

# **Die Rolle von Pes1 in Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle**

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde des Dr. rer. nat.  
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Thomas Christian Grimm

24. August 2006

---

Diese Arbeit wurde angefertigt am  
Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2006

MEINER FAMILIE und meiner Freundin NADINE,

die mich stets nach besten Kräften unterstützten.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Vorwort .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Das Protoonkogen c-Myc .....</b>	<b>2</b>
2.1. Die Rolle von Myc in Wachstums- und Zellzykluskontrolle .....	2
2.2. c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor.....	4
<b>3. Die Regulation der G1-Phase des Zellzyklus, die         Ribosomenbiogenese sowie die Koordination beider Prozesse .....</b>	<b>5</b>
3.1. Die Regulation der G1-Phase des Zellzyklus.....	5
3.2. Ribosomenbiogenese in Eukaryonten .....	7
3.3. Die Koordination von Ribosomenbiogenese und Zellzyklusprogression am Restriktionspunkt.....	8
3.4. Nukleoläre Prozesse sind mit dem Zellzyklus verknüpft .....	10
<b>4. Der PeBoW-Komplex .....</b>	<b>12</b>
4.1. WDR12 .....	14
4.2. Bop1 .....	14
4.3. Pes1.....	16
<b>5. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>16</b>

---

<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>1. Material und Bezugsquellen.....</b>	<b>18</b>
1.1. Zelllinien und Stämme .....	18
1.2. Nukleinsäuren .....	18
1.3. Verwendete Enzyme .....	20
1.4. Verwendete Antikörper .....	20
1.5. Protein Standard .....	21
1.6. Verwendete Chemikalien .....	21
1.7. Kits und Verbrauchsmaterial .....	22
1.8. Medien und Supplemente .....	22
<b>2. Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1. Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	24
2.2. Arbeiten mit DNS .....	25
2.3. Arbeiten mit RNS .....	29
2.4. Arbeiten mit Proteinen .....	32
2.5. Zellkultur .....	35
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>1. Mutagenese und Lokalisation von Pes1 .....</b>	<b>40</b>
1.1. Generierung und Expression der Pes1-Mutanten .....	40
1.2. Lokalisation von Wildtyp-Pes1 und seiner Mutanten.....	42
1.3. Lokalisation von BRCT-Punktmutanten .....	44
<b>2. Identifikation dominant-negativer Mutanten.....</b>	<b>46</b>
2.1. Einfluß der Pes1-Mutanten auf die Zellzykluskontrolle .....	47
2.1.1. Auswirkung der Pes1-Mutanten auf die Proliferation.....	47
2.1.2. Die Expression der Pes1-Mutanten führt zu keinem Anstieg der Apoptoserate .....	47
2.1.3. Die Pes1-Mutanten M1 und M5 induzieren einen reversiblen Zellzyklusarrest.....	50
2.1.4. Die Pes1-Mutanten M1 und M5 arretieren die Zelle in der G1- Phase.....	53

---

2.2. Auswirkung der Mutanten auf die Prozessierung der ribosomalen RNS.....	54
2.2.1. Die Pes1-Mutanten M1 und M5 führen zu einer Akkumulation der 32S pre-rRNS .....	54
2.2.2. Die Pes1-Mutanten M1 und M5 blockieren nur die Reifung der großen ribosomalen Untereinheit.....	57
<b>3. Die Koordination von Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle .....</b>	<b>60</b>
3.1. Die Pes1-Mutanten M1 und M5 induzieren eine p53-Akkumulation abhängig von der Proliferation.....	60
3.2. p53 vermittelt den Zellzyklusarrest nach Expression der Pes1-Mutanten M1 und M5.....	63
3.3. Die p53 Antwort umfaßt die Induktion von p21 .....	64
<b>4. Pes1-Mutanten und ihr Verhältnis zum PeBoW-Komplex .....</b>	<b>66</b>
4.1. Native Gelelektrophorese.....	66
4.2. Co-Immunpräzipitationen .....	73
<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
<b>1. Komplexe von Nop7p .....</b>	<b>77</b>
1.1. An der Ribosomenbiogenese und der Zellzyklusprogression beteiligte Interaktionspartner.....	78
1.2. An der Replikation beteiligte Interaktionspartner.....	79
1.3. Interaktionspartner mit Funktion in der Mitose und der Organisation des Zytoskeletts.....	79
1.4. An der Modifikation der Chromatinstruktur beteiligte Interaktionspartner.....	81
1.5. Die Interaktionspartner von Nop7p legen eine Beteiligung des Proteins in einem weiten Spektrum zellulärer Prozesse nahe .....	81
<b>2. Pes1 und Transformation .....</b>	<b>82</b>
<b>3. Effekt der ectopischen Pes1-Expression .....</b>	<b>84</b>

---

<b>4. Funktionelle Domänen von Pes1 .....</b>	<b>85</b>
4.1. Die NPLP-Domäne .....	85
4.2. Die BRCT-Domäne .....	86
4.3. Der C-Terminus .....	89
<b>5. Koordination von Zellzyklus und Ribosomenbiogenese.....</b>	<b>91</b>
<b>6. Korrelation von dominant-negativen Phänotyp und Inkorporation der     Pes1-Mutanten in den PeBoW-Komplex .....</b>	<b>93</b>
<b>7. Die Inkorporation in den PeBoW-Komplex und die nukleoläre     Lokalisation der Pes1-Mutanten bedingen sich gegenseitig .....</b>	<b>95</b>
<b>8. Ausblick .....</b>	<b>96</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>97</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>109</b>
Abkürzungsverzeichnis .....	109
Lebenslauf .....	111
Publikationsliste.....	112
Danksagung.....	113
Ehrenwörtliche Erklärung.....	114

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht über die zellulären Prozesse mit Beteiligung von c-Myc .....	3
Abb. 2: Regulation des Zellzyklus in der G1-Phase .....	6
Abb. 3: Der PeBoW Komplex .....	15
Abb. 4: Funktionsweise von pRTS-1 .....	37
Abb. 5: Mutagenese von Pes1 .....	41
Abb. 6: Lokalisation der mutanten Pes1-Proteine .....	43
Abb. 7: Lokalisation der Doppelmutanten .....	46
Abb. 8: Expression der Pes1-Mutanten M1 und M5 inhibiert die Proliferation.....	49
Abb. 9: Expression von Wildtyp-Pes1 führt nicht zu erhöhter Apoptose.....	51
Abb. 10: Die Pes1-Mutanten M1 und M5 induzieren einen reversiblen Zellzyklusarrest.....	52
Abb. 11: Expression der Pes1-Mutanten M1 und M5 führen zur Akkumulation von Zellen in G0/G1.....	55
Abb. 12: Die Pes1-Mutanten M1 und M5 führen zur Akkumulation ribosomaler Vorläufer RNS.....	56
Abb. 13: Die Pes1-Mutanten M1 und M5 inhibieren die Reifung der 28S rRNS.....	59
Abb. 14: Zusammenfassung der Effekte von M1 und M5 auf die pre-rRNS-Prozessierung .....	60
Abb. 15: Die Pes1-Mutanten M1 und M5 induzieren die Akkumulation von p53 abhängig von Proliferation .....	62
Abb. 16: Die von den Pes1-Mutanten M1 und M5 induzierte p53-Antwort ist funktionell .....	64
Abb. 17: Die Mutanten M1 und M5 induzieren p21 .....	66
Abb. 18: Inkorporation der Pes1-Mutanten in den PeBoW-Komplex: Native Gelelektrophorese .....	71
Abb. 19: Native Gelelektrophorese der Pes1-Mutanten nach RNase A-Behandlung.....	72
Abb. 20: Inkorporation der Pes1-Mutanten in den PeBoW-Komplex: Immunpräzipitation .....	74
Abb. 21: Zusammenfassung der Pes1-Mutagenesen .....	87
Abb. 22: Modelle der Koordination von Zellzykluskontrolle und Ribosomenbiogenese.....	94



## Einleitung

### 1. Vorwort

Der menschliche Organismus ist ein komplexes Gebilde aus einer großen Anzahl von Zellen. Es liegt auf der Hand, daß das Verhalten dieser Zellen einer vielfältigen Regulation unterworfen sein muß, um die Entstehung und Erhaltung eines solchen Organismus zu ermöglichen. Entziehen sich Zellen dieser Regulation, kann das zu unkontrollierter Proliferation und der Entstehung von Krebs führen.

In der Proliferationsphase durchläuft die Zelle den Zellzyklus, der durch sequentielle Aktivierung von Kinasen voranschreitet und mit der Zellteilung endet. Die Aktivierung des Zellzyklus ist für eine funktionelle Proliferation allerdings nicht ausreichend. Vor ihrer Teilung muß die Zelle ihre Bestandteile replizieren, um die Lebensfähigkeit ihrer Tochterzellen zu gewährleisten. Dazu ist eine Koordination von Wachstum und Zellzykluskontrolle notwendig, um eine verfrühte Zellteilung zu verhindern.

Ein wichtiger Aspekt des Wachstums ist die Ribosomenbiogenese, die einen Großteil des Energiehaushaltes einer Zelle für sich beansprucht. Neben der Aktivierung des Zellzyklus durch Mutationen von Protoonkogenen und Tumorsuppressoren wird neuerdings auch die Deregulation der Ribosomenbiogenese als onkogenes Ereignis in Betracht gezogen.

Das Protoonkogen c-Myc nimmt sowohl auf das Wachstum, als auch auf die Zellzykluskontrolle einer Zelle Einfluß. Damit stellt Myc einen potentiellen Koordinator beider Prozesse dar.

In der Hefe konnte ein in der Evolution konservierter Komplex als weiterer potentieller Koordinator von Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle identifiziert werden. Die Funktion des Komplexes ist für die Reifung der großen ribosomalen Untereinheit essentiell und die Depletion einer seiner Komponenten führt zu einem Zellzyklusarrest. Mit dem PeBoW-Komplex besitzt die Säugerzelle eine Entsprechung dieses Hefekomplexes. Die Komponenten des PeBoW-Komplexes, Pes1, WDR12 und Bop1, sind wie ihre Homologe in der Hefe für die Ribosomenbiogenese essentiell, und dominant-negative Mutanten inhibieren die Zellzyklusprogression. Interessanterweise wird die Expression der Komponenten des PeBoW-Komplexes durch c-Myc induziert. Der PeBoW-Komplex ist somit ein

wichtiger Koordinator von Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle unterhalb von Myc.

In dieser Arbeit sollte ein Protein des PeBoW-Komplexes, Pes1, über Deletionsmutanten untersucht werden. Insbesondere war dabei die Auswirkung dominant-negativer Mutanten auf die Prozessierung der ribosomalen RNS und den Zellzyklus von Interesse, um so Erkenntnisse über den Mechanismus der Koordination von Ribosomenbiogenese und Zellzyklus zu gewinnen.

## 2. Das Protoonkogen c-Myc

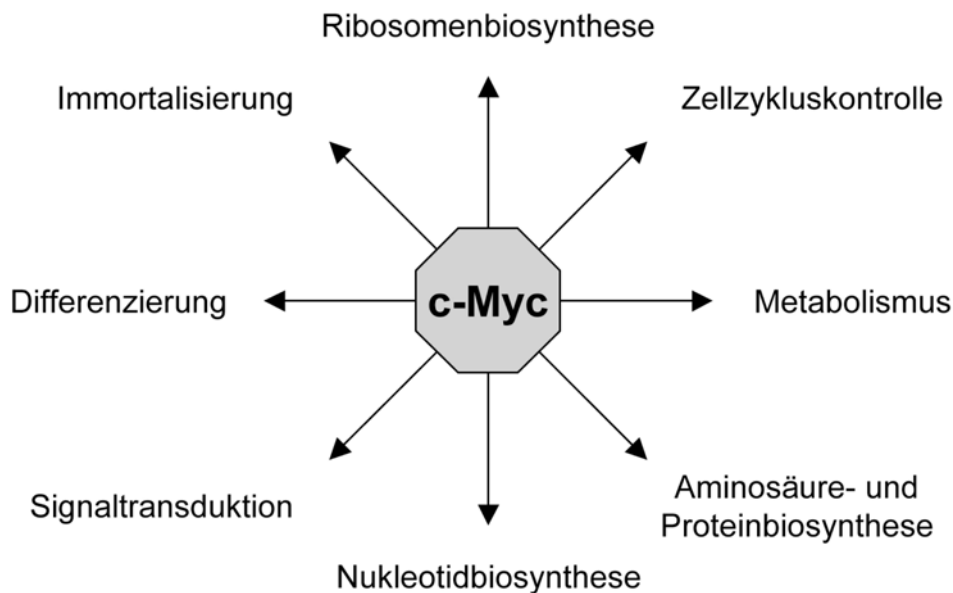
Die Beteiligung von c-Myc an der Tumorentstehung ist schon geraume Zeit bekannt. In vielen Tumorklassen tritt eine deregulierte Expression von *c-myc* auf, und in einer Reihe von Tiermodellen führt eine Überexpression von *c-myc* zu Tumorprädisposition (Adams *et al.*, 1985; Langdon *et al.*, 1986; Pelengaris *et al.*, 1999; Schoenenberger *et al.*, 1988). Überexpression von *c-myc* ist jedoch für die Transformation von Zellen nicht ausreichend, hierzu bedarf es eines weiteren onkogenen Ereignisses. Zusammen mit dem Onkogen *ras*, einem Schlüsselprotein des mitogenen Ras-Raf-MAPK-Signalweges, ist c-Myc in der Lage, primäre Fibroblasten in der Zellkultur zu transformieren, gemessen an der Bildung von Foci und dem Wachstum in Weichagar (Land *et al.*, 1986; Land *et al.*, 1983; Leone *et al.*, 1997).

Die Tatsache, daß *c-myc* ein Protoonkogen darstellt, weckte die Frage nach der Rolle des Proteins in der Zelle. Es konnte ein weites Spektrum zellulärer Prozesse identifiziert werden, an denen c-Myc beteiligt ist, was eine Aussage über kritische c-Myc-Funktionen in der Proliferation erschwert (Abb. 1)

### 2.1. Die Rolle von Myc in Wachstums- und Zellzykluskontrolle

Die Beteiligung von Myc an der Zellzyklusregulation wurde in diversen Systemen demonstriert. Expression von *c-myc* induziert den Eintritt in den Zellzyklus, wie durch die Induktion von DNS-Synthese in ruhenden Nager-Fibroblasten gezeigt wurde (Eilers *et al.*, 1991; Littlewood *et al.*, 1995). Darüber hinaus ist Myc in der Lage, in

verschiedenen Systemen Wachstum, d.h. eine Volumenzunahme der Zellen zu induzieren (Iritani und Eisenman, 1999; Johnston *et al.*, 1999). In der B-Zelllinie P493-6 konnte das Wachstum durch den Entzug von Wachstumsfaktoren von der Zellteilung getrennt werden. Wachstum und Zellzykluskontrolle stellen also voneinander abgrenzbare Prozesse dar (Schuhmacher *et al.*, 1999).



**Abb. 1: Übersicht über die zellulären Prozesse mit Beteiligung von c-Myc**

Das Wachstum einer Zelle kann viele Facetten haben, angefangen bei der Synthese der Plasmamembran über die Ribosomenbiogenese hin zur Synthese von Zytoskelettbestandteilen. Aber welche sind kritische Parameter für die Zellzyklusprogression? Eine Antwort auf diese Frage lieferte eine Mauslinie mit einer konditionalen Deletion des S6-Gens, das eine Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit codiert. Die geschrumpften Hepatozyten gehungerter Mäuse waren nach Fütterung in der Lage, wieder auf ihre Ausgangsgröße anzuwachsen – unabhängig von der Deletion des S6-Gens. Zellproliferation in Folge einer Hepatektomie konnte in der Leber nach Deletion von S6 dagegen nicht mehr beobachtet werden. Wachstum benötigt also nicht generell Ribosomenbiogenese, sie ist jedoch für das Wachstum essentiell, das Zellteilung zum Ziel hat (Volarevic *et al.*, 2000). In Systemen mit konditionalem c-Myc konnte demonstriert werden, daß Myc-Aktivität für die Prozessierung der ribosomalen Vorläufer-RNS (pre-rRNS) essentiell ist (Schlosser *et al.*, 2003).

## 2.2. c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor

c-Myc ist Mitglied der Myc-Genfamilie von basischen Helix-Loop-Helix Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren (bHLH-LZ). Mitglieder dieser Familie üben ihre Funktion als Dimer mit Max aus, mit dem sie über ihre bHLH-Domäne interagieren (Zusammenfassung in Eisenman, 2001). Transkriptionsfaktoren dienen primär der Regulation von Genexpression. Die Effekte der c-Myc Expression auf Wachstum und Zellzyklusprogression beruhen damit auf der Induktion oder Repression seiner Zielgene. Welche dieser Gene spielen eine essentielle Rolle in Proliferation und Transformation?

Der Eintritt in den Zellzyklus, und damit die Proliferation, wird vor allem durch die Aktivität der cyclinabhängigen Kinasen (Cdk) in der G1-Phase reguliert. In dieser Phase liegt der sog. Restriktionspunkt, an dem die Entscheidung fällt, ob eine Zelle in den Zellzyklus eintritt. Einige Zielgene von c-Myc, Cdk4, CyclinD und Cdc25, sind maßgeblich an der Zellzyklusregulation in der G1-Phase beteiligt. Der Eintritt in den Zyklus ist eine irreversible Entscheidung, die Zelle muß ihn somit komplett durchlaufen (Blagosklonny und Pardee, 2002; Bouchard *et al.*, 1999; Galaktionov *et al.*, 1996; Hermeking *et al.*, 2000).

Die Aktivierung der Ribosomenbiogenese durch Myc spiegelt sich in der Induktion einer anderen Gruppe von Zielgenen wieder, die Proteine mit Beteiligung an der Pre-rRNS Prozessierung codiert (Schlosser *et al.*, 2005; Schlosser *et al.*, 2003).

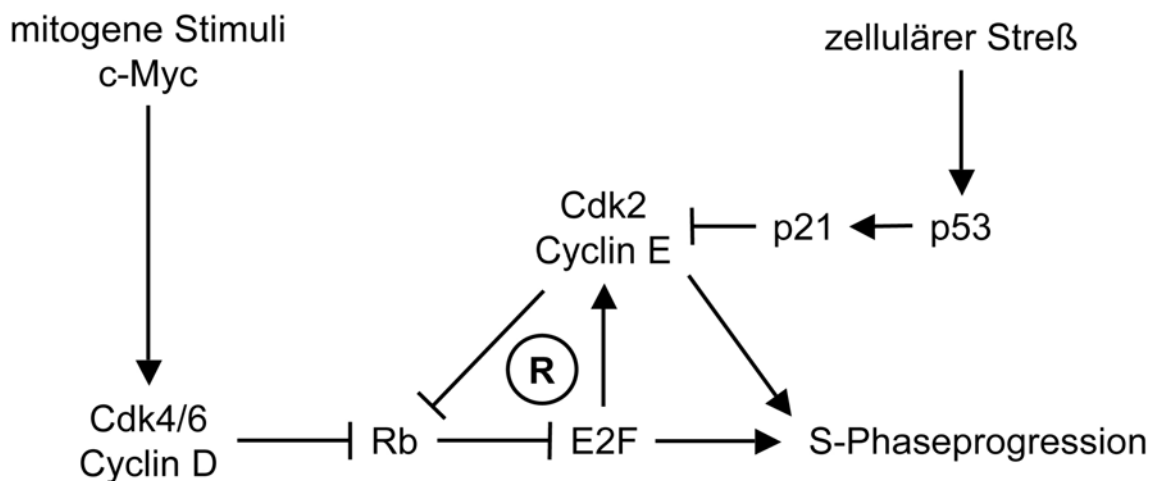
Die simultane Aktivierung der Zellzyklusmaschinerie und der Ribosomenbiogenese ermöglicht es Myc, beide Prozesse zu koordinieren. Als Transkriptionsfaktor kann diese Koordination durch Myc jedoch nur auf der Ebene der Genexpression stattfinden. Weitere Kontrollmechanismen müssen postuliert werden, um der Zelle die Reaktion auf Störungen in der Ribosomenbiogenese zu erlauben. Der entsprechende Kontrollpunkt ist beispielsweise für die Replikation der DNS bereits gut untersucht, ein Kontrollpunkt für die Replikationen der Ribosomen ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

### **3. Die Regulation der G1-Phase des Zellzyklus, die Ribosomenbiogenese sowie die Koordination beider Prozesse**

#### **3.1. Die Regulation der G1-Phase des Zellzyklus**

In der G1-Phase wird die Entscheidung getroffen, ob sich die Zelle teilen wird. Deshalb kommt den Ereignissen in dieser Phase eine essentielle Bedeutung in der Zellzyklusregulation zu. Mitogene Stimuli führen zu einer Aktivierung des Zellzyklus. Die Aktivierung ist anfänglich noch reversibel, ab einem gewissen Punkt in der G1-Phase, dem sogenannten Restriktionspunkt R, ist die Zelle jedoch zum kompletten Durchlaufen des Zyklus gezwungen (Pardee, 1989; Zetterberg *et al.*, 1995). Ein Schema der Regulation des Zellzyklus in der G1-Phase ist in Abbildung 2 dargestellt. Für den Übergang von der G1- in die S-Phase ist die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie essentiell, welche über die „Pocket-Proteine“ negativ reguliert werden. Die „Pocket“-Proteine, deren wichtigsten Vertreter Rb darstellt, sind eine Familie verwandter Proteine mit teilweise redundanter Funktion. Sie binden und inaktivieren E2F abhängig von ihrem Phosphorylierungszustand (Bandara *et al.*, 1993; Helin *et al.*, 1993; Krek *et al.*, 1993; Weinberg, 1995). Mitogene Stimulation induziert in ruhenden Zellen sowohl auf *c-myc*-abhängigen als auch -unabhängigen Wegen zelltypspezifisch die Expression von Mitgliedern der D-Typ Cycline und Cdk4 bzw. Cdk6 (Albanese *et al.*, 1995; Bakiri *et al.*, 2000; Bouchard *et al.*, 1999; Guttridge *et al.*, 1999; Herber *et al.*, 1994; Hinz *et al.*, 1999; Perez-Roger *et al.*, 1999). Nach der Assoziation von Cyclin und Kinase phosphorylieren die Cdk4/6-Cyclin D-Komplexe Rb partiell, was die Inhibition von E2F vermindert. Das so teilweise aktivierte E2F induziert die Expression von Cyclin E, das mit Cdk2 assoziiert. Die Cdk2-Cyclin E-Komplexe phosphorylieren Rb nun vollständig, was die Aufhebung der Inhibition von E2F durch Rb bewirkt (Planas-Silva und Weinberg, 1997). Die Aktivität von E2F und der Cdk2-Cyclin E-Komplexe ist für den Übergang der Zelle in die S-Phase essentiell. Der Restriktionspunkt wird nach allgemeiner Auffassung bei der Aktivierung der positiven Rückkopplungsschleife überschritten, in der sich die Cdk2-Aktivität über Inaktivierung von Rb und der damit verbundenen E2F Aktivierung selbst verstärkt (Blagosklonny und Pardee, 2002). An der Regulation des Zellzyklus wirken auch zwei Familien von Cdk-Inhibitoren und die Phosphatase Cdc25 mit, auf deren Rolle hier nicht weiter eingegangen werden soll.

Zellulärer Streß ist in der Lage, über eine p53-Antwort einen Zellzyklusarrest auszulösen. Die Aktivierung von p53 führt zur Expression von p21, das als Mitglied der Cip/Kip-Familie von Cdk-Inhibitoren Cdk2 enthaltende Komplexe bindet und inaktiviert (Harper *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1993). Die Inhibition der DNS-Replikation über die Assoziation von p21 mit dem „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA), einer Untereinheit von DNS-Polymerase  $\delta$ , deutet auf einen weiteren Mechanismus des p21-vermittelten Zellzyklusarrestes hin (Flores-Rozas *et al.*, 1994; Waga *et al.*, 1994). Auch in der G2-Phase ist p21 an Kontrollpunkten in der Zellzyklusregulation beteiligt (Niculescu *et al.*, 1998). Die Induktion eines Zellzyklusarrestes durch p21 scheint Apoptose entgegenzuwirken, da in verschiedenen Systemen eine Inhibition p53-abhängiger, als auch p53-unabhängiger Apoptose durch p21 gezeigt werden konnte (Gartel und Tyner, 2002).



**Abb. 2: Regulation des Zellzyklus in der G1-Phase**

Mitogene Stimuli induzieren die Bildung aktiver Cdk4- bzw. Cdk6-Cyclin D Komplexe. Diese phosphorylieren nun teilweise die „Pocket-Proteine“, allen voran Rb, was sich in einer partiellen Inaktivierung von Rb äußert. Die daraus resultierende E2F-Aktivität ist für die Induktion von Cyclin E und damit der Aktivierung von Cdk2 ausreichend. Die aktiven Cdk2-Cyclin E-Komplexe vervollständigen die Hyperphosphorylierung und damit die Inaktivierung von Rb, was die vollständige Aktivierung von E2F – und damit eine verstärkte Cyclin E-Expression – zur Folge hat. Die Aktivierung dieser positiven Rückkopplungsschleife wird nach allgemeiner Auffassung mit dem Überschreiten des Restriktionspunktes R gleichgesetzt. Die Aktivität von Cdk2-Cyclin E und E2F ist für die S-Phaseprogression essentiell. Zellulärer Streß kann über Induktion von p53 einen Kontrollpunkt in der G1-Phase aktivieren. Ein Zielgen von p53 ist der Cdk-Inhibitor p21, der präferentiell die Aktivität von Cdk2 unterbindet, und die Zelle so im Zyklus arretiert (Blagosklonny und Pardee, 2002; Ekholm und Reed, 2000).

