämlich den Schutz der Zellen vor Apoptoseinduktion durch zytotoxische Substanzen. Möglicherweise wird die subzelluläre Lokalisation über die Interaktion mit Akt reguliert. Auch p27/Kip1, ein zweiter CDK-Inhibitor, wird über Akt kontrolliert. Hier geschieht dies allerdings auf transkriptioneller Ebene, über die Proteine der FKHR-Familie (Abb.28).

Diese Befunde zeigen, dass die Bereitstellung von mehr PIP₂ durch erhöhte PIP5K-Aktivität und die damit verbundene Aktivierung von PKB/Akt auf verschiedenen Wegen zur Zellzyklusprogression führen kann, von denen nicht notwendigerweise alle in einem bestimmten Zelltyp eingeschlagen werden müssen.



4.3 Proliferationsstimulation und Apoptosemodulation durch PIP5K in HeLa-Zellen

Nachdem in FDC P1-Zellen nur eine moderate Expression von exogener PIP5K erzielt werden konnte, wurden HeLa-Zellen mit PIP5K-Expressionsvektoren transduziert und stabile PIP5K-überexprimierende Zellpopulationen isoliert. Mit diesen Zellen wurden dann analog zu den FDC P1-Zellen Proliferationsexperimente durchgeführt. Zudem wurden die Zellen zur Analyse von Zellzyklus-assoziierten Proteinen und zur Charakterisierung ihrer Reaktion auf alternative Apoptosestimuli genutzt.

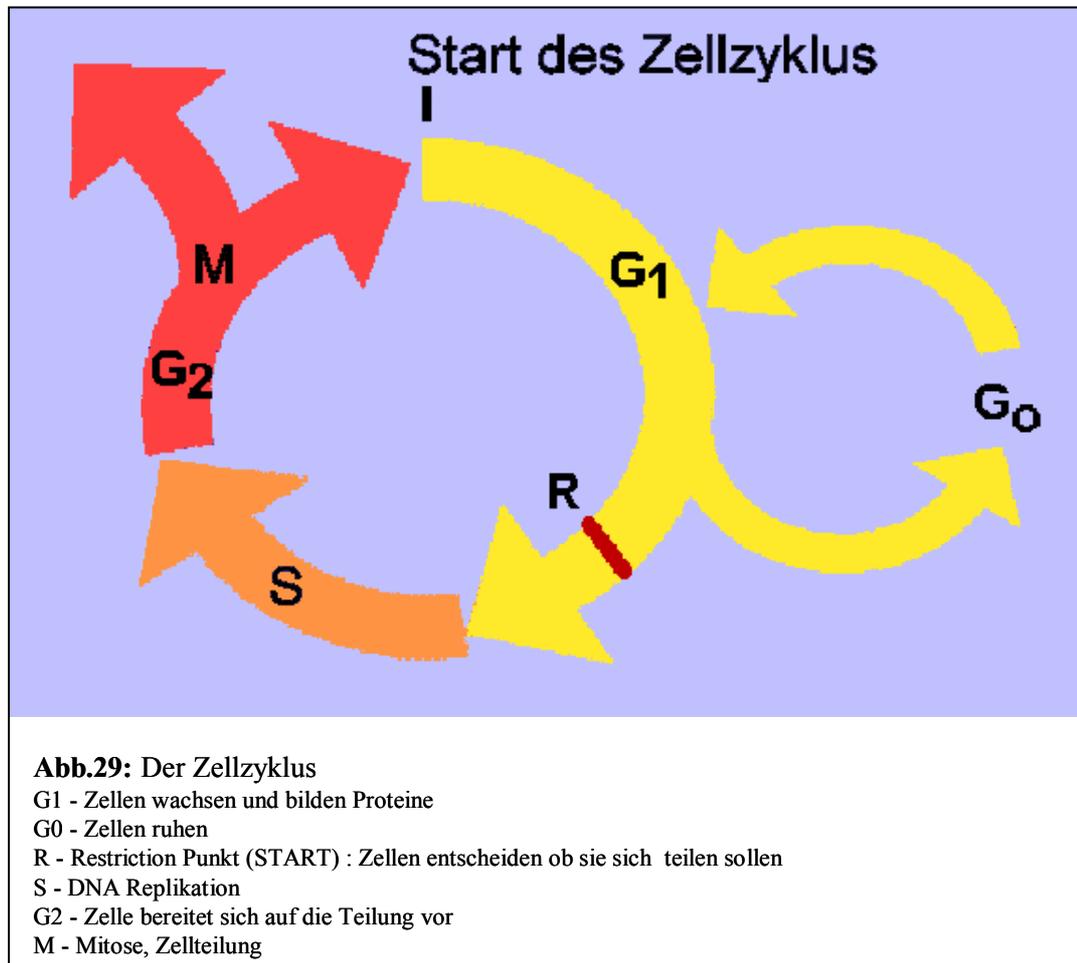
Die Überexpression von PIP5K führte auch in dieser nicht hämatopoetischen Zelllinie zu einer Proliferationsstimulation. Die der verstärkten Proliferation zugrunde liegenden Mechanismen sind wahrscheinlich zumindest teilweise identisch mit denjenigen in FDC P1-Zellen. In einer systematischen biochemischen Analyse von Zellzyklusregulatoren wurden darüber hinaus PIP5K regulierte Zellzyklusproteine identifiziert. So führte die PIP5K Überexpression zu einer Induktion von PCNA, hsMAD2 und DNA-Polymerase ϵ , und zu einer Repression von p21/Cip1/Waf1.

Der Zellzyklus ist in vier Phasen unterteilt (Norbury und Nurse, 1992). Während zweier dieser Phasen führt die Zelle zwei der entscheidenden Vorgänge der Zellteilung durch: Erstens die Generierung einer einzelnen und korrekten Kopie des genetischen Materials (Synthese oder S-Phase), und zweitens die Aufteilung aller zellulären Komponenten in zwei identische Tochterzellen (Mitose oder M-Phase) (Abb.29).

Die beiden anderen Phasen des Zellzyklus -G1 und G2- repräsentieren die „Gap“-Phasen, in denen die Zellen wachsen, Proteine bilden und sich auf den erfolgreichen Abschluss der S- bzw. der M-Phase vorbereiten. Wenn die Zellen die Proliferation einstellen, sei es aufgrund spezieller anti-mitotischer Signale oder wegen des Fehlens mitotischer Signale, verlassen sie den Zyklus und betreten die Ruhephase G0 (Abb.29).

Um sicherzustellen, dass alle Phasen des Zellzyklus' korrekt durchlaufen werden, haben die Zellen eine Reihe von Kontrollpunkten entwickelt. Diese Kontrollpunkte hindern die Zellen daran, eine neue Phase zu betreten, ohne die vorhergehende erfolgreich abgeschlossen zu haben (Hartwell und Weinert, 1989). Der Verlust dieser Kontrollen kann zu einer unkontrollierten Proliferation und zur Entstehung von

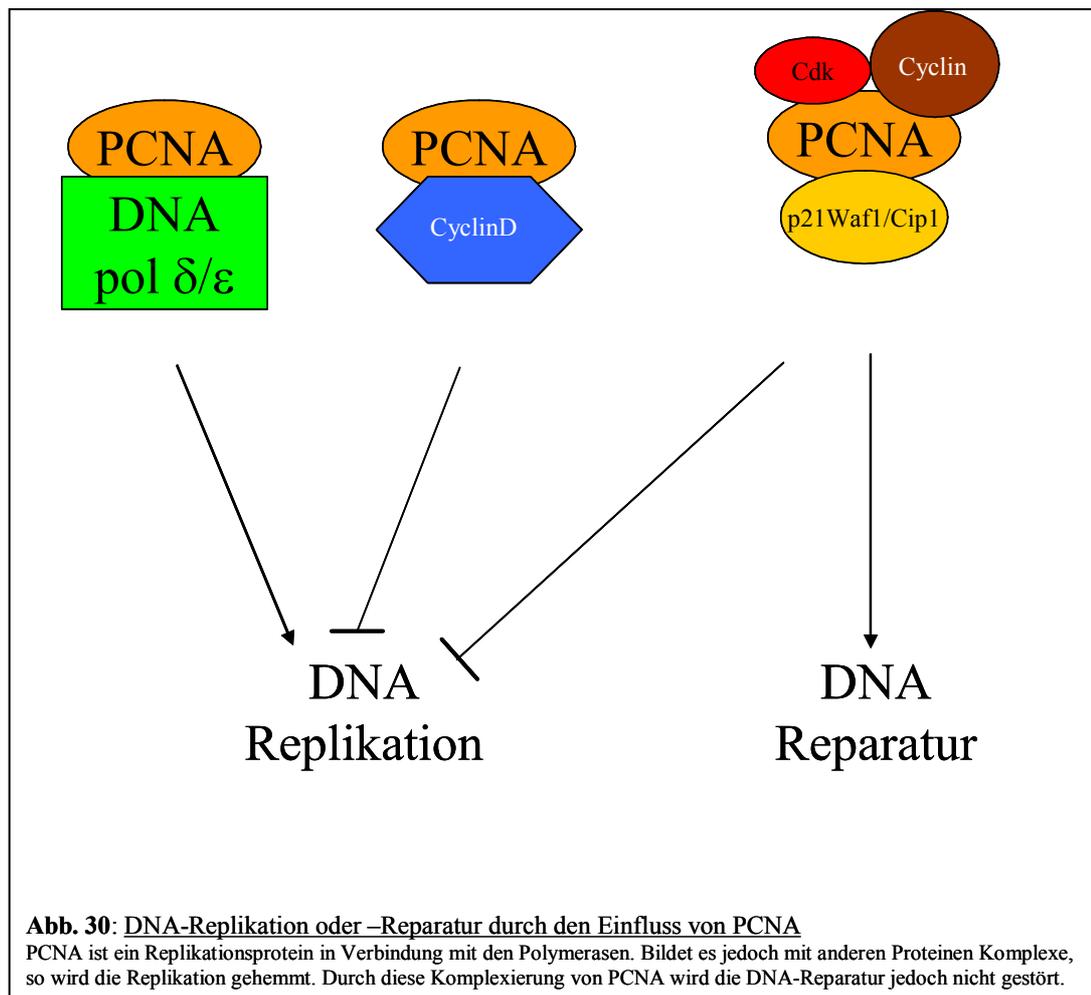
Neoplasien führen. Es ist möglich, dass ruhende oder sich zum ersten Mal teilende Zellen spezielle Kontrollpunkte durchlaufen müssen, bevor sie den Zellzyklus durchlaufen können.



PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ist ein Zellzyklus-Marker Protein, das ursprünglich als ein mit der Autoimmunkrankheit systemischer Lupus erythematoses assoziiertes Antigen entdeckt wurde (Miyachi *et al.*, 1978). Später wurde das Protein *in vitro* als essentieller Faktor für die virale SV 40 (simian virus 40) DNA-Replikation beschrieben, (Prelich *et al.*, 1987). Spätere biochemische und genetische Studien in Hefe konnten bestätigen, dass PCNA auch essentiell für die Replikation chromosomaler DNA essentiell ist (Bauer und Burgers, 1990; McAlear *et al.*, 1994; Ayyagari *et al.*, 1995).

Zusätzlich zu seiner Funktion als akzessorisches Protein der DNA-Polymerasen interagiert PCNA mit einer Reihe von anderen Proteinen. Einige sind an der Bildung der Okazaki-Fragmente beteiligt, andere an der DNA-Mismatch-Reparatur, der

Chromatin-Reorganisation und im DNA-Methylierungsprozeß (Hübscher *et al.*, 1996; Jonsson und Hübscher, 1997; Kelman, 1997). Auch können einige Zellzyklus-Kontrollproteine mit PCNA interagieren und eventuell seine Funktion modulieren. So spielt zum Beispiel ein Komplex aus PCNA, p21Waf1/Cip1, Cdk2 und CyclinD eine entscheidende Rolle während der Reparatur von induzierten DNA-Defekten. Die Bindung von p21Waf1/Cip1 an PCNA blockiert die DNA-Replikation (Abb. 30), um die DNA DNA-Reparaturenzymen zugänglich zu machen. (Flores-Rozas *et al.*, 1994; Shivji *et al.*, 1994; Waga *et al.*, 1994).



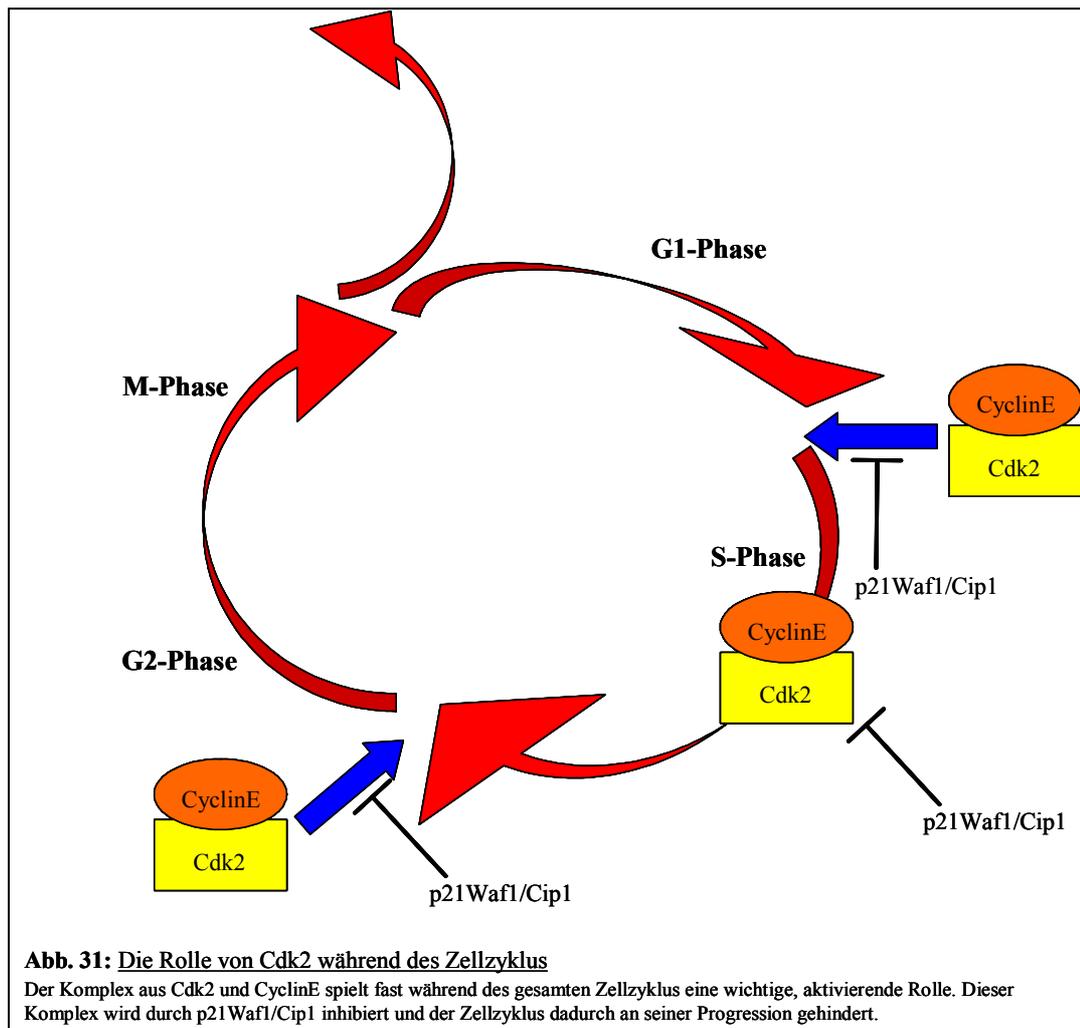
Die replikativen DNA-Polymerasen α , δ und ϵ sind zentrale Komponenten in der DNA-Replikation, der DNA-Reparatur, der Rekombination und in der Kontrolle des Zellzyklus (Wang, 1998; Burgers, 1998; Hübscher *et al.*, 2000). Sie bestehen aus den zwei, mehrere Komponenten enthaltenden, enzymatischen Untereinheiten A und B. Beide Untereinheiten werden durch mitogene Aktivatoren hochreguliert. So wurde z. B. für die humane B-Untereinheit der Polymerase ϵ gezeigt, dass deren Expression von E2F induziert wird (Huang *et al.*, 2001).

DNA-Polymerase ϵ ist essentiell für die Progression des Zellzyklus durch die S-Phase in eukaryotischen Zellen (Waga und Stillman, 1998), sie spielt die Hauptrolle für die Viabilität verschiedener Hefen (Morrison *et al.*, 1990; D'Urso und Nurse, 1997).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die DNA-Elongation durch Polymerase δ und ϵ von p21Waf1/Cip1 sehr effizient unterbunden wird. Dabei wird jedoch nicht die Reparaturfunktion der Polymerase inhibiert (Li *et al.*, 1994; Podust *et al.*, 1995).

p21WAF1/Cip1 gehört zusammen mit p27Kip und p57Kip2 zu einer Familie regulatorischer Proteine, die mit den Zyklin abhängigen-Kinasen (CDKs) interagieren und diese dadurch inhibieren (Abb. 31) (CKI, cyclin dependent kinase inhibitors). Die Aktivierung der Inhibitoren wird unter anderem durch anti-mitotische Stimuli ausgelöst. Da die CDKs in Kombination mit Zyklinen an verschiedenen Stellen des Zellzyklus für dessen Progression essentiell sind, führt ihre Inhibition durch CKIs zu einem Zellzyklusarrest (Abb. 31). Dies zeigt sich auch daran, dass die Überexpression von CKIs einen G1-Arrest hervorruft (Sherr und Roberts, 1995).

Inhibition der Polymerisationsfunktion von DNA-Polymerasen ohne gleichzeitige Inhibition ihrer Reparaturfunktionen ermöglicht die Reparatur von DNA-Schäden, bevor die Zelle wieder in den Zellzyklus eintritt. Dadurch wird eine Weitergabe der DNA-Schäden an Tochterzellen verhindert.



Das MAD2 Protein ist essentiell für die korrekte Chromosomenverteilung während der Zellteilung. In *Saccharomyces cerevisiae* inhibiert MAD2 (mitotic arrest-deficient 2) die Mitose wenn der Zusammenbau des Spindelapparates gestört ist (Li und Murray, 1991). Auch das humane Homolog hsMAD2 ist eine Komponente des mitotischen Spindel-Kontrollpunkts. Es wird dazu benötigt Zellen in der Mitose so lange zu arretieren bis die Chromosomen am Spindelapparat angeheftet sind. Für hsMAD2 ist bekannt, dass es mit verschiedenen Proteinen interagieren kann und sich dessen proteinspezifische Bindungsaffinitäten während des Zellzyklus ändern (Li *et al.*, 1997). Ein Bindungspartner von hsMAD2 ist die gemeinsame β -Untereinheit der Zytokinrezeptoren GM-CSF, IL-3 und IL-5, eine Interaktion, die Zellzyklus-spezifisch reguliert wird. (Miyajima *et al.*, 1993). Der Zytokin-Rezeptor β verankert hsMAD2 im Zytoplasma bis zu dem Zeitpunkt, an dem hsMAD2 im Zellkern benötigt wird. Nach Dissoziation vom Rezeptor gelangt hsMAD2 in den Zellkern, wo es seine Funktion als M-Phase Kontrollprotein ausübt. Nach der M-Phase steigt

die Bindungsaffinität zwischen hsMAD2 und β c wieder an (Takeda *et al.*, 2001). Die Bindungsdomäne von hsMAD2 für die β c-Untereinheit befindet sich in dessen C-Terminus, der eine Reihe von potentiellen Phosphorylierungsstellen enthält.

Die koordinierte Regulation von PCNA, DNA-Polymerase ϵ , p21 und hsMAD2 durch Überexpression von PIP5K in HeLa Zellen verdeutlicht, dass PIP5K sowohl DNA-Reparatur- als auch Zellreplikationsprozesse reguliert. Vor dem Hintergrund der Induktion von PIP5K nach IL-3 Entzug in FDC P1-Zellen ist anzunehmen, dass die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen eine der ersten Antworten auf den apoptotischen Stimulus ist. In den PIP5K überexprimierenden Zellen überwiegen insgesamt die Zellzyklus-stimulierenden Aktivitäten, die für deren erhöhte Proliferation verantwortlich sind.

Schließlich wurde die Rolle von PIP5K während der durch alternative Stimuli induzierten Apoptose in HeLa-Zellen untersucht. Obwohl von einer anderen Gruppe PIP₂ als Inhibitor der Initiatorcaspasen-8 und -9 und der Effektorcaspase-3 während der TNF- α induzierten Apoptose in HeLa-Zellen charakterisiert wurde (Mejillano *et al.* 2001), konnten wir dies in ähnlichen Versuchen nicht reproduzieren. Im Gegenteil, in unseren Experimenten zeigte sich, dass PIP5K die Zytostatika- und Strahleninduzierte Apoptose in HeLa-Zellen akzeleriert.

Entsprechend führte sowohl Doxorubicin Behandlung als auch eine UV- oder γ -Bestrahlung zu einer erhöhten Apoptoserate in PIP5K überexprimierenden HeLa-Zellen, wobei dies wahrscheinlich auf die höhere Proliferationsrate von PIP5K überexprimierenden Zellen zurückzuführen ist. Weil stark proliferierende Zellen gegenüber zytostatischen Agentien um ein Vielfaches empfindlicher sind als ruhende oder schwach proliferierende Zellen, bleibt der Mechanismus der signifikant stärkeren Sensibilisierung gegenüber UV-Strahlen ungeklärt. Denkbar ist eine akute Toxizität der durch UV-Strahlung induzierten DNA-Photoaddukten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PIP5K den Apoptoseprozess je nach Stimulus sowohl verzögern als auch beschleunigen kann. Während PIP5K bei IL-3 Entzug anti-apoptotisch wirkt, geschieht genau das Gegenteil nach zytostatischer Behandlung. Insgesamt spiegelt dies eine subtil aufeinander abgestimmte Regulation von Zellzyklus und Apoptose wieder.

5. Literatur

- Aggarwal, B.B. 2000. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann. Rheum. Dis.* **59**: 6-16.
- Akiyama, N., Y. Matsuo, H. Sai, M. Noda, and S. Kizaka-Kondoh. 2000. Identification of a series of transforming growth factor beta-responsive genes by retrovirus-mediated gene trap screening. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 3266-3273.
- Allen, P.D., S.A. Bustin, M.G. Macey, D.H. Johnston, N.S. Williams, and A.C. Newland. 1993b. Programmed cell death (apoptosis) in immunity and haematological neoplasia. *Br. J. Biomed. Sci.* **50**: 135-149.
- Allen, P.D., S.A. Bustin, and A.C. Newland. 1993a. The role of apoptosis (programmed cell death) in hematopoiesis and the immune system. *Blood Rev.* **7**: 63-73.
- Alnemri, E.S. 1997. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cystein proteases. *J. Cell Biol.* **64**: 33.
- Aravind, L., V.M. Dixit, and E.V. Koonin. 2001. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparison. *Science* **291**: 1279-1284.
- Auger, K.R., C.L. Carpenter, L.C. Cantley, and L. Varticovski. 1989. Phosphatidylinositol 3-kinase and its novel product, phosphatidylinositol 3-phosphate, are present in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**: 20181-20184.

-
- Ayyagari, R., K.J. Impellizzeri, B.L. Yoder, S.L. Gray, and P.M.J. Burgers. 1995. A mutational analysis of the yeast proliferating cell nuclear antigen indicates distinct roles in DNA replication and DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4420-4429.
- Azuma, T., K. Kohts, L. Flanagan, and D. Kwiatkowski. 2000. Gelsolin in complex with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits caspase-3 and -9 to retard apoptotic progression. *J. Biol. Chem.* **275**: 3761-3766.
- Baker, R.K., M.A. Haendel, B.J. Swanson, J.C. Shambaugh, B.K. Micales, and G.E. Lyons. 1997. In vitro preselection of gene-trapped embryonic stem cell clones for characterizing novel developmentally regulated genes in mouse. *Dev. Biol.* **185**: 201-214.
- Balajee, A.S., A. May, and V.A. Bohr. 1999. DNA repair of pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in the ribosomal DNA. *Nuc Acid Res* **27**: 2511-2520.
- Banner, D.W., A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H.J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher, and W. Lessauer. 1993. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**: 431-445.
- Baud, V. and M. Karin. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* **11**: 372-377.
- Bauer, G.A. and P.M.J. Burgers. 1990. Molecular cloning, structure and expression of the yeast proliferating cell nuclear antigen gene. *NA Res.* **18**: 261-265.
- Bazenet, C.E., A.R. Ruano, J.L. Brockman, and R.A. Anderson. 1990. The human erythrocyte contains two of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase which are differentially active toward membranes. *J. Biol. Chem.* **265**: 18012-18022.

-
- Beutler, B. and C. van Huffel. 1994. Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* **264**: 667-668.
- Bhat, K., M.W. McBurney, and H. Hamada. 1988. Functional cloning of mouse chromosomal loci specifically active in embryonic carcinoma stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3251-3259.
- Biggs, W.H., J. Meisenhelder, T. Hunter, W.K. Cavenee, and K.C. Arden. 1999. Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7421-7426.
- Bonaldo, P., K. Chowdhury, A. Stoykova, M. Torres, and P. Gruss. 1998. Efficient gene trap screening for novel developmental genes using IRES gata geo vector and in vitro preselection. *Exp. Cell Res.* **244**: 125-136.
- Boon, A.M., B.J. Beresford, and A. Mellors. 1985. A tumor promotor enhances the phosphorylation of phosphatidylinositides while decreasing phosphatidylinositol labelling in lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **129**: 431-438.
- Boronenkov, I.V. and R.A. Anderson. 1995. The Sequence of Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Defines a Novel Family of Lipide Kinases. *J. Biol. Chem.* **270**: 2881-2884.
- Bravo, R., R. Frank, P.A. Blundell, and H. MacDonald-Bravo. 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature* **326**: 515-517.
- Bretscher, A. 1993. Microfilaments and membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 653-660.
- Brunet, A., A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis, and M.E. Greenberg. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.

-
- Brunet, A., J. Park, H. Tran, L.S. Hu, B.A. Hemmings, and M.E. Greenberg. 2001. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol* **21**: 952-965.
- Burgers, P.M. 1998. Eucaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. *Chromosoma* **107**: 218-227.
- Cantley, L.C., K.R. Auger, C.L. Carpenter, B. Duckworth, A. Graziani, R. Kapeller, and S. Soltoff. 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell* **64**: 281-302.
- Cappello, F., M. Bellafiore, A. Palma, and F. Bucchieri. 2002. Defective apoptosis and tumorigenesis: role of p53 mutation and Fas/FasL system dysregulation. *Eur J Histochem* **46**: 199-208.
- Cardone, M.H., N. Roy, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, T.F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J.C. Reed. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**: 1318-1321.
- Carson, D.A. and J.M. Ribeiro. 1993. Apoptosis and disease. *Lancet* **341**: 1251-1254.
- Carvajal, J.J., M.A. Pook, M. dos Santos, K. Doudney, R. Hillermann, S. Minogue, R. Williamson, J.J. Hsuan, and S. Chamberlain. 1996. The Friedreich's ataxia gene encodes a novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Nature Genetics* **14**: 157-162.
- Casciola, R.L., D.W. Nicholson, T. Chong, K.R. Rowan, N.A. Thornberry, D.K. Miller, and A. Rosen. 1996. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death (see comments). *J. Exp. Med.* **183**: 1957.

-
- Castellino, A.M., G.J. Parker, I.V. Boronenkov, R.A. Anderson, and M.V. Chao. 1997. A novel interaction between the juxtamembrane region of the p55 tumor necrosis factor receptor and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J. Biol. Chem.* **272**: 5861-5870.
- Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer. 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 395.
- Chatah, N.-E.-H. and C.S. Abrams. 2001. G-protein-coupled receptor activation induces the membrane translocation and activation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase Ialpha by a Rac- and Rho-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* **276**: 34059-34065.
- Chinnaiyan, A. and V. Dixit. 1996. The cell-death machine. *Curr. Biol.* **6**: 555-562.
- Chong, L.D., A. Traynor-Kaplan, G.M. Bokoch, and M.A. Schwartz. 1994. The Small GTP-Binding Protein Rho Regulates a Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase in Mammalian Cells. *Cell* **79**: 507-513.
- Cochet, C. and E.M. Chambaz. 1986. Catalytic properties of a purified phosphatidylinositol-4-phosphate kinase from rat brain. *Biochem. J.* **237**: 25-31.
- Cochet, C., O. Filhol, B. Payrastre, T. Hunter, and G.N. Gill. 1991. Interaction between the epidermal growth factor and phosphoinositide kinases. *J. Biol. Chem.* **266**: 637-644.
- Coleman, M.L. and M.F. Olson. 2002. Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **9**: 493-504.

-
- Colombel, M., C.A. Olsson, P.Y. Ng, and R. Buttyan. 1992. Hormone-regulated apoptosis results from reentry of differentiated prostate cells onto a defective cell cycle. *Cancer Res.* **52**: 4313.
- D'Urso, G. and P. Nurse. 1997. Schizosaccharomyces pombe cdc20+ encodes DNA polymerase epsilon and is required for chromosomal replication but not for the S phase checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* **94**: 12491-12496.
- Datta, S.R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M.E. Greenberg. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231-241.
- Deas, O., C. Dumont, M. MacFarlane, M. Rouleau, C. Hebib, F. Harper, F. Hirsch, B. Charpentier, G.M. Cohen, and A. Senik. 1998. Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol* **161**: 3375-3383.
- del Peso, L., M. Gonzales-Garcia, C. Page, R. Herrera, and G. Nunez. 1997. Interleukin 3-induced Phosphorylation of BAD Through the Protein Kinase Akt. *Science* **278**: 687-89.
- Deveraux, Q.L. and J.C. Reed. 1999. IAP family proteins--suppressor of apoptosis. *Genes Dev.* **13**: 239.
- Dexter, T.M., J. Garland, D. Scott, E. Scolnick, and D.J. Metcalf. 1980. Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. *J. Exp. Med.* **152**: 1036-1047.
- Dhein, J., P.T. Daniel, B.C. Trauth, A. Oehm, P. Moller, and P.H. Krammer. 1992. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol* **149**: 3166-3173.

-
- Divecha, N. and R.F. Irvine. 1995. Phospholipide signaling. *Cell* **80**: 269-278.
- Draetta, G.F., L. Brizuela, J. Potashin, and D. Beach. 1987. Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell* **50**: 319-325.
- Draetta, G.F., F. Lucas, J. Westendorf, L. Brizuela, J. Ruderman, and D. Beach. 1989. *cdc2* protein kinase is complexed with both Cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* **56**: 829-838.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrom c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33-42.
- Dudek, H., S.R. Datta, T.F. Franke, M.J. Birnbaum, R. Yao, G.M. Cooper, R.A. Segal, D.R. Kaplan, and M.E. Greenberg. 1997. Regulation of Neuronal Survival by the Serine-Threonine Protein Kinase Akt. *Science* **275**: 661-65.
- Duggan, D.J., M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer, and J.M. Trent. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21**: 10-14.
- Duriez, P.J. and G.M. Shah. 1997. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem. Cell. Biol.* **75**: 337-349.
- Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**: 2245-2262.
- Eck, M.J., M. Ultsch, E. Rinderknecht, A.M. de Vos, and S.R. Sprang. 1992. The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution. *J. Biol. Chem.* **267**: 2119-2122.

-
- El-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**.
- Elledge, S.J. 1998. Mitotic arrest: Mad2 prevents sleepy from waking up the APC. *Science* **279**: 999-1000.
- Ellis, R.E. and H.R. Horvitz. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**: 817-829.
- Ellis, R.E. and H.R. Horvitz. 1991b. Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* **112**: 591-603.
- Ellis, R.E., J.Y. Yuan, and H.R. Horvitz. 1991a. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**: 663.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD (see comments). *Nature* **391**: 43.
- Evan, G. and T. Littlewood. 1998. A matter of life and cell death. *Science* **281**: 1317-1322.
- Evan, G.I., A.H. Wyllie, C.S. Gilbert, T.D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, C.M. Waters, L.Z. Penn, and D.C. Hancock. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**: 119.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. 1984. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.* **137**: 266-267.

-
- Fensome, A., E. Cunningham, S. Prosser, S.K. Tan, P. Swigart, G. Thomas, J. Hsuan, and S. Cockcroft. 1996. ARF and PITP restore GTP gamma S-stimulated protein secretion from cytosol-depleted HL60 cells by promoting PIP2 synthesis. *Curr. Biol.* **6**: 730-738.
- Flores-Rozas, H., Z. Kelman, F.B. Dean, Z.Q. Pan, J.W. Harper, S.J. Elledge, M. O'Donnell, and J. Hurwitz. 1994. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**: 8655-8659.
- Forrester, L.M., A. Nagy, M. Sam, A. Watt, L. Stevenson, A. Bernstein, A.L. Joyner, and W. Wurst. 1996. An induction gene trap screen in embryonic stem cells: identification of genes that respond to retinoic acid in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**: 1677-1682.
- Fraser, A. and G. Evan. 1996. A license to kill. *Cell* **85**: 781-784.
- Freeman, R.S., S. Estus, and E.M.J. Johnson. 1994. Analysis of cell-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* **12**: 343.
- Fukami, K., K. Furuhashi, M. Inagaki, T. Endo, S. Hatano, and T. Takenawa. 1992. Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature* **359**: 150-152.
- Gautier, J., J. Minshull, M. Lohka, M. Glotzer, T. Hunt, and J.L. Maller. 1990. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* **60**: 487-494.
- Gey, G.O., W.D. Coffman, and M.T. Kubicek. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-265.

-
- Girard, F., U.P. Strausfeld, J. Cavadore, P. Russell, A. Fernandez, and N.J.C. Lamb. 1992. cdc25 is a nuclear protein expressed constitutively throughout the cell cycle in nontransformed mammalian cells. *J. Cell Biol.* **118**: 785-794.
- Godi, A., I. Santone, P. Pertile, P. Marra, G. Di Tullio, A. Luini, D. Corda, and M.A. De Matteis. 1999a. ADP-ribosylation factor regulates spectrin skeleton assembly on the Golgi complex by stimulating phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **27**: 638-642.
- Gogos, J.A., W. Lowry, and M. Karayiorgou. 1997. Selection for retroviral insertions into regulated genes. *J. Virol.* **71**: 1644-1650.
- Gossler, A. and J. Zachgo. 1993. Gene and enhancer trap screens in ES cell chimaeras. In *Gene targeting: A practical approach* (ed. A. Joyner), pp. 181-227. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Goyal, L., K. McCall, J. Agapite, E. Hartwig, and H. Steller. 2000. Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J.* **19**: 589-597.
- Gu, H., Y.R. Zou, and K. Rajewsky. 1993. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**: 1155-1164.
- Guo, S., G. Rena, S.C. Cichy, X. He, G.M. Cohen, and T. Unterman. 1999. Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* **274**: 17184-17192.

-
- Haas-Kogan, D.A., S.C. Kogan, D. Levi, P. Dazin, A. T'Ang, Y.K. Fung, and M.A. Israel. 1995. Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. *EMBO J* **14**: 461-472.
- Halenda, S.P. and M.B. Feinstein. 1984. Phorbol myristate acetate stimulates formation of phosphatidyl inositol 4-phosphate and phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate in human platelets. *Biochem Biophys Res Commu* **124**: 507-513.
- Hamatake, R.K., H. Hasegawa, A.B. Clark, K. Bebenek, T.A. Kunkel, and A. Sugino. 1990. Purification and characterization of DNA polymerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the catalytic core and a possible holoenzyme form of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **265**: 4072-4083.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Harlow, E. and D. Lane. 1988. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomars, and S.J. Elledge. 1993. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816.
- Hartmann, K.K., V. Papa, E.J. Brown, U. Doerris, S.M. Rosenthal, and I.D. Goldfine. 1990. A rapid and simple one step method for isolation of poly(A)⁺ RNA from cells in monolayer. *Endocrinology* **127**: 2038-2040.
- Hartwell, L.H. and T. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**: 629-634.

-
- Hay, J.C., P.L. Fiset, G.H. Jenkins, K. Fukami, T. Takenawa, R.A. Anderson, and T.F.J. Martin. 1995. ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca²⁺-activated secretion. *Nature* **374**: 173-177.
- Helin, K. 1998. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 28-35.
- Hengartner, M.O. 1998. Death by crowd control. *Science* **281**: 1298-1299.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
- Hill, D.P. and W. Wurst. 1993. Gene and enhancer trapping: mutagenic strategies for developmental studies. *Curr. Top. Dev. Biol.* **28**: 181-206.
- Hirsch, T., P. Marchetti, S.A. Susin, B. Dallaporta, N. Zamzami, I. Marzo, M. Geuskens, and G. Kroemer. 1997. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* **15**: 1573-1581.
- Hokin, L.E. 1968. Dynamic aspects of phospholipids during protein secretion. *Int. Rev. Cytol.* **23**: 187-208.
- Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel. 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRAD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**: 495-504.
- Huang, D., M. Jokela, J. Tuusa, S. Skog, K. Poikonen, and J.E. Syväoja. 2001. E2F mediates induction of the Sp1-controlled promoter of the human DNA polymerase epsilon B-subunit gene POLE2. *Nuc. Acid Res.* **29**: 2810-2821.
- Hübscher, U., G. Maga, and V.N. Podust. 1996. *DNA replication in eukaryotic cells*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, New York.

-
- Hübscher, U., H.-P. Nasheuer, and J.E. Syväoja. 2000. Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. *Trend Biochem. Sci.* **25**: 143-147.
- Inaba, T., H. Matsushime, M. Valentine, M.F. Roussel, C.J. Sherr, and A.T. Look. 1992. Genomic organization, chromosomal localisation, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics* **13**: 565-574.
- Ishihara, H., Y. Shibasaki, N. Kizuki, H. Katagiri, Y. Yazski, T. Asano, and Y. Oka. 1996. Cloning of cDNAs encoding two isoforms of 68kDa type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 23611-23614.
- Ishihara, H., Y. Shibasaki, N. Kizuki, T. Wada, Y. Yazaki, T. Asona, and Y. Oka. 1998. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. *J. Biol. Chem.* **273**: 8741-8748.
- Itoh, T., T. Ijuin, and T. Takenawa. 1998. A novel phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase (phosphatidylinositol-phosphate kinase IIgamma) is phosphorylated in the endoplasmic reticulum in response to mitogenic signals. *J Biol Chem* **273**: 20292-20299.
- Itoh, T., R. Liu, T. Yokota, K.-I. Arai, and S. Watanabe. 1998. Definition of the role of tyrosine residues of the common beta subunit regulating multiple signaling pathways of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 742-752.
- Jackson, J.G., J.I. Kreisberg, A.P. Koterba, D. Yee, and M.G. Brattain. 2000. Phosphorylation and nuclear exclusion of the forkhead transcription factor FKHR after epidermal growth factor treatment in human breast cancer cells. *Oncogene* **19**: 4574-4581.
- Jacobson, M., M. Weil, and M. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**: 347-354.

-
- Janmey, P.A. and T. Stossel. 1987. Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature* **325**: 362-364.
- Jenkins, G.H., P.L. Fiset, and R.A. Anderson. 1994. Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* **269**: 11547-11554.
- Johnson, D.E. 1998. Regulation of survival pathways by IL-3 and induction of apoptosis following IL-3 withdrawal. *Front. Biosci.* **3**: d313-324.
- Jonsson, Z.O. and U. Hübscher. 1997. Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays* **19**: 967-975.
- Joza, N., S.A. Susin, E. Daugas, W.L. Stanford, S.K. Cho, C.Y. Li, T. Sasaki, A.J. Elia, R. Hakem, H. Yoshida, Y.Y. Kong, T.W. Mak, J.C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer, and J.M. Penninger. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**: 549-554.
- Katanaev, V.L. 2001. Signal transduction in neutrophil chemotaxis. *Biochemistry* **66**: 351-368.
- Kelman, Z. 1997. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* **14**: 629-640.
- Kennedy, S.G., A.J. Wagner, S.D. Conzen, J. Jordan, A. Bellacosa, P.N. Tsichlis, and N. Hay. 1997. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Gen. Dev.* **11**: 701-713.
- Kerr, J.F.K., C.M. Winterford, and B.V. Harmon. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**: 2013-2026.

-
- Kerr, J.F.K., A.H. Wyllie, and A.H. Currie. 1972. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-245.
- Kilby, N.J., M.R. Snaith, and J.A. Murray. 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* **9**: 413-421.
- Kim, A.H., G. Khursigara, X. Sun, T.F. Franke, and M.V. Chao. 2001. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* **21**: 893-901.
- Kim, H.S., C. Skurk, S.R. Thomas, A. Bialik, T. Suhara, Y. Kureishi, M. Birnbaum, J.F.J. Keane, and K. Walsh. 2002. Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3beta signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**: 41888-41896.
- King, R.W., J.M. Peters, S. Tugendreich, M. Rolfe, P. Hieter, and M.W. Kirschner. 1995. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin. *Cell* **81**: 279-288.
- Kinoshita, T. M. Shirouzu, A. Kamiya, K. Hashimoto, S. Yokoyama, and A. Miyajima. 1997. Raf/MAPK and rapamycin-sensitive pathways mediate the anti-apoptotic function of p21Ras in IL-3-dependent hematopoietic cells. *Oncogene* **15**: 619-627.
- Kinoshita, T. T. Yokota, K.-I. Arai, and A. Miyajima. 1995a. Suppression of apoptotic death in hematopoietic cells by signalling through the IL-3/GM-CSF receptors. *EMBO J.* **14**: 266-275.
- Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K.-I. & Miyajima, A. 1995b. Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene* **10**: 2207-2212.

-
- Kipreos, E.T., L.E. Lander, J.P. Wing, W.W. He, and E.M. Hedgecock. 1996. *cul-1* is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell* **85**: 829-839.
- Komada, M., D.J. McLean, M.D. Griswold, L.D. Russell, and P. Soriano. 2000. E-MAP-115, encoding a microtubule-associated protein, is a retinoic acid-inducible gene required for spermatogenesis. *Genes Dev.* **14**: 1332-1342.
- Kops, G.J. and B.M. Burgering. 2000. Forkhead transcription factors are targets of signalling by the proto-oncogene PKB (C-AKT). *J Anat* **197**: 571-574.
- Korsmeyer, S.J., J.R. Shutter, D.J. Veis, D.E. Merry, and Z.N. Oltvai. 1993. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin. Cancer Biol.* **4**: 327.
- Kuida, K., T.F. Haydar, C.Y. Kuan, Y. Gu, C. Taya, H. Karasuyama, M.S. Su, P. Rakic, and R.A. Flavell. 1998. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* **94**: 325-337.
- Kuida, K., T.S. Zheng, S. Na, C. Kuan, D. Yang, H. Karasuyama, P. Rakic, and R.A. Flavell. 1996. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* **384**: 368-372.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lassing, I. and U. Lindberg. 1985. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* **314**: 472-474.
- Lawlor, M.A. and D.R. Alessi. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J. Cell Sci.* **114**: 2903-2910.

-
- Lazebnik, Y.A., S.H. Kaufmann, S. Desnoyers, G.G. Poirier, and W.C. Earnshaw. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**: 346-347.
- Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-331.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrom c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489.
- Li, R. and A.W. Murray. 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* **66**: 519-531.
- Li, R., S. Waga, G.J. Hannon, D. Beach, and B. Stillman. 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA-replication and repair. *Nature* **371**: 534-537.
- Li, Y. and R. Benezra. 1996. Identification of a human mitotic Checkpoint gene: hsMAD2. *Science* **274**: 246-248.
- Li, Y., C. Gorbea, D. Mahaffey, M. Rechsteiner, and R. Benezra. 1997b. MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12431-12436.
- Liu, X., H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1997. DFF, a herterodimeric protein that function downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**: 175.
- Liu, Y., D. Peter, A. Roghani, S. Schuldinger, G.G. Prive, D. Eisenberg, N. Brecha, and R.H. Edwards. 1992. A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* **70**: 539-551.

-
- Loijens, J.C. and R.A. Anderson. 1996a. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases are distinct members of this novel lipid kinase family. *J. Biol. Chem.* **271**: 32937-32943.
- Loijens, J.C., I.V. Boronenkov, G.J. Parker, and R.A. Anderson. 1996b. The phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase family. *Adv. Enzyme Regul.* **36**: 115-140.
- Longobardi Givan, A. 1992. *Flow Cytometry: First Principles*. Wiley-Liss.
- Luna, E.J. and A.L. Hitt. 1992. Cytoskeleton--plasma membrane interactions. *Science* **258**: 955-964.
- Mack, A., B. Sauer, K. Abremski, and R. Hoess. 1992. Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nuc. Acid. Res.* **20**: 4451-4455.
- Majerus, P.W. 1992. Inositol phosphate biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 225-250.
- Majno, G. and I. Joris. 1995. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**: 3-15.
- Martin, A., F.D. Brown, M.N. Hodgkin, A.J. Bradwell, S.J. Cook, M. Hart, and M.J. Wakelam. 1996. Activation of phospholipase D and phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in HL60 membranes is mediated by endogenous Arf but not Rho. *J. Biol. Chem.* **271**: 17397-17403.
- Martin, T.F. 2001. PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 493-499.
- Maruta, H., H. He, A. Tikoo, T. Vuong, and M. Nur-E-Kamal. 1999. G proteins, phosphoinositides, and actin-cytoskeleton in the control of cancer growth. *Microsc. Res. Tech.* **47**: 61-66.