### 3.2. Ribosomenbiogenese in Eukaryonten

Die Ribosomenbiogenese findet im Nukleolus statt und stellt einen in der Evolution hoch konservierten Prozeß dar. Sie ist vor allem in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gut untersucht (Dez und Tollervey, 2004; Fatica und Tollervey, 2002). Ribosomen sind Komplexe aus RNS und Proteinen. Das 80S Ribosom der Hefe besteht aus einer kleinen 40S Untereinheit, die sich aus der 18S ribosomalen RNS (rRNS) sowie 32 ribosomalen Proteinen (rProteine) zusammensetzt, und einer großen 60S Untereinheit, welche neben 46 rProteinen die 25S (28S in Säugern), die 5,8S und die 5S rRNS enthält (Planta und Mager, 1998).

Der Nukleolus enthält viele Kopien der rDNS in Tandem-Wiederholungen, die von RNS-Polymerase I als 35S Vorläufer-rRNS (47S pre-rRNS in Säugern) transkribiert werden. Das primäre Transkript enthält die Sequenzen der reifen 18S, 5,8S und 25/28S rRNS, die durch die „internal transcribed spacers“ 1 und 2 (ITS-1 bzw. -2) getrennt und von den „external transcribed spacers“ (5'- bzw. 3'-ETS) flankiert werden (s. auch Abb. 12A; Lafontaine und Tollervey, 2001). Der 35S/47S-Vorläufer wird schnell von ribosomalen und nicht-ribosomalen Proteinen zum 90S preribosomalen Partikel verpackt. Der erste Schritt zur Reifung der pre-rRNS ist ihre Modifikation durch Pseudouridylierung und Methylierung. Das Ausmaß der Modifikation der pre-rRNS ist in Säugern mit jeweils etwa 100 Pseudouridylierungen und Methylierungen an der 2' Hydroxyl-Gruppe der Ribose etwa doppelt so hoch wie in der Hefe (Maden, 1990; Rozenski *et al.*, 1999; Warner, 1999). Die weitere Reifung erfolgt an hoch konservierten Prozessierungspunkten durch Exo- und Endonukleasen. Säuger unterscheiden sich dabei von der Hefe hauptsächlich in der Reihenfolge der Benutzung dieser Punkte (Bowman *et al.*, 1981).

Der 90S preribosomale Partikel zerfällt relativ bald in die 43S und 66S preribosomalen Partikel, die schließlich zu den 40S bzw. 60S ribosomalen Untereinheiten heranreifen. Der Reifungsprozeß geht mit einem Transport der preribosomalen Partikel durch die verschiedenen funktionellen Bereiche des Nukleolus über das Nukleoplasma in das Zytoplasma einher, wo die letzten Reifungsschritte der 40S und 60S Untereinheiten stattfinden. Vor dem Übergang vom Nukleolus in das Nukleoplasma assoziiert die in Proteine verpackte, von einem eigenen Gen durch RNS-Polymerase III transkribierte 5S rRNS mit dem 66S preribosomalen Partikel (Dez und Tollervey, 2004; Tschochner und Hurt, 2003).

Im Laufe der pre-rRNS Prozessierung assoziieren eine Vielzahl von nicht-ribosomalen Proteinen mit den unterschiedlichen preribosomalen Partikeln. Die fehlende Korrespondenz der Gegenwart einzelner nicht-ribosomaler Proteine mit bestimmten Prozessierungsschritten veranlaßte Dez und Tollervey zu der Annahme, daß die Reifung der Ribosomen nicht entlang eines geradlinigen Weges verläuft, sondern daß verschiedene Reifungsschritte parallel ablaufen. Dabei wäre eine Qualitätskontrolle erforderlich, um ein verfrühtes Ablaufen irreversibler Schritte zu verhindern. Eine Qualitätskontrolle konnte bis jetzt jedoch nicht identifiziert werden, der Abbau der pre-rRNS in aberranten preribosomalen Partikeln deutet jedoch auf die Existenz eines Kontrollmechanismus hin. Der Kontrollmechanismus könnte seine Funktion über die Regulation des Transportes der preribosomalen Untereinheiten ausüben (Dez und Tollervey, 2004).

### **3.3. Die Koordination von Ribosomenbiogenese und Zellzyklusprogression am Restriktionspunkt**

Die Notwendigkeit der Koordination des Wachstums mit der Zellzyklusregulation ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert. Wie koordinieren andere Modellorganismen diese beiden Prozesse? In der Hefe stellt das Erreichen einer gewissen Zellgröße einen wichtigen Parameter für das Überschreiten des Restriktionspunktes (Start) dar. Die kritische Zellgröße variiert je nach Wachstumsbedingung und wird über den Ras/PKA-Signalweg festgelegt (Cross, 1995). Gestörte Expression von Zellzyklusregulatoren kann Einfluß auf die Zellgröße nehmen. Die Überexpression des G1-Cyclins *CLN3* führt zu einem verfrühten Überschreiten des Start-Punktes, was letztendlich in einer Verringerung der Zellgröße resultiert. Inhibition der Zellzyklusprogression, wie z.B. durch Deletion von *CLN3*, hat ein verzögertes Überschreiten des Start-Punktes und damit eine Vergrößerung der Zellen zur Folge (Cross und Blake, 1993; Nash *et al.*, 1988). Die Zellgröße scheint in Säugern ebenfalls gemessen zu werden, da Mausfibroblasten *in vitro* vor dem Durchlaufen des Zellzyklus zu einer bestimmten Größe heranwachsen (Killander und Zetterberg, 1965). Die Überexpression der G1-Cycline Cyclin D1 und Cyclin E führt in Säugerzellen zu einem ähnlichen Phänotyp wie die Überexpression



von *CLN3* in der Hefe (Ohtsubo und Roberts, 1993; Quelle *et al.*, 1993; Resnitzky *et al.*, 1994).

Der Restriktionspunkt trägt in der Hefe also eine wichtige Funktion bei der Koordination von Zellwachstum und Zellzykluskontrolle. Experimentelle Daten unterstreichen eine herausragende Rolle der Ribosomenbiogenese für das Überschreiten des Restriktionspunktes. In der Modellvorstellung wird der Restriktionspunkt überschritten, wenn die kritische Menge eines wachstumsfaktorabhängig exprimierten, instabilen Proteins akkumuliert. In der Hefe handelt es sich bei diesem instabilen Protein um das Cyclin Cln3p. Die Proteinmenge von Cln3p wird auf mehreren Ebenen reguliert, wobei die Translation der *CLN3*-mRNS hierbei als Sensor für die translationale Kapazität der Zelle dient (Polymenis und Schmidt, 1999). Die *CLN3*-mRNS verfügt über ein weiteres Leseraster (uORF) 5' des *CLN3*-Leserasters. Durch diese Tandemanordnung der Leseraster wird die Translationseffizienz des *CLN3*-ORF herabgesetzt. Man geht davon aus, daß nur eine Minderheit der Ribosomen den uORF passiert und *CLN3* translatiert (Polymenis und Schmidt, 1997). Während die Zelle in der G1 Phase wächst, vermehrt sie die Zahl ihrer Ribosomen. Mit der translationalen Kapazität wächst auch die Zahl der Ribosomen, die den uORF passieren und die Syntheserate von Cln3p steigt an. Im Einklang mit diesem Modell führt die Deletion des uORF zu einer erhöhten Cln3p-Synthese (Polymenis und Schmidt, 1997).

In Säugerzellen konnte ein entsprechender Mechanismus nicht demonstriert werden. Die mRNS wichtiger Zellzyklusregulatoren wie Cdk4, Cyclin D1 und p27<sup>Kip1</sup> verfügen in Säugern jedoch über einen komplizierten 5'-Bereich, was eine Kopplung ihrer Translation an die Translationskapazität der Zelle möglich erscheinen lässt (Neufeld und Edgar, 1998).

Ein anderes Modell wurde von George Thomas für *Drosophila melanogaster* vorgeschlagen. Diesem Modell liegt zugrunde, daß die Menge der mRNS die der Ribosomen in der Zelle übertrifft, und daß die mRNS ribosomaler Proteine in mitogen stimulierten Zellen präferentiell translatiert wird. Um die mRNS von nicht-ribosomalen Proteinen, wie z.B. von Zellzyklusregulatoren, in relevanter Menge zu translatieren muß die Zelle die Kapazität ihrer Translationsmaschinerie erhöhen, d.h. Ribosomen synthetisieren. Die Akkumulation der Cycline für das Überschreiten des Restriktionspunktes wäre damit an eine erfolgreiche Ribosomenbiogenese gekoppelt (Thomas, 2000). Dieses Modell basiert auf Untersuchungen des

wachstuminduzierenden PI3K-Signalweges in *D. melanogaster*. Die Aktivierung des Signalwegs durch Insulin- bzw. IGF-Rezeptoren führt zu Aktivierung von Proteinkinase B und S6-Kinase (S6K). Letztere phosphoryliert das ribosomale S6-Protein, woraufhin eine Gruppe von mRNS effizienter translatiert wird. Diese Gruppe, der viele ribosomale Proteine angehören, definiert sich über Oligopyrimidinsequenzen am 5'-Ende der mRNS, der 5'-TOP-Sequenz (Jefferies *et al.*, 1997).

Mutationen in ribosomalen Proteinen äußern sich phänotypisch im langsamen Wachstum der sog. *Minute*-Mutanten bei unveränderter Zellgröße. Das langsame Wachstum ist hierbei ein generelles Phänomen gestörter Ribosomenbiogenese, der Effekt von Mutationen in mehreren ribosomalen Proteinen ist nicht additiv. Mutation von dS6K führt ebenfalls zu langsamer Proliferation, jedoch bei reduzierter Zellgröße. Mutationen in ribosomalen Proteinen limitieren die Ribosomenbiogenese, ohne die mRNS-Menge der rProteine zu verändern. Die Mutation von dS6K inhibiert ebenfalls die Ribosomenbiogenese. Im Gegensatz zur Mutation von rProteinen vermindert sie die Translation der 5'-TOP-mRNS, was eine erhöhte Synthese von Zellzyklusregulatoren und damit ein verfrühtes Überschreiten des Restriktionspunktes zur Folge haben könnte (Thomas, 2000). Diese Art der Regulation könnte auch in Säugerzellen Verwendung finden, was aufgrund der Datenlage weder bestätigt noch widerlegt werden kann.

Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *D. melanogaster* wird am Restriktionspunkt die Translationskapazität der Zelle gemessen und so die Ribosomenbiogenese mit dem Zellzyklus gekoppelt. Dieser Mechanismus repräsentiert jedoch keinen Kontrollpunkt, der spezifisch auf Störungen in der Ribosomenbiogenese reagiert.

### **3.4. Nukleoläre Prozesse sind mit dem Zellzyklus verknüpft**

Die Messung der Translationskapazität am Restriktionspunkt als Mechanismus greift nur an einem Punkt im Zellzyklus. Es sind weitere Kontrollpunkte notwendig, wenn die ungestörte Ribosomenbiogenese während des gesamten Zellzyklus sichergestellt werden soll. Der Nukleolus, ein membranloses Organell im Nukleus der Zelle, dessen Struktur von der Reifung der Ribosomen definiert wird, scheint bei der Verknüpfung von Wachstum und Zellzyklusregulation eine Schlüsselrolle zu spielen.

Lange wurde der Nukleolus lediglich als Fabrik für die Produktion von Ribosomen angesehen, in letzter Zeit zeigt sich jedoch zunehmend auch eine Rolle in der Zellzykluskontrolle. Maßgebliche Regulatoren des Zellzyklus und der Seneszenz, wie z.B. p19ARF, sind nukleoläre Proteine (Melese und Xue, 1995; Tao und Levine, 1999b).

Beide Funktionen des Nukleolus, die Ribosomenbiogenese und die negative Regulation des Zellzyklus bei zellulärem Streß, sind miteinander vernetzt. Die Überexpression des Zellzyklusregulators p19ARF, der keine essentielle Rolle in der Ribosomenbiogenese spielt, kann die Prozessierung der pre-rRNS inhibieren (Sugimoto *et al.*, 2003). Auf der anderen Seite ist der Prozessierungsfaktor Nucleophosmin (NPM) auch an der Regulation der Tumorsuppressoren p53 und p19ARF beteiligt. NPM interagiert mit p19ARF, erhöht dessen Stabilität und inaktiviert es durch Bindung im Nukleolus. Bei der UV-Antwort stabilisiert NPM p53 über Bindung und Inaktivierung von Mdm2, welches für den Abbau von p53 verantwortlich ist (Colombo *et al.*, 2005; Gjerset, 2006; Kurki *et al.*, 2004). Der Einfluß der Ribosomenbiogenese auf die Zellzyklusregulation wird auch dadurch verdeutlicht, daß Dysfunktion von Nucleophosmin häufig mit akuter myeloischer Leukämie assoziiert ist, und auch für NPM heterozygote Mäuse myelodysplastische Syndrome entwickeln (Falini *et al.*, 2005; Grisendi *et al.*, 2005). Der Nukleolus ist auch an der Antwort der Zelle auf UV-Bestrahlung beteiligt. Rubbi und Milner konnten über die Bestrahlung durch Mikroporen lokal UV-Strahlungsschäden in der Zelle auslösen. Die Zelle reagierte nur mit einer p53-Antwort auf die Bestrahlung, wenn der Nukleolus betroffen war. Ohne Beschädigung des Nukleolus konnten selbst große Mengen nukleären DNS-Schadens keine Stabilisierung von p53 herbeizuführen. Der Nukleolus stellt damit bezüglich p53 den primären Sensor der Zelle für DNS-Schäden durch UV-Strahlung dar. Die Zerstörung des Nukleolus durch verschiedene Chemotherapeutika, Injektion von Antikörpern gegen den „upstream binding factor“ (UBF; in Abwesenheit von DNS-Schaden) oder die cre-vermittelte Deletion des RNS-Polymerase I spezifischen Transkriptionsfaktors TIF-IA rief ebenfalls eine Akkumulation von p53 und einen p53-abhängigen Zellzyklusarrest hervor. Der Nukleolus zeichnet sich also für die Aufrechterhaltung einer geringen Menge an p53 verantwortlich, die sich automatisch erhöht, sobald die Funktion des Nukleolus als Antwort auf Streß beeinträchtigt wird (Rubbi und Milner, 2003; Yuan *et al.*, 2005).

Doch über welchen Mechanismus ist die Ribosomenbiogenese als prägnanteste Nukleolusfunktion mit der Zellzyklusregulation über p53 verknüpft? Zwei Modelle wurden vorgeschlagen, wie eine Störung der Ribosomenbiogenese eine Akkumulation von p53 auslösen könnte. In beiden Modellen wirkt eine Störung der Ribosomenbiogenese inhibitorisch auf den Abbau von p53, die Modelle unterscheiden sich jedoch darin, wie diese Störung gemessen wird. Das erste Modell geht von einem verminderten Bedarf an rProteinen aus, von denen einige den Abbau von p53 über Bindung und Inaktivierung von Mdm2 verhindern können. Das zweite Modell postuliert den zytoplasmatischen Abbau von p53, für den ein Coexport von p53 mit den Ribosomen vom Nukleolus ins Zytoplasma Voraussetzung ist.

Der PeBoW-Komplex stellt eine weitere Verbindung zwischen Nukleolus und Zellzyklus dar. Seine Entsprechung in der Hefe ist nicht nur für die Ribosomenbiogenese essentiell, sie wirkt auch an Schlüsselereignissen des Zellzyklus mit.

#### 4. Der PeBoW-Komplex

Der erste Hinweis auf den PeBoW-Komplex stammt aus der Hefe, in der ein Komplex aus den drei Proteinen Nop7p (= Yph1p, Yeast pescadillo homolog), Ytm1p und Erb1p identifiziert wurde (Du und Stillman, 2002). Die drei Proteine sind in der Evolution hoch konserviert, sie sind zu mehr als 40% identisch mit Pes1, WDR12 und Bop1, ihren Homologen in Säugern. Die Entsprechung des Hefe-Komplexes wurde in Säugern bereits identifiziert und nach seinen Komponenten PeBoW (PesBopWDR) genannt (Hölzel *et al.*, 2005). Sowohl der PeBoW-Komplex als auch seine Entsprechung in der Hefe sind an der Ribosomenbiogenese beteiligt. Die Funktion des PeBoW-Komplexes ist dabei für die Reifung der großen ribosomalen Untereinheit essentiell, nicht jedoch für die Reifung der kleinen Untereinheit. Dementsprechend sind Nop7p, Erb1p und Ytm1p Bestandteil der 66S, nicht aber der 43S pre-ribosomalen Partikel (Adams *et al.*, 2002; Du und Stillman, 2002; Hölzel *et al.*, 2005; Lapik *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2005; Oeffinger *et al.*, 2002; Pestov *et al.*, 2001a; Strezoska *et al.*, 2000; Strezoska *et al.*, 2002). Keinem der drei Proteine konnte eine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, was auf eine strukturelle oder regulatorische Funktion des Komplexes hindeutet. Diese Annahme wird

dadurch unterstützt, daß jedes der drei Proteine über eine Interaktionsdomäne verfügt, eine BRCT-Domäne bei Pes1, WD40-Domänen bei WDR12 und Bop1 (Abb. 3).

Die Identifikation einer dominant-negativen Mutante von Bop1, Bop1 $\Delta$ , lieferte einen Hinweis auf eine für die Zellzykluskontrolle relevante Funktion des PeBoW-Komplexes. Die Expression der Mutante inhibierte nicht nur die Ribosomenbiogenese, sie induzierte darüber hinaus einen p53-abhängigen Zellzyklusarrest (Pestov *et al.*, 1998; Pestov *et al.*, 2001b). Untersuchungen in der Hefe untermauerten eine Rolle des PeBoW-Komplexes jenseits der Ribosomenbiogenese. In der Hefe wurden Nop7p, Ytm1p und Erb1p nicht nur in einem trimeren Komplex gefunden, die drei Proteine waren auch Teil eines größeren Komplexes, der neben ribosomalen Proteinen auch ORC- und MCM-Proteine sowie diverse, an der Zellzyklusregulation beteiligte Proteine enthielt. Die durch seine Interaktionspartner angedeutete Rolle von Nop7p in Replikation und Zellzykluskontrolle konnte experimentell bestätigt werden. Die Depletion des Proteins über eine temperatursensitive Mutante inhibierte – unabhängig von der Ribosomenbiogenese – das Durchlaufen der S-Phase und führte zur Arretierung der Zellen in der G1- und der G2-Phase des Zellzyklus (Du und Stillman, 2002). Die starke Konservierung der Proteine in der Evolution macht eine ähnliche Funktion des PeBoW-Komplexes in der Säugerzelle wahrscheinlich, eine Assoziation von PeBoW mit dem ORC-Komplex konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden.

Der PeBoW-Komplex spielt neueren Erkenntnissen zur Folge auch in der Mitose eine essentielle Rolle. Die Depletion von Pes1 oder Bop1 in humanen Zellen induziert abnorme Mitosen, was zu chromosomaler Instabilität (CIN) führt. Einen ähnlichen Phänotyp zeigt auch die Überexpression von Bop1 (Killian *et al.*, 2004; Killian *et al.*, 2006). CIN ist ein Markenzeichen vieler Tumore, was auf eine mögliche Rolle des PeBoW-Komplexes in der Transformation hindeutet. Pes1 ist bislang jedoch die einzige Komponente des PeBoW-Komplexes, der ein pathogener Phänotyp nachgewiesen wurde. Die Überexpression von Pes1 ist in der Lage, Zellen – gemessen an Kolonienbildung im Weichagar – zu transformieren, wenn auch nicht zu immortalisieren (Maiorana *et al.*, 2004; Prisco *et al.*, 2004). Einen Hinweis auf eine Rolle von Pes1 in der Tumorentstehung liefern die Daten der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7, in der nach Stimulation mit 17 $\beta$ -Estradiol die Pes1-mRNS um bis zu 14-fach induziert wird (Charpentier *et al.*, 2000). Auch bei humanen glialen Tumoren

konnte die Pes1-Expression mit Transformation korreliert werden (Kinoshita *et al.*, 2001).

Der Aufbau des PeBoW-Komplexes ist nicht bekannt, in der Hefe wurden die Interaktionen von Nop7p, Erb1p und Ytm1p jedoch aufgeklärt. Erb1p interagiert *in vitro* sowohl mit Nop7p als auch mit Ytm1p, während Nop7p und Ytm1p keine Interaktion zeigen (Miles *et al.*, 2005). Die starke Homologie zwischen Hefe und Säugern macht eine entsprechende Organisation des PeBoW-Komplexes wahrscheinlich, bei der Pes1 nur mittelbar über seine Assoziation mit Bop1 mit WDR12 interagiert (Abb. 3).

#### 4.1. WDR12

WDR12 wurde in einem Versuch identifiziert, Gene mit Funktion in der Entwicklung von Thymozyten zu isolieren. WDR12 codiert für ein nukleoläres Protein von 423 Aminosäuren Länge. Es verfügt über eine N-terminale „Notchless-like Domain“ (Nle) und sieben WD40-Motive. WD40-Motive dienen der Protein-Protein-Interaktion. Es ist anzunehmen, daß sie analog zu den sieben WD40-Motiven der  $\beta$ -Untereinheit der trimeren G-Proteine einen  $\beta$ -Propeller formen. WDR12 verfügt zudem über eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) zwischen den WD40-Motiven 3 und 4 (Abb. 3) (Nal *et al.*, 2002).

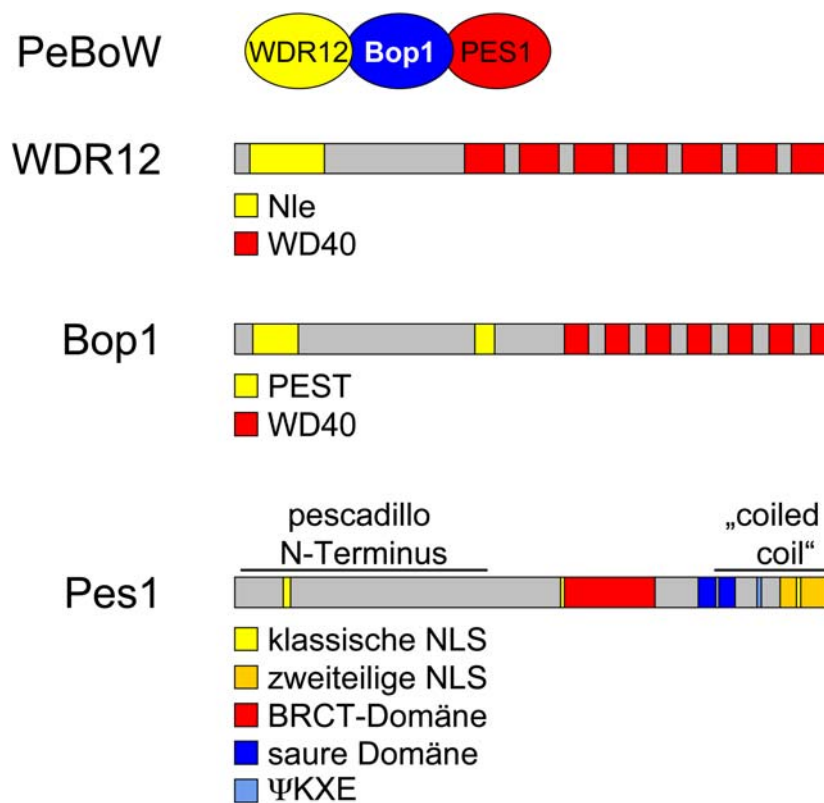
Die Deletion der Nle-Domäne ruft einen dominant-negativen Phänotyp hervor. Die Expression der Mutante induziert einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus und inhibiert die pre-rRNS Prozessierung auf der Ebene 32S pre-rRNS (Hölzel *et al.*, 2005).

#### 4.2. Bop1

Bop1 (Block of proliferation) wurde als verkürzte cDNS bei einem Versuch kloniert, Gene mit antiproliferativer Wirkung zu identifizieren. Die isolierte Mutante trug eine N-terminale Deletion von 250 Aminosäuren und wurde später als Bop1 $\Delta$  bezeichnet (Pestov *et al.*, 1998; Strezoska *et al.*, 2000).

Bop1 ist ein nukleoläres Protein mit einer Länge von 732 Aminosäuren. Es enthält je eine PEST-Sequenz am N-Terminus und in der Mitte des Proteins. Desweiteren verfügt Bop1 über sieben WD40-Motive (Abb. 3). PEST-Sequenzen sind häufig assoziiert mit kurzlebigen, regulatorischen Proteinen, ihr Auftreten in Bop1 legt eine regulatorische Funktion des Proteins nahe (Pestov *et al.*, 1998; Strezoska *et al.*, 2000).

Über eine Deletionsmutagenese wurden zwei dominant-negative Mutanten isoliert, Bop1 $\Delta$  und Bop1N2. Beide Mutanten induzieren einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus und inhibieren die pre-rRNS Prozessierung auf der Ebene der 36S und 32S pre-rRNS (Strezoska *et al.*, 2002).