-
- Mathieu, A.-L., S. Gonin, Y. Leverrier, B. Blanquier, J. Thomas, C. Dantin, G. Martin, G. Baverel, and J. Marvel. 2001. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway protects against interleukin-3 starvation but not DNA damage-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**: 10935-10942.
- Mayol, X., X. Grana, A. Baldi, N. Sang, Q. Hu, and A. Giordano. 1993. Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* **8**: 2561-2566.
- McAlear, M.A., E.A. Howell, K.K. Espenshade, and C. Holm. 1994. Proliferating cell nuclear antigen (p130) mutations suppress cdc44 mutations and identify potential regions of interaction between the two encoded proteins. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4390-4397.
- McNamee, H.P., H.G. Liley, and D.E. Ingber. 1996. Integrin-dependent control of inositol lipid synthesis in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Exp. Cell. Res.* **224**: 116-122.
- Mehendale, H.M. 1994. Amplified interactive toxicity of chemicals at nontoxic levels: mechanistic considerations and implications to public health. *Environ. Health Persp.* **102**: 139-149.
- Meisler, M.H. 1992. Insertional mutation of 'classical' and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet.* **8**: 341-344.
- Mejillano, M., M. Yamamoto, A.L. Rozelle, H.-Q. Sun, X. Wang, and H.L. Yin. 2001. Regulation of Apoptosis by Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Inhibition of Caspases, and Caspase Inactivation of Phosphatidylinositol Phosphate 5-Kinase. *J. Biol. Chem.* **276**: 1865-1872.
- Michell, R.H. 1975. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 81-147.

-
- Mills, J.C., N.L. Stone, and R.N. Pittman. 1999. Extranuclear apoptosis. The Role of the cytoplasm in the execution phase. *J. Cell Biol.* **146**: 703-708.
- Minn, A.J., P. Velez, S.L. Schendel, H. Liang, S.W. Muchmore, S.W. Fesik, M. Fill, and C.B. Thompson. 1997. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **385**.
- Miura, M., R.M. Friedlander, and J. Yuan. 1995. Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8318-8322.
- Miyachi, K., M.J. Fritzler, and E.M. Tan. 1978. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immun.* **121**: 2228-2234.
- Miyajima, A., A.L.-F. Mui, T. Ogorochi, and K. Sakamaki. 1993. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5. *Blood* **82**: 1960-1974.
- Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, H.G. Wang, H.K. Lin, D.A. Liebermann, B. Hoffmann, and J.C. Reed. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**: 1799.
- Moritz, A., J. Westerman, P.N. De Graan, and K.W. Wirtz. 1992. Phosphatidylinositol 4-kinase and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase from bovine brain membranes. *Methods Enzymol.* **209**.
- Morrison, A., H. Araki, A.B. Clark, R.K. Hamatake, and A. Sugino. 1990. A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae*. *Cell* **62**: 1143-1151.
- Motokura, T., K. Keyomarsi, H.M. Kronenberg, and A. Arnold. 1992. Cloning and characterization of human cyclin D3, a cDNA closely related in sequence to the PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene. *J. Biol. Chem.* **267**: 20412-20415.

-
- Muchmore, S.W., M. Sattler, H. Liang, R.P. Meadows, J.E. Harlan, H.S. Yoon, D. Nettlesheim, B.S. Chang, C.B. Thompson, S.L. Wong, S.L. Ng, and S.W. Fesik. 1996. X-Ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**: 335.
- Muise-Helmericks, R.C., H.L. Grimes, A. Bellacosa, S. Malstrom, P. Tschilis, and N. Rosen. 1998. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent manner. *J Biol Chem* **273**: 29864-29872.
- Mullis, K., F. Fallona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Navas, T.A., Z. Zhou, and S.J. Elledge. 1995. DNA polymerase epsilon links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell* **80**: 29-39.
- Nave, B.T., M. Ouwens, D.J. Withers, D.R. Alessi, and P.R. Shepherd. 1999. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J.* **344**: 427-431.
- Nebl, T., S.W. Oh, and E.J. Luna. 2000. Membrane cytoskeleton: PIP(2) pulls the strings. *Curr. Biol.* **10**: R351-354.
- Nicholson, D.W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* **6**: 1028-1042.
- Nicholson, K.M. and N.G. Anderson. 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling* **14**: 381-395.

-
- Niggli, V. 1999. Rho-kinase in human neutrophils: a role for myosin light chain phosphorylation and cell migration. *FEBS Lett.* **445**: 69-72.
- Nishizuka, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**: 693-698.
- Norbury, C. and P. Nurse. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 441-470.
- O'Connell, M.J., J.M. Raleigh, H.M. Verkade, and P. Nurse. 1997. Chk1 is a Wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting Cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J.* **16**: 545-554.
- Ochman, H., J.W. Ajioka, D. Garza, and D.L. Hartl. 1990. Inverse polymerase chain reaction. *Biotechnology (NY)* **8**: 759-760.
- Ochman, H., A.S. Gerber, and D.L. Hartl. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**: 621-623.
- Ochman, H., M.M. Medhora, D. Garza, and D.L. Hartle. 1990. Amplification of flanking sequences by inverse PCR. In *PCR protocols: A guide to methods and application* (ed. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White), pp. 219-227. Academic Press Inc, London.
- Ohta, T., T. Kinoshita, M. Naito, T. Nozaki, M. Masutani, T. Tsuruo, and A. Miyajima. 1997. requirement of the caspase-3/CPP32 protease cascade for apoptotic death following cytokine deprivation in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 23111-23116.
- Owen-Schaub, L.B., L.S. Angelo, R. Radinsky, C.F. Ware, T.G. Gesner, and D.P. Bartos. 1995. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3032-3040.

-
- Ozes, O.N., L.D. Mayo, J.A. Gustin, S.R. Pfeffer, L.M. Pfeffer, and D.B. Donner. 1999. NF-kappaB activation by tumor necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**: 82-85.
- Palacios, R., G. Henson, M. Steinmetz, and J.P. McKearn. 1984. Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature* **309**: 126-131.
- Pavlov, E.V., M. Priault, D. Pietkiewicz, E.H. Cheng, B. Antonsson, S. Manou, S.J. Korsmeyer, C.A. Mannella, and K.W. Kinnally. 2001. A novel high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J. Cell Biol.* **155**: 725-731.
- Payraastre, B., M. Nievers, J. Boonstra, M. Breton, A.J. Verkleij, and P.M. Van Bergen en Henegouwen. 1992. A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* **267**: 5078-5084.
- Pike, L.J. and A.T. Eakes. 1987. Epidermal growth factor stimulates the production of phosphatidylinositol monophosphate and the breakdown of polyphosphoinositides in A431 cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 1644-1651.
- Pines, J. and T. Hunter. 1990. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protei p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346**: 760-763.
- Plon, S.E., K.A. Leppig, H.N. Do, and M. Groudine. 1993. Cloning of the human homolog of the CDC34 cell cycle gene by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10484-10488.
- Podust, V.N., L.M. Podust, F. Goubin, B. Ducommun, and U. Hübscher. 1995. Mechanism of inhibition of proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Biochemistry* **34**: 8869-8875.

-
- Polyak, K., J.-Y. Kato, M.J. Solomon, C.J. Sherr, J. Massagué, J.M. Roberts, and A. Koff. 1994. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**: 9-22.
- Prelich, G., M. Kostura, D.R. Marshak, M.B. Mathews, and B. Stillman. 1987. The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro. *Nature* **326**: 471-475.
- Prinz, C., R. Zander, M. Gerhard, S. Mahe, N. Neumayer, B. Hohne-Zell, and M. Gratzl. 1999. The mechanism of histamine secretion from gastric enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol.* **227**: C845-C855.
- Raff, M.C. 1992. Social control on cell survival and cell death. *Nature* **356**: 397-400.
- Rameh, L.E., K.F. Tolia, B.C. Duckworth, and L.C. Cantley. 1997. A new pathway for synthesis of Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* **390**: 192-196.
- Ren, X.-D., G.M. Bokoch, A. Traynor-Kaplan, G.H. Jenkins, R.A. Anderson, and M.A. Schwartz. 1996. Physical Association of the Small GTPase Rho with a 68-kDa Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase in Swiss 3T3 Cells. *Mol. Biol. Cell* **7**: 435-442.
- Rena, G., S. Guo, S.C. Cichy, X. He, P. Cohen, and T. Unterman. 1999. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* **274**: 17179-17183.
- Ricci, C., B. Scappini, V. Divoky, S. Gatto, F. Onida, S. Verstovsek, H.M. Kantarjian, and M. Beran. 2002. Mutation in the ATP-binding pocket of the ABL kinase domain in an STI571-resistant BCR/ABL-positive cell line. *Cancer Res.* **62**: 5995-5998.

-
- Roberts, R., J. Gallagher, E. Spooncer, T.D. Allen, F. Bloomfield, and T.M. Dexter. 1988. Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* **332**: 376-378.
- Rodriguez-Tarduchy, G., M. Collins, and A. Lopez-Rivas. 1990. Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *EMBO J.* **9**: 2997-3002.
- Romashkova, J.A. and S.S. Makarov. 1999. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**: 86-90.
- Rossant, J. and N. Hopkins. 1992. Of fin and fur: mutational analysis of vertebrate embryonic development. *Genes Dev.* **6**: 1-13.
- Roucou, X., T. Rostovtseva, S. Montessuit, J.C. Martinou, and B. Antonsson. 2002. Bid induces cytochrom c-impermeable Bax channels in liposomes. *Biochem. J.* **363**: 547-552.
- Russ, A.P., C. Friedel, K. Ballas, U. Kalina, D. Zahn, K. Strebhardt, and H. von Melchner. 1996. Identification of genes induced by factor deprivation in hematopoietic cells undergoing apoptosis using gene-trap mutagenesis and site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15279-15284.
- Ryves, W.J. and A.J. Harwood. 2003. The interaction of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) with the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* **5**: 489-495.
- Sadu, K., S.I. Reed, H. Richardson, and P. Russell. 1990. Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 5139-5143.

-
- Saijo, M., Y. Sakai, T. Kishino, N. Niikawa, Y. Matsuura, K. Morino, K. Tamai, and Y. Taya. 1995. Molecular cloning of a human protein that binds to the retinoblastoma protein and chromosomal mapping. *Genomics* **27**: 511-519.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis (see comments). *Nature* **391**: 96.
- Salmon, E.D. 1989. Cytokinesis in animal cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1**: 541-547.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sauer, B. and N. Henderson. 1988. Site-specific recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5166-5170.
- Savill, J. 1996. Phagocyte recognition of apoptotic cells. *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 1065-1069.
- Schier, A.F., A.L. Joyner, R. Lehmann, and W.S. Talbot. 1996. From screens to genes: prospects for insertional mutagenesis in zebrafish. *Genes Dev.* **10**: 3077-3080.

-
- Schluter, C., M. Duchrow, C. Wohlenberg, M.H. Becker, G. Key, H.D. Flad, and J. Gerdes. 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.* **123**: 513-522.
- Schrader, J.W. 1986. The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes (interleukin-3). *Annu. Rev. Immunol.* **4**: 205-230.
- Schraven, B., H. Kirchgessner, B. Gaber, Y. Samstag, and S. Meuer. 1991. A functional complex is formed in human T lymphocytes between the protein tyrosine phosphatase CD45, the protein tyrosine kinase p56lck and pp32, a possible common substrate. *Eur. J. Immunol.* **21**: 2469-2477.
- Schwartz, M.A., D. Toksoz, and R. Khosravi-Far. 1996. Transformation by Rho exchange factor oncogenes is mediated by activation of an integrin-dependent pathway. *EMBO J.* **15**: 6525-6530.
- Scudiero, D.A., R.H. Shoemaker, K.D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T.H. Nofziger, M.J. Currens, D. Seniff, and M.R. Boyd. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**: 4827-4833.
- Seculic, A., C.C. Hudson, J.L. Homme, P. Yin, D.M. Otterness, L.M. Karnitz, and R.T. Abraham. 2000. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* **60**: 3504-3513.
- Sherr, C.J. and J.M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**: 1149-1163.

-
- Shiratsuchi, A., T. Mori, and Y. Nakanishi. 2002. Independence of plasma membrane blebbing from other biochemical and biological characteristics of apoptotic cells. *J. Biochem.* **132**: 381-386.
- Shivji, M.K., S.J. Grey, U.P. Strausfeld, R.D. Wood, and J.J. Blow. 1994. Cip 1 inhibits DNA replication but not PCNA-dependent nucleotide excision-repair. *Curr. Biol.* **4**: 1062-1068.
- Skippen, A., D.H. Jones, C.P. Morgan, M. Li, and S. Cockcroft. 2002. Mechanism of ADP ribosylation factor-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in HL60 cells. *J Biol Chem* **277**: 5823-5831.
- Smith, C.D. and K.J. Chang. 1989. Regulation of brain phosphatidylinositol-4-phosphate kinase by GTP analogues. A potential role for guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **264**: 3206-3210.
- Spradling, A.C., D.M. Stern, I. Kiss, J. Roote, T. Laverly, and G.M. Rubin. 1995. Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the Drosophila genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **121**: 3797-3807.
- Sternberg, N., S. Austin, D. Hamilton, and M. Yarmolinsky. 1978. Analysis of bacteriophage P1 immunity by using lambda-P1 recombinants constructed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 5594-5598.
- Sternberg, N. and D. Hamilton. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* **150**: 467-486.
- Sternberg, N., D. Hamilton, and R. Hoess. 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol* **150**: 487-507.

-
- Sternberg, N., B. Sauer, R. Hoess, and K. Abremski. 1986. Bacteriophage P1 cre gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *J. Mol. Biol.* **187**: 197-212.
- Stossel, T.P. 1993. On the crawling of animal cells. *Science* **260**: 1086-1094.
- Strasser, A. 1995. Life and death during lymphocyte development and function: evidence for two distinct killing mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 228-234.
- Takeda, M., N. Dohmae, K. Takio, K.-I. Arai, and S. Watanabe. 2001. Cell cycle-dependent interaction of Mad2 with conserved Box1/2 region of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor common beta/c. *J. Biol. Chem.* **276**: 41803-41809.
- Tassan, J.P., M. Jaquenoud, A.M. Fry, S. Frutiger, G.J. Hughes, and E.A. Nigg. 1995. In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO J.* **14**: 5608-5617.
- Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-1462.
- Thorey, I.S., K. Muth, A.P. Russ, J. Otte, A. Reffelmann, and H. von Melchner. 1998. Selective disruption of genes transiently induced in differentiating mouse embryonic stem cells by using gene trap mutagenesis and site-specific recombination. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3081-3088.
- Toker, A. and L.C. Cantley. 1997. Signalling through the lipid products of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* **387**: 673-676.
- Tolias, K.F., L.C. Cantley, and C.L. Carpenter. 1995. Rho Family GTPases Bind to Phosphoinositide Kinases. *J. Biol. Chem.* **270**: 17656-59.

-
- Tordaro, G.J. and H. Green. 1964. An assay for cellular transformation by SV40. *J. Virol.* **23**: 117-119.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, E. Jaffe, and C.M. Croce. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**: 1440.
- Tsujimoto, Y. and C.M. Croce. 1986. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5214.
- Tsujimoto, Y., L.R. Finger, J. Yunis, P.C. Nowell, and C.M. Croce. 1984a. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosomal translocation. *Science* **226**: 1097.
- Tsujimoto, Y., J. Yunis, L. Onorato-Showe, J. Erikson, P.C. Nowell, and C.M. Croce. 1984b. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) translocation. *Science* **224**: 1403.
- Urumow, T. and O.H. Wieland. 1986. Stimulation of phosphatidylinositol 4-phosphate phosphorylation in human placenta membranes by GTP gamma S. *FEBS Lett* **207**: 253-257.
- Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440.
- Verhagen, A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson, and D.L. Vaux. 2000. Identification of DIABOLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**: 43-53.

-
- von Melchner, H., J. DeGregori, H. Rayburn, S. Reddy, C. Friedel, and H.E. Ruley. 1992. Selective disruption of genes expressed in totipotent embryonal stem cells. *Genes Dev* **6**: 919-927.
- von Melchner, H. and H.E. Ruley. 1990. Retroviruses as genetic tools to isolate transcriptionally active chromosomal regions. *Environ. Health Persp.* **88**: 141-148.
- von Melchner, H. & Ruley, H.E. 1995. Gene Entrapment. In *Functional analysis of the human genome* (ed. F. Frarzaneh and D.N. Cooper). Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Waga, S., G.J. Hannon, D. Beach, and B. Stillman. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction. *Nature* **369**: 574-578.
- Waga, S. and B. Stillman. 1998. The DNA replication fork in eucaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 721-751.
- Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**: 1635-1636.
- Wajant, H. 2003. Death receptors. *Essays Biochem* **39**: 53-71.
- Walker, D.H. and L. Pike. 1987. Phosphatidylinositol kinase is activated in membranes derived from cells treated with epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7513-7517.
- Wang, J., X. Chenivesse, B. Henglein, and C. Brechot. 1990. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* **343**: 555-557.

-
- Wang, J.Y. 1998. Cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 240-247.
- Wang, S.L., C.J. Hawkins, S.J. Yoo, H.A. Muller, and B.A. Hay. 1999. The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell* **98**: 453-463.
- Waseem, N.H. and D.P. Lane. 1990. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen(PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J. Cell Science* **96**: 121-129.
- Waterson, R.H., K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, and e. al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**: 520-562.
- Weernink, P.A., Y. Guo, C. Zhang, M. Schmidt, C. Von Eichel-Streiber, and K.M. Jacobs. 2000. Control of cellular phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by adhesion signals and rho GTPases in NIH 3T3 fibroblasts involvement of both phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase and phospholipase C. *Eur J Biochem* **267**: 5237-5246.
- Wei, Y.F., K.C. Carter, R.P. Wang, and B.K. Shell. 1996. Molecular cloning and functional analysis of a human cDNA encoding an *Escherichia coli* AlkB homolog, a protein involved in DNA alkylation damage repair. *Nucl. Acid Res.* **24**: 931-937.
- Weinstein, J., F.W. Jacobsen, J. Hsu-Chen, T. Wu, and L.G. Baum. 1994. A novel mammalian protein, p55CDC, present in dividing cells, is associated with protein kinase activity and has homology to the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle proteins Cdc20 and Cdc4. *Mol. Cell Biol.* **14**: 3350-3363.

-
- Wempe, F., J.-Y. Yang, J. Hammann, and H. von Melchner. 2001. Gene trapping identifies transiently induced survival genes during programmed cell death. *Genome Biol.* **2**: 3-10.
- Whetton, A.D. and T.M. Dexter. 1983. Effect of haematopoietic cell growth factor on intracellular ATP levels. *Nature* **303**: 629-631.
- White, E. 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* **10**: 1-15.
- Whitney, M., E. Rockenstein, G. Cantin, T. Knapp, G. Zlokarnik, K. Durick, F.F. Craig, and P.A. Negulescu. 1998. A genome-wide functional assay of signal transduction in living mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **16**: 1329-1333.
- Wiley, S.R., K. Schooley, P.J. Smolak, W.S. Din, C.P. Huang, J.K. Nicholl, G.R. Sutherland, T.D. Smith, C. Rauch, and e. al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**: 673-682.
- Williams, G.T., C.A. Smith, E. Spooner, T.M. Dexter, and D.R. Taylor. 1990. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* **343**: 76-79.
- Wyllie, A.H., J.F.K. Kerr, and A.R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.
- Yang, E. and S.J. Korsmeyer. 1996. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* **88**: 386-401.

- Yatabe, Y., R. Suzuki, K. Tobinai, Y. Matsuno, R. Ichinohasama, M. Okamoto, M. Yamaguchi, J. Tamaru, N. Uike, Y. Hashimoto, Y. Morishima, T. Suchi, M. Seto, and S. Nakamura. 2000. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma; a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* **95**: 2253.
- Yee, A., M.A. Nichols, L. Wu, F.L. Hall, R. Kobayashi, and Y. Xiong. 1995. Molecular cloning of CDK7-associated human MAT1, a cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly factor. *Cancer Res.* **55**: 6058-6062.
- Yin, X.M., Z.N. Olival, and S.J. Korsmeyer. 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax (see comments). *Nature* **369**: 321.
- Yu, Z.K., J.L. Gervais, and H. Zhang. 1998. Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 11324-11329.
- Zha, J., H. Harada, E. Yang, J. Jockel, and S.J. Korsmeyer. 1996. Serin phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**: 619-628.
- Zhou, B.P., Y. Liao, W. Xia, B. Spohn, M.H. Lee, and M.C. Hung. 2001. Cytoplasmic localisation of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in Her-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* **3**: 245-252.
- Zou, H., Y. Li, X. Liu, and X. Wang. 1999. An Apaf-1 cytochrom c multimeric complex is a functional apoptosom that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**: 11549-11556.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulphat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
cDNA	komplementäre-DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötale Kälberserum
G418	Aminoglykosid-Antibiotikum
H	Stunde
IV	inverse PCR
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
min	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulphonsäure
NP-40	Nonidet P40
OD	optische Dicht
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfo-phenylazo)phenylazo]di-sulfonsäure

RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	„messenger“ RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulphat
sec	Sekunde(n)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Octylphenylpoly(ethylenglycolether)n
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Enzymeinheit („unit“)
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
Vol	Volumenanteil
VT	Volumenteil

Tabelle A1: Sequenzlängen der mit IV-PCR ermittelten Klone

Klon Name	Enzyme	3' oder 5' Seq-Primer	Sequenzlänge in bp
26-22-10	C+3xS	3' 5F2N	293
26-22-10	C+3xS	3' 5B2N	502
26-22-10	C+3xS	5' FW1	204
26-22-10	C+3xS	5' cre43	203
26-22-9	C+3xS	3' 5F2N	389
26-22-9	C+3xS	3' 5B2N	296
26-31-7	C+3xS	3' 5F2N	192
26-31-7	C+3xS	3' 5B2N	453
26-31-7	C+3xS	5' FW1	72
26-31-7	C+3xS	5' cre43	72
26-31-8	C+3xS	3' 5B2N	260
26-31-8	C+3xS	3' 5F2N	254
26-32-6	C+3xS	3' 5B2N	409
26-32-6	C+3xS	3' 5F2N	378
26-32-7	C+3xS	3' 5F2N	100
26-32-8	H+S	3' 5B2N/gr	238
26-32-8	H+S	3' 5F2N/gr	227
26-32-8	H+S	3' 5B2N/kl1	411
26-32-8	H+S	3' 5F2N/kl1	260
26-32-8	H+S	3' 5B2N/kl2	449
26-32-9	C+3xS	3' 5B2N	44
26-32-9	C+3xS	3' 5F2N	44
26-32-10	H+S	3' 5F2N	479
26-32-10	H+S	3' 5B2N	462
26-41-1	H+S	3' 5F2N	11
26-41-1	H+S	5' FW2	295
26-41-5	H+S	3' 5F2N	505
30-11-3	H+S	3' 5B2N	380
30-11-3	H+S	3' 5F2N	386
30-11-4	C+3xS	3' 5F2N	144
30-11-4	C+3xS	3' 5B2N	139
30-11-5	C+3xS	3' 5F2N	343
30-11-6	C+3xS	3' 5B2N	205
30-11-6	C+3xS	3' 5F2N	500
30-11-7	C+3xS	3' 5F2N	89
30-11-7	C+3xS	3' 5B2N	90