**Abb. 3: Der PeBoW Komplex**

Die hypothetische Form des PeBoW-Komplexes entspricht der des Hefe-Komplexes. Pes1 und WDR12 interagieren nur mittelbar über ihre Interaktion mit Bop1. Die schematische Darstellung zeigt die Struktur der Proteine: WDR12 verfügt über eine „Notchless-like domain“ (Nle) am N-Terminus und über sieben WD40-Motive, welche höchstwahrscheinlich einen Propeller formen. Bop1 enthält zwei PEST-Sequenzen und sieben WD40-Motive. Pes1 verfügt über eine BRCT-Domäne und drei klassische nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS), wobei sich die N-terminale NLS aus drei überlappenden NLS zusammensetzt. Der C-Terminus ist als „Coiled-coil“ ausgeprägt und enthält neben sechs zweigeteilten NLS auch das konsensus-SUMOylierungsmotiv  $\Psi$ KXE sowie zwei saure Domänen. Der N-terminale Teil von Pes1 stellt eine in der Evolution hoch konservierte Domäne dar.

### 4.3. Pes1

Pes1 ist die am besten untersuchte Komponente des PeBoW-Komplexes. Das humane Gen codiert ein Protein von 588 Aminosäuren Länge. Es enthält die in der Evolution hochkonservierte „N-terminal pescadillo-like protein domain“ (NPLP-Domäne, Pfam-Datenbank Nr.: PF06732) und eine BRCT-Domäne in der Mitte des Proteins. Der C-Terminus ist als „coiled coil“ ausgeprägt und enthält das konsensus-SUMOylierungsmotiv  $\Psi$ KXE sowie zwei saure Domänen und sechs überlappende zweigeteilte nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS). Desweiteren sind drei klassische NLS über das Protein verteilt (Haque *et al.*, 2000; Kinoshita *et al.*, 2001). Humanes und murines Pes1 sind etwa zu 90% identisch, die funktionellen Domänen sogar zu fast 100%.

Pes1 wurde ursprünglich als pescadillo bei der Suche nach Genen identifiziert, die an der Embryogenese des Zebrafisches *Danio rerio* beteiligt sind. Die Disruption des Genes durch eine Transposoninsertion führte zu schweren Defekten in der Embryogenese (Allende *et al.*, 1996). Pes1 ist in der Maus ebenfalls essentiell. Seine Deletion führt zu einer Arretierung der Embryonalentwicklung auf Stufe der Morula, die Nucleoli differenzieren nicht korrekt und eine Akkumulation von Ribosomen findet nicht statt (Lerch-Gaggl *et al.*, 2002).

## 5. Zielsetzung der Arbeit

Für die Koordination von Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle sind in der Evolution verschiedene Mechanismen entstanden. Einen Mechanismus stellt die Messung der Translationskapazität der Zelle am Restriktionspunkt des Zellzyklus dar. Er ist in *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* verwirklicht, über einen entsprechenden Mechanismus in Säugern liegen bislang keine Daten vor. Ein weiterer Mechanismus besteht in der Verwendung essentieller Prozessierungsfaktoren in Schlüsselereignissen des Zellzyklus. Dieser Mechanismus wird ebenfalls in der Hefe verwendet. Dort ist Nop7p – wahrscheinlich im Kontext des trimeren Komplexes mit Ytm1p und Erb1p – für die Replikation der DNS essentiell. Die starke Konservierung des Komplexes in der Evolution legt eine Verwendung dieses Mechanismus auch in Säugern nahe.



Störungen in der Ribosomenbiogenese können auch über Kontrollpunkte von der Zelle wahrgenommen werden. Die Natur dieser Kontrollpunkte ist noch weitgehend unbekannt. Die Bedeutung des PeBoW-Komplexes bzw. dessen Entsprechung in der Hefe für Ribosomenbiogenese und Zellzyklusprogression wurde bereits in verschiedenen Systemen belegt.

In dieser Arbeit sollten Mutanten von Pes1 generiert werden, um funktionelle Domänen des Proteins zu identifizieren. Dabei war die Generierung von Mutanten mit dominant-negativer Wirkung auf die Ribosomenbiogenese beabsichtigt, um den Einfluß dieser Mutanten auf die Zellzyklusprogression zu untersuchen. Bislang konzentrierten sich die Studien v.a. auf jeweils eines der drei Proteine Pes1, WDR12 oder Bop1, wodurch unklar ist ob die jeweils beschriebenen Phänomene durch das untersuchte Protein allein oder den PeBoW-Komplex hervorgerufen werden. Deshalb sollte die Korrelation zwischen den beobachteten Phänomenen mit der Inkorporation der Pes1-Mutanten in den PeBoW-Komplex einen Schwerpunkt dieser Arbeit darstellen.

## Material und Methoden

### 1. Material und Bezugsquellen

#### 1.1. Zelllinien und Stämme

##### 1.1.1. *Escherichia coli* Stämme

DH-5 $\alpha$ (Invitrogen)	F <sup>-</sup> $\phi$ 80/lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ) <i>gal<sup>+</sup> phoA supE44 <math>\lambda</math><sup>-</sup> thi<sup>-</sup>1 gyrA96 relA1</i>
DH-10B (Invitrogen)	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80/lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 <i>recA1 endA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galJ galK <math>\lambda</math><sup>-</sup> rpsL nupG</i>
XL1-BLUE (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <sup>'</sup> <i>proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)</i> ]

##### 1.1.2. Zelllinien

TGR-1	Rattenfibroblastenlinie (J. Sedivy, Brown University, Providence, RI)
U2OS	humane Osteosarcom-Zelllinie
H1299	humane Lungencarcinom-Zelllinie

### 1.2. Nukleinsäuren

#### 1.2.1. Verwendete Plasmide und Vektoren

Vektor	Beschreibung
pUC18-HA	Modifizierter pUC18-Vektor für HA-Fusionen (zur Verfügung gestellt von Michael Hölzel)
pUC18-Pes1-HA	pUC18-HA-Derivat; trägt humanes Pes1 als HA-Fusion, entweder Wildtyp (WT) oder mutiert (M1-M11); wurde für die Mutagenese von Pes1 verwendet
pRTS-1	EBV-basierter, episomaler Expressionvektor; exprimiert doxycyclinabhängig simultan EGFP und Luziferase über bidirektionalen CMV-Promotor; Hygromycinresistenz (zur Verfügung gestellt von Georg Bornkamm)
pRTS-1-Pes1HA	pRTS1, exprimiert Pes1-HA WT bzw. Mutante anstelle der Luziferase

## 1.2.2. Verwendete Oligonukleotide

**Pes1 Hs Mutation 1-2 s:** 5'-GAT CCG GCC TCA CTG GCC GGC GAT GCC ACC ATG-3';  
**Pes1 Hs Mutation 1-2 as:** 5'-CAT GGT GGC ATC GCC GGC CAG TGA GGC CG-3';  
**Pes1 Hs Mutation 3 s:** 5'-GAT CCG GCC TCA CTG GCC GGC GAT GCC ACC ATG C-3';  
**Pes1 Hs Mutation 3 as:** 5'-TCG AGC ATG GTG GCA TCG CCG GCC AGT GAG GCC G-3';  
**Pes1 Hs Mutation 6 s:** 5'-TCG AGG GTC AGG CCC AAG CAG AGG CAG-3';  
**Pes1 Hs Mutation 6 as:** 5'-CTA ACC TGC CTC TGC TTG GGC CTG ACC C-3';  
**Pes1 Mutation 8 s:** 5'-GAC CCA GGA AAC CTG AAT GAG GCC CGG CTG GCA GCC CTG-3';  
**Pes1 Mutation 8 as:** 5'-CAG GGC TGC CAG CCG GGC CTC ATT CAG GTT TCC TGG GTC-3';  
**Pes1 Mutation 9 s:** 5'-GCC AAG CGC CTG CAG ATT ATG TAC CCT TAT GAT GTG CCA-3';  
**Pes1 Mutation 9 as:** 5'-TGG CAC ATC ATA AGG GTA CAT AAT CTG CAG GCG CTT GGC-3';  
**Pes1 Mutation 10 s:** 5'-AGG GTG ATG GCC GGC ACC TTG AGG CTG GAG GAT-3';  
**Pes1 Mutation 10 as:** 5'-ATC CTC CAG CCT CAA GGT GCC GGC CAT CAC CCT-3';  
**Pes1 Hs Mutation 11 s:** 5'-AGA AGC ACA AGA AGC TTT TCT CTG GGG TGC AGC T-3';  
**Pes1 Hs Mutation 11 as:** 5'-AGC TGC ACC CCA GAG AAA AGC TTC TTG TGC TTC T-3';  
**NcoI SUMO1 NcoI fwd:** 5'-CCA TGG CTA TGT CTG ACC AGG AGG CAA AAC C-3';  
**NcoI SUMO1 NcoI rev:** 5'-CCA TGG CAA CTG TTG AAT GAC CCC CCG TTT G-3';  
**Pes1 Seq middle:** 5'-TCT CCT TCC TTC TCG GTC AC-3';  
**as Pes1 Seq middle:** 5'-GTG ACC GAG AAG GAA GGA GA-3';  
**pEBNA\_Sfi+55bp-3:** 5'-AAT CAA GGG TCC CCA AAC TC-3';  
**HsPescadillo fwd:** 5'-GCC ACC ATG GGA GGC CTT GAG AAG AAG-3';  
**HsPescadillo bwd:** 5'-CTC CGG CCT TGC CTT CTT GGC CTT C-3';  
**1962 Rn p21 (Cdkn1a) fwd1:** 5'-AGC TCC AGT GGC AAC TGC CCT TC-3';  
**1963 Rn p21 (Cdkn1a) rev1:** 5'-AGG CAC CAT CTT GGC CTG ACT CC-3';  
**1964 Rn p21 (Cdkn1a) fwd2:** 5'-ACT GGC CTC ATG CCA TCT GCA TC-3';  
**1965 Rn p21 (Cdkn1a) rev2:** 5'-TGT CAA GGC TCT GGA CGG TAC GC-3';  
**Pes1 F327R sense:** 5'-GAG AAG CAC AAG AAG CTT CGT GAG GGC CTG AAG TTC-3'  
**Pes1 F327R antisense:** 5'-GAA CTT CAG GCC CTC ACG AAG CTT CTT GTG CTT CTC-3'  
**Pes1 I347R sense:** 5'-GAG GCC CTG GCC TTC ATC CGC AGG AGT TTT GGT GG-3'  
**Pes1 I347R antisense:** 5'-CCA CCA AAA CTC CTG CGG ATG AAG GCC AGG GCC TC-3'  
**Pes1 W397R sense:** 5'-CTA CGT GCA GCC CCA GCG GGT GTT TGA CTC AGT G-3'  
**Pes1 W397R antisense:** 5'-CAC TGA GTC AAA CAC CCG CTG GGG CTG CAC GTA G-3'  
**18S rRNS Sonde (Pan 18S):** 5' -CAC CCG TGG TCA CCA TGG TAG GCA CGG CGA CTA CCA  
TCG AAA GTT GAT AG-3';  
**ITS-1 rRNS Sonde (Rn ITS1-2):** 5' -CCG GAG AGA TCA CGT ACC ACC CCC GGT GCA CAC  
GAG ATC ACG GAG CCG-3';  
**ITS-2 rRNS Sonde (Rn ITS2-2):** 5' -GGA GCG GTC GGC CCC GGT AGA GGG AGC GGG GGA  
GGA GAG GGA CGC GAG-3';  
**oligo(dT)15:** 5'-TTT TTT TTT TTT TTT-3'

### 1.2.3. DNS-Standards

Für die Größenbestimmung von DNS-Fragmenten im Agarosegel wurde die DNS-Leiter "1kb DNA ladder" (*Promega, Mannheim*) verwendet.

### 1.2.4. Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden durchgeführt von *Sequiserie, Vaterstetten*

## 1.3. Verwendete Enzyme

Restriktionsenzyme	<i>New England Biolabs, Frankfurt</i> <i>MBI Fermentas, St. Leon-Rot</i>
T4-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
T4-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Pfu-Polymerase	<i>Promega, Mannheim</i>
Taq-Polymerase	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
T4-Polynukleotidkinase	<i>MBI Fermentas, St. Leon-Rot</i>

## 1.4. Verwendete Antikörper

### 1.1.1. Primäre Antikörper

$\alpha$ Pes1	Ratte monoklonal; Klon 8E9 (E. Kremmer); Spezifität: human
$\alpha$ WDR12	Ratte monoklonal; Klon 1B8 (E. Kremmer); Spezifität: human
$\alpha$ Bop1	Ratte monoklonal; Klon 6H11 (E. Kremmer); Spezifität: human
$\alpha$ HA	Ratte monoklonal; Klon 3F10 ( <i>Roche, Mannheim</i> );
$\alpha$ p53	Maus monoklonal; PAb240 ( <i>Dianova, Hamburg</i> )

### 1.1.2. Sekundäre Antikörper

$\alpha$ Ratte (HRP)	Ziege polyklonal ( <i>Jackson ImmunoResearch, Soham</i> )
$\alpha$ Ratte (Cy3)	Maus polyklonal ( <i>Jackson ImmunoResearch, Soham</i> )
$\alpha$ Maus (HRP)	Ziege polyklonal ( <i>Promega, Mannheim</i> )

### 1.5. Protein Standard

Für die Größenbestimmung von Proteinen in der denaturierenden Gelelektrophorese wurden die Proteinleitern "BenchMark Prestained Protein Ladder" (*Invitrogen, Karlsruhe*) oder "PageRuler Prestained Protein Ladder" (*MBI Fermentas, St. Leon-Rot*) verwendet.

### 1.6. Verwendete Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (Rothphorese; *Carl Roth, Karlsruhe*); Agar (*GibcoBRL, Paisley*); Agarose (*Invitrogen, Karlsruhe*); Ampicillin, Ammoniumperoxodisulfat (APS; *Carl Roth, Karlsruhe*); [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (3000 Ci/mmol; *Hartmann-Analytik, Braunschweig*); Borat (*Merck, Darmstadt*); Bovines Serumalbumin (Fraktion V; *Carl Roth, Karlsruhe*); BrdU (Bromdesoxyuridin), Bromphenolblau (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen*); Calciumchlorid, Casein, Chloroform (p.A.; *Merck, Darmstadt*); Ciprobay (*Bayer, Leverkusen*); DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol), DEPC (Diethylpyrocarbonat; *Sigma-Aldrich, Deisenhofen*); di-Natriumhydrogenphosphat (*Merck, Darmstadt*); Dithiothreitol (DTT; *Sigma-Aldrich, Deisenhofen*); Dimethylsulfonat (DMSO; *Carl Roth, Karlsruhe*); dNTPs (*Promega, Mannheim*); Doxycyclin (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen*); EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure), Essigsäure, Ethanol (p.A.; *Merck, Darmstadt*); Ethidiumbromid-Lsg. (10 mg/ml; *MP Biomedicals, Irvine*), Formaldehyd-Lsg (37%; *Merck, Darmstadt*); Formamid (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen*); Glucose (*Merck, Darmstadt*); Glycerin (*Carl Roth, Karlsruhe*); Glycogen (20 mg/ml; *Roche, Mannheim*); Hoechst33258 (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen*); Hygromycin B (*PAA Laboratories, Colbe*); Isopropanol (p.A.), Kaliumacetat, Kaliumhydroxid, Lithiumchlorid (*Merck, Darmstadt*); Magnesiumsulfat (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen*); Mangan(II)chlorid, Methanol (p.A.; *Merck, Darmstadt*);  $\beta$ -Mercaptoethanol, Milchpulver (*Carl Roth, Karlsruhe*); MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure; *Roche, Mannheim*); Natriumacetat (*Merck, Darmstadt*), Natriumazid (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen*); Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat (*Merck, Darmstadt*); Nonidet P40 (NP40; *Roche, Mannheim*); [ $^{32}$ P]-Orthophosphat (*Hartmann-Analytik, Braunschweig*); Phenol (*Biomol, Hamburg*); Phenol/Chloroform (*Carl Roth, Karlsruhe*); Phosphataseinhibitor (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen*); Polyfect (*QIAGEN, Hilden*); PonceauS (*ICN Biomedicals, Eschwege*); Proteaseinhibitor (Complete EDTA-free; *Roche, Mannheim*); Protein G Sepharose (*GE Healthcare, Buckinghamshire*); RNAsin (*Promega, Mannheim*); Rubidiumchlorid (*MP Biomedicals, Illkirch*); Salzsäure (*Merck, Darmstadt*); Sodiumdodecylsulfat (SDS), Sparfloxacin, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin), Tris ( $\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin; *Carl Roth, Karlsruhe*); Tween-20, Xylencyanol (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen*);

### 1.7. Kits und Verbrauchsmaterial

Deckgläser (*Menzel-Gläser, Braunschweig*); ECL™ Kit (*GE Healthcare, Buckinghamshire*); Einfrierampullen Cryotubes (*Nunc, Wiesbaden*); FACS-Röhrchen (*Micronic, Lelystad*); Filme (Hyperfilm ECL bzw. MP; *GE Healthcare, Buckinghamshire*); Küvetten (*Brand, Wertheim*); LightCycler<sup>R</sup> FastStart DNA Master SYBR Green I (*Roche, Mannheim*), Lumingen™ TMA-6 Kit (*GE Healthcare, Buckinghamshire*); Mehrfachlochplatten (*BD Biosciences, Erembodegem*); MiniElute Gel Extraction Kit (*QIAGEN, Hilden*); Mounting Medium (*Sigma-Aldrich, Deisenhofen*); Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL), Nylon-Membran (Hybond-N+; *GE Healthcare, Buckinghamshire*); Objektträger (*Menzel-Gläser, Braunschweig*); Parafilm (*Dynatech, Denkendorf*); Petrischalen, Plastikpipetten (*Greiner, Frickenhausen*); Polypropylen-/Polystyrolröhrchen 15 ml, 50 ml (*BD Biosciences, Erembodegem*); QIAGEN Plasmid Maxi Kit, QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN RNeasy RNA Mini Kit, QIAshredder (*QIAGEN, Hilden*); Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 ml (*Eppendorf, Hamburg*); Spritzen (*Carl Roth, Karlsruhe*); SuperScript II-Kit (*Invitrogen, Karlsruhe*); TriFast (*PeqLab, Erlangen*); UV-Küvetten (UVette, *Eppendorf, Hamburg*); Whatman Papiere (*Schleicher und Schuell*); Zellschaber, Zellkulturschalen Ø10 und 15 cm (*Nunc, Wiesbaden*);

### 1.8. Medien und Supplemente

#### 1.8.1. *E. coli* Medien

LB-Medium	1% Casein (Pepton 140)
	0,5% Hefeextrakt
	0,5% NaCl
	0,1% Glucose

ggf. Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) oder MgSO<sub>4</sub> nach dem Autoklavieren

LB-Platten	1% Casein (Pepton 140)
	0,5% Hefeextrakt
	0,5% NaCl
	0,1% Glucose
	2% Agar

pH mit NaOH auf 7,5 eingestellt; ggf. Zugabe von Ampicillin nach dem Autoklavieren (Endkonzentration 100 µg/ml)

**1.8.2. Supplemente für E. coli**

1000x Ampicillin	100 mg/ml; in 70% Ethanol
50x MgSO <sub>4</sub>	1 M MgSO <sub>4</sub> in Wasser, autoklaviert

**1.8.3. Zellkulturmedien**

DMEM	4500 mg/ml Glukose, enthält L-Glutamin, Pyruvat; Supplementiert mit Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin, fötalem Kälberserum, ggf. Hygromycin und/oder Sparfloxacin/Ciprobay ( <i>Invitrogen, Karlsruhe</i> )
DMEM (phosphatfrei)	Supplementiert mit dialysiertem fötalem Kälberserum und Doxycyclin; ( <i>Invitrogen, Karlsruhe</i> )
Optimem1 „Einfrier“-Medium	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i> 50% Fötales Kälberserum 40% DMEM (10% FCS) 10% DMSO

**1.8.4. Supplemente und Reagenzien für die Zellkultur**

100x L-Glutamin (200 mM)	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
100x Penicillin/Streptomycin	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
2000x Sparfloxacin	20 mg/ml in 0,2 N NaOH
Ciprobay	<i>Bayer, Leverkusen</i>
Hygromycin B	50 mg/ml in PBS; sterilfiltriert
1000x Doxycyclin	1 mg/ml
Fötales Kälberserum	<i>PAA Laboratories, Colbe</i>
Fötales Kälberserum (phosphatfrei)	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>
Trypsin/EDTA	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>

## 2. Methoden

### 2.1. Arbeiten mit *E. coli*

#### 2.1.1. Allgemeine Kulturmethoden

*E. coli* wurden bei 37°C in LB-Medium bzw. auf LB-Platten kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei dieser Temperatur mit 180 rpm geschüttelt. *E. coli* können auf Platten und in Flüssigkulturen kurzzeitig bei 4°C gelagert werden. Für langfristige Lagerung empfiehlt sich das Anlegen von Dauerkulturen.

#### 2.1.2. Herstellung chemokompetenter *E. coli*

Eine Übernachtskultur wurde 1:100 in LB-Medium/20 mM MgSO<sub>4</sub> verdünnt und bei 37°C auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 angezüchtet. Die Kultur wurde für 5 min mit 4500 x g bei 4°C zentrifugiert und die Zellen in einer, 20% des ursprünglichen Kulturvolumens entsprechenden, Menge eiskaltem TBF1 gewaschen. Danach wurden die Zellen in einem Volumen eiskaltem TBF2 resuspendiert, das 2% des ursprünglichen Kulturvolumens entsprach. Nach 15-60 min Inkubation auf Eis wurden Aliquots zu 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

**TFB1:** 30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 100 mM RbCl;  
15% Glycerin; pH 5,8 mit 1 M Essigsäure eingestellt; Filtersterilisation

**TFB2:** 10 mM MOPS oder PIPES pH 6,5; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM RbCl 15% Glycerin;  
pH 6,5 mit 1 M KOH eingestellt; Filtersterilisation

#### 2.1.3. Transformation chemokompetenter *E. coli*

Aliquots chemokompetenter *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe der zu transformierenden DNS wurden die Zellen gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock von 42°C für 30-45 s. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB Medium versetzt und für 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (20 s bei 10000 x g), in ca. 100-200 µl Medium resuspendiert und auf LB-Amp Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.



#### 2.1.4. Minipräparation von Plasmid-DNS

Bei der Minipräparation von Plasmid-DNS wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in LB/Ampicillin-Medium abzentrifugiert und in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl des SDS-haltigen Puffers P2 lysiert. Der Ansatz wurde 5 min inkubiert, bevor durch Zugabe von 150 µl P3 die SDS-Protein-Aggregate ausgefällt wurden. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 15 min bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die enthaltene DNS durch Zugabe von 450 µl Isopropanol ausgefällt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die DNS abzentrifugiert (5 min bei 15000 x g) und mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurde die DNS in 50-70 µl 10 mM Tris-Puffer pH 8,5 resuspendiert

*P1, P2, P3:* Puffer aus QIAGEN Plasmid Maxi Kit (*QIAGEN, Hilden*)

#### 2.1.5. Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNS

Für die Präparation von Plasmid-DNS in größerem Maßstab wurden die entsprechenden Kits und Protokolle von QIAGEN verwendet. Die Kulturen hatten ein Volumen von 100 ml bzw. 400 ml für Midi- bzw. Maxipräparationen. Die DNS wurde in 100 µl bzw. 400 µl TE resuspendiert.

*TE:* 10 mM Tris/HCl pH 7,5-8,5; 1 mM EDTA

#### 2.1.6. Dauerkulturen

Für das Anlegen einer Dauerkultur wurde eine Übernachtskultur mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15% versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Für die Inokulation wurde etwas Material von der gefrorenen Dauerkultur abgekratzt und auf eine LB-Platte (ggf. mit Ampicillin) ausgestrichen. Von dieser Platte wurden neue Übernachtskulturen angeimpft.

### 2.2. Arbeiten mit DNS

#### 2.2.1. Restriktionen

Für Kontrollrestriktionen wurde eine geeignete Menge DNS (0,5 µg oder 3 µl aus der Plasmid-Minipräparation) mit 1-2 U pro Enzym in 20 µl Volumen bei den vom Hersteller empfohlenen Temperaturen und Pufferbedingungen 1-16 h inkubiert.

Für präparative Restriktionen wurde eine geeignete Menge DNS mit ca. 4 U Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNS für 1-2 h bei den vom Hersteller empfohlenen Temperaturen und Pufferbedingungen geschnitten. Nach dem Auftragen auf ein Agarosegel wurden die gewünschten Fragmente durch Ausschneiden der Banden und Extraktion der DNS aus dem Agarosegel mittels MiniElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) isoliert.

### 2.2.2. T4-Polymerase

Die T4-Polymerase wurde gemäß den Angaben des Herstellers verwendet, um überhängende Enden geschnittener DNS aufzufüllen oder abzubauen.

### 2.2.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

#### 2.2.3.1. Gezielte Einführung von Mutationen

Um gezielt Mutationen in Plasmide einzuführen, wurden zueinander komplementäre Oligonukleotide entworfen, welche die beabsichtigte Mutation enthielten. Bei Punktmutationen lag die zu mutierende Stelle in der Mitte des Oligonukleotids, für Deletionen entsprach die Sequenz des Oligonukleotids etwa 20 Nucleotiden der finalen Sequenz beidseitig der Deletion.

Folgender Ansatz und Programm wurden verwendet:

10x Pfu-Puffer	5 $\mu\text{l}$	94°C	2 min	18x Wiederholung
Oligonukleotid 1 (100 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,15 $\mu\text{l}$	94°C	0,5 min	
Oligonukleotid 2 (100 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,15 $\mu\text{l}$	73°C	9,5 min	
Ausgangsplasmid	50 ng	73°C	10 min	
dNTP-Mix (10 mM)	1 $\mu\text{l}$	10°C	$\infty$	
Pfu-Polymerase	1 $\mu\text{l}$			
Wasser	ad 50 $\mu\text{l}$			

Vor der Transformation in *E. coli* wurde das PCR-Produkt gefällt und das Ausgangsplasmid über eine Restriktion mit DpnI zerstört.