Klonname	Enzyme	3'oder 5' Seq-Primer	Sequenzlänge in bp
30-11-8	H+S	3' 5F2N	313
30-12-2	H+S	3' 5B2N	227
30-12-2	H+S	3' 5F2N	364
30-12-3	H+S	3' 5B2N	124
30-12-3	H+S	3' 5F2N	124
30-12-3	H+S	5' FW1	176
30-12-3	H+S	5' cre43	124
30-12-4	C+3xS	3' 5B2N	431
30-12-4	C+3xS	3' 5F2N	422
30-12-4	C+3xS	5' FW1	512
30-12-4	C+3xS	5' cre43	462
30-12-5	C+3xS	5' FW1	251
30-21-2	H+S	3' 5F2N	251
30-21-2	H+S	5' FW2	114
30-21-2	H+S	3' 5B2N	250
30-21-2	H+S	5' FW1	259
30-21-2	H+S	5' cre43	262
30-21-4	H+S	3' 5B2N	56
30-21-4	H+S	3' 5F2N	375
30-21-6	C+3xS	3' 5F2N	271
30-22-2	H+S	3' 5F2N	421
30-22-2	H+S	3' 5B2N	471
30-22-4	C+3xS	5' FW1	354
30-22-4	C+3xS	3' 5F2N	26
30-31-1	C+3xS	3' 5F2N	328
30-31-2	H+S	3' 5F2N	458
30-31-3	C+3xS	3' 5F2N	312
30-31-4	C+3xS	3' 5F2N	411
30-31-4	C+3xS	3' 5B2N	426
30-31-5	C+3xS	3' 5F2N	362
30-31-7	H+S	3' 5B2N	279
30-31-7	H+S	3' 5F2N	283
30-31-8	C+3xS	5' FW1	205
30-31-9	3xS	5' FW1	207
30-31-9	3xS	3' 5B2N	266
30-31-9	3xS	3' 5F2N	267
30-32-1	C+3xS	5' FW1	240
30-32-1	C+3xS	3' 5B2N	291
30-32-1	C+3xS	3' 5F2N	294

Klonname	Enzyme	3'oder 5' Seq-Primer	Sequenzlänge in bp
30-32-3	H+S	3' 5B2N	127
30-32-3	H+S	3' 5F2N	124
30-32-3	H+S	5' FW1	119
30-32-3	H+S	5' Cre43	26
30-32-4	H+S	3' 5B2N	195
30-32-4	H+S	3' 5F2N	196
30-32-5	H+S	3' 5B2N	98
30-32-5	H+S	3' 5F2N	94
30-32-6	H+S	5' FW1	195
30-32-6	H+S	5' Cre43	201
30-32-6	3xS	3' 5B2N	405
30-32-6	3xS	3' 5F2N	436
30-32-7	C+3xS	5' FW1	435
30-32-7	H+S	5' Cre43	187
30-32-7	H+S	3' 5B2N	96
30-32-7	H+S	3' 5F2N	94
30-32-8	C+3xS	5' FW1	71
30-32-9	H+S	3' 5B2N	92
30-32-9	C+3xS	3' 5B2N	126
30-32-9	C+3xS	3' 5F2N	165
30-32-9	C+3xS	5' FW1	333
30-32-11	H+S	5' Cre43	51
30-32-11	H+S	5' FW1	50
30-32-11	C+3xS	5' FW1	68
30-32-12	H+S	5' FW1	58
30-32-12	H+S	5' Cre43	58
30-32-12	C+3xS	3' 5F2N	64
30-32-12	C+3xS	3' 5B2N	64
30-32-14	C+3xS	3' 5F2N	224
30-32-14	C+3xS	3' 5B2N	221
30-32-15	C+3xS	3' 5B2N	151
30-32-16	H+S	3' 5F2N	125
30-32-16	H+S	3' 5B2N	126
30-32-16	C+3xS	3' 5B2N	56
30-32-17	H+S	3' 5F2N	124
30-32-17	C+3xS	3' 5F2N	46
30-32-17	H+S	3' 5B2N	127
30-32-17	C+3xS	3' 5B2N	43

Klonname	Enzyme	3' oder 5' Seq-Primer	Sequenzlänge in bp
30-32-18	C+3xS	5' FW1	454
30-32-18	C+3xS	5' cre43	124
30-32-18	C+3xS	3' 5B2N	192
30-41-1	C+3xS	5' FW1	195
30-41-1	C+3xS	5' cre43	193
30-41-1	C+3xS	3' 5F2N	100
30-41-1	C+3xS	3' 5B2N	126
30-41-2	C+3xS	5' FW1	262
30-41-3	3xS	5' FW1	263
30-41-4	C+3xS	5' FW1	431
30-41-4	C+3xS	5' cre43	341
30-41-4	C+3xS	3' 5F2N	81
30-41-4	C+3xS	3' 5B2N	81
30-41-6	H+S	3' 5F2N	123
30-41-6	H+S	3' 5B2N	125
30-41-7	H+S	3' 5F2N	125
30-41-7	H+S	3' 5B2N	124
30-41-8	C+3xS	3' 5F2N	505
30-41-8	C+3xS	3' 5B2N	486
30-41-9	C+3xS	5' cre43	442
30-42-1	C+3xS	3' 5F2N	181
30-42-1	C+3xS	3' 5B2N	180
30-42-10	C+3xS	5' FW1	236
30-42-10	C+3xS	3' 5F2N	467
30-42-10	C+3xS	3' 5B2N	484
30-42-2	3xS	3' 5F2N	399
30-42-2	3xS	3' 5B2N	444
30-42-3	C+3xS	5' FW1	199
30-42-4	C+3xS	3' 5F2N	87
30-42-4	C+3xS	3' 5B2N	85
30-42-6	C+3xS	5' FW1	113
30-42-7	C+3xS	5' FW1	354
30-42-7	C+3xS	5' cre43	358
30-42-7	C+3xS	3' 5B2N	523

Die inversen PCRs wurden mit verschiedenen, in der Tabelle angegebenen folgenden Restriktions Endonukleasen (Enzyme) behandelt:

H+S = HincII und SspI

3xS = StuI, SspI und ScaI

C+3xS = ClaI, StuI, SspI und ScaI

Die Orientierung und Lage der synthetischen Oligonukleotide, die in der IV-PCR und der darauffolgenden Sequenzierung verwendung gefunden haben sind in Abb. A1 dargestellt.

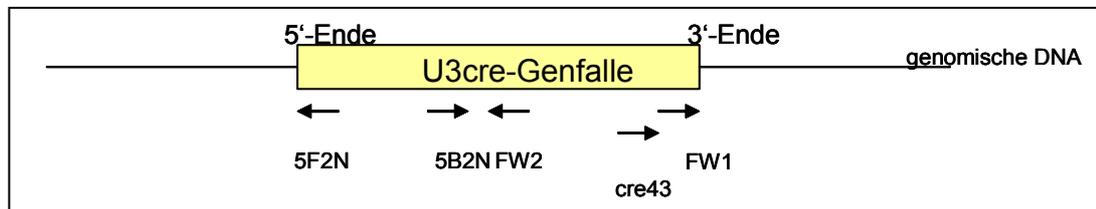


Tabelle A2: Sequenzlängen der mit 5'RACE ermittelten Klone

Klonname	Sequenzlänge
26-23-8	293 bp
26-31-7	192 bp
26-32-2	44 bp
26-41-3	11 bp
30-11-5	343 bp
30-11-7	90 bp
30-12-2	364 bp
30-12-3	124 bp
30-21-2	251 bp
30-31-3	312 bp
30-32-1	291 bp
30-32-1	294 bp
30-32-11	51 bp
30-32-3	127 bp
30-32-6	436 bp
30-32-9	333 bp
30-42-4	180 bp
30-42-10	467 bp

A) SEQUENZEN aus den inversen PCRs (siehe Tabelle A, Anhang A)**26-22-9**

3' SEQUENZEN

5F2N (389 bp)

TTCTGAAATC TGAAAAAAT ACTCAGGTTT CAGTAAAGTG TCTCGAGCAC
 TTGATTACCA TATACTGTAA TTTTCCATTC TCTCTTCTAT GGGTCCCTAG
 GCTATGTTAT TTCTGAGCTG TAGGAAGGGA AAACATCTGA ACCATTTCCCT
 GATGCACGGC TTATCTTCAT GATGAATTAT AGGACACTGG TAGGTACCCG
 AGCAAACCA CATGACGCCA TTTCTCAAAG GGGATAATCT GAGTAATGAC
 TATTTATGTC CCTAGAAAGG AATCTTAAAA CTTACATTTA ATGTGTATCG
 GTGGTTTCCC TGAATGAATT ATGCACCCAC CATGTTGTGC TTGGTGCCTG
 CAAAGAAAAA AGGTCCTTGG ATCCCGGGAA CTGTAGTCC

5B2N (296 bp)

TCTGTGACTA CAGTTCCTA GGGGTCCAAG GGACTTTTCT CTCTTCTGCA
 GGCACCAAGC ACAAACATGG GATGGTGTGC ATATATTCAT TCAGAAAACC
 ACTGATACAC ATAAAATGTA AAGTCTTAAG AATTCCTCTC TTAGGGACTA
 TAAATAGTCA TCTACTTCAG ATCTATCCCC TTCTGTAGAA ATGGCTGTCA
 CTCTGTGTGT TCTGCTCGGG TACTACCAGT GTCCTATAAT TCATATGAAG
 ATAAGCCGTG CATCAGGAAA TGGTTCAGAT GTTCTCCCTT CCTACA

26-22-10

3' SEQUENZEN

5F2N (293 bp)

CTACCTTTCT TTTTCTTTGC AACAGCATT AACTGTGTTA AACAAAATCT
 AGCCCTGTTT GTTAACCTGT AAAGTATTTC CAGTCACCCT AGTTTCAAAA
 AAATACTGGG GATATCACAA CTGTTTTGTG CACTCTGCAT CAAAAAATA
 AGGGTAGGCA CTGGGCACTG TAACCATGGT CTTGTACTCT GGTCCACAAT
 CACAGCCCTG GGGGTGGGGA GCACAAACAT GGGGCCAGGT CCGTGCTTGC
 CCTTCATGTC ACCTCTCCCC TGTCCCGAAG GCCCCATTCC TCC

5B2N (502 bp)

TAAGTCTGGC CTCTGCCATT CAATGCATTT GAGAACCACC TCAGTTGTTC
 AGTATCAGTG ATCCTAGTAG CTCAACAAGT CATTGAGCAG TGTCTATTGC
 ATGAGTGTAC AGTAGGCAGG ATTCCCCTGC ACAATTGTTC CGTTGACCAC
 ACCCTGTGGT TTCCGGCACT TGGCTGTCCA CACGCCTCAT TTCTCTTGGG
 CTGATATCCA ACAATAGAAT TACTGGACTG TTCAGCCAGT GTATGTTTGA
 CTTTCTAAGA AAGTTTTTACA CAGTGACTGC AGCCTGTAC GCTTCCGTTA
 CAGCGTGTGG TTCCAGGGGT GCCCTCGGTG GCTCACACAT GTGACACAGG
 CAGAGCAGGA CTATGGTTAG AGTCTAATTG GCATCTCTTG ATAAATAACA
 AAGGCCACTT CTTTTTTTACC TGTCTTGGGT CTTTTGTGAT CCCCTGTCTT
 TTGCTTGCTT TTAATTACAC CTTTGGTAAT GATTTGCGGG AGTTCTGTAT
 CT

5' SEQUENZEN

FW1 (204 bp)

ATTGTCATGA ATATATCCGT AACCTGGATA GTGAAACAGG GGCAA*GGTG
 CGCCTGCTGG AA*ATGGCGA TTAGGCTAGC TTAAGT*TCG CCA*TTTGCA
 AGGCATGGAA AAATACATAA CTGA*AATAG AAAAGTTCA* ATCAA*GTCA
 GGAACA*ATG GAACAGGGTC GA*CGGTCGA *CGGTC*ACC CTCAGATAA*
 CATC

CRE43 (203 bp)

TTCCCCCCTT TTTCTGGAGA CTAAATAAAA TCTTTTATTT TATCTATGGC
 TCGTACTCTA TAGGCTTCAG CTGGTGATAT TGTTGACTCA AAACTAGAGC
 CTGGACCACT GATATCCTGT CTTTAACAAA TTGGACTA*T C*CGGGATCC
 CCTCGACTCT AGAGGATCAT TTGCATGATC CCCCCCTCGA GGGGAAAAGC
 GGC

26-31-7

5' SEQUENZEN

FW1 (72 bp)

TCTTTGTAGT CACTTAAGAG AGAAAATATG TAACCCCTTA TTTGGCCTTG
 GTATTTATCG TGCAGGGGTG TTTGAAA

CRE43 (72 bp)

AACATCCCTG CACGATAAAT ACCAAGGCCA AATAAGGGGT TACATATTTT
 CTCTCTTAAG TGACTIONACAAA GACATCC

3' SEQUENZEN

5F2N (319 bp)

GTTACACATCG GAAGTCCTTA ACTACCTCAA AGGTAGGTAA AATTGGAGTC
 CAAAACCTCAA CTCTCAAAAA GTTGTTAGCA AATAAGGTTT TAAAGTCATG
 TGAATTACTG TGGAAAGCGT GTGCCCTGAAA TTAACATTGG ACTCTGAAAA
 GCCCTTAGGT CATCACCTTT ATCCTGCCGT AATGCCCTCCC AAAATGCTCT
 TTTTTGTGGT GGTACACAGT GCTCAAAAAT ATAGTACGGA TTGATTAAAT
 GTAAGCTTGG CTTGTCAATT TCACCAGCTC AGCAGGTAA TGCTACCATT
 TTAAAAAGCT ATTGTCACA

5B2N (435 bp)

ATACTCAGAT ACTCCACACA CCTAAGATTT CAACTCACTC ATTTATGTCA
 GAACCCAAGG TACTGAACTT TTTGAGAGAA AATTTTTCCC CTTTCTGACT
 TTCCTCTAGC CATTTTCCTC TCTGCTCTAA CCTGACTCTG TGACAAACTT
 CTCTAAAATG CTACTACCTG CTGAGCTGGT GAAATTGAAA GCTGCTTACA
 TTTAATCAAT CCGTACTATA TTTTGAGCAC TGTGTATCAC CGTTAGAGCA
 CTTCTGGGAG GATTACGTGG AAAGGACGAA ACTAGGGGCT CTTCAGATCC
 GGTGTTATCC TGCACGTGCT TCCACGCGTA ATCACATGAC TCTAAAACCT
 TATCTGCTAC AAACCTTCTG AGAAGTTGAG TCTGGGATCA ATTACGACTC
 TGAGGTACTA AACTTCGATG TGATGGAACC CGCTG

26-31-8

3' SEQUENZEN

5F2N (254 bp)

CAAAAAGCCA TAAAGTTATG CCTTACTAAT CTAAATATCC TCTCTGATAC
 TAATTACCAT GTAATAATAG TATGCTTTGT TGTGTGCGCA CAACACTACA
 GGAGGACAGG TGTCTTAAAG TCAATGTTAA AGCTATTTCA AAAACAGCT
 TATGGCTTGT AGGGAACCTGG ATGGTTTCAA TGTTAAAATT ACAAATGGAA
 AACCATAAAT GCCAAAAATG AATATGCATG TGGTCCTCAC CAAGCCTGAA
 AGTA

5B2N (260 bp)

TACTCTCAGA CTTGGATGAA AAACATGCAT ATCTCATCTC TGGATCTATG
 GTTTCTCCAC TTCTGTAATC TTAACATTGA AAACCATCCA GTTCCTACAA
 GCCATAAGCT GTTTTTTTGAA AATAGCTTTA ACATTGATTT AAGAAAACCT
 GTCCTCCTGT AGTCGTTGTG CGCACACACA AAAGCATACT ATTACTTACA
 TGGTAATTAG TATCAGAGAA GGAAC TTAGA CTTACGTTAG GATAACTTTA
 TGGCTTTTTG

26-32-6

3' SEQUENZEN

5FN2 (378 bp)

ATAATAATAT AAATATATTT CAAAATCATC CTGACATGGG ATTGGCATAA
 TTTATCTTTC TACTGTGTTT CATTAAACTG GAAAATAAAC AAAAAGGAAG
 GTGGAGCAGG ACACCCTGGA CAGTGGACAG GTCACTGTGT ACTGCCTTAC
 AAACGGTGGC CCACCTGGCC TGACCCTCGG TAAAAACGGA ACGCTTCACC
 GGATGGGATC TGAAAACGCA CTTGTACTTC CCAAAGCGGC AGGAGGATCC
 TTCCCACAAG CCTGCCCCAA GGATCCCTGC ACCTCTCTCG TCGCCTCCGG
 CACCAATCCT TCCTGCTCCT GGGCCTCTCC ACCCGCGCAA GGGCCCAATT
 CTGTTTTTAA ACCCAGGGGA TTTGAGGC

5B2N (409 bp)

CTCCGTTACT CACAATGTAC TCTCCCGAGG ACCTCTACAG GCCACGGTGC
 CACAAATCAT CTCACACCAA GCACCGTGGC TGTGCCTCAC ACTTCCCCTG
 ATGTCTATTA AACATACTGT GGGCCTTGCG CTGGGATGGA GAGGCCCAGG
 GACAAGATAT TGTGTGCCGG ATGCTGGATG AAAAGGTGCA GGCATCCTT
 TGGGGCAGGC TCTGTGGCAA AGGAATCCTC CTGCCGTTTG AGGAAGTACA
 AGTGCGTTTC AATTCCATCC GGTAAC TCCG TTCTTACCGA GGGTCAGGCC
 AGGTGGGCCA CCGTCTGTAA GGCAGTACCA GTGACCTGTC CCTGTCCAAG
 GGTTGCTCCT GCTCCTTCCT CTTTTGTCTA TTTTCCAGTT GAATGAAACC
 CCCCAGAAA

26-32-7

3' SEQUENZ

5F2N (100 bp)

GAGGATGCTG GAAATATATA TATATATATA TATATATATA TATATATATA
 TTCTCCCCC AGTGTGTTAT ATTCTCTCTT CTCCCCCCCC CCGAGAGAGA

26-32-8

3' SEQUENZEN

5F2N (GROSSES FRAGMENT) (227 bp)

CTATAACCTC AAGCCAAAA TAACCATGCC AGCATTTTAC CCTAAACTTT
 CAGCATCCAA AACCATCAAA ATGAAATTCT GCGGGGTATA ACCACCTATT
 ATGGCCCTTT GTAGCAACAA CTGAACTAAA ACAGGTGGTT TGGTTTGGTT
 TTTTGGGGTT TTTTTTCATT AATTTTCCTG GTCATATGGC TGGAAGGGTC
 TGTGGCAACA GGAAACTTGC AGTGGTT

5F2N (Kleines Fragment) (260 bp)

CTGGAGGGAA ATCTGAAATT AAACATTGGT TTTGAAAAAA CATTTGTCAA
 ATAAAATACA AATGAATTAA AAAAAAATA AAGGCCGGCA TCTGGTGCAC
 CCCTTTACCC CAAAACCTGGG AAGGCCGACA TTTCTTTTTC CCCTACCAGG
 AACAAAAGGA AACCTTTTTC CCTTTAAATT AGGAAACCCG GAATTCCCCC
 CCGGGAACAA AACCCCAAAT TTAAAAAACC TAGGGTTTTC CCCCTAATAC
 GACTGTCTCC

5B2N (Grosses Fragment) (238 bp)

GACATAACCA CTGCAAGTTC CTGTTGCCCA GACCCTTCCA GCCACTATGA
 CCAGAAAAAT TAATGAAAA AAAACCCAAA AAAACAAAAC CAAACCACCT
 GTCTTAGTTC AGTCTGTTGC TACAAAGGGC CATCAACTAG GTGGCTTATA
 CCCGCCAAAA TTTCAATTCTG ATGGTTCTGG ATGCTGAAAG TCTAGGGTCA
 AAATGCTGGC ATGGTACTT TCTGGCTTGA GTTTATAG

5B2N (Kleines Fragment1) (411 bp)

ATTTAATTGG TCCAGCCCAG CTTGCATGAT CTCCGGTATT GAAACCTAGA
 AAGAAGAGCA TTTAACAGAT TGCAGACAAA TGAAAACAAG ACTCAATATC
 ACGCACGAAC ACACCCTCAG CTTTTCTACA TCTGATGGTC TTGATCCCAT
 GGGACTGCTA CTCCTGGCTT TTCCTTAATC TAAATGCTAC ATGTGTTCTT
 CTTGTCCTCG ATAGGGAAAC ACAGACACTG TCCAGGCCTC CCAAGTTCTG
 GGATCAAAGG CGTGCACCAC GACTGCCTGG CCTCTATTTT TTTTTTTAAC
 CACTTCGTTA CCTTATTTGA CAAATATCTT TCAAACCAT TCTATTTCAA
 AATCCCCTCC ATCAAAAACC TGATCTAAAG GGTTCATCC TCAAAGGAAA
 CCCCCGGAAC G

5B2N (Kleines Fragment 2) (449 bp)

GTCTGGCCGC GGGCCATATT TTCAACAAAT ACAGAAACCG TCAGACAGAG
 ACAACACAGA ACGATGCTGC AGCAACAAGA CGCGCGGCGC GGCTTCGGTC
 CCAAACCGAA AGCAAAAATT CAACGGAGGC GGGAACTGTT TTAGGTTCTC
 GTCTCCTACC AAACCACATA TCCCTCCTCT AAGGGGGGTG CACCAAAGAG
 TCCAAAACGA TCGGGATTTT TGGACTCAGG TCGGGCCACA AAAACGGCCC
 CCGAATCCCT GGGACGTCTC CCAGGGTTGC GGCCGGGCGT TCCGAACTCG
 TCAGTTCCAC CACGGGTCCG CCAGATACAG AGCTAGTTAG CTAAGTAGTA
 CCGACCAGGC GCATAAAATC AGTCTTAAAC CTAGACATCG GACGACCCGA
 TAATTGCTGG CCACTTCTCC CGTTGTGGTT CGGTGGTCCT GGCGGGTCC

26-32-9

3' SEQUENZEN

5B2N (44 bp)

CAAAGTTTAA ATTTTCATGTT CTAACGCAAG CTACACGCTC TCAC

5F2N (44 bp)

TGAAAGCTGT GTAAGTTGCTT AAAACATGAA ATTTAAACTT TGAT

26-41-1

5' SEQUENZEN

FW2 (295 bp)

GTCATAGATC TTGATAGAGG ATGA*CCTCC T**GATGGAG GGGACCGGTG
 GGA*TCATTT CGGCAACGAA TGGGTTG*A* GA*CTCAGCT *ACTGCCACC
 ATACCTCATT CTGT*AACTT GGTTAATGTT GTGTTTTG** A*TT***TG*
 AA*TGTGTGC CCT*TCA**A TCGCCTGCT* *C*TTTGAGC *CCCTGGTC*
 TTCT*CTT** TCACCTTATG AT*CAGCTGC CTTTGG*CCT A*G*TAAACA
 CAACTTGGG CCT**TCT*CT GGGAAACTAT CTAT*CCTGT TTCTA