**2.2.3.2. Für Klonierungen**

Für die Klonierung des SUMO1-Gens wurden folgender Ansatz und Programm verwendet:

10x Pfu-Puffer	10 µl	94°C	4 min	
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl	94°C	0,5 min	35x Wiederholung
NcoI SUMO1 NcoI fwd (100 pmol/µl)	2 µl	60°C	0,5 min	
		73°C	1 min	
NcoI SUMO1 NcoI bwd (100 pmol/µl)	2 µl	73°C	5 min	
		10°C	∞	
cDNS	1 µl			
Pfu-Polymerase	2 µl			
Wasser	ad 100 µl			

**2.2.3.3. Von *E. coli*-Kolonien**

Die Klonierung der Pes1-Mutanten in pRTS-1 erfolgte über das Restriktionsenzym SfiI, weswegen die Leseraster in beiden Orientierungen in das Vektorrückgrat ligiert werden können. Um die Orientierung zu überprüfen, wurden PCR-Reaktionen direkt mit *E. coli* Kolonien aus der Transformation angesetzt. Das erste Oligonukleotid, pEBNA\_Sfi+55bp-3, bindet 3' des Leserasters im Vektorrückgrat. Das andere Oligonukleotid bindet im Leseraster. Nur bei einer korrekten Orientierung des Pes1 Gens war auch das zweite Oligonukleotid für die PCR korrekt orientiert. Damit entstand nur bei korrekter Orientierung des Leserasters ein PCR-Produkt. Ansatz und Programm für die PCR lauteten folgendermaßen:

10x Taq-Polymerase Puffer	2 µl	94°C	10 min	
dNTP-Mix (10 mM)	4 µl	94°C	0,5 min	20x Wiederholung
pEBNA_Sfi+55bp-3 (100 pmol/µl)	0,5 µl	55°C	0,5 min	
		72°C	2 min	
HsPescadillo fwd oder as Pes1 Seq middle (100 pmol/µl)	0,5 µl	72°C	10 min	
		10°C	∞	
Taq-Polymerase	2 µl			
Wasser	ad 20 µl			

#### 2.2.3.4. Gelelektrophorese

Für das Auftrennen von DNS-Fragmenten wurden Gele aus 1% Agarose in 0,5x TAE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Als Laufpuffer diente 0,5x TAE. Nach dem Gellauf wurden die Gele mittels „Eagle Eye“-Apparatur (*Stratagene, La Jolla*) fotografiert.

*DNS-Ladepuffer:* 0,03% Bromphenolblau; 0,03% Xylencyanol; 10 mM Tris/HCl pH 7,5;  
50 mM EDTA pH 8,0; 30% Glycerin (oder 15% Ficoll 400)

*50x TAE:* 2M Tris/Acetat, 0,05M EDTA; pH 7,8 mit Eisessig einstellen

#### 2.2.4. Ligation

Für die Ligation wurden Vektor und ein Überschuß an Insert mit 200 U Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl 1x Ligasepuffer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

#### 2.2.5. Fällung von DNS

Der Ansatz wurde mit 0,1 Volumen 5 M LiCl-Lösung (oder 3 M NaAcetat) versetzt und entweder 1 Volumen Isopropanol oder 2 Volumen Ethanol zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde der Ansatz für 15 min gekühlt bei 15000 x g zentrifugiert. Die DNS wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in einer geeigneten Menge 10 mM Tris- oder TE-Puffer (s. Midi- und Maxipräparationen von Plasmid-DNS) resuspendiert. Glycogen-Lösung kann als Träger für die Präzipitation verwendet werden, 1,5 µl wurden dem Ansatz zu Beginn zugesetzt.

#### 2.2.6. Phenol/Chloroform Extraktion

Der zu extrahierende Ansatz wurde mit TE-Puffer auf 500 µl aufgefüllt, nach der Zugabe von 500 µl Phenol für 10 s gevortext und die Phasen durch 10 min Zentrifugation bei 15000 x g getrennt. Dieser Vorgang wurde nach der Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform zum Überstand wiederholt, ggf. erfolgte ein weiterer Waschschrift mit Chloroform. Die DNS im Überstand wurde ausgefällt und in einer entsprechenden Menge Puffer resuspendiert.

## 2.3. Arbeiten mit RNS

### 2.3.1. Bereitung RNase-freier Lösungen

Um Wasser und Lösungen von RNasen zu befreien, wurden die Flüssigkeiten bis zu einer finalen Konzentration von 0,1% mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C autoklaviert. Es ist zu beachten, daß einige Substanzen, wie beispielsweise Tris, DEPC gegenüber empfindlich sind.

### 2.3.2. Extraktion von Gesamt-RNS

Für Die Isolation von Gesamt-RNS wurde eine Zellkulturschale (Durchmesser 15 cm, 40-60% konfluent) mit 1,7 ml TriFast lysiert. Die Isolation der RNS erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die RNS wurde in 70 µl DEPC-behandelten Wasser resuspendiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

Alternativ wurde die RNS mit den QIAshredder- und Rneasy RNA Mini Kit nach entsprechendem Protokoll isoliert.

### 2.3.3. Elektrophorese und RNS-Transfer

Für die Elektrophorese von RNS wurden 1% Formaldehydgele (1x MOPS pH 7 mit 1% Agarose, 16,75% Formaldehyd-Lösung (37%)) verwendet. Für die Proben wurden identische Mengen RNS mit DEPC-Wasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt und mit 2x RNS-Ladepuffer versetzt. Nach der Denaturierung der RNS bei 55°C für 10 min wurden die Proben auf Eis gekühlt und sofort auf das Gel geladen. Der Transfer der RNS auf die Nylon-Membran erfolgte über Nacht durch einen Kapillar-Transfer mit 10x SSC als Träger. Die RNS wurde mittels „Stratalinker“ (*Stratagene, La Jolla*) mit der Membran verbunden.

10x MOPS: 200 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 7,0 mit NaOH eingestellt

2x RNS-Ladepuffer: 50% Formamid; 15% Formaldehyd (37%); 1x MOPS pH 7,0; 0,1% Bromphenolblau; 10 µg/ml Ethidiumbromid

20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0 mit NaOH eingestellt

### 2.3.4. Hybridisierung mit <sup>32</sup>P-endmarkierten Sonden

Die Markierung der Oligonukleotid-Sonden erfolgte über die Endmarkierung mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/mmol) durch T4-Polynukleotidkinase nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Membranen wurden in 20 ml Church-Puffer für 60 min bei 65°C prähybridisiert, bevor sie über Nacht in 10 ml Church-Puffer mit den markierten Sonden bei 65°C rollend inkubiert wurden. Das Waschen erfolgte bei 65°C für 10 min zuerst in 2x SSC 1% SDS und danach in 0,2x SSC 0,5% SDS. Nach dem Trocknen wurden das  $^{32}\text{P}$  über das Auflegen eines Röntgenfilmes detektiert. Für Quantifizierungen wurde der Phosphoimager (Fuji BAS 1000; *Fuji Photo Film CO Ltd.*) verwendet.

*Church-Puffer:* 0,5 M Natriumphosphat pH 7,1; 7% SDS; 1 mM EDTA

### 2.3.5. "Strippen" von Membranen

Um Membranen von bereits hybridisierten Sonden zu befreien, wurden sie für 10 min mit heißer 0,1% SDS-Lösung geschüttelt und anschließend 10 min mit heißer 0,1% SDS-Lösung gewaschen.

### 2.3.6. Synthese von cDNS

Für die Synthese von cDNS wurden 3 µg Gesamt-RNS mit 3,75 µl 17 pmol/µl oligo(dT)15-Oligonukleotid gemischt und auf 17,25 µl mit Wasser aufgefüllt. Nach 5 min Denaturierung bei 65°C wurden dem Ansatz 12,75 µl RT-Mix zugesetzt, die Reaktion erfolgte bei 37°C für 55 min. Nach der Inaktivierung für 5 min bei 95°C wurde der Ansatz durch Zugabe von 270 µl Wasser verdünnt. Für die Analyse im LightCycler wurden 2 µl pro Reaktion eingesetzt.

RT-Mix:

5x RT-Puffer	2 µl
β-Mercaptoethanol (0,1M)	1 µl
dNTPs (20 mM)	0,5 µl
Rnasin	0,25 µl
Superscript II	0,5 µl

### 2.3.7. Analyse von RNS mit dem LightCycler

Bei der quantitativen RT-PCR wird die Häufigkeit einer spezifischen mRNS in der Gesamt-RNS bestimmt. Hierfür wird cDNS synthetisiert und mittels LightCycler (*Roche*) untersucht. Im LightCycler wird eine PCR mit einem Oligonukleotidpaar gefahren, durch das ein Bereich der zu quantifizierenden mRNS spezifisch amplifiziert wird. Der Ansatz enthält SYBR Green 1, einen Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz sich bei der Einlagerung in doppelsträngige DNS 100-fach erhöht. Nach jedem Zyklus der PCR wird die Fluoreszenz im Ansatz, d.h. die Menge

an PCR-Produkt, gemessen. Anfänglich ist die Fluoreszenz zu niedrig, um sich vom Hintergrund abzuheben, ab einem gewissen Punkt ist die Fluoreszenz detektierbar und steigt von Zyklus zu Zyklus exponentiell an. Die Zyklenzahl, an der der Graph der Fluoreszenz nach dem Heraustreten aus dem Hintergrund seinen Wendepunkt hat, wird als „Crossing Point“ (cp) bezeichnet und vom LightCycler-Programm berechnet. Der Crossing Point kann verwendet werden, um den Gehalt der untersuchten mRNA zu quantifizieren. Dafür ist es erforderlich, die Effizienz der PCR-Reaktion zu kennen, weswegen eine Eichgerade erstellt werden muß. Für die Eichgerade wird das PCR-Produkt einer vorangegangenen Reaktion verdünnt, und die Reaktion mit den Verdünnungsstufen  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-9}$  wiederholt. Es empfiehlt sich, die Verdünnungsstufen  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  als Referenz für spätere Reaktionen des gleichen Oligonukleotidpaars aufzuheben, wobei die Zugabe einer Trägersubstanz (z.B. MS2 RNS, 10 ng/ $\mu$ l) die Adsorption der DNS an die Wand des Reaktionsgefäßes und die damit einhergehende Verfälschung des Referenzwertes verhindert. Für die Quantifizierung von Proben ist es erforderlich eine Referenz (z.B. die  $10^{-7}$  Verdünnung) aus der Eichgeraden mitzuführen oder bei der Erstellung der Eichgeraden eine der zu untersuchenden Proben zu quantifizieren. Um Unregelmäßigkeiten bei der cDNS-Synthese zu kompensieren, sollten die quantifizierte mRNA-Menge mit der eines Haushaltsgens wie z.B. der Aldolase abgeglichen werden. Die Spezifität der Reaktion kann über die Schmelzkurve des Produktes und der Betrachtung des Amplifikats auf dem Agarosegel überprüft werden. Die Berechnungen der mRNA-Mengen anhand des cp-Wertes übernimmt das LightCycler Programm, die Quantifizierung kann jedoch nach folgenden Formeln manuell vorgenommen werden:

Die Effizienz der PCR-Reaktion berechnet sich folgendermaßen:

$$E = 10^{-1/m}$$

E: Effizienz der PCR-Reaktion  
m: Steigung der Eichgeraden

Die Menge des PCR-Produkts am „Crossing Point“ berechnet sich nach der Formel:

$$K = T_0 \cdot E^{cp}$$

K: Menge des PCR-Produkts am Crossing Point (konstant)  
 $T_0$ : Ausgangskonzentration der mRNA in der cDNS  
 E: Effizienz der PCR-Reaktion  
 cp: Zyklenzahl zum Erreichen des Crossing Points

Für den Abgleich mit einem Haushaltsgen ergibt sich folgende Formel:

$$T_{0x} \cdot (E^{cp})_x = T_{0HG} \cdot (E^{cp})_{HG}$$

X: zu bestimmendes Gen  
 HG: Haushaltsgen

Also gilt:

$$T_{0x} = T_{0HG} \cdot (E^{cp})_{HG} \cdot (E^{cp})_x^{-1}$$

Für die Quantifizierungen wurde folgender Ansatz verwendet:

Wasser	5,2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,8 µl
Oligonukleotidpaar (je 5 pmol/µl)	1 µl
Roche-Mix	1 µl
cDNS	2 µl

Die Programme lauteten folgendermaßen:

Aldolase (Oligonukleotidpaar 1793/1794 von R. Mailhammer)

Aktivierung/Denaturierung	95°C 10 min	
Amplifikation	95°C 1 s	50 Zyklen
	68°C 10 s	
	72°C 11 s	
Schmelzkurve	70°C 10 min	
	Auf 97°C in 0,1°C Schritten	
Kühlen	40°C 10 min	

p21 (*Rattus norvegicus* Cdkn1a; PubMed-ID: NM\_080782; Primerpaar: 1962/1963)

Aktivierung/Denaturierung	95°C 10 min	
Amplifikation	95°C 1 s	50 Zyklen
	68°C 10 s	
	72°C 11 s	
Schmelzkurve	70°C 10 min	
	Auf 97°C in 0,1°C Schritten	
Kühlen	40°C 10 min	

## 2.4. Arbeiten mit Proteinen

### 2.4.1. Lyse von Zellen (denaturierend)

Vor der Lyse wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem vollständigen Abnehmen des PBS wurden die Zellen durch Zugabe von ca. 100 µl 2x SDS-Ladepuffer pro  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen



unter zur Hilfenahme eines Schabers auf der Platte lysiert. Vor dem Auftragen wurden Proben aufgekocht und sonifiziert.

*2x SDS-Ladepuffer:* 100 mM Tris/HCl pH 6,8; 200 mM Dithiothreitol; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycerin; 5 mM EDTA

#### 2.4.2. Denaturierende Gelelektrophorese und Transfer

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Trenn- und Sammelgele nach gängigen Protokollen gegossen. Der Gellauf erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer mit 30 mA Stromstärke pro Gel (Dicke: 2 mm). Die Proteine wurden mittels Naß-Transfer in 1x Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Nachweis von Proteinen erfolgte über die Hybridisierung der Membran mit Antikörpern.

*2x Tris/SDS pH8,8:* 750 mM Tris Base; 0,2% SDS; pH mit HCl auf 8,8 eingestellt

*2x Tris/SDS pH6,8:* 250 mM Tris Base; 0,2% SDS; pH mit HCl auf 6,8 eingestellt

*10x SDS Laufpuffer:* 1,92 M Glycin; 250 mM Tris-Base; 1% SDS

*10x Western:* 1,92 M Glycin; 250 mM Tris-Base

*Transferpuffer:* 1x Western; 10-20% Methanol

#### 2.4.3. Lyse von Zellen (nativ)

Die Zellen wurden trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und dreimal in PBS gewaschen. Für die Lyse wurden die Zellen in 100 µl Lysepuffer (nativ) pro  $3 \cdot 10^6$  resuspendiert, gevortext und 20 min auf Eis inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 16400 x g für 10 min bei 4°C wurden unlösliche Bestandteile sedimentiert. Der Überstand wurde für Immunpräzipitationen und native Gelelektrophorese verwendet.

*Lysepuffer (nativ):* 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1% NP40; 150 mM NaCl; 1x Proteaseinhibitor; 1x Phosphataseinhibitor

*Proteaseinhibitor (50x):* 1 Tablette "Complete EDTA-free Protease inhibitor Cocktail" (Roche) in 1 ml Wasser

#### 2.4.4. Native Gelelektrophorese und Transfer

Für die native Gelelektrophorese wurden einphasige Acrylamidgele (6,5%, 375 mM Tris/HCl pH 8,8) verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Lysate mit 2x Auftragspuffer (nativ) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte im Kühlraum bei 100 V (einlaufen bei 80 V) in 1x Western-Puffer.

Die Proteine wurden mittels Naß-Transfer in 1x Western-Puffer auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Nachweis von Proteinen erfolgte über die Hybridisierung der Membran mit Antikörpern.

*2x Auftragspuffer (nativ):* 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 30% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau

#### 2.4.5. Immunpräzipitation

Als Kontrolle für das eingesetzte Material wurde etwas natives Lysat 1:1 mit 2x SDS-Ladepuffer gemischt und aufgekocht.

Um die Protein G Sepharose für die Immunpräzipitation vorzubereiten, wurden 20 µl Sepharose einmal in PBS gewaschen, danach für mindestens eine Stunde bei 4°C mit 100 µl der entsprechenden Hybridom-Überstände rollend inkubiert und danach zweimal mit je 850µl Lysepuffer (ohne Protease- und Phosphataseinhibitor) gewaschen (Tischzentrifuge: 1 min 6000 rpm). Die Sepharose wurde nun mit 100 µl nativem Zellysat über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 850µl Lysepuffer (ohne Protease- und Phosphataseinhibitor) wurde die Sepharose in 100 µl Lysepuffer/2x SDS-Ladepuffer 1:1 aufgekocht.

#### 2.4.6. Ponceau S-Färbung

Um die Beladung eines Gels zu kontrollieren, wurde die Membran in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen, bis die Membran weiß war, die Proteine aber noch rosa angefärbt waren. Nach der elektronischen Speicherung des Bildes wurde die Membran mit Wasser und TBST entfärbt.

*Ponceau S-Lösung:* 0,1% PonceauS; 5% Essigsäure

#### 2.4.7. Hybridisierung mit Antikörpern

Vor der Hybridisierung wurden die Membranen durch 30 min Inkubation in TBST/5% Milchpulver mit Protein abgesättigt. Die Inkubation mit Antikörpern (in TBST/5% BSA, Natriumazid) erfolgte entweder tagsüber bei Raumtemperatur für mindestens 2 h oder über Nacht im Kühlraum. Die Membranen wurden zweimal kurz mit Wasser und drei mal 5 min mit TBST gewaschen. Nach der Inkubation mit Sekundäantikörpern (Verdünnung 1:5000 bis 1:10000 in TBST/5% Milchpulver) wurden die Membranen zweimal kurz mit Wasser, dreimal 5 min mit TBST und fünfmal kurz mit Wasser gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mittels ECL<sup>TM</sup> Kit, ggf. gemischt mit Lumingen<sup>TM</sup> TMA-6 Kit sowie Chemolumineszenz-Filmen.

<i>10x TBS:</i>	100 mM Tris, 1,4 M NaCl
<i>1x TBST:</i>	1x TBS; 0,1% Tween20

#### 2.4.8. "Strippen" von Membranen

Um Antikörper von Membranen zu entfernen, wurden die Membranen für 10 min in „Western-Strip“-Puffer bei 55°C geschüttelt und anschließend mehrmals mit TBST gewaschen. Vor der Inkubation mit Antikörpern wurde die Membran erneut mit 5% Milchpulver in TBST abgesättigt.

*„Western-Strip“-Puffer:* 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 0,69%  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### 2.4.9. Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenzen wurden Deckgläser mit UV-Licht sterilisiert und in 6- oder 12-Lochplatten abgelegt. Pro Loch wurden ca.  $10^5$  (6-Loch) oder  $5 \cdot 10^4$  (12-Loch) Zellen ausplattiert und nach 1-2 d Doxycyclin zugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer eiskalten 1:1 Mischung Methanol/Aceton für 2 min fixiert. Nach dem Trocknen an der Luft und der Rehydratation mit PBS wurden die Präparate mit PBS/10% FCS für 30 -120 min blockiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern (Hybridomüberstände 1:10 oder Antikörper 1:100 in PBS/1,5% FCS) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Deckgläser wurden dreimal mit PBST gewaschen, danach dunkel bei RT in der feuchten Kammer mit den Sekundärantikörpern (1:250-1:1000 in PBS/1,5% FCS) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden die Präparate mit einer 1:10000-Verdünnung von DAPI in PBS inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Die Deckgläser wurden mit „Mounting Medium“ benetzt, auf die Objektträger gesetzt und mit Nagellack versiegelt. Die Präparate konnten bei 4°C oder -20°C gelagert werden.

<i>PBST:</i>	PBS mit 0,1% Tween20
<i>DAPI-Lösung:</i>	5 mg/ml DAPI

### 2.5. Zellkultur

#### 2.5.1. Allgemeine Kulturmethoden

Adhärente Zellen wurden mit DMEM-Medium (supplementiert mit L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, 10% FCS und ggf. Ciprobay oder Sparfloxacin) bei 37°C, 8% CO<sub>2</sub> kultiviert. Um die Zellen von der Platte abzulösen, wurden sie mit PBS gewaschen und mit

Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Nach dem Ablösen wurden die Zellen mit Zellkulturmedium resuspendiert.

*PBS*: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 2.5.2. Stickstoffkulturen

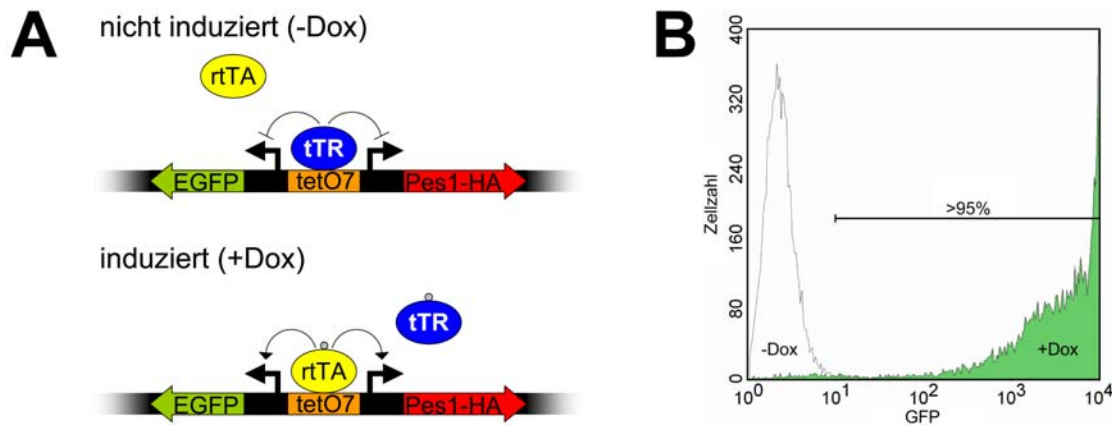
Um Zelllinien für längere Zeit zu konservieren, wurden proliferierende Zellen trypsinisiert und mit „Einfrier“-Medium resuspendiert. Das Einfrieren erfolgte langsam bei -80°C durch Isolation der „Cryotubes“ mit Zellstoff, die endgültige Lagerung erfolgte in Stickstofftanks. Um Stickstoffkulturen wieder in Kultur zu nehmen wurden die Zellen bei 37°C rasch aufgetaut, mit Medium gewaschen und über Nacht mit 20% FCS kultiviert.

### 2.5.3. Transfektion und Selektion

Transfektionen wurden mit Polyfect nach dem Lipofectamin-Protokoll durchgeführt. Dabei wurden pro ml Transfektionsansatz 1,5 µg DNS und 4 µl Polyfect verwendet. Die Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz betrug ca. 5 h. Zur Selektion wurden die Zellen 1-2 d später mit Hygromycin B supplementiertem Medium (200 µg/ml) kultiviert. Die Selektion dauerte je nach Zelllinie 7-14 d.

### 2.5.4. Arbeiten mit pRTS-1

Der Vektor pRTS-1 verfügt über einen bidirektionalen basalen CMV-Promotor, der die gleichzeitige Expression der Pes1-Allele (bzw. der Luziferase in der mock-Situation) und EGFP steuert, anhand welchem man die Induktion der Vektoren per FACS oder Fluoreszenzmikroskop detektieren bzw. quantifizieren kann. Die Regulation des Promotors erfolgt über ein tetO7-Element und die doxycyclinabhängige Bindung der ebenfalls auf dem Plasmid codierten rtet-Transaktivator- und tet-Repressor-Proteine. In der Abwesenheit von Doxycyclin bindet der tet-Repressor und reprimiert aktiv den Promotor. Nach der Zugabe von Doxycyclin löst sich der tet-Repressor und der rtet-Transaktivator bindet an das tetO7-Element, was zu einer Aktivierung der Transkription führt. Somit wechselt die Aktivität des Promotors von aktiver Repression zu Transaktivierung, was trotz hoher Promotoraktivität nach Induktion zu einer nicht nachweisbaren Basalaktivität führt. Die Expressionsstärke des Vektors kann über die Doxycyclinkonzentration titriert werden. In dieser Arbeit wurde pRTS-1 stets mit 1 µg/ml Doxycyclin induziert, was einer maximalen Expression entspricht.



**Abb. 4: Funktionsweise von pRTS-1**

(A) Der pRTS-1 Vektor ermöglicht simultan die konditionale Expression eines Gens und EGFP über basale CMV-Promotoren. Die Regulation erfolgt über die Bindung der ebenfalls auf dem Plasmid codierten tet-Silencer (tTR) bzw. rtet-Transaktivator (rtTA) in Ab- bzw. Anwesenheit von Doxycyclin. (B) Beispielhafte FACS-Analyse einer TGR-1-Zelllinie: nach 24 h Induktion exprimieren mehr als 95% der Kultur EGFP.