26-41-5

3' SEQUENZEN

5F2N (505 bp)

GGGCTGGTAA TCAGAAATCA CTCAGTGTCC TTTCAAGGCC TAACTTCAGT
 GAAATCCTTG TCTCTACTAA CAGGAAAACG ATTTGAAACA AGAAAGGAAA
 AAAAATCTAA GCTTTTATAT TGAATTTTAT GCATAATTAT TTTATTTTAT
 TTTTTTTTAC TTGAAACTTG TTGATACCTG TTTTGTGCCC CAGTCTTTCT
 TTTGTGCCCC A*ATGTGTTT AGTTCTAAAA CCTAGGAGAT TCCAAGTGG
 AAACAAGGTC TATGAA*TTT ATTCTGGCTT AAGTTACCAG ACAAACCTAA
 CACAAAAAAC TATTACTGCA TACTCTTCTA ATTGA*GATT TTTTCATGAG
 ACTACTA*TA TATTTAAGCT TTGTCTTAAC TTCCTTGTTA AGAAAAAATG
 CATCACTAAG GGCTAAAAAA AT*ATACTTG GCTAACAGCA TTCCTGTTCT
 TTCA*AAGGA CTTCTTTGGG *CCTGA*A*C CCTCTGGCA* TCAAACCCT
 TTTTA

30-11-3

3' SEQUENZEN

5B2N (380 bp)

AACCGATGCA AGTTTTCTC ATTGACCTAG GACAGAAACC TGTGTAGTGT
 GACCACTGAT GTATAGGGT GGCAACTGGG GAACACTCGA GGACCCACA
 GCATGGCCCT GGGCTTAAGG TTGGCTTCAG GCTAAAGTAC ACCTTAAGCC
 AGTGAGTGAC CCAAGACTTA GTCCCTAAAA GTACCGCTGG GGCTCTTCT
 ACCCGGGATG TGTACTGGGA CTATGGGGAA GCGGGGCTGA CAGCACAAC

TGGTTCATCC GGTGGCCTTA CCCAGTGTTT TGGAGCCTGA CCTCTGGTGG
 AAAGGCTGGA GGAAGTCTC TGGGGCGACT TTCACTGAGG CTAACAGGGA
 AAAGCACAGT ACTGCCTGCC CAGGCAGGTC

5F2N (386 bp)

TTGAAAAAAAA TCTGCCCTGT GCCAGCGCTA CCTGCCTGGC AGGCAGTACT
 GTGCTTTCCC TGTTAGCCTC ATGAAATCCC CCAAAGCAGT CCTCCAGCCT
 TTCCACCAAG GTCAGGCTCC AAACCTGGGT AAGGGGCCAC CGGATGAACC
 ATCTGCTGTC GCCCGCTCCC CATGTCCGTG AACGTCCGGG TAAGAAAAGC
 CCCAGGGGTA CTTCTAGGGG ATTAAGTCTG GGGTCCTCCC GGGTAAGGTG
 TACGCGACCG AAAGCACCCCT TACCCAGGG GCGCTGTGGG GGTCTCAAC
 GTGTTCCCCT GCGCGCCGT GAGCCAGGGT CCTAGGAGGG TTTCTTCCGG
 GTCTGGGAAA ATTGGGCCCG GAGCCGGGAG CATCCC

30-11-4

3' SEQUENZEN

5B2N (139 bp)

AT***GTAAG G*G***AC*C *AGGTA*ATT T*AAATT*TA GCTTTTTAAT
 TTTTTAAAAG GTTATGTCCT CCTCATATTT ACCTACATAG CCATGGCTGT
 TCTGGACCTG TATACATATA CATCAGTCTA GTCTCGAAC

5F2N (144 bp)

GTACAATAAA AAAGG*AT*T ATAT*TATAC AGGTCCAAAA CAGCCATGGC
 TAT*TA*TGT AAATAT*AGG AGGACATAAC CTTTTTAAAA AATTAAAAAT
 GCAAAAAATA AAAATAAACC TTGTTTCAAC ACCTGTACTC TATT

30-11-5

3' SEQUENZEN

5F2N (343 bp)

GGAAGCC*AG GCAGGAAAAT CGTTACTCAA AGCCTAGCTG GGACTAC*TG
 GC*ACTGTCT GCAACCAACA AAATCCCTTT GAGGACTGGA CCCTGGTTA*
 ACCCCACGTT CTTCTCAAAT *CTTCCAAC GCA*TTCTCC AACGTTAAAA

AGACA*ACG TCAAAACCCA GGAATTTTAC CAAAATAAAA A*CCAGAAAT
 AATCAACAAT TTATTCTGGA GCTA*CTGCT CT*CGTTTGA TGGCCTGAAA
 ACGTTTTTAT TTCCCCCCT GACAATCATC TATCTGTATC CATA*AAA*T
 TAATACTGCC *CCGGACTCT TAGCA*C*A* CACAAACTGT TTA

30-11-6

3' SEQUENZEN

5B2N (205 bp)

CCTGGGTTTT GAACCATCTG GGTCTAACCT GTCATTTTGG GAAATTTGTG
 CTGTCCCGAT TCCCGTCCCA TCACAAAAC ACTCTTAAAA CAAATACTCT
 TAAATTTAGG GTGCTTTACC TCAGGGGTAA ATGGCAACCC GCTCATTCAG
 CCGTCTACCA ACTGTTTGGC CACTGAACTT CCTAAGGGAA CAGCCACCAG
 CCTTA

5F2N (500 bp)

CACCATCCCC TCGTCCAGCC CCCAGGACAT GTACCTCCTC CCAGGAACTG
 TCCTCCGCAC CCCATCTCAC TTTATCTGAG CATTCTGTCT GCCAAAAAGT
 TGAAGAACGT GCTGTGTAGA GAACAAACAA AAACCATTCT TGACACAAGC
 CTTCTCTGCC CCAACTCCTG GGAGCTGCAA CTTGTGGGTT CGTTTTCCCG
 GAGGTCAGGT CGACCCTGTG ACATCCGATA AGGCCCAGAA GCTGTGT TTC
 CTCCTGGATA ACTGAACTGC CTGCTTCCCT TTCGTCCACT TTGCACTGAG
 ATGAAAAAGA TTTCTGTCAA AATGAACCAA GTGTGCTAAG CTGGCTCGCT
 GTCCCTTAGG ACGTTCAGTG GCCAAACAGT TGGTACACGG CTTGAATCGA
 TCGAGTCGCC ATCTACCCCT GAGGTAAAGC ACCCTACTCT AAGAGTATTG
 TTCTAGGAAT GTTTTTGTGA TGGACGGGG ACCACGGATC ACGGTCTCCC

30-11-7

3' SEQUENZEN

5B2N (90 bp)

CCTTTCTTAA ACAAAAAAAA AAGGGATTTA AAAAGCTGCC CCA*CGGTTA
 AAAACACCAT CTGCTCTTCT AAAGGACCTG GGTCTTTAT

5F2N (89 bp)

CTAAAGGACC AGGTCCTTTA AAAAA*CAAA TGGT*T*CTT AACCGCTGGG
GCAGCTCTTT AACTCCCTTT T*CTCTTGTT TAAAAAAGG

30-11-8

3' SEQUENZEN

5F2N (313 bp)

CAAAAAGCTA TAAAGTTATG CCTTACGTAA *TCTAAGTAT *CCT*CTCTG
ATACTAATTA CCATGTAA*T AATAGTATGC TTTTGA*TGT GCGCACAACA
ACTACAGGAG GACAGGTGTC TTAAAGTCAA TGTTAAAGCT ATTT*CAAAA
ACAGCTTATG GCTTGTAGGA ACTGGATGGT TTCCAATGTT AAAATTACA*
AAA*TGGAAA AACCATCGAA TGCCA*AAAT GA*ATATGCA TGTGGTCCTC
A*CCAAGCTC TGAAAGTAAT ATGGTCATGA ACTATATCCG TAACCTGGAT
AGTGAAACAG GGA

30-12-2

3' SEQUENZEN

5B2N (227 bp)

TATCCTAAGT GCCTCTGCTC CTATCTTCCC TTTCAGGGAT AAGCATGTCC
ACCGCCATGG AAGAAACTCA AGCAATTACA CGTGTTGATG CCTAGCTCCC
TGACATCATG TCAGGGATGG GGGTGGGGGT GGGAGATTGA CAGTGAAGCC
CTTCAGCCCC TATTCCTGGT CCCTATTAC GATACGAGCT GCATCTCCAA
CATCTTGTCT CTCACACCTC CCCTTCA

5F2N (364 bp)

ATCACCCCTGA CAGACCTGGG ACAAGAGGTA CTATCTACAG GTGAGAGGCG
GCAGTGAATA GGCTCTGTCC TTTCCTGCCT GAGACTTCTC ATCCTGCACC
TTCAGAAGCA GTCTTACCGG GGACTGTGAC CTCCTGAAGG TCACACAGCT
GGTTAGAGGT GGAGTCTGGG CGGGGCTCTG ACCCTCCTCC CACTCGAGCA
ACTTGACCAA GACTCCCCCT GGGTTGTCAG CTGAAGGGGA GGTGCTGAGA
GACAAGACTG TTGGAGATGC AGCTCTTATC CTGAATAGGG ACCAGGGAAT

AGGTGCTGAA GGGCTTCACT GTCAATCTCC CACCCCACCC CCATCCCTGA
CCTGATGTCA GGA

30-12-3

3' SEQUENZEN

5B2N (124 bp)

ATTTAAAAGC GGCACCTCTTA GTGATGTTAA CAAGTGTTTT GATTTTACTG
GTTTCTTTAT ACTTTTCATA TGTGATAATG CTTCAGTGTA AAAATGTCAT
TTTCTTCTCT GTGAAAGTTA TGTA

5F2N (124 bp)

GTACATAACT TTCCAGAGAA GAAAATGACA TTTTACACT GAAGCATTAT
CACATATGAA AAGTATAAAG AACCAGTAAA ATCAAAACAC TTGTAAACAT
CACTAAGAGT GCCGCTTTTT AAAT

5' SEQUENZEN

CRE43 (124 bp)

ACATCATCAA CACTACCTTA GGTTATTAAA TCACTATAAA AATACCACCT
ATAATGTCTG TGTGGTATCT ATACAAGGAT TTCCACAAT CTGAAAACCT
TATTTTAACT TCATAATTAT ATTT

FW1 (176 bp)

ATTAACCCCT TCTTTTCTTT CGCTGTTATA GCTTTTTTTT CTTTAGTGTG
GATCTCATTT CACCTCGTGG GGCTATGGGA TAGCAGTGGC TCTTTGCTAT
AGCAACCCAC ATCTGGCATT TCTTTCTGTT TCCTACTTGT CTTGGCAAAA
GATTTGCATT ATAAGCATGC CTGGTC

30-12-4

3' SEQUENZEN

5B2N (431 bp)

CCAGGAATTA CTCCAATAA AACCAAATTC CCATGACTCT CCATTACTTT
 TAAGTTCCAT AATCCCCTCA ACATTTTGAT CTATTAATTT CACAATCACT
 TTGGTATCTA CCTTACACCT TTATCTACCA AACTCCGTT TACGTTATTT
 TGTCTTATTA AGCCCAGATC CTGATGCATG CTAGACGAAG ATCTCCACTA
 CTAAGCTGTA TCCTCAGTCT CCACTGATTC GTTTCTCCAC TCCTGTTGTC
 GTTTCTCTCT TAACCCCAA CCTTCAGTCT CCATCCTTCC TCCTCAAAGT
 TCTCAACGCA GTCGCCTCTG AGACACTGTG TGAGTTTTCG TCAGCTTCTT
 TTTTCTCAGC GACATCCATC CTTTCCCAG ACTCCTCTAG TAATAGAATT
 GTCTACTTCA AAGTCCGGTC CTGTCCTCCC T

5F2N (422 bp)

AGGGAGGAAG GACCGGACTT TGAAGTAGAC AATTCTATTA CTAGAGGAGT
 CTGGGGGAAA GGATGGATGT CGCTGAGAAA AAGGGAAGCT GACGAAAAC T
 CACACAGTGT CTCAGAGGCG ACTGCGTTGA GAACTTTGAG GAGGAAGGAT
 GGAGACTGAA GGTGGGGGT TAAGAGAGAA ACGACAACAG GAGTGGAGAA
 ACGAATCAGT GGAGACTGAG GATACGCTTA GTAGTGGAGA TCTCGTCTAG
 CATGCATCAC GATCTGGGCT TAATAAGCCA AATAACGTAA ACGGAGTATT
 GGTAGATAAA GGTGTAAGGT AGATCAAGTG ATTGTGAAAT TAATAGATCA
 AATGTTGAGG GATTATGGAC TTAAAAGTAT GGAATCATGG GAATTGTGGA
 TTTATTGGGG AGTAGTTCTG GA

5' SEQUENZEN

CRE43 (462 bp)

TTCCCCCTTT TTCTGGAGAC TAAATAAAAT CTTTTATTTT ATCTATGGCT
 CGTACTCTAT AGGCTTCAGC TGGTGATATT GTTGAGTCAA AACTAGAGCC
 TGGACCACTG ATATCCTGTC TTTAACAAAT TGGACTAATC GCGGGATCCC
 CTCGACTCTA GAGGATCATT TGCATGATCC CCCCCTCGAG GGGAAAAGCG
 GCATCGACTT C*TTGGGCAG TTGAGTGGGG CGCCCATCAT CGCCCCGCAC
 CGCCTTTCTA GCCTCTG*AG AAGCACCCGT TGTTTTTCTT CTCCGGTCAG
 CAGAGTCCCA ACAGCTGCTG ACAGTCGTCC AGGTGGGCTG ATGGGTGATG
 AGGACA*ACT CGATCAGAGC TGTCAGTTTA CT*GGATCTT C*GAAAAAAG
 AAGGGTTATT ATTTTCCAGT TGTA**GGTC AAAAAAGAAA ACGCCA*T*T
 GAAACTGTCC TT

FW1 (512 bp)

GTGTCTGAAT ATGGCCGTAA CCTGGATAGT GAAACAGGGG CAATGGTGCG
 CCTGCTGGAA GATGGCGATT AGGCTAGCTT AAGTAACGCC ATTTTGCAAG
 GCATGGAAAA ATACTAACTG AGAATAGAAA AGTTCAGATC AAGGTCAGGA
 ACAGATGGAA CAGGGTCGAC CGGTTCGACCG GTCGACCCTA GTAGAACCAT
 CAGATGTTTC CAGGGTGCCC CAAGGACCTG AAATGACCCT GTGCCTTATT
 TGAACTACCA ATCAGTTCGC TTCTCGCTTC TGTTTCGCGCG CTCTGCTCC
 CCGAGCTCAA TAAAAGAAGC CCACAACCCC TCACTCGGCG CCGCCAGTCC
 TCCGATTGAC TGAGTCGCCC GGGTACCGTG TTCCATAAAC CCTCTTGCGAG
 TTGCATCCGA CTGTGGTCTC CCTGTTTCTT TGGGAAAGGT CCCTCTGATG
 ATTGAACTAC CGTCACCGGG GGTCTTTCAT TTGGGGGGCC TCCCGGGATC
 CGGAAACCCG CC

30-12-5

5' Sequenzen

FW1 (251 bp)

ATCA**CAAG TCGT*GATCG C*ACGGAGAA ATAGGAAGGT GTCGA*TGCG
 ACTCGACCGT ACAC*A***T CTGCCTGTAT ***ACGGTCG ATGC*GCAAC
 TGACGATGGT TCGCA*ATTC *CGTGGCT*G TTCACTGATG TCTCCTGC*A
 GATGCATCAT A*TCTGA*CA TGCCTA*A*C TCTCCCACCC TGACTTA*CA
 CCCGTTTTTCT TTCCATGCGC CTGAGTATA* GCCATGTCCC TT*GCTGTCC
 C

30-21-2

3' SEQUENZEN

5B2N (250 bp)

ATTTTACAGG GGCATTTCTG GGG*ATTCCC AGCCGAACCT TAAGCACAGC
 ATCAGCTATG TTCCCGTCCA TTATACCTCA TTGTCTTTCT CTTTTCTCCT
 TATGCTTTGG AATAGGAACT GCT*TGCTGA TGGACGGGCT TCCTTGGAAA
 GTGGCTCTTC CATACTCTCT TCTTTCCTTC TTCCTTC*GT CTG*TGCTCT
 GTTAGTCTTT CTGTCTTCCT TTCATGCTAA *GATTGTT*C TAA*GTAGC*

5F2N (150 bp)

GGTTACGTTA GGAACAATCC TTAGCATGAA AGGAAGACAG AAAGACTAAC
 AGACCAGCAG ACCGAAGG*A AGAAGGAAAG AAGAGAGTAT GGAAGAGCCA
 CTTTCCAAGG *AAGCCCGTC CATCAGCAGA GCAGTTCCTA GTCCAAAGAA
 AAAGAAGAAA AGAGAAAGAC AATGAGGTAT AATGGACGGG AACATAGCTG
 ATGCTGTGCT TAAGGTTCAG TTGGGAATGG CCCAGAAATG CCCTGTAAAAT

5' SEQUENZEN

CRE43 (262 bp)

ACCAGGAGTG TTCCATTAAA AGCTCCAGGC TGCCCTAATG AGCCAGGCTT
 GGCCACTCAT CCCAAGGTAC *AATTAAAGA GACAATTACT GACACA*GG*
 AGAGTAAAGA GTCCTAATTA ACCTCCTGGG AAGAGGTACA AATACAGGGG
 TCCTGCTCCC CTTGAGTTGG GATTCAGGGG ACCTGCCATG GA*CCCTACA
 ACCAAGTAAA GGAAGGATTG GTGCAAAGTA TGAGAGATTA AGAAAGCTAA
 GCAGTCTGGG TC

FW1 (259 bp)

GACCCAGACT GCTTAGCTTT CTTAATCTCT CATACTCTGC ACCAATCCTT
 CCTCTACTTG GTCGTAGGGC TCATGGCAGG TCCCTGAATC CCAACTCAAG
 GGGAGCAGGA CCCCTGTATT TGTACCTCTT CCCAGGAGGT *AATTAAGAC
 TCTTTACTCT GCCTTGTGTC AGTAATTGTC TCTTTAATTG GTACCTTGGG
 ATAAGTGGCC AAGCCTGGCT TATTAGGGCA GCTGGAGCTT TTAATGGAAC
 ACTCCTGGT

FW2 (114 bp)

ACCAGGAGTG TTC*A*TAAA A*CTCCA*CT GCCCTAATAA GCCATGCTTG
 GCCACTCATC CCAAGGTA*C AATGTAAA*A GACAATTACT GACACAAGGC
 A*AGTATAA* AGTC

30-21-4

3' SEQUENZEN

5B2N (56 bp)

TATTATCAGA CCAACTCTTC AAGGGCAGTA CAGAGTTAAG AATGGAATCT
 ATTGCA

5F2N (259 bp)

AGAGGAGATA GGTGTTGAGT TGCAGGTAA TTTGCGGTAA TTTACTGGAC
 GTGTTTATTT AAGGTGTTTT TGTTTTTTGT TTTTGTTTTT TAAATCTTAA
 AGTAGGAAAG GCCTCCTTAA GGTAGAGATT GTGCAGTTTG TGCAATAGCT
 TTACGTGACT TACTTGCATT TATTTTACCT CCGGAGTAGT CTGGAGTAAC
 TGTGCAGTTT TTGGTTTTTT TTCAACAGGA TAATCATTTT TTTTAAACT
 TTTTTTTTTT

30-21-6

3' SEQUENZEN

5B2N (271 bp)

CAAAAAGCCG TAAAGTTATG CTTACGTAA *TCTAAATAT *CCT*CTCTG
 ATACTAATTA CCATGTAAGT AATAGTATGC TTTTGTGTGT GCGCACAAC*
 ACTACAGGAG GACAGGTGTC TTAAA*TCAA TGCTAAA*GC TATTT*CAAA
 AAACAGCTTA TGGCTTGTAG GAACTGGATG GTTT*CAATG TTAAAATTAC
 A*AAA*TGGA *AAACCATAA ATGCCAAAA TGA*ATATGC ATGTGGTCCT
 CA*CCAAGCT CTGAAAGTAA T

30-22-2

3' SEQUENZEN

5B2N (420 bp)

ATTATAAATT ATTGAATAGG TGACTIONGGAA AATTATATCA TGTGAAGAGC
 TACTCACTTA AAGTTTATGT ATTGATAATC ATGCAAAAAT TATACAAATT
 TAATGAGAAA AATATGGAAA ATGTGTATCA ATTACAACTT AA*AGTAAAG
 TTTATAGTCA GTGCTTTAA* AAGTTTTTCT CAAACAAAAG AAATCTCATA
 TAGAACTTAA CACATGGCCG CTTATCAGGT TTCTGTGAAA AATGAGAAGT
 GTAT*GGCCC AAGAAAAGGG TGAATTTAAG AAATTCTTCC CATAGCAACT
 GAAGAGGAGA TGATGGAGAG ATAAGGGAAA TTAAACAGGA GGTAAGTCCA
 GCATTTGCAA AATGCTCAGT GAGGCTAAGG CTATACTTTG ATGAC*AAAC
 *TACCAGTGA AGGACTACAC AACCCACACT CATGGACTCA CAAGACTGAG
 GAACGC*A*C TGTACCCATG

5F2N (421 bp)

ATGGAAAATG TTGTGAAAAC TGAGTGTCTC TGTAATCGT GTCCTTAACA
 TAGCCACTGT GGATGGTTTC CAAGCATCTC AGGTATCTAT AACAC*TGTT
 CAT*CACAGG AGCAAAGCTC ATGGTCTCCC ATGGGTGTCA CAGGCTCGCA
 GGCTTCCTCA GTCTTTGTGA GGTCAT*A* TGT*GGGTTG TTGTAGGTCC
 T*CACTGGTA TGTTT*GTCA *CAAAGTATA GCCTTA*CC* CACTGAG*AT
 TTTGCAAATG CTGT*ACTTA CC*CCTGTTA AATT*CCCTT ATCTCTCCAT
 CATCTCC*CT TCAGTTGCTA TGGGGAA*AA TT*CTTAAAT CCACCTTTCT
 TGGGCCAATA CACT*CTCAT TTT*CACA*A AACCTGATAA GCGGCCATGT
 TGTTAAGTTC TATATGAAAT T

30-22-4

3' SEQUENZEN

5F2N (26 bp)

ACGTCAT*GT ATTAT*CTGA AT*GTC

5' SEQUENZEN

FW1 (353 bp)