In der Säugerzelle repliziert der Vektor episomal dank seines EBV-basierten OriP/EBNA1-Systems und ist über Hygromycin B selektierbar. Frisch selektionierte Kulturen der Rattenfibroblasten-Linie TGR-1 induzierten quantitativ (>95%) die Expression von pRTS-1, wie über eine FACS-Analyse auf EGFP-Fluoreszenz 24 h nach Induktion nachgewiesen wurde. Der induzierende Anteil der Kultur verminderte sich mit der Dauer der Kultivierung, weswegen es erforderlich war, diesen immer wieder zu untersuchen und bei Bedarf neue Zelllinien zu generieren (Abb. 4A, B; Bornkamm *et al.*, 2005).

Um das Ausmaß der Induktion des Vektors in der Kultur zu testen wurden Zellen für 24h mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Doxycyclin kultiviert, trypsiniert und nach der Zugabe von Propidiumiodid (Endkonzentration 1  $\mu\text{g/ml}$ ) im FACS analysiert. Die Einstellungen wurden für jede Messung optimiert, und uninduzierte Zellen als Kontrolle mitgeführt.

### 2.5.5. Proliferationsversuch

Für den Proliferationsversuch wurden in einer 24-Lochplatte je  $1,2 \cdot 10^4$  Zellen pro Loch mit 1 ml Medium mit Doxycyclin ausplattiert. Nach 6 d wurden die Zellen trypsiniert und ausgezählt bzw. mit  $-20^\circ\text{C}$  kaltem Methanol für 10 min fixiert und nach dem Trocknen mit GIEMSA angefärbt. Bei der GIEMSA-Färbung wurden die Platten 30 min mit GIEMSA 1:20 inkubiert und mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

### 2.5.6. Untersuchung Pes1-exprimierender Kulturen auf Apoptose

Um die Induktion von Apoptose durch die Expression von Wildtyp-Pes1 bzw. der Mutanten in TGR-1-Zellen zu testen, wurden in vier Löchern einer Sechsllochplatte je  $5 \cdot 10^4$  Zellen der entsprechenden Zelllinie ausplattiert. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde im Abstand von je 24 h ein Loch mit PBS gewaschen und die Vektoren durch Zugabe von Doxycyclin ins Kulturmedium induziert. Während des Versuches wurden die Zellen täglich lichtmikroskopisch auf Apoptose untersucht. Die FACS-Analyse erfolgte nach dem Standardprotokoll, mit der Ausnahme, daß der Kulturüberstand in die Analyse mit einbezogen wurde.

### 2.5.7. BrdU/light-Versuch (nach Pestov und Lau, 1994)

Für den BrdU/light-Versuch wurden je  $10^5$  Zellen pro Kulturschale (10cm) ausplattiert und am nächsten Tag Doxycyclin zugegeben. Nach 30 h wurde dem Medium für ca. 72 h  $100 \mu\text{M}$  BrdU zugesetzt. Nach 3-4 h Inkubation mit  $4 \mu\text{g/ml}$  Hoechst33258 wurden die Zellen für 15 min mit einer Neonröhre (30W, Distanz 11 cm) bestrahlt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen ohne Selektionsbedingungen und Doxycyclin kultiviert, bevor die entstandenen Kolonien mit Methanol fixiert und mit GIEMSA angefärbt wurden (s. Proliferationsversuch).

### 2.5.8. Untersuchung der Zellzyklusprofile

Für die Analyse der Zellzyklusprofile wurden Kulturen von TGR-1-Zelllinien für ca. 7 d subkonfluent gehalten, um eine asynchrone Proliferation zu sichern. Eine subkonfluent Zellkulturschale (10 cm) pro Zelllinie wurde für 48 h mit Doxycyclin behandelt, die Zellen trypsinisiert und nach der Inaktivierung des Trypsins durch Medium mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in  $600 \mu\text{l}$  PBS resuspendiert und durch langsame Zugabe von  $-20^\circ\text{C}$  kaltem Ethanol fixiert. Nach 10-20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit PBS gewaschen (4 min,  $1000 \times g$ ). Nach der Resuspendierung der Zellen in  $400 \mu\text{l}$  PBS/1% FCS/RNase A ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) wurde die RNS während 30-60 min Inkubation bei Raumtemperatur verdaut. Dem Ansatz wurde Propidiumiodid (Endkonzentration  $20 \mu\text{g/ml}$ ) zugesetzt, bevor der Ansatz im FACS auf die PI-Fluoreszenz untersucht wurde.

### 2.5.9. *In vivo*-Markierung von RNS mit $^{32}\text{P}$

Für die *in vivo* Markierung der RNA mit  $^{32}\text{P}$  wurden in 2 Löchern einer 6 Lochplatte je  $3 \cdot 10^5$  Zellen der stabil transfizierten TGR-1-Zelllinien ausplattiert. Die Zellen wurden mit  $1 \mu\text{g/ml}$  Doxycyclin für 24 h kultiviert, bevor das Medium gegen phosphatfreies Medium (10% dialysiertes Serum, Doxycyclin) ausgetauscht wurde. Nach etwa 3 h wurde das Medium durch

je 1 ml frisches phosphatfreies Medium mit 25  $\mu\text{C/ml}$  [ $^{32}\text{P}$ ]-Orthophosphat pro Loch ersetzt. Nach 1 h Inkubation (im Inkubator des Isotopenlabors) wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und in Standard-Zellkulturmedium inkubiert. Die Lyse erfolgte 30 min bzw. 3 h später gemäß des Trifast- oder RNeasy-Protokolls. Mit der isolierten RNS wurde ein denaturierendes Formaldehyd-Gel gefahren, welches zur Ladungskontrolle fotografiert und vor der Exposition auf dem „Gel Dryer Model 543“ (*Biorad*) mit einer Vakuumpumpe getrocknet wurde.

## Ergebnisse

### 1. Mutagenese und Lokalisation von Pes1

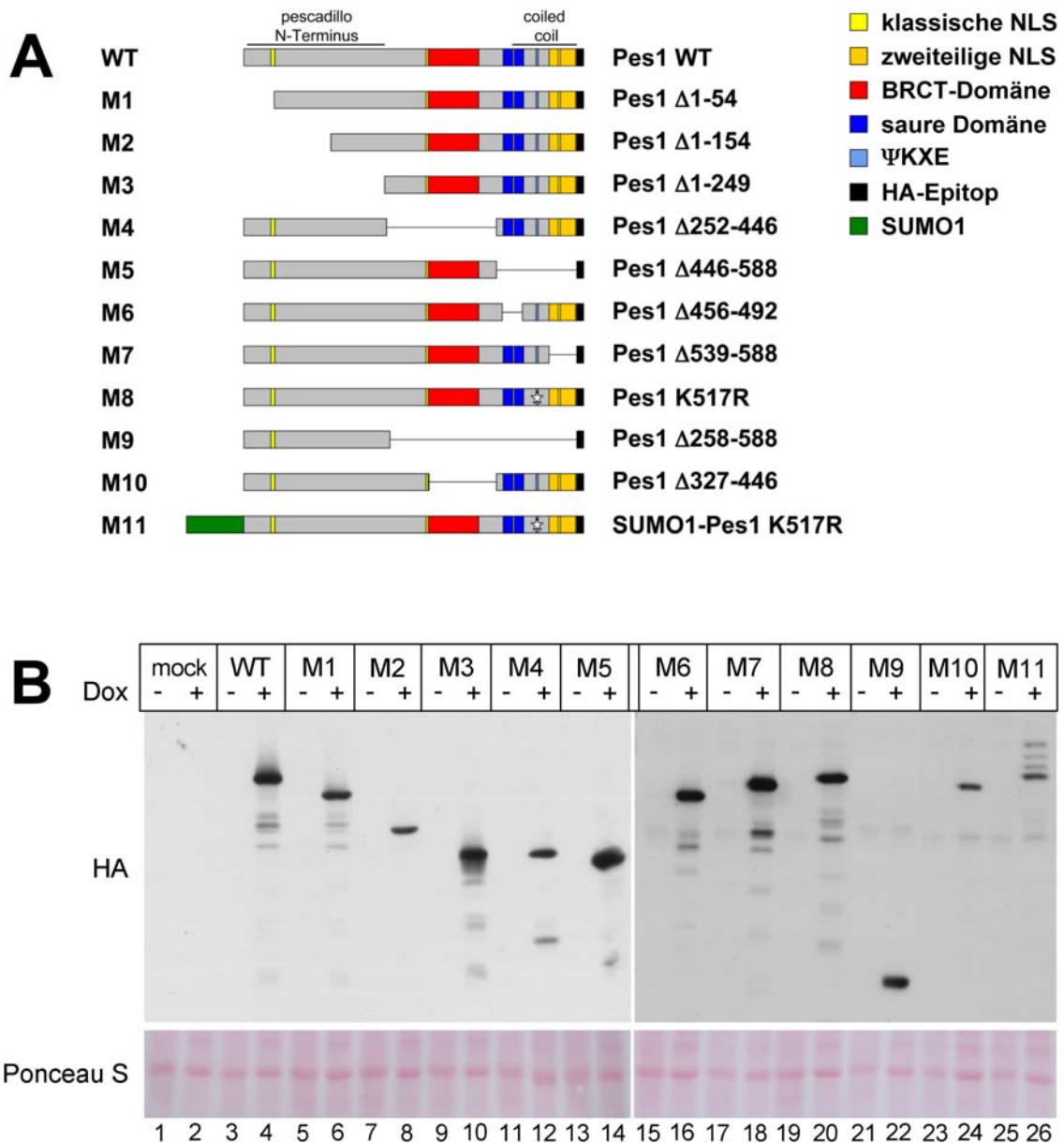
#### 1.1. Generierung und Expression der Pes1-Mutanten

Deletionsmutanten sind ein beliebtes Mittel, um Proteindomänen bestimmte Funktionen zuzuordnen. Zudem sind die bekannten dominant-negativen Mutanten von Bop1 und WDR12 ebenfalls Deletionsmutanten. Pes1 wurde deshalb durch das systematische Einführen von Deletionen mutiert. Ausgangspunkt der Mutagenese von Pes1 war ein pUC18 Vektor, in dem das C-terminal mit einem HA-Epitop fusionierte Pes1-Wildtyp Allel kloniert worden war. Die Mutanten wurden über Restriktionsenzym- und Polymerasekettenreaktion-basierte Ansätze generiert und sequenziert.

Für die Expression der Pes1-Mutanten und des Wildtyps wurden die Allele in den konditionalen Expressionsvektor pRTS-1 kloniert, der durch Doxycyclin induziert werden kann (Bornkamm *et al.*, 2005). Die mit den pRTS-1 Vektoren transfizierten Zelllinien werden im Folgenden mit dem Namen der von ihnen exprimierten Pes1-Allele bezeichnet.

Pes1 verfügt über einen in der Evolution hochkonservierten N-Terminus, welcher in den Mutanten M1 bis M3 in unterschiedlichem Ausmaß deletiert ist (Abb. 5A). In der Mutante M4 wurde das zentrale und in Mutante M5 das C-terminale Drittel von Pes1 deletiert. Letzteres wurde mit den Mutanten M6, M7 und M8 genauer untersucht. Die Deletion in Mutante M6 umfaßt die saueren Domänen und in M7 die zweiteilige NLS. In Mutante M8 ist das Konsensus-SUMOylierungsmotiv mutiert. Die Mutante M9 umfaßt nur den konservierten N-Terminus von Pes1, in Mutante M10 wurde die BRCT-Domäne deletiert. Da bereits bekannt ist, daß Pes1 SUMOyliert wird und daß Fusionen mit SUMO1 das Verhalten der Fusionsproteine verändern können, wurde in Mutante M11 das gesamte SUMO1-Leseraster 5' an das Pes1-Leseraster der Mutante M8 fusioniert (Dobrevva *et al.*, 2003; Kinoshita *et al.*, 2001). Die Absicht dabei war, über die Mutation der putativen endogenen SUMOylierungsstelle den Effekt der endogenen SUMOylierung zu unterbinden und somit nur das konstitutiv SUMOylierte Pes1 zu betrachten.





**Abb. 5: Mutagenese von Pes1**

(A) Übersicht über die C-terminal mit einem HA-Epitop fusionierten Pes1-Mutanten. (B) Expression der rekombinanten Proteine in TGR-1 Zellen 24 h nach Induktion. Die Ponceau S-Färbung dient der Ladungskontrolle.

Abbildung 5B zeigt die Expression der rekombinanten Proteine 24 h nach Induktion. Man beachte, daß Mutante M7 trotz ihrer kleineren Deletion im Gel schneller wandert als Mutante M6. Der Grund hierfür liegt höchstwahrscheinlich darin, daß bei Mutante M6 ein extrem saurer Bereich deletiert wurde (Spur 16 und 18).

Das Fusionsprotein aus Pes1 und SUMO1 ist instabil. Die stärkste Bande in Spur 26 liegt auf der gleichen Höhe wie bei Mutante M8, welche Ausgangspunkt für die

Klonierung der Mutante M11 war. Somit scheint beim Hauptanteil von Mutante M11 SUMO1 vom N-Terminus des Proteins abgespalten worden zu sein. Für die Aktivierung von SUMO1 in der Zelle wird das Protein nach zwei aufeinanderfolgenden Glycinen im C-Terminus gespalten. Die Spaltung des Fusionsproteins könnte über diesen physiologischen Mechanismus erfolgen. SUMO1 ist ein Protein mit einer Größe von 101 Aminosäuren und seine berechnete Proteingröße liegt bei ca. 11,5 kD. Die beobachtete Veränderung der Proteingröße durch SUMOylierung beträgt im PAA-Gel typischerweise aber ca. 20 kD. Das vollständige Fusionsprotein sollte somit ca. 20 kD größer sein als die Pes1-Mutante M8. Neben dem Spaltprodukt treten jedoch noch drei Banden mit größerem Molekulargewicht auf. Die Abspaltung von SUMO1 scheint demnach über verschiedene Zwischenstufen abzulaufen bzw. Modifikationen von Pes1 hervorzurufen. Welche Bande das Vollängenprotein darstellt und welche Modifikationen bzw. Zwischenformen während der Abspaltung auftreten, bedarf noch weiterer Untersuchung.

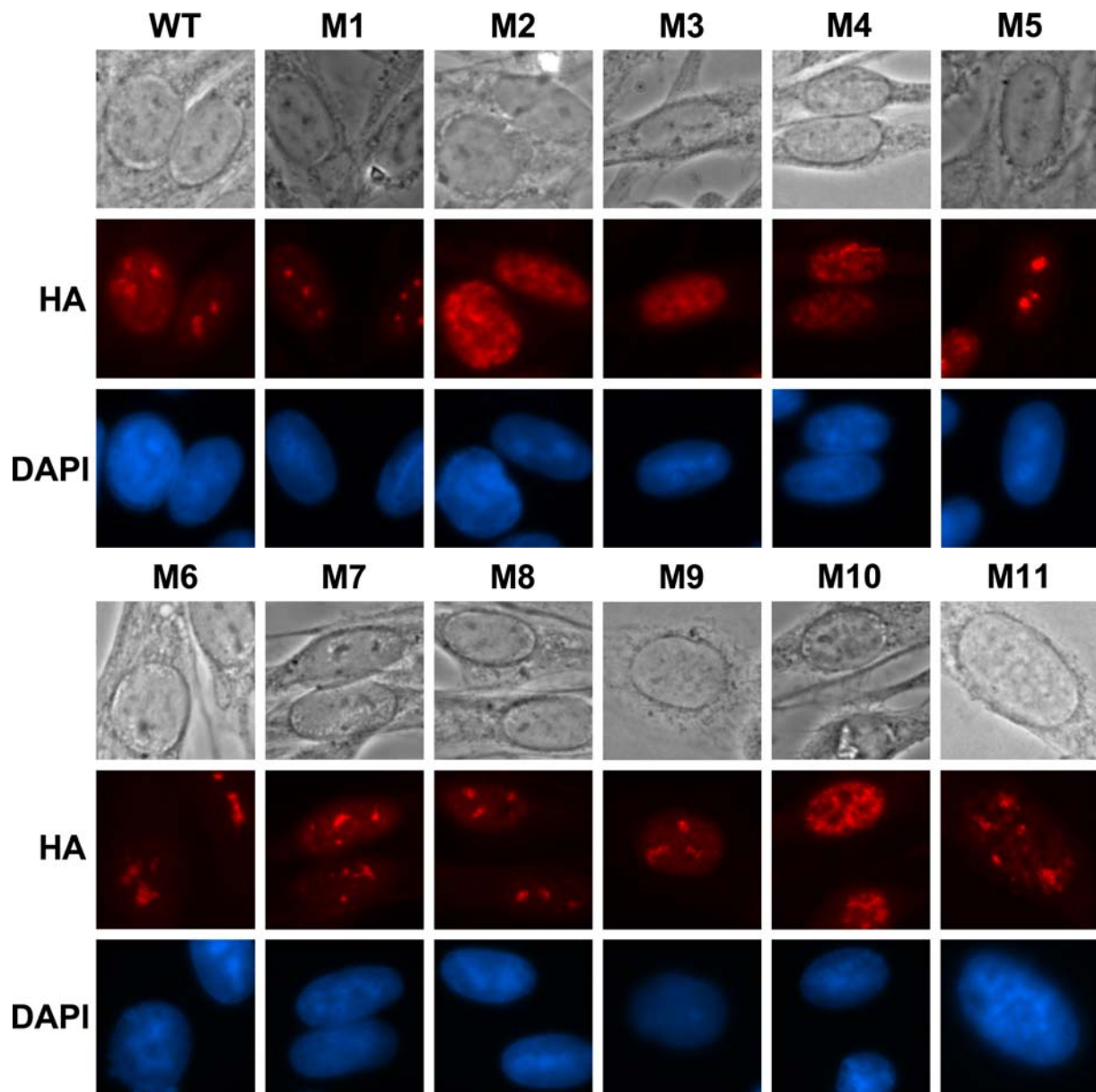
## **1.2. Lokalisation von Wildtyp-Pes1 und seiner Mutanten**

Eine ganze Reihe von Domänen wurde für Pes1 vorhergesagt. Welche dieser Domänen spielt eine Rolle für die Lokalisation des Proteins?

Um diese Frage zu beantworten, wurde die Lokalisation von Wildtyp-Pes1 und seiner Mutanten in der Immunfluoreszenz bestimmt. Hierzu wurde die Expression der rekombinanten Proteine für 24 h mit Doxycyclin induziert. Nach der Fixierung wurden die Proteine über Antikörper gegen ihr HA-Epitop angefärbt. Im Auflicht sind die Nukleoli als dunkle Areale im Nukleus sichtbar und können mit der Lokalisation der Pes1-Mutanten verglichen werden.

Das Wildtyp-Pes1-Protein lokalisierte im Nukleolus, wobei in stark exprimierenden Zellen zusätzlich eine nukleoplasmatische Pes1-Färbung beobachtet wurde (Abb. 6). Die Verkürzung des Proteins um die N-terminalen 54 Aminosäuren in Mutante M1 veränderte seine Lokalisation nicht. Die Ausdehnung der Deletion auf 154 bzw. 249 Aminosäuren in den Mutanten M2 bzw. M3 führte jedoch zu einer diffusen nukleoplasmatischen Lokalisation der trunkierten Proteine. Somit ist der Bereich

zwischen Aminosäure 54 und 154 für die nukleoläre Lokalisation des Proteins essentiell. Ob der Bereich zwischen Position 154 und 249 für die nukleoläre Lokalisation von Pes1 ebenfalls eine Rolle spielt, kann anhand der bestehenden Deletionsmutanten nicht bestimmt werden.



**Abb. 6: Lokalisation der mutanten Pes1-Proteine**

Die angegebenen TGR-1-Zelllinien wurden 24 h nach der Induktion fixiert. Die rekombinanten Pes1-Proteine mit Antikörpern gegen das HA-Epitop angefärbt, die Kerne wurden mit DAPI dargestellt.

Die Deletion der Aminosäuren 252-446 in Mutante M4 führte zu einer diffusen Kernfärbung, wobei das rekombinante Protein leicht im Nukleolus akkumulierte. Die Mutante M10, bei der die Deletion die BRCT Domäne enger umgrenzt als bei

Mutante M4, lokalisiert ebenfalls diffus im Kern, jedoch ohne Akkumulation im Nukleolus. Damit trägt die BRCT-Domäne eine Funktion für die nukleoläre Lokalisation. Ihr Fehlen allein bedingt jedoch keine Störung der Lokalisation von Pes1, da Mutante M9, welche nur aus dem N-Terminus von Pes1 besteht, eine nukleoläre Lokalisation zeigte.

Mutationen im C-Terminus haben keinen Effekt auf die Lokalisation von Pes1, da die mutanten Proteine M5, M6, M7 und M8 eine nukleoläre Färbung aufwiesen. Mutante M5 zeigte hierbei stets die ausgeprägteste nukleoläre Lokalisation, auch in extrem stark exprimierenden Zellen war die nukleoplasmatische Färbung im Vergleich zum Wildtyp Protein stets gering.

Mutante M11 lokalisierte ebenfalls nukleolär. Aufgrund der Beobachtung im Western-Blot (Abb. 5B, Spur 26) ist jedoch zu erwarten, daß die nukleoläre Färbung vor allem von dem Mutante M8 ähnelnden Spaltprodukt herrührt.

Über die Immunfluoreszenz konnten zwei Bereiche definiert werden, die die Lokalisation des Proteins beeinflussen. Der erste Bereich liegt im hochkonservierten N-Terminus des Proteins zwischen den Aminosäuren 54 und 154 und erstreckt sich ggf. noch weiter bis Aminosäure 249. Der zweite Bereich umfasst die BRCT-Domäne, die jedoch für die nukleoläre Lokalisation des N-terminalen Pes1-Fragments nicht erforderlich ist. Desweiteren scheint die Deletion des C-Terminus die nukleoläre Lokalisation zu intensivieren.

### **1.3. Lokalisation von BRCT-Punktmutanten**

Die Beobachtungen in der Immunfluoreszenz lassen sich mit folgendem Modell erklären: Der N-Terminus von Pes1 ist essentiell für die nukleoläre Lokalisation. Aus diesem Grund lokalisieren die Mutanten M2 und M3 diffus im Kern. Der C-Terminus trägt möglicherweise Information für den Export von Pes1 aus dem Nukleolus, weshalb die Mutante M5 eine besonders starke nukleoläre Färbung zeigt. Die Lokalisationssignale des N- und des C-Terminus stehen im Gleichgewicht zueinander. Wie das Protein lokalisiert, hängt nun davon ab, wie die BRCT-Domäne das Gleichgewicht verschiebt. Ihr Fehlen im Kontext von N- und C-Terminus bei Mutante M4 und M10 führt zu diffuser nukleärer Lokalisation, während es bei

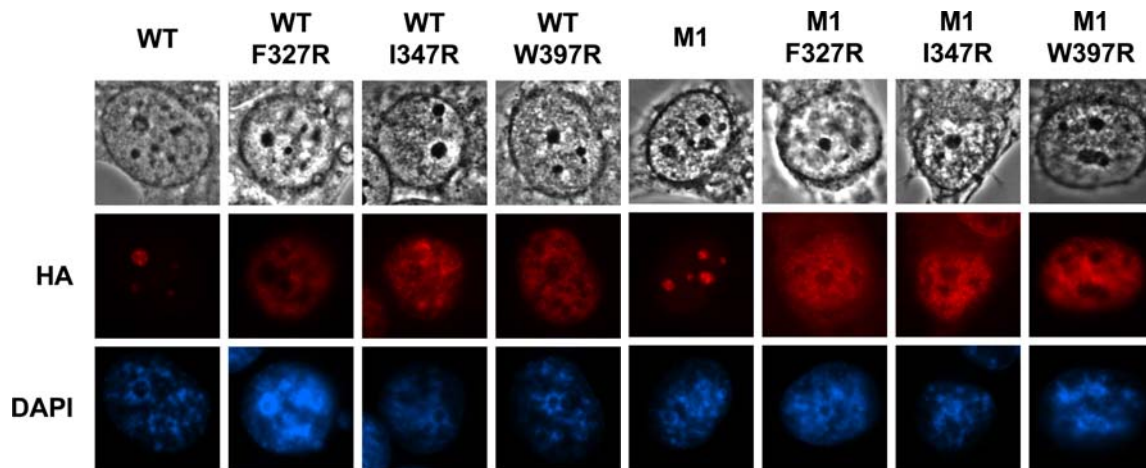
Mutante M9, im Kontext des N-Terminus allein, die nukleoläre Lokalisation nicht beeinflusst.

Um diese Annahme zu testen, wurden drei verschiedene Punktmutationen in die BRCT-Domäne des Wildtyp Proteins sowie der Mutanten M1 und M5 eingeführt. Das Phenylalanin an Position 327 und das Isoleucin an Position 347 wurde zu Arginin mutiert. Homologe Mutationen in Nop7p führen zu thermosensitiven Allelen. Die Mutation des Tryptophans an Position 397 zu Arginin entspricht der Mutation W1837R in BRCA1, die eine Tumor-Prädisposition zur Folge hat. Die homologe Mutation in Nop7p führt ebenfalls zu einem thermosensitiven Allel (Du und Stillman, 2002; Kinoshita *et al.*, 2001). Alle drei Punktmutationen führen in der Säugerzelle zu einer diffusen nukleoplasmatischen Lokalisation von Pes1 (Michael Hölzel, Publikation in Vorbereitung), zeigen also einen äquivalenten Phänotyp wie die Pes1-Mutanten M4 und M10. Mutante M5 besteht hauptsächlich aus der NPLP- und BRCT-Domäne, die Deletion des C-Terminus war ausreichend, um eine Intensivierung der nukleolären Lokalisation von M5 herbeizuführen. Sollte das oben genannte Modell zutreffen, wäre nach Mutation der BRCT-Domäne eine nukleoläre Lokalisation von M5 zu erwarten. Mutante M1 dient als Kontrolle.

Die entsprechenden H1299-Zelllinien wurden für 24 h induziert. Nach der Fixierung wurden die rekombinanten Proteine mit Antikörpern gegen ihr HA-Epitop angefärbt.

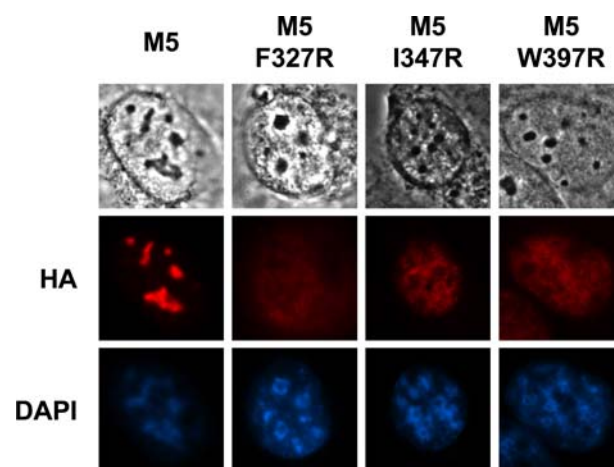
Wildtyp-Pes1 lokalisierte im Nukleolus der Zellen, die Mutation der BRCT Domäne an den Positionen 327, 347 und 397 führte zu diffuser nukleoplasmatischer Lokalisation (Abb. 7). Das gleiche Ergebnis lieferte die Kombination der nukleolär lokalisierenden Mutanten M1 und M5 mit den Mutationen der BRCT-Domäne.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Rolle der BRCT-Domäne für die Lokalisation von Pes1. Die Deletion des C-Terminus kann die nukleoläre Lokalisation nicht wiederherstellen. Somit ist entweder die Annahme falsch, daß der C-Terminus für den Export von Pes1 aus den Nukleolus verantwortlich ist, oder die Mutation der BRCT-Domäne ist dominant über die Deletion des C-Terminus. Alternativ könnte die nukleoläre Lokalisation der NPLP-Domäne auch von unspezifischen Effekten herrühren.



**Abb. 7: Lokalisation der Doppelmutanten**

Die angegebenen H1299-Zelllinien wurden 24 h nach der Induktion fixiert und die rekombinanten Pes1-Proteine mit Antikörpern gegen das HA-Epitop angefärbt. Die Kerne wurden mit DAPI dargestellt.



## 2. Identifikation dominant-negativer Mutanten

Das Hefehomolog von Pes1 ist für das Überleben der Hefezelle essentiell. Pes1 bzw. pescadillo ist in der Maus bzw. im Zebrafisch für die Embryonalentwicklung essentiell. Pes1 und seine Homologe sind an der Ribosomenbiogenese beteiligt und erfüllen dort eine essentielle Funktion. Konnten in der Deletionsmutagenese Mutanten erzeugt werden, die mit den essentiellen Funktionen des endogenen Pes1 interferieren? Die Expression dieser Mutanten sollte die Proliferation von Säugerzellen hemmen, und auch einen dominant-negativen Effekt auf die Prozessierung der pre-rRNS ausüben.

## **2.1. Einfluß der Pes1-Mutanten auf die Zellzykluskontrolle**

### **2.1.1. Auswirkung der Pes1-Mutanten auf die Proliferation**

Pes1 ist an diversen zellulären Prozessen beteiligt. Eine Störung der Funktion des endogenen Pes1 durch die Expression dominant-negativer Mutanten sollte die Proliferation der Zellen beeinträchtigen. Als erster Test zur Identifikation dominant-negativer Mutanten wurde die Auswirkung der verschiedenen Pes1-Mutanten auf die Proliferation untersucht. Dazu wurden entsprechende TGR-1-Zelllinien in geringer Dichte ausplattiert und sofort induziert. Nach 6 Tagen wurden die Zellen ausgezählt und mit der Luziferase-exprimierenden mock-Zelllinie verglichen (Abb. 8).

Die Expression von Wildtyp-Pes1 führte in diesem Experiment zu einer im Vergleich zur mock-Zelllinie um 37,5% reduzierten Zellzahl. Die Expression der übrigen Mutanten verminderte die Zellzahl um ein ähnliches Maß wie der Wildtyp. Die Ausnahme hiervon waren die Mutanten M1 und M5, deren Expression zu einer Reduktion der Zellzahl um 89,6% bzw. 77,6% führten.

Die starke Verminderung der Zellzahl bei Expression der Mutanten M1 und M5 im Vergleich zu Wildtyp-Pes1 weist auf einen dominant-negativen Phänotyp der Mutanten hin. Dieses Experiment zeigt auch, daß bereits die Überexpression von Wildtyp-Pes1 eine verminderte Proliferation hervorruft. Dies beruht nicht auf der simultanen Überexpression zweier Proteine, Pes1 und EGFP, da die Kontrollzelllinie ebenfalls zwei Proteine, Luziferase und EGFP, exprimiert.

### **2.1.2. Die Expression der Pes1-Mutanten führt zu keinem Anstieg der Apoptoserate**

Die Expression von Wildtyp-Pes1 und seiner Mutanten führte im Proliferationsexperiment zu einer verminderten Zellzahl. Als Grund hierfür kommen Apoptose und die Induktion eines Zellzyklusarrestes in Frage. In beiden Fällen würde die Population der proliferierenden Zellen verkleinert und die Zunahme der Zellzahl so verringert. Falls Expression von Pes1 Apoptose auslöst, sind zwei Szenarien

denkbar: Zum einen könnte kurz nach Induktion von Pes1 eine große Anzahl Zellen apoptotisch werden. Zum anderen könnte die Apoptose auch im geringeren Ausmaß während der gesamten Proliferationsdauer auftreten. Für beide Möglichkeiten läßt sich die zu erwartende Apoptoserate berechnen. In der nachfolgenden Berechnung für Wildtyp-Pes1 wurde angenommen, daß die Apoptoserate der Kontrollzelllinie vernachlässigbar ist:

Für die massive Apoptose nach Pes1-Induktion gilt:

$$p \cdot 2^5 = 0,6 \cdot 2^5$$

Für die kontinuierliche Apoptose gilt:

$$(p \cdot 2)^5 = 0,6 \cdot 2^5$$

Somit gilt:

$$p = 0,6$$

$$p = \sqrt[5]{0,6}$$

$$p = 0,90$$

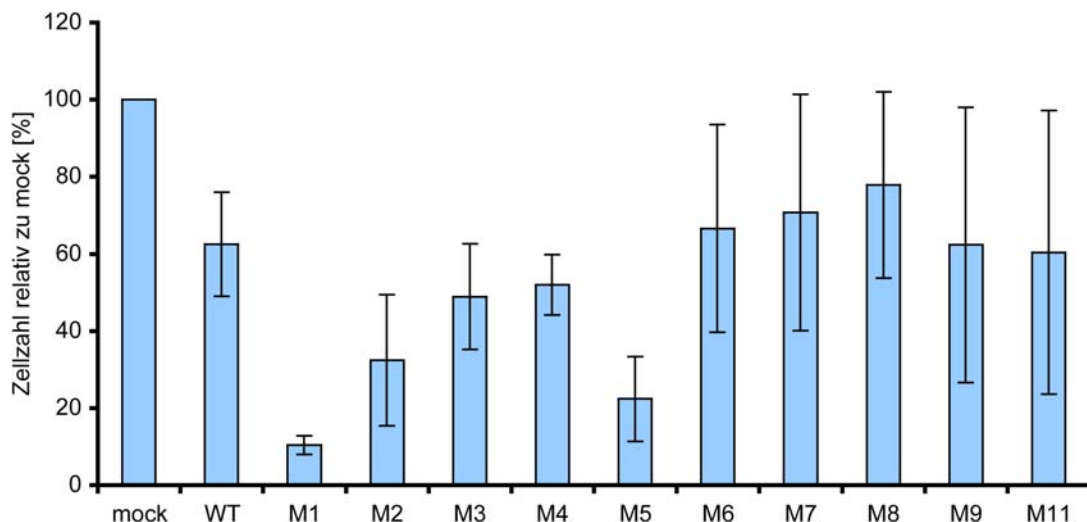
$p$  stellt hierbei den Bruchteil der Zellen dar, die keine Apoptose begehen, und sich somit während den folgenden sechs Teilungen exponentiell vermehren. Durch das exponentielle Wachstum über sechs Generationszeiten kann sich die Kultur um den Faktor  $2^5$  vermehren, bei Überexpression von Wildtyp-Pes1 werden davon jedoch nur 60% erreicht. Um dies durch Induktion von Apoptose zu erklären, müßten entweder 40% der Zellen kurz nach Induktion von Pes1 oder 10% bei jeder Teilung in die Apoptose gehen.

Um den Effekt der Pes1-Überexpression auf die Apoptoserate zu untersuchen, wurden entsprechende TGR-1-Zelllinien für 1 bis 4 Tage mit Doxycyclin induziert. Bei der Betrachtung im Mikroskop zeigte keine der Zelllinien eine, im Vergleich zur mock-Kontrolle signifikant erhöhte Menge an toten Zellen, unabhängig vom gewählten Zeitpunkt.

Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurden die Kulturen im FACS auf tote Zellen hin untersucht. Tote Zellen sind permeabel für Propidiumiodid, das in die DNS der Zellen interkaliert und über seine Fluoreszenz nachgewiesen werden kann. Zur



Vereinfachung werden nur die Daten für die mock-Kontrolle, Wildtyp-Pes1, sowie die Mutanten M1 und M5 gezeigt. Abbildung 9A zeigt die Primärdaten der FACS-Analyse der mock- und der Wildtyp-Pes1 exprimierenden Zelllinien nach vier Tagen Induktion. Das linke Feld zeigt die Verteilung der Population nach „Forward Scatter“ (FSC), einem Maß für die Partikelgröße, und „Side Scatter“ (SSC), einem Maß für die Granularität der Partikel. Die dort umrandete Zellpopulation wurden im rechten Feld auf ihre EGFP-Fluoreszenz (FITC-Kanal) und ihre Propidiumiodid-Fluoreszenz (PI-Kanal) hin untersucht. Die im rechten Feld umrandete Population wurde als PI-positiv betrachtet. Diese Zellpopulation ist aber nicht notwendigerweise apoptotisch. Die Fluoreszenz von EGFP strahlt bei hoher Intensität in den PI-Kanal hinein, was die Definition der toten Zellen über die PI-Fluoreszenz erschwert. Das ist jedoch sowohl bei der Kontrollzelllinie als auch bei Wildtyp-Pes1 und seinen Mutanten der Fall. Eine Zunahme der PI-positiven Zellen relativ zur mock-Kontrolle zeigt somit das Auftreten von Apoptose in der Kultur an. Der Anteil dieser PI-positiven Zellen an der Gesamtpopulation ist in Abbildung 9B dargestellt.



**Abb. 8: Expression der Pes1-Mutanten M1 und M5 inhibiert die Proliferation**

Die angegebenen TGR-1-Zelllinien wurden dünn ausplattiert und sofort induziert. Nach 6 Tagen wurden die Zellzahlen relativ zur Luziferase exprimierenden mock-Zelllinie bestimmt.

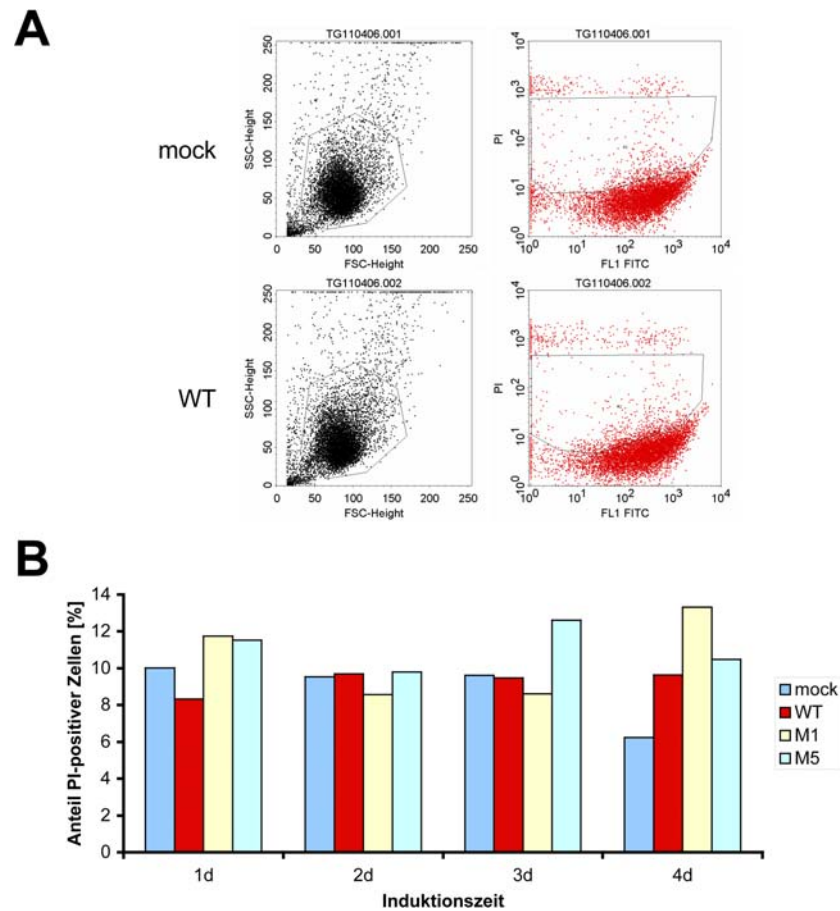
Wie man dem Histogramm entnehmen kann, variiert die Anzahl der PI-positiven Zellen zwischen den verschiedenen Zelllinien nur geringfügig. Um den Effekt von Wildtyp-Pes1 auf die Proliferation über Apoptose erklären zu können, bedarf es einer Apoptoserate in der Gesamtpopulation, die um mindestens 10% über der der mock-

Kontrolle liegt. Bei der Apoptose von adherenten Zellen ist es jedoch häufig zu beobachten, daß apoptotische Zellen von ihren Nachbarn phagozytiert werden. In diesem Versuch wurden die Zellen dünn ausplattiert, um diese Gefahr möglichst gering zu halten. Trotzdem wäre auch ein Prozentsatz von unter 10% Indiz für Apoptose als Ursache für den Proliferationsdefekt. Der Anteil PI-positiver Zellen variiert zwischen den verschiedenen Zelllinien nur geringfügig. Damit kann ausgeschlossen werden, daß die Verminderung der Zellzahl im Proliferationsexperiment von Apoptose herrührt. Dies gilt sowohl für Wildtyp-Pes1 und die dominant-negativen Mutanten M1 und M5, als auch für die restlichen Pes1-Mutanten, deren Daten in Abbildung 9 nicht dargestellt wurden. Damit bestätigt die FACS Analyse die mikroskopische Beobachtung.

### **2.1.3. Die Pes1-Mutanten M1 und M5 induzieren einen reversiblen Zellzyklusarrest**

Neben der Induktion von Apoptose kann der antiproliferative Effekt der Pes1-Mutanten im Proliferationsexperiment auch über die Induktion eines Zellzyklusarrestes erklärt werden.

Die Induktion eines Zellzyklusarrestes kann mit Hilfe des BrdU/light-Versuches nachgewiesen werden (Pestov und Lau, 1994). Bei diesem Experiment wurden entsprechende TGR-1-Zelllinien in geringer Dichte ausplattiert. Die Zellen wurden für mehr als 24 h in der Gegenwart von Doxycyclin kultiviert, um den ektopisch exprimierten Proteinen die Induktion eines Zellzyklusarrestes zu ermöglichen. Danach wurde dem Medium für 72 h das Basenalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) zugesetzt, welches von nicht arretierten Zellen während der S-Phase in ihre DNS inkorporiert wird. BrdU-Einbau in die DNS führt in Verbindung mit Hoechst33258 zu einer hohen Lichtempfindlichkeit der Zellen. Die Bestrahlung mit sichtbarem Licht überlebten nur Zellen, die kein BrdU in ihre DNS inkorporiert haben, also während der letzten 72 h keine S-Phase durchliefen. Überlebende Zellen wuchsen in der Abwesenheit von Doxycyclin zu Kolonien heran, die mittels GIEMSA angefärbt wurden (Abb. 10).

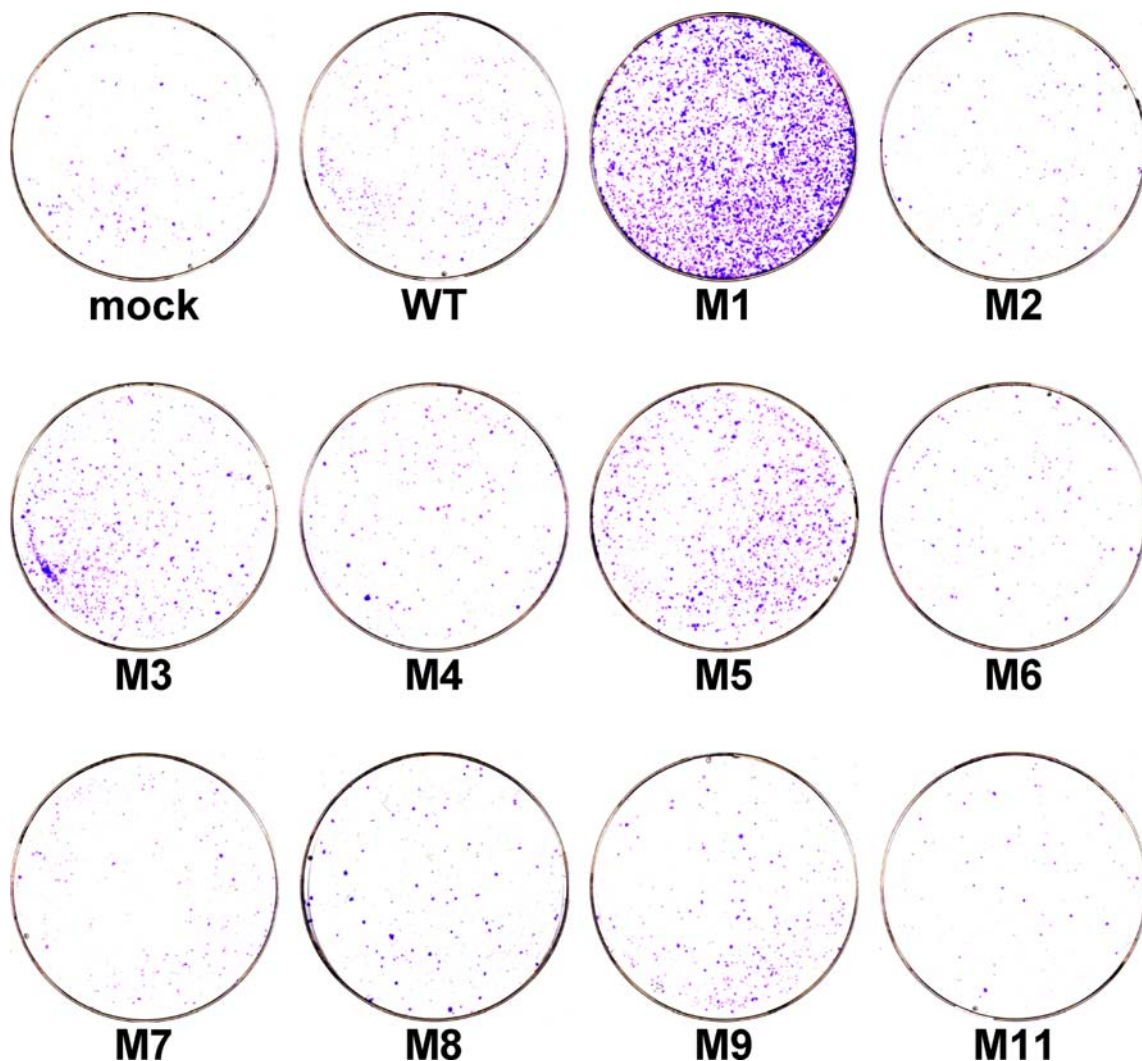


### Abb. 9: Expression von Wildtyp-Pes1 führt nicht zu erhöhter Apoptose

TGR-1-Zelllinien wurden für die angegebenen Zeiträume induziert und die Gesamtpopulation im FACS auf abgestorbene Zellen hin untersucht. (A) Beispielhafte FACS-Ergebnisse nach 4 d Induktion für Luziferase (mock)- bzw. Wildtyp-Pes1 (WT)-exprimierende TGR-1 Zellen. Das linke Diagramm dient der Definition der zu untersuchenden Zellen über deren Vorwärts- und Seitwärts-Streuung (Fenster). Das rechte Diagramm zeigt die EGFP-Expression (FITC-Kanal) und die Propidiumiodid-Inkorporation (PI) dieser Zellen. Der umrandete Bereich wurde als PI-positiv definiert. (B) Histogramm über den Anteil Propidiumiodid-positiver Zellen an der Gesamtpopulation der angegebenen Zelllinien.

Die Luziferase-exprimierende mock-Zelllinie zeigte in diesem Versuch eine geringe Kolonienzahl, die den Hintergrund des Versuches darstellt. Die Expression des Pes1 Wildtyp-Proteins führte zu einer kleinen Anzahl Kolonien, die in etwa der mock Kontrolle entspricht. Im Gegensatz hierzu zeigten die Mutanten M1 und M5 eine große Kolonienzahl. Die durch M1 hervorgerufene Kolonienzahl war dabei größer als die von M5, was einem höheren Potential für die Induktion eines Zellzyklusarrestes entspricht. Mutante M3 rief eine geringfügig über dem Hintergrund liegende Kolonienzahl hervor. Alle anderen Mutanten zeigten keinen Effekt auf den Zellzyklus.

Dieser Versuch zeigt deutlich, daß die Expression der Pes1-Mutanten M1 und M5 einen Zellzyklusarrest induziert. Die im Proliferationsversuch gemessene Verminderung der Zellzahl bei Expression dieser Mutanten beruht somit zumindest teilweise auf der Induktion eines Zellzyklusarrests. Bezüglich der Proliferation stellen die Pes1-Mutanten M1 und M5 damit dominant-negative Mutanten dar.



**Abb. 10: Die Pes1-Mutanten M1 und M5 induzieren einen reversiblen Zellzyklusarrest**

Die angegebenen TGR-1-Zelllinien wurden subkonfluent ausplattiert und 30 h vor der Zugabe von 100  $\mu$ M BrdU mit Doxycyclin induziert. Nach 72 h wurden die Zellen für 3 h mit Hoechst33258 inkubiert, was bei BrdU-Einbau in die DNS der Zellen Photosensitivität hervorruft. Die anschließende Bestrahlung mit sichtbarem Licht überlebten nur im Zyklus arretierte Zellen. Diese bildeten nach dem Entzug von Doxycyclin Kolonien, die mit Methanol fixiert und GIEMSA angefärbt wurden.

#### 2.1.4. Die Pes1-Mutanten M1 und M5 arretieren die Zelle in der G1-Phase

Der BrdU/light-Versuch demonstriert, daß die Mutanten M1 und M5 einen Zellzyklusarrest induzieren. Um die Zellzyklusphase zu identifizieren, in der dieser Arrest auftritt, wurde die Veränderung der Zellzyklusprofile durch die Expression von Wildtyp-Pes1 und der Mutanten untersucht.

In diesem Experiment wurden asynchron proliferierende TGR-1-Zelllinien für 48 h mit Doxycyclin kultiviert, fixiert und nach einer RNase-Behandlung und Propidiumiodid-Färbung im FACS untersucht. Das Propidiumiodid färbt die DNS der Zellen an, weswegen man sie entsprechend ihres DNS-Gehalts einer Zellzyklusphase zuordnen kann (Abb. 11A). Abbildung 11B zeigt zur Verdeutlichung die Verteilung der Zellzyklusphasen relativ zur mock Situation.

Das Zellzyklusprofil der mock-Zelllinie zeigt eine Spitze, welche dem einfachen DNS-Gehalt der Zellen in der G0- oder G1-Phase entspricht. Rechts davon befindet sich eine weitere Spitze, die den verdoppelten DNS-Gehalt der Zellen in G2 repräsentiert. Zwischen beiden Spitzen liegen die Zellen in S-Phase, deren DNS-Gehalt stark variiert. Der kontinuierliche Übergang der drei Phasen ineinander erschwert eine exakte Bestimmung ihrer Anteile an der Gesamtpopulation, v.a. S-Phase und G2-Phase waren nur schwer zu trennen. In der Luziferase-exprimierenden mock-Zelllinie befanden sich 46,6% der Zellen in der G0- oder G1-Phase, 23,1% in der S-Phase und 30,4% in der G2-Phase. Die Expression von Wildtyp-Pes1 hatte mit 47,8% der Zellen in der G0/G1-, 24,6% in der S- und 27,7% in der G2-Phase keine nennenswerte Veränderung des Zellzyklusprofils zu Folge. Mutante M1 hingegen erzeugte eine Akkumulation der Zellen in der G0/G1-Phase (62,3%), wohingegen der Anteil der Zellen in S- (17,8%) und G2-Phase (19,9%) abnahm. Auch die zweite dominant-negative Mutante, M5, bewirkte einen deutlichen Anstieg des Anteils der G0/G1-Phase (59,1%), der mit einer Verminderung der Zellzahl in S- (18,2%) und G2-Phase (21,9%) einherging. Somit induzieren M1 und M5 einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Die Mutanten M3 und M9 bewirkten eine moderate Akkumulation der Zellen in G0/G1 (53,3% bzw. 52,7%). Mutante M3 führte dabei zu einer Verringerung des S-Phaseanteils in ähnlicher Stärke wie bei Mutante M1 und M5 (18,2%). Die restlichen Mutanten zeigten keinen nennenswerten Effekt auf den Zellzyklus.