CCAGTA*C*A *AATTAGTCT *CATT**CG* TCGATGAAGA CATT*A**AG
 GTACGGAGT* ATG**AACGT ACCAATTGGC ACAGGTT*AA CAA*GGCTGC
 TTTTAATTTTC TTTACTCCCT GGAGCT*ATT GTTGCCCCTC TGCTAATATG
 CCATATCCCC AAG*ACTTAA GATT*CCTGG GGCTCACTCA TTGGAA*CCT
 CTACCTCAGA CAACGCTCTG TCTGGATTGG ATGTTGGGAG GCCTCTGGCA
 TCCTTGAAGC TTCTTACCTT TGCTGCGTGT CTGGAATTCT TCTGTCTGTC
 TTTCAGGGCC CAGTGGCCTA CGCTCCAATT TCCTGGGC*C TCAGGTTCTG
 GAC

30-31-1

3' SEQUENZEN

5F2N (328 bp)

TA*CCAACT TCCTACTTTA CCCTTCCAAG *AAGCTAA*C CTATATAT*A
 AAAAGCTATC ATAGAAGTGT *TT*CAGT*C ATAGTTAACT CTGTCAAATA

TTTTTAAAGA ATTTAT*T*T ATTTTACTTT ATGTGTATAA *TGGTTTGCA
 TGCATGCCT* TGCCAAGGGA AGGAC*TAAA AAGGCATCAA ATCTCCTGGA
 CTAGTCATTA TGCTGGT*AG CCACCATGTG GGT*ATAGGT CCTCTACAGG
 AAACATCAA* TGCTCTTAAC TACTGAGCCG *CTCCAGCTC CTGCTTGAC*
 GTTGGGTAAC TATGCATGTA AAGTCACA

30-31-2

3' SEQUENZEN

5F2N (458 bp)

GTTTCACACT GTTTTTTCTA CATATGGTCC ATTGGTCAGG ACAGGGAGTC
 ATTTTCAGGCC ACAGGTTACT TTGGCTTAGG TTCTATGCCA CAGTCATGGA
 GCTCTTCAGG AAGTGTGGAA AGGACATTTT GTCCCATGG CAGACCCTGT
 GTTGGTACTT CCTGTTGATG GCAGGCAGAG TCTGAAGAGG AAATGCCATT
 GCCATGGCAT TTTCTGCTGA GGTATTTTAC AGTGGTCACA GGCTGAGGTA
 GAAAAGTTTG TCCAGTGGCT TTGGCAACTT CTGCAGCTTT ACCTCAAGTT
 GTAACCTCAC AGGATGAAGG CAGGGGCTGA TAACAACCTGC ACACCTCTCA
 *GGACTTCAA TCTGAGCACA GTGTAATAAA GCCAAAATGA CAACAGTTAA
 ATCCCTAAGG AAAAATTAC* AAC*CCTGGA AAT*AAA*GG AGACATGACT
 GAATAATT

30-31-3

3' SEQUENZEN

5F2N (264 bp)

CAAAAAGCCA TAAAGTTATG CCTTAC*TAA *TCTAAGTAT *CCT*CTCTG
 ATACTAATTA CCATGTAA*T AATAGTATGC TTT*GTGTGT GCGCACAACA
 ACTACGGGAG GACAGGTGTC TTAAAGTCAA TGTAAAGCT ATTT*CAAAA
 AACAGCTTAT GGCTTGTAGG AACTGGATGG TTT*CAATGT CAAAATTACA
 *AA*TGGA*A A*CCATAAAT GCCAAAATG A*ATATGCAT GT*GT*CTCA
 *CCAAGCTCT GAAA*TAATA T*GTCATGAA CTATATCCGT AACCTGGATA
 GTGAAAC*GG GA

30-31-4

3' SEQUENZEN

5B2N (426 bp)

```

ATTTATTTCT GATCAGTATG GAGTCCTGAG CACTGAGAAA AGTAGGGAGG
ATAAACTAC ATATTGAGTG ATGTA CTCTG CAGTGGTTTC TGACTGATCA
A*AGTTGTGA TTATCAA ACT TTGTAACAAC TTTTGTTTAT GACTTTCTAA
GCAACACACT GCTATAAATA CATCACTGCT TAAAACCTAC AACTCATAAT
GCAGCCATGT AAAAACAGGT TTCATAA ACT ACATCTCCTT TACAGAACTA
GAAATCCTGC ATAGCATATG ACCAGTTCAC CATCCCCTTA CAAATCCATG
GGAAAATATG TGCTCCACAC AACAGT*CTC TCACCACCCA AAGTTTAAAC
TGTTGT*TAT TC*CAACAAA ACATAACT*G TGAAGTA*AG C*CC*AAAGC
AAAATCCTC* CAAATCTACA CTACTC

```

5F2N (411 bp)

```

GGTGCAGTAA AAAGGCCCTG TT*CTTTTAA AACAACCAAAA TCTTCAACT*
CTCTT*CTA* CCTCCTTTAA CTTTGTGT*C AGTACATAAAA ACATTTTAGG
TTT*GT*GTT TAA*CTGAAA TAT*A*TCTA GTAT*GCCTT ACATTACTAC
TGC*CTTTAG TGGAAATTGA AAACCCCAAAA GTCTGTGGCA CAATATAATG
CAGGA*TA*T GTAAATTTGG GATGGATTTT *GCTTTGTGG AGCTTGTACT
*CACTA*TTA TGTTTTATTG AAAATAAACA ACAGTTTAA* CTTTGGGTGG
TGAAAGA ACT GTTGTGTG*A CCACATAT** CCATGGATTT GTAGGGGATG
GTGA*CTGGT CAT*TGCTAT GCAGGATCCT ATTCCTGTA* AGGA*ATGTA
*TTT*TGA*C C

```

30-31-5

3' SEQUENZEN

5F2N (362 bp)

```

TTTGGGGGCT CGTCCGGGAT CGGGAAACCC TGCCCAGGG* ACCACCGACC
CACCACCGGG AAGGTAAGCT GGCCAGCAAC TTATCTGTGT CTGTCC*ATT
GTCTAGTGTC TAT*ACTGAT TTTATGCGCC TGC*TCGGTA CTA*TTAGCT
AACTACCTCT GTATCTGGCG GACCCGTGGT GGA ACTGACA ATTTCCGGAAC
ACCCGGCCGC AACCTGGGA AAC*ATTGAC TTACGGCGCT AAGGAT*ACT
CTGGTCAAAA ATACCTGGCC TGGTCTGGAC CAGTGCCCGT GTCGGAGCCG
CGCAAGATAT GGCCCGCGCT GGATTTTCA* TACCGGAGAT CATGCAAGCT
GGTGGCTGGA CC

```

30-31-7

3' SEQUENZEN

5B2N (279 bp)

ATTCTTTTGG TTTATCTTGC TTTTAGTTAA TATCTTGATG AGAGTAGTAA
 TCTTAAAATA CAAGATGGCT TAGCGTGTTT TGTACTGGAC TTCCAGCAAT
 GTTAGATCCT AGCTAAATGA GCTAATTTCT GTCGGTAAAG GAGTAAGGGG
 TAGATAAGGC ATCCCATTTG CTTTAAACTC TTTGACCAA TCATAAACAG
 TACAGTACCA ATAATCAATG TGTTTCCCTT GATGAGCATT TGTGATTCAT
 TCTGGACACA GCCATCATCT CAAGTTTAA

5F2N (283 bp)

TTAAACTTTG AGATGATGTG CTCGTGTCCA GAATGAAGCA CAAATGCTCA
 TCAGGGAGAC ACATTGATTA TTGGTACTGT ACTGTTTATG ATTTGGTCAA
 AGAGTTTAAA GCAAATGGGA TGCCTTATCT ACCCCTTACT CCTT*ACCGA
 C*GAAATTAG CTCA*TTAGC TAGGATCTAA CATTGCTGGA AGTCCAGTAC
 AAAAAACGCT AAGCCATA*T GTATT*GGAA GATTACGCTC TAATTCA*GA
 TATTAAATAA AAGCAAGAAT AAACCAAAG AAT

30-31-8

5' SEQUENZEN

FW1 (205 bp)

CGT*GATCTG AAG*CTATAT AGT*CGAGCC ATAGATAAAA TAAAAGATTT
 ATTTAGTCTC CAGAAAAAGG GGGGAATGAA AGACCCACC TGTTAGGTTTG
 GCAAGCTAGC ATGCCAAGA AGA*GAGGAA GGTGTCCAAT TTAGTACCG
 TACACCAAAA TTTGCCTGCA TTACCGGTCG ATGCAACGAG TGATGAGGTT
 CGCAA

30-31-9

3' SEQUENZEN

5B2N (266 bp)

ATTAC*TTTT TTCTAA*TTA AAACTCTACC AGCCTCAACC CTGGAAACAG
 TCATGAATCT GACGCATACA AAAACTTACA ATTACCTAAA AGGGGTAAAA
 GGTCCATGTG CCTGTTTACC TCTCAAAGGC AGTTGTGGGG AACT*AGGGA
 AATGA*CACT GTTTGTTTGA GGCATAACAA GACTAGAGG TATTTTAAGG
 GCAGTCAATA AATC*CAGCA CCCTGCAAAA *TGGGGCCAG TGTGGA*AAA
 ATGAGGAAC* TTAAC

5F2N (267 bp)

TTTAAC*T*C CTCATTT*CT CCACACTGGC CCCACTTCTG CAGGGTGCTG
 CAATTTATT* ACTGCCCTTA AAATACCTCT A*TCTCTGTT ATGCCTCAAA
 CAAACAGTGC TCATTTCCCT CA*TTCCCCA CAACTGCCTT T*AAAGGTAA
 ACAGGCACAT GGACCTTTAA CCCCTTTTA* CTACTTGTA *TTTTTGTAT
 GC*TCAAAT* CAT*ACTGTT TCCAGGGTT* AGGCTGGTAA ATTTTAACT
 TAT*AAAAA ATGTAAT

5' SEQUENZEN

FW1 (207 bp)

CGT*GATCTG AGG*CAATAT AGT*CGAGCC A*AGATAAAA TAAAAGATTT
 ATTTAGTCTC CAGAAAAAGG GGGGAATGAA AGACCCACC TGTAGGTTTG
 GCAAGCTAGC ATGCCCAAGG AAGAAGAGGA AGGTGTCCAA TTTACTGACC
 GTACACCAAA ATTTGCCTGC ATTACCGGTC GATGGCAACG AGTGATGAGG
 TTCGCAA

30-32-1

3' SEQUENZEN

5B2N (290 bp)

CCTTTAAAAT GGATT*AAAA ATACTTGGA AAAGGTATTT AGGGT*TCTT
 *GGTTAC*TC T*ATTCCC*C TGAAA*CCAA AAAATAAAAC AC*TAAAAA*
 *C**CAA*CC TAAAATCCCC ATAA*CATAA AAAC*T*C*C AAAAT*ATA*
 CCTTATT*GG GGT*ATTTTT TATTATTTGC TGTGGGTTTA AA*CAAACAA

AATCTCCA*C CCCACAGGCA A*T*CAAATA ATATTTT*AA AAC*GGTTAC
*TTTAA*CTT AATAT*C*G* AATTAAATTT TTACCCC*CT

5F2N (294 bp)

C*AAGGGCTA AACTTTTACT TCCATTATAT CAAGTATCAC ATGTAACCA*
TT*CAAACT ATTA*CT*AA TTTGCCTGTG GGGTTGGAAA T*CTGTCT*A
TTCAAACCAA CAGCAAATAC TAAAACATCA CCCCAAATAA GGTTA*CATT
T*GTGTATGT CTTTAT*A*C ATGGGAAT*C TAGGTTT*AT *ATT*CTTAT
TGTTTTAT CTCTGGAT*C CAAAGGAAAC TAAAAT*TAA CCAAAAACCC
CTAAATACCT GCT*CCAA*T ATTTTGTCAA TTCCA*CCTA AAGG

5' SEQUENZEN

FW1 (240 bp)

TCA*CATCCC AAAG*TGCTG TGGCAACCCA CTCCACACAC ACAAACAGAC
CAG*AGACAT TATAGGCGTC GGGG*ACAAT GGGGAGGTAG AGAACTGCTG
AGTCAAAGTT GAAGCATTGT TAAATGTTAC CTCCGTCCCT CCCCAGACAC
AAAGTAGTAA TCATAATTTA *GTGGCTGTA TTTCCCATG TCTAAGTATA
TAAGCCCAGG GGAATTAACC TAAGGTCTTA AAGATTCAGA

30-32-11

5' SEQUENZEN

CRE43 (51 bp)

ATCACCTGA TT*TCA*T*A TGCTTGGG*C AGGTCCTGA* ACTACC*TCA
T

FW1 (H+S) (230 bp)

A*G*C*CAA* *AT*GGCCG* GC*TAC*G*C C*ATGC*CAA T*GA**AGT*
CCGCAACCCC ACCTGT*GGT *TGGCAAGC* ATCATGCCCA ATGAA*AAGA
GGA*GGTGTC CAATTTACTG ACCGTACACC G*A*TTTGCC TGCATTACCG
GTCGATGC** CGAGTGATGA GGTTGCGAA* CCATA*AT** GATA**CGAT
*TTATTTA*T CTCC**CAAA *AGGGGGGAA

FW1 (C+3XS) (68 bp)

GATGCACGAG CGATGAGG*T CGCAAGATAA AATAAAAGAT TTATTTAGTC
TCCAGAAAAA GGGGGGAA

30-32-12

3' SEQUENZEN

5B2N (64 bp)

TCGGTGTCTC CTGTGAGTTA CAACACAACC AGGGATCCTG GGTTTAGGTT
CAGAGGACAC AGTG

5F2N (64 bp)

ACTGTGGTCC TCTGACCCTA AACCCAGGAT CCCTGGTTGT GTTGTAACTC
ACAGGAAACA CCGA

5' SEQUENZEN

CRE43 (58 bp)

GTGAAAGAAT AGAACCCCCA GTGCCAGGAT TTAATGTGCC AGTACGGTAT
CGTTGGAG

FW1 (58 bp)

CTCCACGATA CTGT*CTGGC ACATTAAATC CTGGCACTGG GGGG*TCTAT
TCTTTCCT

30-32-14

3' SEQUENZEN

5B2N (221 bp)

TCTCCAGGG TTGCGGCCGG GTGTTCCGAA ATCGTCAGTT CCCCACGGGT
CCGCCA*ATA CAGAGCTAGT TAGCTAACTA GTACCGACGC AGGCGCATAA
AATCAGTCAT TTACACTAGA CAATCGGACA GACACAGATA AGTTGCTGGC

CA*CTTACCT CCCGGTGGTG GGTCGGTGGT CCCTGGGCAG GGGTCTCCCG
ATCCCGGACG *AGCCCCCAA A

5F2N (224 bp)

TTTGGGGGCT CGTCCGGGAT CGGGAAACCC TGCCCAGGGA ACCACC*ACC
CACCACCGGG AAGGTAA*CT GGCCA*CAAC TTATCTGT*T CTGTCCAATT
GTCTATTGTC TATAACTGAT TTTATGC*CC TGCTTCGGTA CTATTTA*CT
AACTACCTCT GTATCTGGCG *ACCC*TGGT G*AACTGACA ATTTCCGG*AA
CACCCGGCCG CAACCCTGGG AAAA

30-32-16

3' SEQUENZEN

5B2N(C+3XS) (56 bp)

CCTATCTTCC TCCAAGCTTG CTGTTCTCT TGCTTATATG GAGCTGGG*G
TCTCAG

5B2N (H+S) (126 bp)

ATTTCAAAGC GGCACCTCTTA GTGATGTTAA CAAGTGTTTT GATTTTACTG
GTTTCTTTAT AG*TTTCATA TGTGATAA*G CTTCAGGTGT AAAAATGTCA
TTT*CTTCTC TGTGAAAGTT ATGTAC

5F2N (125 bp)

ATACTAACTT TCAC*GAAAA *AAAATGA*T TTTTACACTG AAGCATTATC
ACATATGAAA AGT*TAAAGA AACCAGTAAA ATC*AAACAC TTGTTAACAT
C*CTAAGGAA TGCCGCTTTT TAAAT

30-32-17

3' SEQUENZEN

5B2N (C+3XS) (43 bp)

CTTTCAGTTG GTACTATGTA AGCATATTTA TCTGGAAATT TAT

5B2N (H+S)(127 bp)

ATTTAAAAAG CGGCACTCTT AGTGATGTTA ACAAGTGTTT TGATTTTACT
 GGTTTCTTTA TACTCTTCAT ATGTGATAAT GCTTCAGTGT TAAAAATGTC
 ATTTTCTTCT CTGTGAAAGT TATGTAC

5F2N (C+3XS)(46 bp)

ATAAATTTCC AAATAAATAT GCTTACATAT *TACCAACTT GAAAGG

5F2N (H+S)(124 bp)

GTACTAACTT TCCCGAAAAG AAAATGACCT TTTTAC*CTG AAGCATTATC
 *CATATGAAG A*T*TAAAGA AACCAGT*AA ATCCAAACAC TTGTTAACAT
 CACTAAGAAT GCCGCTTTTT AAAT

30-32-18

3' SEQUENZEN

5B2N (192 bp)

TTAGAG*CCA TGACAACCT* CAGGGGA*CC GC*CC*GGAA ACTCGA*ACT
 C*AATGAT*T T*T*GGTT*C TG*A*CCC*T *CGAATGTTA CTCCAGCTC*
 CCTGATGCAA ATC*TCCCTT CGCTACTCTG TGA CTCTTA* GTACTGGGT*
 CAG*CG**CT *GA*AGGCGT *GTCCATCCC *CGGA*GCAG AC

5' SEQUENZEN

CRE43 (112 bp)

CCTTACCGTG AACTTGAAGT GCCTACCCCA ACCCCATTTG GGATTAA*AT
 ACGGGGCAGG GCCTGGGGAG GCAGCAGCCA CTCATCCAAT CCAAATTGGG
 GGGGGGGGGG AA

FW1 (454 bp)

TTA*GGAAAA GTTGA*GGGC CGGAGCTGCC CTTTGAAAGA AGCCATCTGT
 AGCTCCCCTG CCTCCTGACT GATATTTAGT GTCTCTGGCA ACAGGGTC**
 CCACCTGCAG AATGGTGCTC CTCT*TCTCT TAGAAGGTCC CCCATTCTGC
 CTCTGCTATG TGTACTGGGT GCTGGCTCTG CCCCAGCAGG TTTTGCCAGC

CCTCTAGACT GACCAGAAAG CAGCCCTCCC CTGTACCAGG ATACCTTATC
 TCATATGATG GGCTGGGCCT TAGAGCATCT TCTGTGTTTT AGGGCACAGG
 GACTTGGGA CCTTTGAGGT GGCCT*CTGT GATCCTTAGA GCTGGGGGCG
 GGGGCATTGG AATGATTGGC TGCTAAAACT CACTCCTGCT CTCTGGCCAC
 TTTGTACCTT CAAGATCACC TTCCA*AAGG AATGAAAGGC AGGTGCTTCC
 CCCC

30-32-3

3' SEQUENZEN

5B2N (127 bp)

ATTTAAAAAG CGGCACTCTT AGTGATGTTA ACAACGTGTT TTGATTTTAC
 TGGTTTCTTT AACTTTTCA TATGTGATAA TGCTTCAGTG TAAAAATGTC
 ATTTTCTTCT CTGTGAAAGT TATGTAC

5F2N (124 bp)

CTACTAACTT TCCACGAAAA GAAAATGA*T TTTTACCCTG AA*CATTATC
 *CATATGAAA AGT*T*AAGA AACCAGT*AA ATCCAAACAC TTGTTAACAT
 C*CTAAGAAT G*CGC*TTTT AAAT

5' SEQUENZEN

CRE43 (26 bp)

TTGGTCCAGC CACAGCTTGC ATGATA

FW1 (119 bp)

CCCCCTGTA* G*TTGGCAAG CT*CATGCCC *GTAAAA**A GGAAG*TG*C
 CAA*TT*CTG ACCGTACACC AAAATTTGCC TGCATTACCG GTCGATGCAA
 CGAGTGATGA GGTTCGCAA

30-32-4

3' SEQUENZEN

5B2N (195 bp)

CCTAAATAAA ACAAGAAGT* TATAAATACA TCCTTCACGG AGCCTGGCAT
TACATAAGGG ACCCACTTCG CGCCGCTCCC CTCCCCCTCC CAGCCCTCCA
TCCTCTCTTC GCAATCACTC ATAGACC*AG TGCAGAAGCC ACAA*AGCGC
TTCCCGGCGA GGCTTGCAA GGAGGAGAGG AGGTA*AGAG GGGGA

5F2N 196 bp)

TCCCCCTCTC TACCTCCTCT CCTCCTTTG* AA*CCTC*CC GGGGAA*CGC
TCTGTGGCTT CTGCACTTGT GT*TATGAAT *A*TGC*AAA AAAAGA*GGA
AGGCTGGGAA GGGGAAGGGA ACGGCGC*AA *TGGGTCCCT TATGTTATGC
CA*G*TCCGT GAA*GATGTT TTTATATACT TCTTGTTTTA TTT*AG

30-32-5

3' SEQUENZEN

5B2N (94 bp)

AGGACAGACC GGATAACTTG CTGG*C*GCT TACCTC*CGG T*GTGGGTCCG
GTGGTCCTGG GCAGGGGTCT C*CAATCCCG GAC*ATCCCC CAAA

5F2N (98 bp)

TTTGGGGGCT CCTCCGGGA* CAGGAAA*CC T*CCCAGGGG A*CACC*A*C
CACCACCGGG CAAGT*AGCT GGCCACCAAC TTATCT*T*T CTGTCCGA

30-32-6

3' SEQUENZEN

5B2N (436 bp)

CTCCGTTACT CAC*AGTGTA TCTCTCCCGA GGACCTCTAC AGGCCACGGT
GCCACAA*AA TCATCTCACA CCAAGCACCG TGGCTGTGCC TCACACTTCC

CCTGAGTGTC TATTAAACAT GACTGTGGGC CTTGCGCTGG GATGGAGAGG
 CCCAGGGA*C AAAGATGATT GTGTGCCGGA TGCTGGATGA GAGAGGTGCA
 GGGCATCCTT TGGGGCAGGC TCTGTGGC*A AGGAATCCTC CTGCCGTTTG
 AGGAAGTACA A*TGCGTTTT CA*ATTCCAT CCGGT*AA*C GTTCCGTTCT
 TACCGAGGGT CAGGCCAGGT GGGCCACCGT CTGTAAGGCA GTACACAGTG
 ACCTGTCCAC TGTCCAGGGC TGCTCCTGCT CCACCTTCCT CTTTGTCTAT
 TTTCCAGTTT AATGAAAACA CCGCTC*GAA AGATAA

5F2N (405 bp)

TAATAATATA AA*TAATTAT TT*CAAAA*T CAT*CCTGAC ATGGGATTGG
 CAT*AA*TTT ATCTTTCT*A *CTGTGTTT* CATTAAACTG GAAAATAAAC
 AAAAAGGAAG GTGGA*CAGG A*CAGCCCTG GACAGTGGAC AGGTCACTGT
 *TACTGCCTT ACAAACGGTG GCCCACCTGG CCTGACCCTC GGTA AAAACG
 GAACGCTTCA CCGGATGGAA TCTGAAAAC* CACTTGTACT TCCTCAAACG
 GCAGGAGGAT *CCTTCGCCA CAAAGCCTGC CCCAAAGGAT GCCCTGCACC
 TCTCTCATCC AGCATCCGGC ACACAATCAT CTCTGCTCCC TGGGCCTCTC
 CATCCCACGC AAGG*CCACA G*C*TGTTTA ATAAACCTCA GGGGAA*TGT
 GAGGC

5' SEQUENZEN

CRE43 (201 bp)

CTGTAACTAA GAAATGGGAA CTTAGAAACT AAGAAATATG TATTGTGGCC
 CCAATGTGCA GCGCGGGAAT GGCTTTCCTC TCTTTTTTTT CCTTAAAATT
 ATTATACCAC CACAACCTGAT GAGGCAGGCC ATTGGAACCA TTTTACA*AT
 GGGGTAACCTG AGGCAAGGGC AATTTGCATT TTTTCAGTAT TGTTAGTGGT
 T

FW1 (195 bp)

AACATAACAA TACTGAAAAA ATGCAATTGC CTTGCCTCAG TTACCCCATC
 TGTA AAAATGG TTCCAATGGC CTGCCTCATC AGTTGTGGTG GTATAATAAT
 CTTAAGGAAA AAAAAGAGAG GAAAGCCATT CCCCCTGCA CTTGGGGCCA
 CAATACATAT TTCTTAGTTT CTAAGTTCCC ATTTCTTAGT TACTG

30-32-7

3' SEQUENZEN

5B2N (94 bp)

GGGAAGAACA GATAAGTTGC TGGCCAGCTT ACCTCCCGGT GGTGGGTCGG
 TGGTCCCTGG GCAGGGG*CT CCCGATCCCG GAC*AGCCCC CAAA

5F2N (96 bp)

TGTGGGGGGC TCCTCCAGGA TCAGGA*A*C CTGCCCAGGG GAAAC*GA*C
 CACCACCGG* AAGTTAGCTG GCCACCAACT TATCTTTTT* TGT*CG

5' SEQUENZEN

CRE43 (187 bp)

ATTTATGGTG CAGCACTTCA CTGGGTGACC TTCACA*GGC TGCACACTGG
 CGAGCTGGAG AGCTTTGAAG AAAAATAATG *GCTGAGAGG TTCATGACAT
 GCTATTAAGA AGTTTGTGAT TGGACTTGGG AAATCAGATG GATCTCCAAG
 G*AAAAGGGA CCATATCTGA ACCATTGCAT TTAGAAT

FW1 (435 bp)

CCGCTTATAG GGACCAAGAC ACCCCTTCCG ACAGGGCACG GA*ATGGTGG
 AGAAGCGACC CCTGCGGGAG AGGCACCGGA CCCCTCCCA ATGGCATCTC
 GCCTACG*TG GGAGACGGGA GCCCCCTGTG GCCGACTCCA CTACCTCGCA
 GGCATTCCCC CTCCGCGCA* GAGGAAACGG AC*GCTTCAA TACTGGCCGT
 TCTCCTCTTC TGACCTTTAC A*CTGGAAA ATAATAACCC TTCTTTTTCT
 GAA*ATCCAG GTAA*CTGAC AGCTCTGATC GA*TCTGTCC TCATCACCCA
 TCAGCCCACC TGGGAC*ACT GTCAGCAGCT GTTGGGGACT CTGCTGACCG
 GAGAAGAA*A ACAACGGGTG CTCTTA*A*G CTA*AAAGGC GGTGCGGGGC
 *AT*ATGGGC GCCCACTCAA CTGCCCAATG AA*TC

30-32-8

5' SEQUENZEN

FW1 (71 bp)

GACTGAAG*C TATAGAGTGC GAGCCATAGA TAAAATAAAA GATTTATTTA
 GTCTCCAGAA AAAGGGGGGA A

30-32-9

3' SEQUENZEN

5B2N (92 bp)

CGGGAAGAAC AGATATGTTG CTGG*CATCT TACCTC*CGG TGGTGGGTCCG
 GTGGTCCATG GGC**GGGTC TCCCA*CCC GGA*CA*CCC CC

5B2N (C+3XS) (126 bp)

ATTTAAAAGC GGCACCTCTTA GTGATGTTAA CAAGTGTATT GATTTTACTG
 GTTTCTTTAT ACTTTTCATA TTGGTGATAT GCTTCAGTGT AAAAATGTCA
 TTTTCTTCTC TGTGAAAGTT ATGTAC

5F2N (C+3XS) (165 bp)

GTACATAACT TTCACCAAGA ATAAAGAGAA TAGACACTTT GTCTCACAGC
 GTGGACAGCC ATATACTCAC ATTACTGGAG AAGAGTATAA CACGAACACC
 ACGTAAAATC ATAGATAGCT ACTGTGTTTA ACATTCACTC TATGAA*TGC
 CAGCTGTATT TAAAT

5' SEQUENZEN

FW1 (333 bp)

CT*GCCTGCT CTTCCAGAGA TCTGGGTTCC AGGACCACGT GGTGGCTCAC
 AAGTCTGTAA TCCAGGGG*A TTGAATGCCA TTGT*TTATC TCAGGGTTCT
 CTTAAGGAAC AGAACTGATA CAATGAATCC CCCCCCCAC AACACGCACA
 CACGTATATA *GATTTATTC ACAATGGG*T TAAA*TCTGT GGTCAGATCA
 ATCCAGCAAT GGACATTTCC CAACAAAAG GTC**GCACA TGTTA*TTGT
 TCA*TTCATA CCAACTGGAT GTCTCAGCA* TTCCA*TCT* GTGCTGT*GC
 TA**AATCTG GGA CT TCCCG GGG*AAGTCC TAA

30-41-1

3' SEQUENZEN

5B2N (126 bp)

C*TT**TCCC *GCAAG**T* G*T*TCCC*C T*G*TTATTT G*AC**GGGT
 T*CTCATT*A AAAACCCC** TAA*GGTTAT TCA**C**C AAAGGAAACC
 C*CCCCGG** A*C**CAAAA CCCC

5F2N (100 bp)

CTGAAACTCC A*CTCCATAT AA*CAAAGG AACA*CAA*C TGTGGAGGGA
 AAATAGG*T* **CTTAA**T *TTCCC*TAC C**GGAATAT TAAA*CGGGA

5' SEQUENZEN

CRE43 (193 bp)

TTCCCCCCTT TTTCTGGAGA C*AAATAAAA TCTTTTATTT TATCTATGGC
 TCGTACTCTA TAGGCTTCAG CTGGTGATAT TGTTGAGTCA AAA*TAGAGC
 CTGGACCACT GATATCCTGT CTTTAACAAA TTGGACTAAT CGCGGGATCC
 CCTCGACTCT AGAGGATCAT TTGCATGATC CCCCCCTCGA GGG

FW1 (195 bp)

CCCTCGAGGG GGGGACATGC AAATGATCCT CTAGAGTCGA GGGGATCCCG
 CGATTAGTCC AATTTGTTAA GGG*AGGAT ATCAAGTGGT CCAGGCTCTA
 ATTTTGACTC AACAATATCA CCAGCT*AAG CCTATACAGT ACGAAGCCAT
 AGATAAAATA A*AGATTTTA TTTAGTCTCC AGAA*AAGGG GGGAA

30-41-2

5' SEQUENZEN

FW1 (262 bp)

ATTGGTCATG AATATATCCG TAACCTGGAT AGTGAAACAG GGAGCAATGG
 TGCGCCTGCT GGAAGATGGC GATTAGGCTA GCTTAAGTAA CGCCATTTTG
 CAAGGCATGG AAAAATACAT AACTGAGAAT AGAAAAGTTC AGATCAAGGT
 CAGGAACAGA TGAACAGGG TCGACCGGTC GACCGGTCGA CCCTAGAGAA

CATCAGATGT TTCCAGGGTT GCCTGCATTA CCGGTCGATG CAACGAGTGA
TGAGGTTTCGC AA

30-41-3

5' SEQUENZEN

FW1 (263 bp)

ATTGTCATGA ACTATATCCG TAACCTGGAT AGTGAAACAG GGGCAATGGT
GCGCCTGCTG GAAGATGGCG ATTAGGCTAG CTTAAGTAAC GCCATTTTGC
AAGGCATGGA AAAATACATA ACTGAGAATA GAAAAGTTCA GATCAAGGTC
AGGAACAGAT GGAACAGGGT CGACCGGTTCG ACCGGTCGAC CCTAGAGAAC
ATCAGATGTT TCCAGGGTTG CCTGCATTAC CGGTCGATGC AACGAGTGAT
GAGGTTTCGCA AGC

30-41-4

3' SEQUENZEN

5B2N (81 bp)

TACTCTAATC TACTAATCTT CAGCCCCTAC GTAAGGAATT TGGAAAAAGT
AAGGTACCTT AAAAAA*AAA CCACTTTTCTC C

5F2N (81 bp)

GGAAAAA*TG GTTCCTTTTT TAAGGTACTT ACTTTT*CCA AT*CCTTAC*
TAGGGGCT*A AAATTAGTAA ATTAAAGGTA A

5' SEQUENZEN

CRE43 (341 bp)

TTCCCCCCTT TTTCTGGAGA CTAAATAAAA TCTTTTATTT TATCTATGGC
TCGTA CTACTA TAGGCTTCAG CTGGTGATAT TGTTGAGTCA AA ACTAGAGC
CTGGACCACT GATATCCTGT CTTTAACAAA TTGGACTAAT CGCGGGATCC
CCTCGACTCT AGAGGATCAT TTGCATGATC CCCCCCTCGA GGGGAAAAGC
GGCATCGACT TCATTGGGCA GTTGAGTGGG GCGCCCATCA TCGCCCCGCA

CCGCCTTTCT AGCCTCTAAG A*CACCCGTT GTTTTTCTTC TCCGGTCAGC
AGAGTCTTTA CATTGGTCCA GCCACCAGCT TGCATGAATA A

FW1 (431 bp)

ATCTGCTGAC CGGAGGAAGA AAAAACGGGT GCTCTTAGAG GCTACAAAGG
CGGTGCGGGG CGATGATGGG CGCCCCACTC GTCTGCCCAA TGAAGTCGAT
GCCGCTTTTC CCCTCGAGGG GGGGATCATG CAAATGATCC TCTAGAGTCG
AGGGGATCCC GCGATTAGTC CAATTTGTTA AA*ACAGGAT ATCAGTGGTC
CAGGCTCTAG TTTTGA CTCA ACAATATCAC CAGCTGAAGC CTATACAGTA
CGA*CCATAG ATAAAATAAAA AGATTTTATT TACTCTCCAG AAAAAGGGGG
GAATGAAAGA CCCC*CCTGT AGGTTTGGCA AGCTA*CATG CCC*A*AAAG
AA*AGGAAGG TGTCCAATTT ACTGACCGTA CACCAAATT TGCCTGCATT
ACCGGTC*AT GCAAC*AGTG ATGAGGTCCC A

30-41-6

3' SEQUENZEN

5B2N (124 bp)

ATTTAAAAGC GGCCTCTTA GTGATGTTAC AAGTGTTTTG ATTTTACTGG
TTTCTTTATA CTTTTCATAT GTGATAATGC TTCACTGTAA AAATGTCATT
TTCTTCTCTG TGAAAGTTAT GTAC

5F2N (123 bp)

CTACTA ACTT TCCCGAAAA* AAAATGA*TT TTTACTACTGA AGCATTATC*
CATATGAAAA GT*TAAAGAA ACCAGT*AAA TCCAAACACT TGTTAACATC
*CTAAGAATG CCGCTTTTTA AAT

30-41-7

3' SEQUENZEN

5B2N (124 bp)

ATTTAAAAGC GGCCTCTTAG TGATGTTAAC AAGTGTTTTG ATTTTACTGG
TTTCTTTATA CTTTTCATAT GTGATAATGC TTCAGTGTAA AAATGTCATT
TTCTTCTCTG TGAAAGTTAT GTAC

5F2N (90 bp)

C*TACTA**T TTCCCGA*AA GAA*ATGA*T TTTTACACTG AAGCATTATC
 ACATATGAAA AGT*TAAAGA AACCAGTAAA ATCCAAACAC TTGTTAACAT
 C*CTAAGGAA TGCCGCTTTT TAAAT

30-41-8

3' SEQUENZEN

5B2N (486 bp)

CT*T*T*GTT TACCACCTTT TTA*A*CGGT AATT*T*ATA AA*CC*TTTC
 *CTT*GGCTG TTA CT TGGAT TAAAA*CCAA ACTTCCATTA *TGGAGGA*T
 TTA*CT*C*C TAAATTTCCC *CTATTTAAA CAAAT*GGAA AAAAATT*AA
 GGAATTTTA* TATTT*CACT TG*ACTTTGG A*GGCTGG*A CCAAAGGCTT
 AAAAAACC T*GGGA*GGT AAACCAAAAA *TAAAAACCC AT*CCTG*AA
 AAATGGCAC* CTT*C**CTG G*ACCG*ACA CA*C*CACCC CTGGACTTTG
 GCCTATATTA *GGATTCCCT *AAATTCAT *CTA*GGTGC TTG*AC*TCC
 *T*TTTCACA *TAG*AG*AA AATTCTGGTC TTAACCCAAA A*CT*AAAAT
 TG*AAAGGGG ATAGGAAGGT T*CCCTCA*T *CTAAATCC* AAAGGGTCTC
 CCCA*TAACC AAAAACACTG GCGGGCGG*T GCA*CT

5F2N (505 bp)

GGGGCAATGA GCCTGCCATC AGGTACCTAT TGTGCTGAAA CAATGCTAAA
 TATGGAGAGT CACACTCCCA AAGAACCCTC CATAGCTTGC AAGCCGCCTG
 CCATGTTGGT CTCTTGCTTT ACTGGTGGCA AACCTCTGT GTGATCTAGG
 AACTGAGGTG ACTACCTTCC TATCCCCTCT CCACTCTTCA GCTCTTGGCT
 CATGACCAA CTCTTCCTCC TACTGTGACA CAGGAAATGT CCAAGCACCT
 TAAACTGGAC TTTCAGGTGA CTCCTTACTA TAGGCCAAA* TCCAGGC*TG
 AGCTGTGTCC GGTCCAAATG AAAGTGTGCC ATTCTTCCAG GACTGGCTTT
 CTATTTCTTG CTTTACCTTC CCAATGGTCT CTTCATGCCT TTTGCTCCCA
 GCCTTCCAAG TCCAGGTGCA CATATTAAAC TTCCTTCATT TCTCTTCTAT
 CTGTCTAACT AAAAGTACTC AAAGTATTAA TTCCCCTTA CGAATGTCGC
 TTCCT

30-41-9

5' SEQUENZEN

CRE43 (442 bp)

GCTAT*TTTA CCTCTG*GCA ACTT*CTAGT CA*CTCTGGA *CAGTTCAAG
 GCAGGCCCCG GGAAAAAGGA TTTAT*TGAG AGAAGGCT*C TGGGATCCTC
 T*CCTCCCAA AGGAAAGGAA GTACATTCAT *CTGATTCCG GGTCCGCACA
 GATACAG*AG CTATTTA*CT *ACTAGT*CC GACGC*CGCG CATATAATCA
 GTCATAGTAC *CTATACA** *CGGACAG*C GCAGATA**T *GCTGGCA*G
 CTTACCTCCC GGTGGTGGGT CTGTGGTCCT GGGCATGGGT CTCCC*AATC
 CCGGACAAGC CCCCCAATGA A*CACCCCGC TGACGGGTA* TCATCC*TCT
 AGGA*ACCCT CCCAGTGAAC *GC*AAGAC* *C*ACTTCGG ATGCATCTGC
 CT**AAGGTT TTTTGGACC* TCCGGTACCG GGG*CA*TCC AT

30-42-1

3' SEQUENZEN

5B2N (180 bp)

CCT*TGGGTA ACGAC*CAAC GATTCGAAGG CAAACAA*TC TCTTAAAT*C
 AAGGCCA*CC TGGCGA*T TT CAC*CCACCA AGGGTCCTGT ATTGAGGCTC
 TGTCTCAAAC TAACA*ACAA ATCAATAAAT AATGGAAT*A TAGGTAAATT
 GGTGGTAAAT TGACAAATGA TA*TGTCAAA

5F2N (181 bp)

CTCT*ACCTA *C*GTTGTCA ATTTACCACC AATCTACCTA TCAT*CCATT
 ATCTATTGA* CTGTCTGTCT GTCT*AAACA AAGCCTC*CT ACAGGACCCT
 TGGTGGC*T* AAAGTGGCCA GGCTGGCCTT *AATTTAAAA AATTTGTCTG
 CCTCT*ACTC CTGATTGTTG CTACCAAAGG A

30-42-2

3' SEQUENZEN

5B2N (444 bp)

ATTTGAAAGC CTGTA*CAGC C*CGGACTAT CTAATTTAAA AAAA*ACTGC
 A*CAAACAAT TTTATATTTA AAAAAAAAAA* TC*AAATAA* CTGATT*CCT
 GT*TT*CTAG TTTGACTACA ATACAACAAG CAAACTCAA A*ACAACA*A
 TAATGCAAAT GGTGTCTGG CAA*TCCTAA *TGTGGA*CC AAATAAAAAA
 AA*TGAGAA* TCTGAAAAAC TCTA*CAATT ACAAACA*A AA*AGGTTAT
 TGGAACAGGG TGAGCTTTA* TTACAAACTC AAA*GGATTG TC*CCAGGAC
 A*A*TTA*CT AAAAACACTG GCT*CCCTTT *CTTTGACGT TGCACAGTTT
 AA*TTT*CAG TCCATAAAAC TGTTGGGA*T TATCTTTCCA ACTGTCTCTT
 GAAAAACCCC GCTGACGGGT ATC**TCCTC AAA*GAAACC *CCC

5F2N (399 bp)

AAAAAGTTGG AAAAATAAT* CCCAACAGTT TTAT*AACTG AAAATTTAAA
 CTGT*GCAAC GTCAAAAAAA AGGGAA*CCA GTGTTTTTAG TTAACCTCTGT
 CCTGGTGACA A*CCTTT**A *TCTGTAATT AAAGCTCACC CTGT*CCA*T
 AACCTCTTTC TGTCTTGTA T*GT*AAAGT CTTTAAACTT CTCACCT*CT
 *CTATTTGGC TCCACACTTA GGACTTGCCA *ACAACCA*C TGCATTA*C*
 GTTGTCTTTT *AGTT*GCTT *TGGTATTGT A*TC*A*CTA AAA*TACAGG
 AA*TCA*ATT AT*C*ACTTT TTT*CT*AAG TATAAAATCG TTGGCTGC*C
 TCTTTTTTTA AATTAGATAT GTC*GTGGGG GC***GGCT TCCAAATAT

30-42-3

5' SEQUENZEN

FW1 (199 bp)

CTGAAGCCTA TAGAGTACGA GCCATAGATA AAATAAAAGA TTTATTTAGT
 CTCCAGAAAA AGGGGGGAAT GAAAGACCCC ACCTGTAGGT TTGGCAAGCT
 AGCATGCCCA AGGAAGAAGA GGAAGGTGTC CAATTTACTG ACCGTACACC
 AAAATTTGCC TGCATTACCG GTCGATGCAA CGAGTGATGA GGTTCGCAA

30-42-4

3' SEQUENZEN

5B2N (95 bp)

TGTTAAGCTA CAAAGTTACA GCACTTTCTT TTGAATTACT ATATCTGCCC
CCTAGAAGGA TGTGTGCTTG TAATCTCCAA CTTAGATTTT ATATG

5F2N (87 bp)

CTAAGTTGGA GATTACAAGC ACCATCCTTC TAGGGGGCAG ATATGTGTAA
TTCAAAGAA AGTGCTGGTA ACTTTGGTAG CTTAACA

30-42-5

3' SEQUENZEN

5B2N (260 bp)

TGTAG*GCATG*C*CGCTCAGAGGGTGACC**CCA*TGGGTCAGCGAG*CAACAAG
GGTCTCCCGATCCCGGACGAGCCCC* AATGA*AGACCCCGCTGACGGGTAGTCC
ATCACTCAGAGGAGACCCTCCCTTGGTAACAGCGAGACCT*TGATTTCGG*GATG
GGATGTGTGATGGA*TCGCTGGGTTCTGC*TC*A*CTG**TGTTTCGGTGCCCC*
TT*CGG*GT**ACTGTC*TGAGCCG**TTTCTT*TG*GCC

30-42-6

5' SEQUENZEN

FW1 (113 bp)

CTGTA*GTTT GGCAGCTAGC ATGCCAGGAA GAAGAGGAAG GTGTCCA*TT
TACTGACCGT ACACCAAAT TTGCTGCAT TACCGGTCGA TGCAACGAGT
GATGAGGTTC GCA

30-42-7

3' SEQUENZEN

5B2N (523 bp)

```

AT*GGTC*CT C*CATA*AAA TT*G*T*ACT AGCTA*T*GT GT*GCT*GCT
CT*TCCATC* CTCTTCAACT CTAAACTATC **CAC**A*G ACTAT*CTTT
GCT*AGACAG **T*GGACC* CACT*GTG*G TCTG***TCC TGT*GCAGGG
GTCTC*CTAC CCCTGA*TAA CACGATGCTG A*TCACCCCC **TAACAGGT
ATCTGCCCCT CTGGAAGACA A*CTCCC*CG *ATC*TC*AA ACGCTACTC*
TGAATATAAG CATACGCGTG TACATATGAC TTCTACAGTG AA*ACTCAGC
*TGGCA*CTC GCAGCTATGA GCTGCCATCT *GAACGGGTT ACTTCTCTCT
GCCTCCCATT TCTCAATTGT AACATGACCT GAATACTTTG CTCACAAA*C
TCTTGTA** TCCATCAGCT ATTACATACA A**TGTTTA* AGCACTCTGG
GTACCATTAC *TGTGACTCC ATGCC*TTCT CAGATGTCCT GAAGAAAAT*
TCTT*TGCAA ATTTCTTT*T TTA

```

5' SEQUENZEN

CRE43 (358 bp)

```

ATAGATGGGT CGTCCT*TCT G*TA*GACTC ATA*GTCAAA GTTATTT*GA
AA*ATGTA*C TGAG*ATCCC AAC*GGGCTA *AC*GGGGGG A*TTTTACTA
CTTCA*CATT TA*AAGGATA CCGGGGAGGG TTAT*CC*GT GGAATGG**G
GTTTTCTCGT GTCTTGGGTG *AG*T*CTC* TTGCTTC*TC TTCTATGTC*
TCTCACAC*A CCTTCGC*T* C*ACTTGT** AGACTAACA* TGA*ATCCCA
*CCCCA*ATT *A*TAAGTGC CTTCCCTTGT* TAGAT*CTC* ACACCT**CT
TGCTAGA*CC A*AGTAGAAC AG**AATGTT CTC***A*AG GA*CGA*GTG
GAGGGAGG