Die Zellzyklusprofile bestätigen das Ergebnis des BrdU/light-Versuches. Nur die Mutanten M1 und M5 zeigen deutlich die Induktion eines Zellzyklusarrests. Dieser tritt in der G0/G1-Phase auf, die Stärke der Akkumulation von Zellen in dieser Phase korreliert mit der von den Mutanten hervorgerufenen Kolonienzahl im BrdU/light-Versuch.

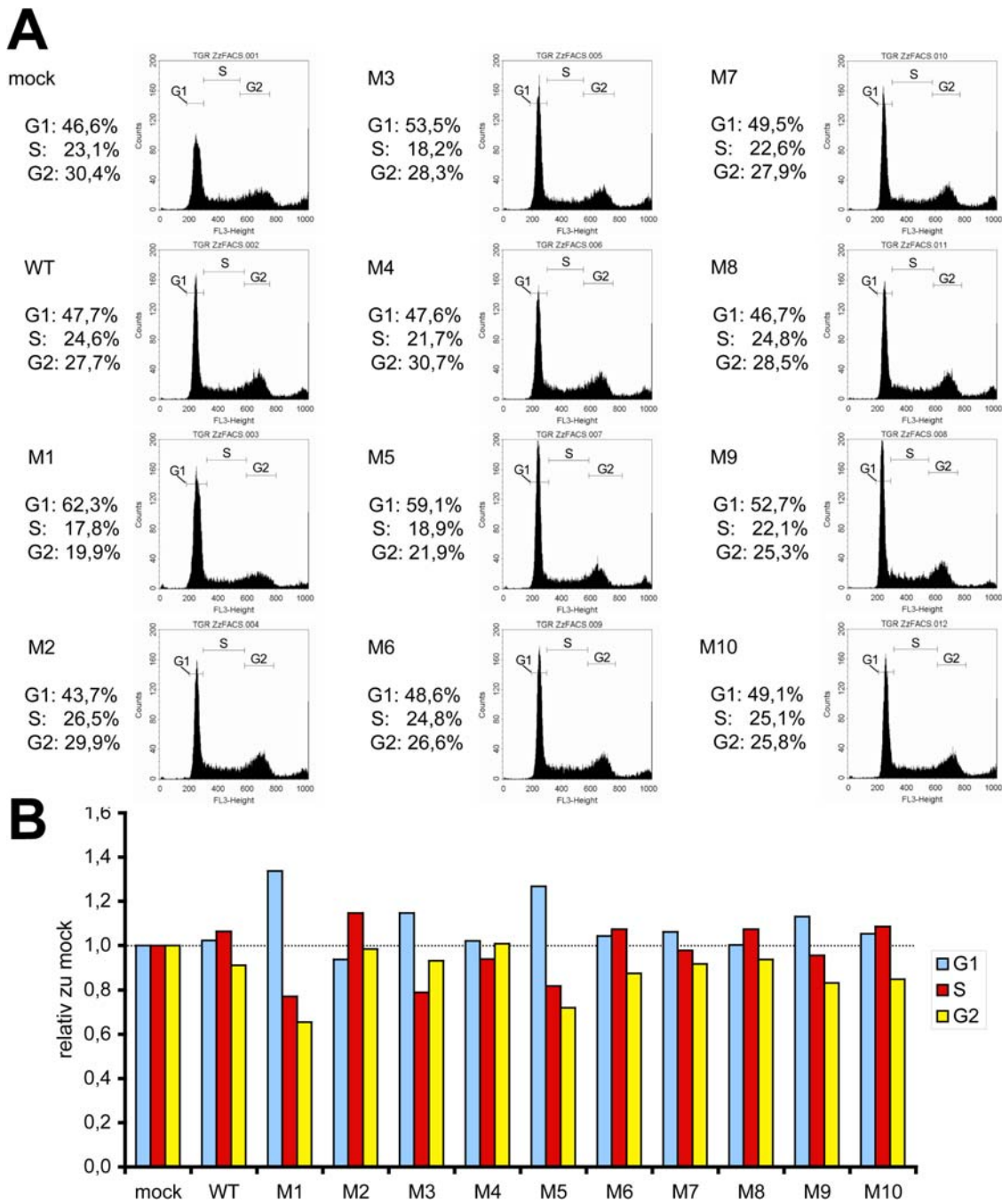
## **2.2. Auswirkung der Mutanten auf die Prozessierung der ribosomalen RNS**

In den vorangegangenen Versuchen zeigten die zwei Pes1-Mutanten M1 und M5 einen starken Effekt auf die Proliferation und Zellzyklusprogression. Könnte dies auf der Inhibition der pre-rRNS Prozessierung beruhen? Um diese Frage zu beantworten wurde der Einfluß der Pes1-Mutanten auf die Prozessierung der ribosomalen Vorläufer RNS untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Aspekte betrachtet: die Akkumulation von rRNS-Vorläufern in der Gesamt-RNS und die Geschwindigkeit der Prozessierung der pre-rRNS.

### **2.2.1. Die Pes1-Mutanten M1 und M5 führen zu einer Akkumulation der 32S pre-rRNS**

Bei der Ribosomenbiogenese reift die 47S pre-rRNS über zahlreiche Zwischenstufen zu den reifen 18S, 5,8S und 28S rRNS heran. Um die Pes1-Mutanten auf einen inhibitorischen Effekt auf die Ribosomenbiogenese zu testen, wurde die Akkumulation einzelner pre-rRNS Spezies untersucht.

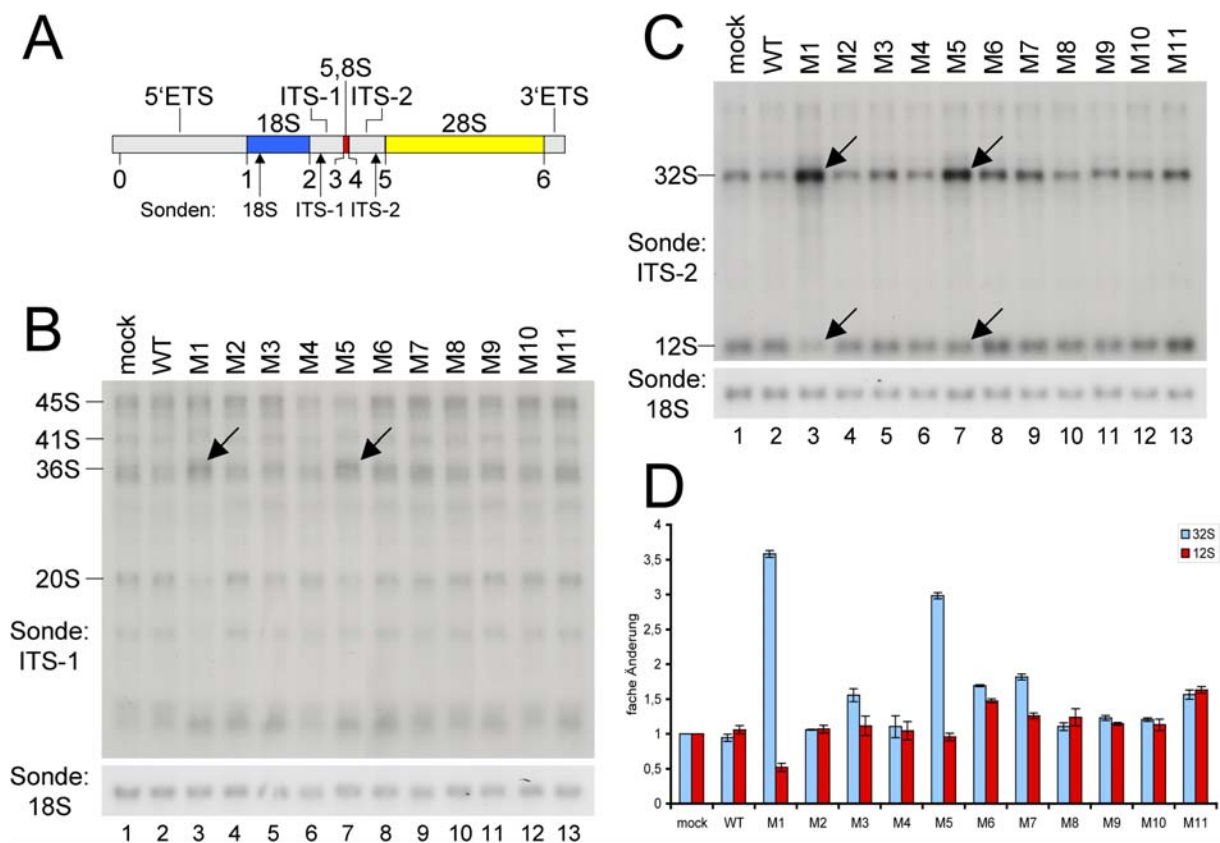
Bei diesem Versuch wurde 30 h nach Induktion der pRTS-1 Vektoren die Gesamt-RNS subkonfluenter TGR-1-Zelllinien isoliert. Der Gehalt der RNS an den unterschiedlichen pre-rRNS Spezies wurde im Northern Blot über Hybridisierung mit Sonden gegen ITS-1 und ITS-2 untersucht. Die Beladung der Gele wurde über Hybridisierung gegen die 18S rRNS überprüft. Die Position der Sonden ist in Abbildung 12A dargestellt.



**Abb. 11: Expression der Pes1-Mutanten M1 und M5 führen zur Akkumulation von Zellen in G0/G1**

Asynchron proliferierende TGR-1-Zelllinien wurden für 48 h mit Doxycyclin kultiviert, anschließend trypsinisiert, fixiert und die DNS nach RNase-Behandlung mit Propidiumiodid angefärbt. Die Propidiumiodid-Fluoreszenz der Zellen wurde im FACS analysiert. (A) Histogramme der PI-Fluoreszenz. Die dem DNS-Gehalt entsprechenden Zellzyklusphasen sind angegeben. (B) Histogramm der Zellzyklusverteilung, relativ zur mock-Situation.

Bei der Hybridisierung mit der ITS-1-Sonde zeigte die Expression von Wildtyp-Pes1 keinen Einfluß auf das Hybridisierungsmuster (Abb. 12B). Die Expression von Mutante M1 hingegen führte zu einer deutlichen Akkumulation der 36S Vorläufer-rRNS, die auch bei der Expression von Mutante M5 beobachtet wurde (Abb. 12B, Pfeile). Alle anderen Mutanten zeigten, wenn überhaupt, nur geringfügige Effekte auf die 36S pre-rRNS. Da im oberen Bereich der Membranen die 36S pre-rRNS nicht gut von der darunter laufenden Bande abzugrenzen sind, konnte ihre Akkumulation nicht quantifiziert werden.



**Abb. 12: Die Pes1-Mutanten M1 und M5 führen zur Akkumulation ribosomaler Vorläufer RNS**

Die Gesamt-RNS der angegebenen TGR-1-Zelllinien wurde nach 30 h Induktion isoliert und im Northern Blot auf die Akkumulation von pre-rRNS Intermediaten hin untersucht. Als Ladungskontrolle dienten Hybridisierungen mit einer für die 18S rRNS spezifischen Sonde. (A) Maßstabsgetreue Darstellung der 47S Vorläufer-rRNS. Die Position der verwendeten Sonden sind angegeben. Hybridisierung der Membran mit einer ITS-1 (B), und ITS-2 (C) spezifischen Sonde. (D) Quantifizierung der Akkumulation der 12S und 32S pre-rRNS mittels Phosphoimager. Das Diagramm zeigt die Akkumulation relativ zur mock-Zelllinie nach Abgleich der Beladung durch die 18S rRNS.



Hybridisierung der Membranen mit ITS-2 spezifischen Sonden stellt vor allem die 32S und 12S pre-rRNS dar und ermöglicht deren Quantifizierung. Die Expression von Wildtyp-Pes1 veränderte die Menge dieser beiden ribosomalen Vorläufer RNS gegenüber der mock-Situation nicht (Abb. 12C, D). Die Expression der Pes1-Mutanten M1 und M5 bewirkte eine Akkumulation der 32S pre-rRNS um den Faktor 3,58 bzw. 2,98 (Abb. 12C, Pfeile; Abb. 12D).

Während sich die Mutanten M1 und M5 in ihren Effekten auf die 36S und 32S pre-rRNS stark ähnelten, unterschieden sie sich jedoch in ihrer Wirkung auf die 12S pre-rRNS. Bei Mutante M5 war die Menge an 12S pre-rRNS gegenüber der mock-Kontrolle nicht verändert, bei Mutante M1 war jedoch eine deutliche Reduktion der 12S pre-rRNS-Menge feststellbar (Abb. 12C, Pfeile; Abb. 12D). Die 12S pre-rRNS ist ein Produkt aus der Prozessierung des 32S Vorläufers. Eine Blockierung dieses Prozessierungsschrittes führt folglich dazu, daß keine neue 12S pre-rRNS gebildet wird. Demnach ist zu erwarten, daß bei ungestörter Prozessierung der 12S pre-rRNS diese RNS mengenmäßig abnimmt. Das ist bei der Expression von Mutante M1 zu beobachten, nicht jedoch bei M5. Somit kann postuliert werden, daß Mutante M5 neben der Prozessierung der 36S und 32S pre-rRNS auch die Prozessierung der 12S pre-rRNS hemmt. Die anderen Mutanten zeigten, wenn überhaupt, deutlich schwächere Effekte auf die 32S und 12S pre-rRNS.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Expression von Wildtyp-Pes1 keinen Effekt auf die pre-rRNS Prozessierung hervorrief. Die Mutanten M1 und M5 zeigten den deutlichsten Phänotyp, ihre Expression führte zur Blockierung der Prozessierung von 36S und 32S pre-rRNS. Die Mutante M5, nicht jedoch M1, inhibierte zusätzlich die Prozessierung der 12S pre-rRNS.

### **2.2.2. Die Pes1-Mutanten M1 und M5 blockieren nur die Reifung der großen ribosomalen Untereinheit**

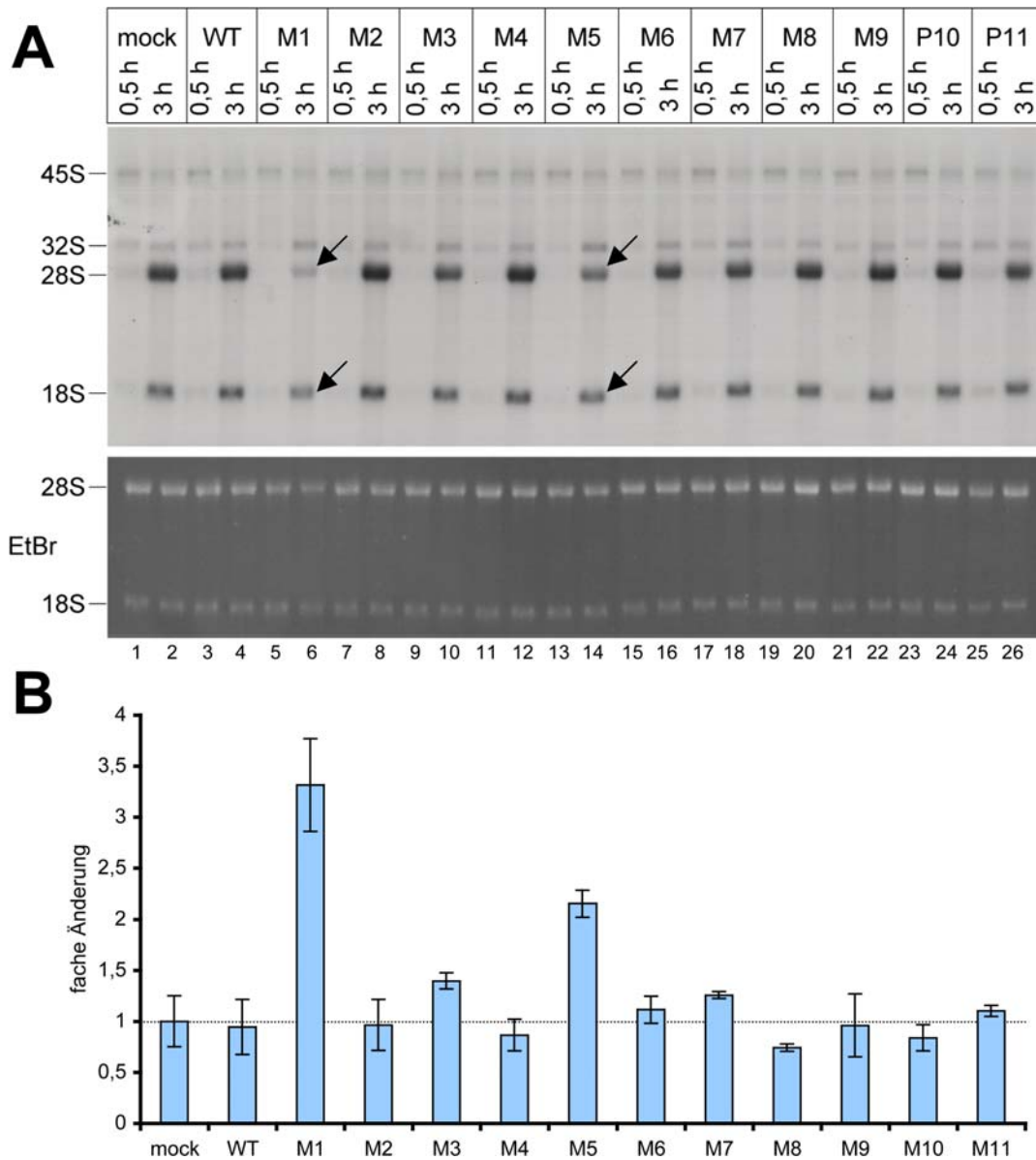
Die Untersuchung der Gesamt-RNS in der Zelle zeigt nur die Akkumulation der verschiedenen pre-rRNS zu einem bestimmten Zeitpunkt. Sie kann keine Aussage darüber treffen, in welchem Umfang die Reifung der 28S rRNS trotz der Blockierung durch die Mutanten M1 und M5 noch erfolgt. Effekte der Mutanten auf die Reifung

der kleinen ribosomalen Untereinheit können ebenfalls nicht im Northern Blot festgestellt werden.

Um den Effekt der mutanten Pes1-Proteine auf die Reifung der 18S und 28S rRNS zu testen, wurde die RNS *in vivo* mit  $^{32}\text{P}$  markiert und die Verteilung der markierten pre-rRNS-Spezies nach 0,5 h und 3 h untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden TGR-1-Zelllinien für 24 h mit Doxycyclin kultiviert, um den Einbau der ektopisch exprimierten Pes1-Mutanten in die endogenen Komplexe zu gestatten. Der Phosphat-Vorrat der Zelle wurde durch die Kultivierung in phosphatfreiem Medium für 30 min depletiert und 1h mit [ $^{32}\text{P}$ ]-Orthophosphat aufgefüllt. Nach 0,5 h bzw. 3 h Inkubation unter Standardkulturbedingungen wurde die Gesamt-RNS isoliert und auf einem 1%-igen Formaldehyd-Gel aufgetrennt. Die Beladung kann über die Ethidiumbromidfärbung der RNS abgeschätzt werden (Abb. 13A). Die Intensität der  $^{32}\text{P}$ -markierten RNS-Spezies wurde mittels Phosphoimager bestimmt. Abbildung 13B zeigt das Verhältnis von 32S pre-rRNS zur reifen 28S rRNS nach 3 h.

Nach 0,5 h zeigten alle Zelllinien eine schwache, aber ähnlich starke Bande des 45S Vorläufers, sowie geringe Mengen der anderen pre-rRNS Spezies. Erst nach 3 h trat in der mock-Situation eine nennenswerte Akkumulation der reifen 28S rRNS ein (Abb. 13A). Die Expression von Wildtyp-Pes1 veränderte die Kinetik der pre-rRNS-Prozessierung nur marginal. Mutante M1 verhinderte die Bildung der reifen 28S rRNS, nicht aber die der 18S rRNS. Das Verhältnis von 32S pre-rRNS zu 28S rRNS war deutlich erhöht (Abb. 13A Spur 6, Pfeile; Abb. 13B). Die zweite dominant-negative Mutante, M5, inhibierte ebenfalls die Bildung der reifen 28S rRNS, ohne die Reifung der 18S rRNS zu stören. Das Verhältnis von 32S pre-rRNS zu 28S rRNS war ebenfalls deutlich erhöht, wenn auch in geringerem Maße wie bei Mutante M1 (Abb. 13A Spur 14, Pfeile; Abb. 13B). Die übrigen Mutanten zeigten keinen deutlichen Einfluß auf die Reifung der 18S und 28S rRNS.

Die metabolische Markierung der pre-rRNS zeigt, daß der inhibitorische Effekt von Mutante M1 auf die Reifung der 28S rRNS stärker ist als der von M5. Der dominant-negative Effekt der beiden Mutanten beschränkt sich auf die Prozessierung der pre-rRNS der großen ribosomalen Untereinheit. Die Reifung der 18S pre-rRNS wurde durch die Mutanten nicht maßgeblich beeinträchtigt. Die Effekte der Mutanten M1 und M5 auf die pre-rRNS-Prozessierung sind in Abbildung 14 dargestellt.



**Abb. 13: Die Pes1-Mutanten M1 und M5 inhibieren die Reifung der 28S rRNS**

Die angegebenen TGR-1-Zelllinien wurden subkonfluent ausplattiert und für 24 h mit Doxycyclin induziert. Neusynthetisierte RNS wurde für eine Stunde mit [ $^{32}$ P]-Orthophosphat markiert, die gesamt-RNS nach 0,5 h bzw. 3 h Inkubation in Standard-Medium isoliert und auf einem 1%-igen Formaldehydgel aufgetrennt. (A) Autoradiographie des getrockneten Gels. Die Ethidiumbromidfärbung zeigt die Beladung des Gels. (B) Das Histogramm zeigt das Verhältnis von 32S pre-rRNS zu 28S rRNS 3 h nach der Markierung.

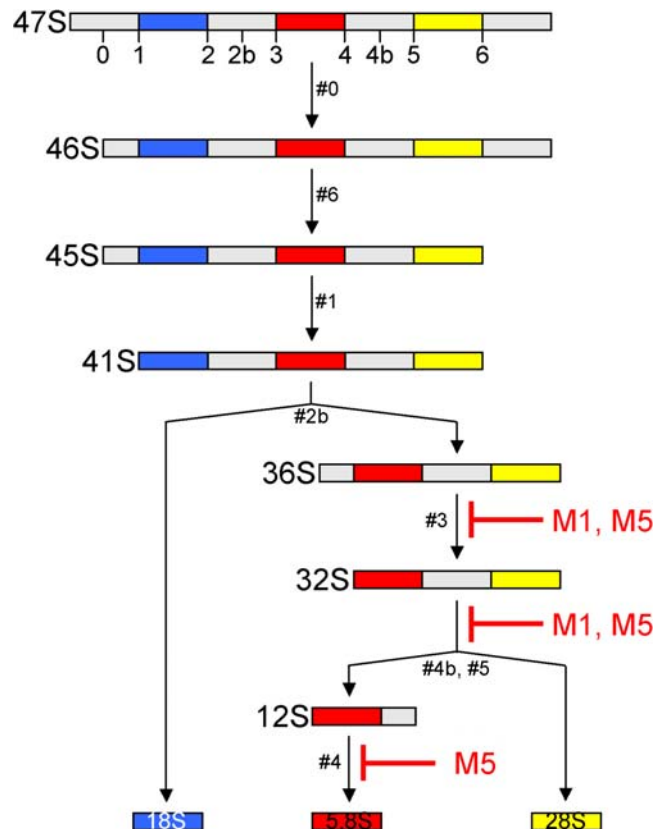


Abb. 14: Zusammenfassung der Effekte von M1 und M5 auf die pre-rRNS-Prozessierung

### 3. Die Koordination von Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle

#### 3.1. Die Pes1-Mutanten M1 und M5 induzieren eine p53-Akkumulation abhängig von der Proliferation

Der Tumorsuppressor p53 ist bei vielen verschiedenen Arten zellulären Stresses für die Induktion eines Zellzyklusarrests verantwortlich. In den Modellen der Koordination von Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle spielt p53 ebenfalls eine Schlüsselrolle. Um den Effekt der Expression von Wildtyp-Pes1 und seiner Mutanten auf die p53-Menge zu untersuchen, wurden proliferierende TGR-1-Zelllinien für 30 h mit Doxycyclin kultiviert und die Lysate im Western Blot analysiert.

Der p53-spezifische Antikörper produzierte eine unspezifische Bande, die zur Kontrolle der Beladung des Gels verwendet werden konnte. Die mock-Kontrolle zeigt, daß die gleichzeitige Expression zweier Proteine, EGFP und Luziferase, keinen

Anstieg der p53-Menge hervorrief (Abb. 15A Spur 1 und 2). Auch die Expression von Wildtyp-Pes1 führte zu keiner Zunahme an p53 (Abb. 15A, Spur 3 und 4). Die Expression der Mutanten M1, M3 und M5 führte zu einem deutlichen Anstieg der p53-Menge (Abb. 15A, Spur 5 und 6, 9 und 10, 13 und 14). Der Anstieg war bei Mutante M1 am stärksten, Mutante M3 führte zu einem ähnlich starken Anstieg wie M5. Alle anderen Mutanten waren nicht in der Lage, p53 zu induzieren.