```

FW1 (354 bp)

```

ATTCGTCATG AACTATATCC *T**CCTGGA CTTCA**CA* G*GCAAAGGT
GCGCC*TCAG GAGTACGG*G ATTAGCCATT AACGCGTAAA TGATTGCCAT
*CTT*GGAAT GTATAT*AGT GACATGTG*A CA*AGGATTT CA*CATCG**
GGATCAAAT* TACTGCTGTC AGTGTGCACT AGTTATTCCT TCGCCAGCCA
*TCAATGATC AC*GT*AATC CGAGCGATAG AA*G*CTGAT GTTGACTCAA
TATCCGTTGC *TTTCCTGTC CCCCATGTA* T**CGTCGGA *T*TCCA*AC
TTCTTGCTAG TG**C*CT*A *T*T*GA*TC GCTA*CGAAA GGAT*ATGTA
*TAC

```

30-42-10

3' SEQUENZEN

5B2N (484 bp)

TTCTCA*AA* AAGAGCAC*C **T*TCTCCA CA**GGGTGT GT*CTC*CCC
 A*ACAC*GGA *A***TA*AA AAC*CATCTC TCTC***A* ACTC*GGGGG
 GCTC*CTCA* ATAT*TCCCA AAA**GCTA TTATAA*ATC T*G*G*CCCA
 AA*TGTACAA AAA*CTC*A* AAT**GTTTG CG*TTTAAA TA*AGTGT**
 CTC**T*CTC CCCC***T* **CT*T*CCC TCTCTCCCC C*A*A*AATG
 TGTGGGGCAA AAAC**CGCC **ACTCTGCG CTCGTGTGGG TGTGA*AACT
 GGGAGAAA* AC*CAC*CTC TACTCTA*AT GTGCACATAT ATA*CGCCCC
 *A**CTCTAG GAGAA*TTCA CCAC**AGAG GGGCTC**C* AGAAA**ATC
 TCG*GGTGTT GTTTCTC*AG TG*GGTC*CA *AAAAAATA ATGTTCC*T
 TATG*CCCCA C*CTCAAGGG CTCCC*TG*G GTAG

5F2N (467 bp)

TT*A*CAGCA AACGAAAAC TAAACT*C*C TCAAACACAC AAC*TATGGG
 GAGGGGGAAG GGAGGGGTGG CTGGATTTTA CTT*TT*A*C CAATT*CA*C
 AGGTTGGCCT TTGCT*TG*T CCCCCAGGT GGGGGAAGCC TAT*CCACAG
 GAAAAACCCT TAAATT*TGG GGCATAAGGT GGGACA*TTT TTTTTTCCT*
 TAAAT*CC*C TTTAAAAAAA CAAC*CCACA ACTT*G**C* CAGGC*AACC
 CC**C*TTGC T*TAATTTCC CACTAAAC*C AAGGAT*CA* T*TT*CT*TC
 CCTTATT*AA TAAATTGTGA ATTTCCCTCCA TT*TCCCAC* CCAACCG*AC
 CCTACCTTA* GGATGGTCC* TT*CCAAACC TA*T*TTTGG GGGGAAAAA
 AGGCTAAATA *TT*AGGGG* AAATTTAAA* CT*CCTCT*T AAA*CC*ACC
 CCTTTAT**A TTT*CT*

5' SEQUENZEN

FW1 (236 bp)

CTTGTCTGAA CCGCGGTCCC A*GTCCATGT CGCATATTAA GGGTGAC*CG
 TGTGGCCTC* AA*AC*GAAT CGACCCC*CC TCT*TAATTG TTAGCGCTCA
 CT*TTC*ACC ACTCCACCAT GC*CAAAGTA *CAGGAA*GT GTCCA*GTTT
 ACTGACCGTA **CC*AA*TT TGCCTGCATT A*CGGTCTAT GCACGTATTG
 ATGACGTTCG CAAAGCCTA* CT*AAGGATG GTTCGT

B) SEQUENZEN aus der RACE (siehe Tabelle A2)**5'-SEQUENZEN****26-23-8** (226 bp)

AGTTCAATTT CCATCACCCA CATCGAGGCA GCTCGCAATG GCCTGTGGGC
 ATCTGAAGGC TCTCGTCTCT TATGAACACC GCACGGCAAT GTGCAGATGC
 TCACAACGGA CATAACATA GATGCATAAT TAAAAGTAAA ACTAAATCTC
 ACAAAGGAA CACTCAGGCT CTCTCCCTCT CTTCTGCCA CA*AACAATA
 TAATTGTAAG TTTGGTTCGC TAT

26-31-7 (78 bp) (AlkB Homolog)

GGATGTTCTT TGTAGTCACT TAAGAGAGAA AATATGTAAC CCCTTATTTG
 GCCCTTGGTA TTTATCGTGC AGGGATGTT

26-32-2 (505 bp)

CCGTAGGCCG CTTTCGTAGTC CAGCACGAGC TCACTGAGCG TGCGGAAGGC
 GGGCGGTTTG TACATCAGGT CCTCCCTTCG GCTCATAACC AGGGCGCCAT
 AGCGGCCCCC GAAGTTCACC CCCAGCACAA TGTGGCGGAA GTAGTTCCCT
 GAGAAATAGG TCTTGAAGCT GATGGGAAAG CGTTCCAAGG TGGGCATACT
 GTTGGTGAGG TAACTGGTGA ATCCGAGTGC TAAGGAAAGG GTTAGGTCTG
 GGTGGTCACG TGTGCCAAAG AGGCCTTCTG AAGACAATCT GGCCATGTTT
 ACCCACTCAC TCCCCTGCCC TGACTGGGGT CCTACAGAGG GCTGCTTCTC
 CTGGGGGCTG GTCAGTCTTC CTAGGTGCCC CTTTGCCCTT GCGCGGCTGG
 CTGCGAAACC CGTGTGCATC TTTTLAGGTT AGTTCTGATT CCAAAGCTGT
 CTGGACGTCT ATAAATATCA CTACCTGG** GAGCAAC*CG GGGCTT*T

26-41-3 (676 bp)

ATTATCACAG GACAGAATGT CCCTCAACTG AAAGGGTGGC AAGTACACTG
 CATACATACA CACAGATTTC TTTAGACGTT TAAGGTACAT TTTAGCAGTA
 CCTTAAAACG ATGTTCTCAG TCAAGGCAAA AGGACCTTAA GTTCAAGGCC
 ACCCAA*GA TACTTTAGGC TATAGTTTTT CCTCAAATA CTTTAAACAT
 ATAGAAGGTC TAAAGTAAGA ACTAAAATCA TTAGCTATTT TACTAGTTTA
 TTTTAAAAAA AAACAAAATG AGGAAGAGAC CTGAGAAAGT GGCCGTGGCT
 TGTAATTCCA GTECTCAGGA AGCCAGAGCT AAATGAGCTC CTAGCTCAA

CCGGGGGTGG GGTGGGGGCG CGGGTGTTCG GCAATTAACA AACTTGGTAG
 ACCCTACTTT TGGCCTTTAT GCGATACTGA ACCTATATGT TCTCACATTT
 AAGTATTTCA AGGATAAGCC CGAAGAAAGC CAGAACAGTG AAAGGCTAAA
 ACATTCTAAG CATGTGCTAA TTATCCTTCC GACAAAAGGG CGTAGGGGAA
 AAGAGACTAC GCATTTCTTT TCCTTTATGT ACACCATCAA AAATTACGGG
 GGTAGGAGGA ACGAAAAGAT AGCTATAATC TGAGTTTAAT TTCGCGACAA
 ATTACAGGAA GATCACACCT TCCTAC

30-11-5 (284 bp)

CAGGAACAGT AATACTGAAG CGATAGAACT GTCTGCTCAA ATCTGACAAG
 CTTCCGAGAT GACAATTATT AATTGGGACA TCAGTAAAGC AAGATTTATG
 ATGTAATTAC ATTAATACTA ACATATATTT TTGTTAAAGC AGCTTACAAA
 CAGGTTTTTA ACAACTACAA GCTAAAGATA TGTTTCTTCC ACTCAATTCA
 AAATTATTTT CAAACACTAA AATCTGTCAT TTCTAGAAAC TCTCAAGCTG
 GGGACAATGG TGCACACGTG TTAAACCCAG CAGG

30-11-7 (140 bp)

TCTTGCCTTT AAAAAAACT TTATTTATAT GCATTGGTGT TTTGCTTGCA
 TATATATCTG TGTGAGGGTG TCAGATCTCC TGGAAC TAGA GTCACAGGCA
 GTTCTGAGCT GCCATGCGGG AGCTAGGGCC AGGTTTCTT

30-12-2 (130 bp) (Hexokinase)

CCACCATCAG TAAGACGGGA TGTTCTTTTT CTCTGAGATA GACTAAGTTG
 GTTAGGAAAA CACCTAGGAC ATTAGTATTG GTGCTATGGG TATGCCTTAC
 CTACCCTAGG ATAGGTTAAT AGCATCATCA

30-12-3 (337 bp)

GATTGCCTTA TAAGATTTGA ATATTAACCC CTTCTTTTCT TTCGCTGTTA
 TAGCTTTTTT TTCTTTAGTG TGGATCTCAT TTCACCTCGT GGGGCTATGG
 GATAGCAGTG GCTCTTTGCT ATAGCAACCC ACATCTGGCA TTTCTTTCTG
 TTTCTACTT GTCTTGGCAA AAGATTTGCA TTATAAGCAT GCCTGGTCTT
 TTTTT***TT TTAAATATAA TTATGAAGTT AAAATAAAGT TTTCAGATTC
 TGGGAAATCC TTGTATAGAT ACCACACAGA CATTATAGGT GGTATTTTTG
 ATAGTGATTT AATAACCTAA GGTAGTGTTG ATGATGT

30-21-2 (259 bp)

GACCCAGACT GCTTAGCTTT CTTAATCTCT CATACTCTGC ACCAATCCTT
 CCTCTACTTG GTCGTAGGC TCATGGCAGG TCCCTGAATC CCAACTCAAG
 GGGAGCAGGA CCCTGTATTT GTACCTCTTC CCAGGAGGTT AATTAAGACT
 CTTTACTCTG CCTTGTGTCA GTAATTGTCT CTTTAATTGG TACCTTGGGA
 TGAGTGCCA AGCCTGGCTT ATTAGGGCAG CTGGAGCTTT TAATGGAACA
 CTCCTGGT

30-31-3 (102 bp)

CTTCAAAGCT CTCCAGCTCG CCAGTGTGCA GCCTGTGAAG TGTCACCCAG
 TGAAGTGCTG CACCATAAAT CAAAAGCCA TAAAGTTATG CCTTGCGTAA
 GT

30-32-1 1.Variante(445 bp)

TTTAACGTCT GCGTTT***T TTTTGAGAAA TACCCCTGAC TGTCCTAGAA
 TTCAGCGTAG ACCTGCCTGC CTCTGTCTCC CCACACATGT GCTGGCACTG
 AAGGTGAGCC CACCACACCC TGCTCTACTT CCTACCTTCC CTCCAAAAAT
 AAGGTCAGCA CCAGCTTCTC TCCTCTCCAT GATTTGACAC TTAGGCCTTA
 GGCCTCACAC ATCCCAAAGA TGCTGTGGCA ACCCACTCCA CACACACAAA
 CAGACCAAAA GACATTTATA GCGCTCGGGG ACAATGGGGA GGTAGAGAAC
 TGCTGAGTCA AAGTTGAAGC ATTGTTAAAT GTTACCTCCG TCCCTCCCCA
 GACACAAAGT AGTAATCATA ATTTATGTGG CTGTATTTCC CCATGTCTAA
 GTATATAAGC CCAGGGGAAT TAACCTAAGG TCTTAAAGAT TCAGA

30-32-1 2.Variante (762 bp)

CAAATAGGAG A*ATCAAGAG GGAGGGTTTT ACCCTTGTTA CCTTTCTTCA
 TCTCCTTTTC CTTCTTGAAG ATCTTCCCTG TCTCTTCCAT AATCATGGCA
 TCACCTTTCT CACACAAGCT CAGCACAGAC ACACCTGAGC TGGAAGCCTC
 CACCAAAGAT CGAAGCACCC CTGGGAACAG GAGAAACCCA TCAGCCCTGC
 ATGCGTTCAT CATGTGACCA GACCACAAAC TGAATTTTCGT TTCTCATACT
 CCCAACACTG TTCATTGTCC TAAGGTAGAG AGAGGAAAGG TTTATGTCCT
 GGAATAATCT ACCCATGGAA AGGGAAGAGA GACGGGGTTT CTCTGTATAG
 CCATGGCTGT CCTG-GAATT CAGCGTAGAC CTGCCTGCCT CTGTCTCCCC
 ACACATGTGC TGGCACTGAA GGTGAGCCCA CCACACCCTG CTCTACTTCC
 TACCTTCCCT CCAAAAATAA GGTCAGCACC AGCTTCTCTC CTCTCCATGA
 TTTGACACTT AGGCCTTAGG CCTCACACAT CCCAAAGATG CTGTGGCAAC

CCACTCCACA CACACAAACA GACCAAAGA CATTATAGG CGTCGGGGAC
 AATGGGGAGG TAGAGAAGCTG CTGAGTCAAA GTTGAAGCAT TGTTAAATGT
 TACCTCCGTC CCTCCCCAGA CACAAAGTAG TAATCATAAT TTATGTGGCT
 GTATTTCCCC ATGTCTAAGT ATATAAGCCC AGGGGAATTA ACCTAAGGTC
 TTAAAGATTC AGA

30-32-3 (628 bp)

ATGAGTGGCA AAATTGGCCT TGAAGCAATG T***TGTTT T*TTTAACT
 TTAGTTCTTT TAATACATCA TTTAGTT**A TCTTATGTAC AATGGTGT
 TGCCTGTCTA TCAGTGTGAG GTGTCAGAAG CTCTGGAACCT GGAGTTGCTT
 ACAGACAGTT GTAAGTTGCC ATGTAGGTGC TGGGAATTGA ACCCAGGGCC
 TCTAGAAGAG CAGTTGGTGC TCTTGACCAC TGAGCCACCT CTGAGCCATC
 CATCCCTTCA GCTCCCTGAA ACACTGCTTT GCTGAAGCTG AGGGTTGAGC
 *TCTGTTGTC ***TTCTGCT TATA*ATAGT CTACATGCCA ACCATTGCTC
 ATCAGAGCCT CGATCATATG AGTCATTTTCG TGAAACTGCA AACCATTGCT
 GCGTATGCTG TGGTACGAGG CCAGCCCTGA TGACTCTGAG TGTGTGCTTA
 CGTAGGGACT GGGTGTATCT GACTGCCCTC TTCCCTCAAG CCAGTAGCCC
 GATCTTCCCG GAGAGGGAAG GAAGTTCTGT GGGTTGAGAC GCTAAAAGTT
 CTAGAAACCT CCAGTTTAAA ACCTGTCCCC TGTATCCCTG TACCATTCT
 CCTGTCCTTG GAAGGAGGCT CTGTCAAA

30-32-6 (688 bp)

GGGGGGGGGG GGGCTCAGGA GATGGTCAGG CACCCCAAGA GTATGCACAG
 TACTAGGTGT CTTTCTACTC TTACAACCTC TCTGATGCTT CAGAAATATG
 TGCAGGTGTG TGCATATGCT GCCATGTGGG GGGAGGGGTG GTAAAGGGTG
 GCACTCGCCC TGTGCACGTA CTTGTGGAGT TCAGAGGTCA ACCTTGGGGT
 TGTTCCTTAG GATCTGTCCC TTCCCCCTC CCCCACAGGA ACTAGGGGCC
 ACTGAATCAG AGAGGCTTTA GAACCAGTGA GCCCAGGCA TCCTGCTGTC
 TCTACCTCTG GCAGTGTGGG GGAACCACAG GGGCATGCCA TTATGCCTGG
 CATTTTTTCGA AAGTTATGGC AGGTTTCTCT TTTGAATGTG TGACTGAGGA
 AGTGAAAGAC ACCTGAAGGG GACCGGATGT TACAACAAAG GTTAGTGATA
 AAATAAAGCC AGCCCTCGAT GACCCTGGGG CACAAAAGTC AACCCTAAC
 AATACTGAAA AAATGCAAAT TGCCCTTGCC TCAGTTACCC CATCTGTAAA
 ATGGTTCCAA TGGCCTGCCT CATCAGTTGT GGTGGTATAA TAATCTTAAG
 GAAAAAAAAG AGAGGAAAGC CATTCCCCGC TGCACTTGGG GCCACAATAC
 ATATTTCTTA GTTTCTAAGT TCCCATTTCT TAGTTACTG

30-32-9 (798 bp)

GAGAGAAGGG AAGGGAAGGG AAAAGAAGGG ACAGGGAGGA GAAAGGTGGG
 AAGGGAAAGA ACAGAGAGAG AGAAAGAGAA GGGAGAGAGA GAGAAGGGAA
 AAAGGGAGGA AGAGAGGAAG GAGGGAGAGA AGGAAGTAGA AGGAGGGAGG
 GAGGAAGGGA GAGAGAGAGC AAAGAAAAAG AACATTCAAG TCCATGTTGT
 ATCTAAGTCC TATCTCCTAG TTTTACCAC TTCCACATAA AACTGTGCGAA
 TTATGAACCC ATCAGTGGCT TAGCCTACTA AGGCAGAGCC CTCATGATCT
 GACCACTTCC CTAAAGACTC TTCTCTGAAT ACTGACTGGA AACCAAACCT
 TAGACACATG GGCCTTTTTG GAGGACACTT CATAGTCAAG CATAACGCTA
 AGATAGACTA AGCACTTAAA AGAGACCTAA GTTTTGGGGG CTGCTGAGAT
 GGCTTAGCTG TTAGAGTACT GCCTGCTCTT CCAGAGAATC TGGGTTCCCA
 GGACCCACGT GGTGGCTCAC AAGTCTGTAA TCCAGGGGAT TGAATGCCAT
 TG***TTATC TTCGGGTTCT CTTAAGGAAC AGAACTGATA AATGAATCCC
 C*CC*ACACA CACGCACACA CGTATATAGG ATTTATTAC AATGGCTTAA
 AGTCTGTGGT CAGATCAATC CAGTAATGGA CATTTCCCAA CAAAAAGGTC
 AGGCACATGT TAGTTGTTCA GTCCATAAAA CTGGATGTCT CAGCATTTC
 AATCTAGTCC TGT*GCTAGA ATCTGGGACT TCCCGGGGAG TCCTAAA

30-32-11 (235 bp)

TGGTCCAAAG TGGGGCCCAG GCGTGGAATT CAGGTCATTG GGCCTAAAC*
 ***** ***** ***** ***** *****AAATA
 CAAGCTCCGG GGTTTGAACC CAGTTTCTCA GATTTGCAAA GCAAACACTT
 AGTCTTATCA ACCCCTTAAA TATACTTTTA AGTCAGTTTA TGATGGAGTC
 TCAGGACCTG ACCCAAGCAT CAGTGAAAAT CAGCT

30-42-4 (121 bp)

CATAAAGTCG TCAGAATTAA TGAAAAGAGG AAGCCGGATC GGAGAACGGT
 AACGCTCTAA CACAGCATGA CTCCTTACTG TTGGAAGTGA ATAAGAATAG
 AAAGAAGACG ATGTCCCTGC T

30-42-10 (133 bp)

CAGAGCCCGT CAAGCTGTAA TGTTCCAATA GACTCGAGGA TGCAATATAT
 CTGTGCACTT ATTGAATAGA GTGTGAATTT TCTCCAGTGT TCCCACGCCA
 ACCGGAGCCT AGTCTTAAGG ATGGTTTCG*T GCA

Danksagung

Herrn Prof. Dr. von Melchner möchte ich an dieser Stelle für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seinem Labor und für die Überlassung des interessanten Themas danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Bölker möchte ich mich für seine Bereitschaft als Gutachter zur Verfügung zu stehen ganz besonders herzlich bedanken.

Auch möchte ich mich bei Dr. Frank Wempe und Dr. Joachim Altschmied bedanken, die mich während meiner Zeit im Labor und auch danach sehr unterstützt haben.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilungen Hämatologie und Onkologie und Molekulare Hämatologie an der Frankfurter Universitätsklinik bedanken, die mir mit Rat und Tat beim Anfertigen dieser Arbeit geholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt aber Herrn Egbert Kullmann, ohne den diese Arbeit nie fertig geworden wäre.

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

„Identifizierung während der Apoptose transkriptionell hochregulierter Gene mittels einer viralen
Genfalle und die Charakterisierung eines dieser Gene:
Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase“

Selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe, mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg, im Mai 2004

Emil-Mannkopff-Str.6, 35037 Marburg, (06421-63572; smr_schneider@web.de)

Stephanie Schneider

geboren am 11. Mai 1967 in Essen

Berufserfahrung

seit Mai 2002 **Institut für Klinische Genetik
Universitätsklinik Marburg**

wissenschaftliche Angestellte

- Leiterin eines DFG-Projekts
- Molekulare Tumorzytogenetik (CGH, FISH und Mutationsanalysen)

Nov. 1996-Jan. 2002 **Molekulare Hämatologie
Universitätsklinik Frankfurt**

Doktorandin

- Molekulargenetik
- Zellkultur
- Sicherheitsbeauftragte für den Umgang mit Radioaktivität

Jan. 1990–Sept. 1990 **Fachklinik Hochsauerland
Willingen/Upland**

BTA

- Patientenkontakte
- Biochemische Analysen
- Labororganisation

Juli 1989– Dez. 1989 **Zentrum der Anaesthesiologie und Wiederbelebung
Universitätsklinik Frankfurt**

BTA

- Klinisch-chemische Analysen

Ausbildung

Okt. 1990- Juli 1996

Philipps-Universität Marburg

- Abschluß **Diplom-Biologin** (22. 07. 1996)
- Fachbereich Biologie Hauptfach „Molekulargenetik/Entwicklungsbiologie“
 1. Nebenfach Zoologie (Parasitologie)
 2. Nebenfach Virologie
 3. Nebenfach Mikrobiologie
- Thema der Diplomarbeit „Nachweis einer Transkriptionseinheit in einem genomischen DNA-Fragment mit Sequenzhomologien zu den regulatorischen Elementen des $\beta 2$ Tubulin-Gens aus *Drosophila melanogaster*“

Aug. 1987- Juni 1989

Berufsfachschule für Technische Assistenten Fachrichtung Biologie, Olsberg

- Abschluß **Biologisch Technische Assistentin** (15. Juni 1989)

Aug. 1977- Mai 1987

Christian-Rauch-Schule Bad Arolsen Gymnasium des Landkreises Waldeck-Frankenberg

- Abschluß **Abitur** (21. 05 1987)

Interessen

- Vorstandsmitglied des Vereins zur Förderung des studentischen Wohnens e.V., Marburg