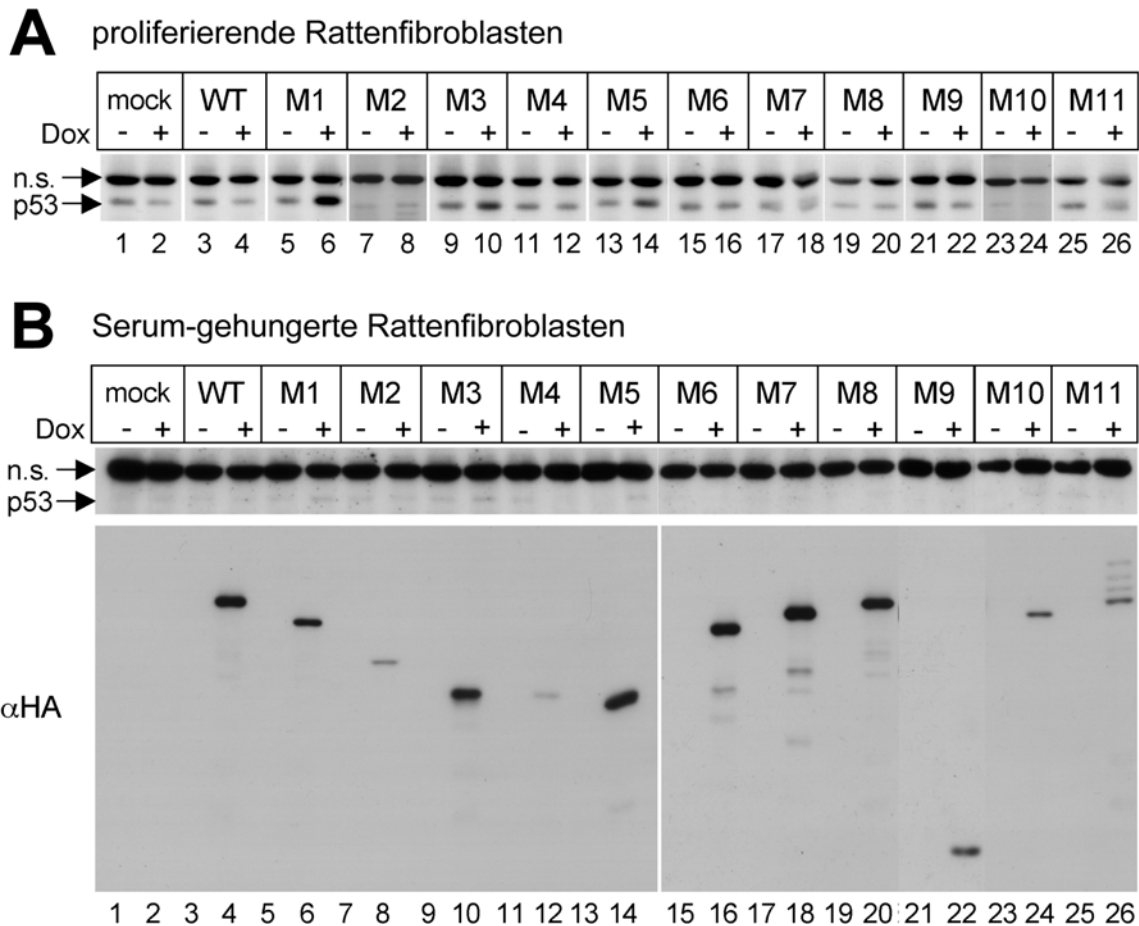
Ist die Störung der Ribosomenbiogenese durch die Mutanten M1 und M5 der Auslöser für die Akkumulation von p53? In diesem Fall sollten Zellen, die eine verminderte Ribosomenbiogenese aufweisen, nicht in der Lage sein, p53 zu induzieren. Obenstehender Versuch wurde mit Zellen wiederholt, die 72 h vor und auch nach der Zugabe von Doxycyclin mit nur 0,1% Serum kultiviert wurden. Die Reduktion des Serums im Kulturmedium bewirkt, daß die Zellen aus dem Zellzyklus austreten und sich in die G<sub>0</sub>-Phase begeben. Damit einhergehend ist zu erwarten, daß die Ribosomenbiogeneserate abnimmt, da die Zellen ihre Ribosomenmenge nicht für eine Teilung verdoppeln müssen.

Der Eintritt in die Ruhephase ruft in der TGR-1-Zelllinie offensichtlich keine Akkumulation von p53 hervor (Abb. 15B, oberer Teil: Spuren mit ungerader Nummer), ebenso wie die Expression von Luziferase (Abb. 15B, Spur 1 und 2) oder von Wildtyp-Pes1 (Abb. 15B, Spur 3 und 4). Im Gegensatz zu den proliferierenden Zellen war keine der Pes1-Mutanten in der Lage, p53 in ruhenden Zellen zu induzieren (Abb. 15B, Spur 5 und 6, 9 und 10, 13 und 14).

Ein möglicher Grund hierfür ist, daß die Pes1-Mutanten in ruhenden Zellen nicht exprimiert wurden. Um dies auszuschließen wurden die rekombinanten Pes1-Proteine über ihr HA-Epitop in den Lysaten nachgewiesen. Wie im unteren Teil der Abbildung 15B zu sehen ist, wurden die Pes1-Mutanten in den Zellen exprimiert. Der Gehalt an rekombinantem Protein war in proliferierenden und gehungerten Zellen ähnlich (siehe auch Abb. 5B).

Die Expression der dominant-negativen Mutanten M1 und M5 führt zu einer Akkumulation von p53. Das spricht dafür, daß die Mutanten M1 und M5 die Zellzyklusprogression über die Induktion von p53 inhibieren. Die Unfähigkeit von M1

und M5 in serumgehungerten Zellen eine p53-Akkumulation induzieren, spricht für die Abhängigkeit der p53-Antwort von der Störung der Ribosomenbiogenese.



**Abb. 15: Die Pes1-Mutanten M1 und M5 induzieren die Akkumulation von p53 abhängig von Proliferation**

(A) Die angegebenen TGR-1-Zelllinien wurden subkonfluent ausplattiert und 30 h mit Doxycyclin induziert. Die Lysate wurden mit Antikörpern gegen p53 (PAb240; Dianova) untersucht. Die unspezifische Bande (n.s.) dient als Ladungskontrolle. (B) Wiederholung von (A), jedoch mit Hungern der Zellen mit 0,1% Serum 72 h vor und während der Inkubation mit Doxycyclin. (C) Die Lysate aus (B) untersucht auf Expression der rekombinanten Pes1-Proteine mittels Antikörper gegen das HA-Epitop.

### 3.2. p53 vermittelt den Zellzyklusarrest nach Expression der Pes1-Mutanten M1 und M5

Die Expression der Pes1-Mutanten M1 und M5 induziert einen Zellzyklusarrest und die Akkumulation von p53 – aber ist die p53-Antwort auch für die Arretierung der Zellen verantwortlich? Um diese Frage zu beantworten, wurde die Rolle von p53 im BrdU/light-Versuch untersucht.

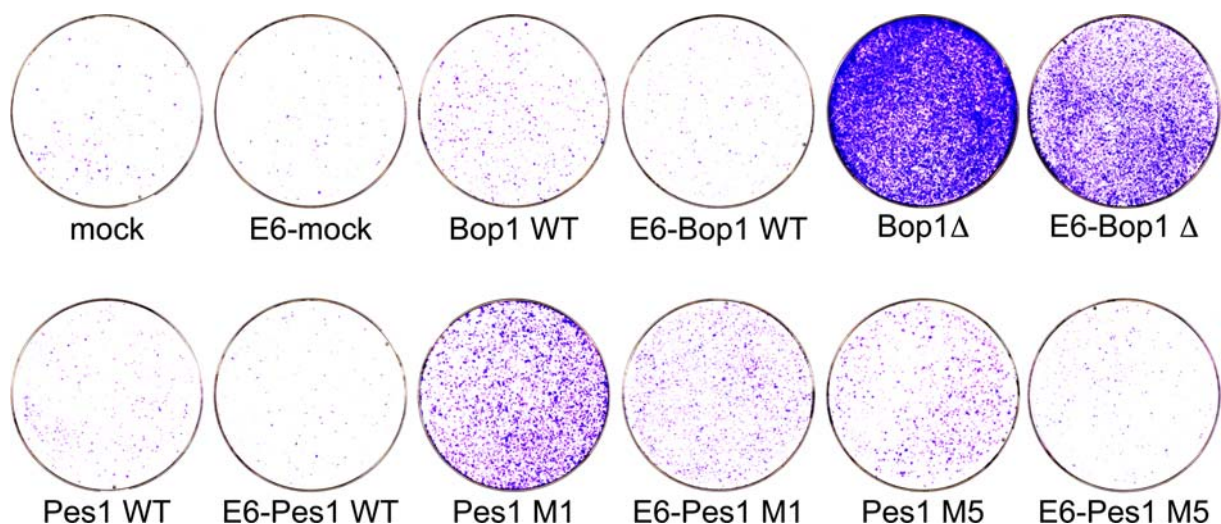
Zahlreiche virale Proteine dienen dazu, die Funktion von p53 in der Wirtszelle zu unterdrücken. Das E6-Protein des humanen Papilloma Virus (HPV) bindet p53 und inhibiert seine Transaktivierungsaktivität. In einer TGR-1-Zelllinie, die das E6-Protein von HPV16 konstitutiv exprimiert, sollte die p53-Antwort deutlich abgeschwächt sein (Hölzel *et al.*, 2005; Scheffner *et al.*, 1990). Die parentale TGR-1- und die TGR-1-E6-Zelllinie unterscheiden sich demnach nur in der Funktionsfähigkeit von p53. Der BrdU/light-Versuch (s. Abb. 10) wurde in beiden Zelllinien parallel für die Pes1-Mutanten M1 und M5, sowie als Kontrolle auch für die mock-Situation, Wildtyp-Pes1, Bop1 und Bop1 $\Delta$  durchgeführt.

Die mock-Kontrolle zeigte in diesem Experiment eine geringe Zahl an Kolonien (Abb. 16). Die Expression des E6-Proteins übte nur einen marginalen Einfluß auf die Kolonienzahl aus. Um den Versuchsaufbau zu testen wurden Zelllinien mitgeführt, die Bop1 und die dominant-negative Mutante Bop1 $\Delta$  exprimierten. Für Bop1 $\Delta$  ist bekannt, daß der von ihm induzierte Zellzyklusarrest von p53 abhängt und durch das E6-Protein abgeschwächt werden kann (Pestov *et al.*, 2001b). Die Expression von Bop1 zeigte einen moderaten Effekt auf die Kolonienzahl, die Expression von Bop1 $\Delta$  führte zu einem sehr starken Anstieg der Kolonienzahl. In beiden Fällen wurde die Kolonienzahl durch die Coexpression des E6-Proteins deutlich reduziert. Damit ist gezeigt, daß der p53-abhängige Zellzyklusarrest durch Coexpression des E6-Proteins vermindert werden kann, das Versuchssystem also funktionell ist (Abb. 16). Die Expression von Wildtyp-Pes1 führte zu einer Kolonienzahl, die in etwa der der mock-Kontrolle entsprach, und durch Coexpression des E6-Proteins leicht reduziert wurde. Die dominant-negativen Mutanten M1 und M5 zeigten eine großen Zahl an Kolonien, die durch Coexpression des E6-Proteins drastisch reduziert wurde (Abb. 16).

Durch dieses Experiment wurde gezeigt, daß die Induktion des Zellzyklusarrestes durch die Pes1-Mutanten M1 und M5 durch die Coexpression des viralen E6-Proteins vermindert werden kann. Dies bedeutet, daß der beobachtete Zellzyklusarrest von p53 abhängig ist.

### 3.3. Die p53 Antwort umfaßt die Induktion von p21

Für die Zellzyklusprogression ist unter anderem die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) essentiell. Die Cdk-Aktivität kann über Cdk-Inhibitoren negativ reguliert werden. Der Tumorsuppressor p53 induziert als Transkriptionsfaktor den Cdk-Inhibitor p21. p21 hemmt CyclinE/Cdk2-Komplexe und induziert so einen G1-Arrest. Die Regulation der p21-Menge erfolgt hauptsächlich über die Transkription (Gartel und Tyner, 1999; Harper *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1993). Um zu testen, ob p21 durch die Mutanten M1, M3 und M5 induziert wird, wurde die Menge der p21-mRNS bestimmt.



**Abb. 16: Die von den Pes1-Mutanten M1 und M5 induzierte p53-Antwort ist funktionell**

Der BrdU/light-Versuch wurde mit einer TGR-1-Zelllinie wiederholt, die das E6-Protein stabil exprimiert. Das E6-Protein katalysiert den Abbau von p53 und inhibiert zusätzlich dessen Transaktivierungsfunktion. Die p53-Abhängigkeit des Zellzyklusarrestes kann durch den Vergleich von TGR-1- und TGR-1-E6-Zelllinien getestet werden.

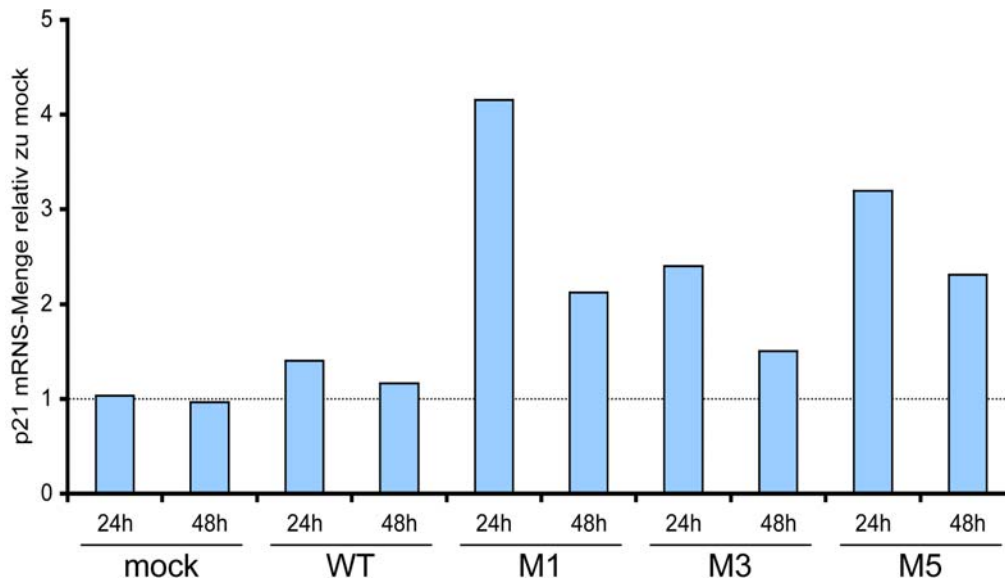


Entsprechende TGR-1-Zelllinien wurden für 24 h und 48 h induziert. Von der isolierten Gesamt-RNS wurde cDNS synthetisiert und im LightCycler auf die Menge der p21-mRNS untersucht. Die p21-mRNS-Mengen in der cDNS wurde über den Gehalt von Aldolase-mRNS normiert.

Die Expression der Luziferase in der mock-Zelllinie zeigte keinen Effekt auf die Menge der p21-mRNS (Abb. 17). Die Expression von Wildtyp-Pes1 induzierte eine minimale Akkumulation der p21-mRNS nach 24 h, die zum 48 h Wert hin etwas abnahm.

Bei Expression der dominant-negativen Pes1-Mutanten M1 und M5 wurde 24 h nach Induktion eine starke Akkumulation der p21-mRNS beobachtet, die nach weiteren 24 h wieder abgenommen hatte. Die von M1 hervorgerufene Akkumulation war nach 24 h stärker als die von M5, nach 48 h war die p21-mRNS-Menge in beiden Zelllinien in etwa identisch. Die Mutante M3, deren Expression ebenfalls eine p53-Akkumulation induzierte, wenn auch ohne deutlichen Effekt auf Proliferation und pre-rRNS Prozessierung, bewirkte ebenfalls eine Akkumulation der p21-mRNS. Wie bei M1 und M5 nahm die p21-mRNS-Menge vom 24h zum 48h Wert hin ab, war jedoch schwächer als bei M1 und M5 zum entsprechenden Zeitpunkt.

Die Induktion von p21 durch die Mutanten M1, M3 und M5 bekräftigt die Aussage, daß der beobachtete Zellzyklusarrest von p53 abhängig ist. Die Abnahme der mRNS-Menge vom 24 h- zum 48 h-Wert hin ist jedoch etwas überraschend. Eine mögliche Erklärung wäre ein unterschiedlicher Bedarf an p21 für die Arretierung proliferierender Zellen und das Aufrechterhalten dieses Arrestes. Die p21 Induktion spricht zudem gegen die Induktion von Apoptose durch Wildtyp-Pes1 sowie der Mutanten, da p21 im allgemeinen als Inhibitor der Apoptose angesehen wird (Gartel und Tyner, 2002).



**Abb. 17: Die Mutanten M1 und M5 induzieren p21**

Das Histogramm zeigt die Menge der p21 (Cdkn1a)-mRNS 24 h bzw. 48 h nach Induktion der angegebenen TGR-1-Zelllinien. Die Werte sind auf die Menge der Aldolase-mRNS normiert.

#### 4. Pes1-Mutanten und ihr Verhältnis zum PeBoW-Komplex

Pes1 ist ein Bestandteil des PeBoW-Komplexes. Üben die Mutanten M1 und M5 ihren Effekt auf Ribosomenbiogenese und Proliferation über die Störung der Funktion des PeBoW-Komplexes aus? Um diese Frage zu beantworten, sollte der bestehende Satz an Pes1-Mutanten für die Definition der Interaktionsdomänen genutzt werden.

Die von E. Kremmer generierten Antikörper gegen die PeBoW-Komponenten sind gegen die humanen Proteine gerichtet. Die Interaktionsstudien wurden deshalb in der humanen Osteosarcoma-Zelllinie U2OS durchgeführt, in der die pRTS-1 Vektoren gut selektiert und quantitativ induziert werden konnten. Für die Fragestellung wurden zwei Techniken verwendet: Native Gelelektrophorese und Co-Immunpräzipitationen.

##### 4.1. Native Gelelektrophorese

Um eine Übersicht zu gewinnen, ob das rekombinant exprimierte Wildtyp-Pes1 und seine Mutanten in den PeBoW-Komplex inkorporiert werden, bzw. in welchen Komplexen die Pes1-Mutanten vorliegen, wurden entsprechende U2OS-Zelllinien für

20 h mit Doxycyclin behandelt und anschließend mittels nativer Gelelektrophorese untersucht.

Bei dieser Technik werden Zellen unter nicht denaturierenden Bedingungen lysiert und die Proteinkomplexe auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Laufgeschwindigkeit der Komplexe hängt dabei von ihrer Größe und Gestalt sowie ihrer Ladung ab. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Membran kann die Verteilung eines Proteins auf verschiedene Komplexe über Antikörper bestimmt werden. Es wurden vier parallele Ansätze gefahren, die jeweils mit einem der Antikörper gegen Pes1, WDR12, Bop1 bzw. das HA-Epitop untersucht wurden.

Bei der mock-Kontrolle waren im Blot gegen Pes1 zwei Banden zu sehen, von denen die untere eine Entsprechung in den Blots gegen WDR12 und Bop1 hatte (Abb. 18, Pfeil). Laufen in der nativen Gelelektrophorese Proteine auf der gleichen Höhe, müssen sie sich nicht zwingend im gleichen Komplex befinden. Die Existenz des PeBoW-Komplexes wurde bereits bewiesen, weswegen ein identisches Laufverhalten der drei Proteine ihre Inkorporation in einen gemeinsamen Komplex bedeutet. Damit entspricht die Bande in der Mitte des Gels dem PeBoW-Komplex. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß dieser Komplex neben Pes1, WDR12 und Bop1 weitere Proteine enthält. Aufgrund der Größe des Komplexes ist es jedoch unwahrscheinlich, daß es sich hierbei um 66S preribosomale Partikel handelt. Der Blot gegen das HA-Epitop zeigte auf der Höhe des PeBoW-Komplexes kein Signal, nur eine unspezifische Bande oberhalb des Komplexes.

Die Expression von Wildtyp-Pes1 veränderte das Laufverhalten des PeBoW-Komplexes nicht. Im Blot gegen das HA-Epitop konnte das rekombinante Protein auf der Höhe des PeBoW-Komplexes nachgewiesen werden (Abb. 18, Spur 2, Pfeil). Damit wird das Wildtyp-Protein in den Komplex eingebaut. Zusätzlich war, wie bei den Pes1-Mutanten auch, freies Pes1 (oder Komplexe ohne Beteiligung von WDR12 und Bop1) nachweisbar. Die Mutante M1 produzierte im Blot gegen das HA-Epitop einen starken Hintergrund, ansatzweise war eine Bande auf Höhe des PeBoW-Komplexes zu erkennen. Die Inkorporation in den PeBoW-Komplex konnte so nicht eindeutig gezeigt werden. Die Mutante M3 produzierte im Blot gegen das HA-Epitop ebenfalls einen starken Hintergrund, eine Bande auf Höhe des PeBoW-Komplexes konnte nicht nachgewiesen werden. Damit wird Mutante M3 höchstwahrscheinlich nicht in den PeBoW-Komplex inkorporiert. Mutante M5 wurde in einen Komplex

inkorporiert, der geringfügig schneller als der endogene PeBoW-Komplex lief. Im Blot gegen WDR12 und Bop1 waren ebenfalls Banden sichtbar, die minimal schneller liefen als der endogene Komplex (Abb. 18, Spur 7, Pfeile). Damit wird Mutante M5 in den PeBoW-Komplex inkorporiert, ihr Einbau verändert jedoch das Laufverhalten des Komplexes. Die Mutante M7 konnte im Blot gegen das HA-Epitop auf Höhe des PeBoW-Komplexes nachgewiesen werden. Zusätzlich lag das rekombinante Protein in einem langsamer laufenden Komplex vor, der neben der Mutante auch WDR12 und Bop1 enthielt (Abb. 18, Spur 9, Pfeile). Die Mutante M7 wird also nicht nur in den normalen PeBoW-Komplex inkorporiert, sie induziert zusätzlich die Bildung eines PeBoW-Komplexes mit deutlich verändertem Laufverhalten. Die Mutanten M8 und M11 konnten im Blot gegen das HA-Epitop auf Höhe des endogenen PeBoW-Komplexes nachgewiesen werden, sie werden also ebenfalls in den Komplex inkorporiert (Abb. 18, Spur 10 und 13, Pfeile). Da bei Mutante M11 in der Zelle das SUMO1-Fragment vom N-Terminus abgespalten wird, handelt es sich bei dem inkorporierten Protein wahrscheinlich v.a. um das der Mutante M8 ähnliche Spaltprodukt (s. 1.1.Expression der Mutanten).

Die Mutanten M2, M4, M6 M9 und M10 zeigten im Blot gegen das HA-Epitop kein Signal, obwohl die Expression der Proteine in Western Blot nachgewiesen werden konnte.

Im Blot gegen Pes1 war bei allen Zelllinien eine sehr langsam laufende Bande zu sehen, deren Intensität in etwa der des PeBoW-Komplexes entsprach. Diese Bande fand keine Entsprechung im Blot gegen WDR12 und Bop1. Bei dieser Bande könnte es sich um Komplexe von Pes1 handeln, die weder WDR12 noch Bop1 enthalten. Für diese These spricht die starke Intensität der Bande. Eine andere Erklärung ist, daß es sich bei dieser Bande um ein Artefakt handelt. Für diese Erklärung spricht, daß an dieser Position extrem viel Protein lief, wie die Ponceau S-Färbung der Membranen ergab. Dazu zeigte der Blot gegen Bop1 an dieser Stelle nicht einmal das sonst so starke Hintergrundsignal. Und letztendlich wurde kein rekombinantes Pes1 in diesen Komplex eingebaut. Der Pes1-Antikörper zeichnete sich im Western Blot durch eine sehr hohe Spezifität aus, was jedoch nicht zwingend für die native Gelelektrophorese ohne den Einsatz von SDS gelten muß. Der Antikörper gegen das HA-Epitop wies im Western Blot eine ähnlich hohe Spezifität auf, produzierte in der

nativen Gelelektrophorese aber unspezifische Banden, die den spezifischen Banden in ihrer Intensität ähnelten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß über die native Gelelektrophorese ein PeBoW-Komplex identifiziert werden konnte. Dies steht im Einklang mit den von Hölzel *et al.* erhobenen Daten. Das rekombinant exprimierte Wildtyp-Pes1 wurde in diesen Komplex inkorporiert, wofür die NPLP-Domäne, nicht aber der C-Terminus, essentiell waren.

Aus der Arbeit von Michaela Rohrmoser war bekannt, daß die Behandlung der Zellysate mit RNase die Laufeigenschaften des PeBoW-Komplexes verändern kann. Im Rahmen einer von M. Rohrmoser durchgeführten Testreihe wurden die Lysate von TGR-1-Zelllinien mit unterschiedlichen Mengen mit RNase A behandelt und durch native Gelelektrophorese untersucht. Die Expression der Pes1-Mutanten wurde im Western Blot gegen das HA-Epitop geprüft. Aufgrund der Spezifität der Antikörper gegen WDR12 und Bop1 für die humanen Proteine konnten keine Ansätze für diese Proteine gefahren werden. Das Experiment wird hier beschrieben, da es Aufschluß über die Inkorporation der Mutanten M1 und M6 in den PeBoW-Komplex liefert.

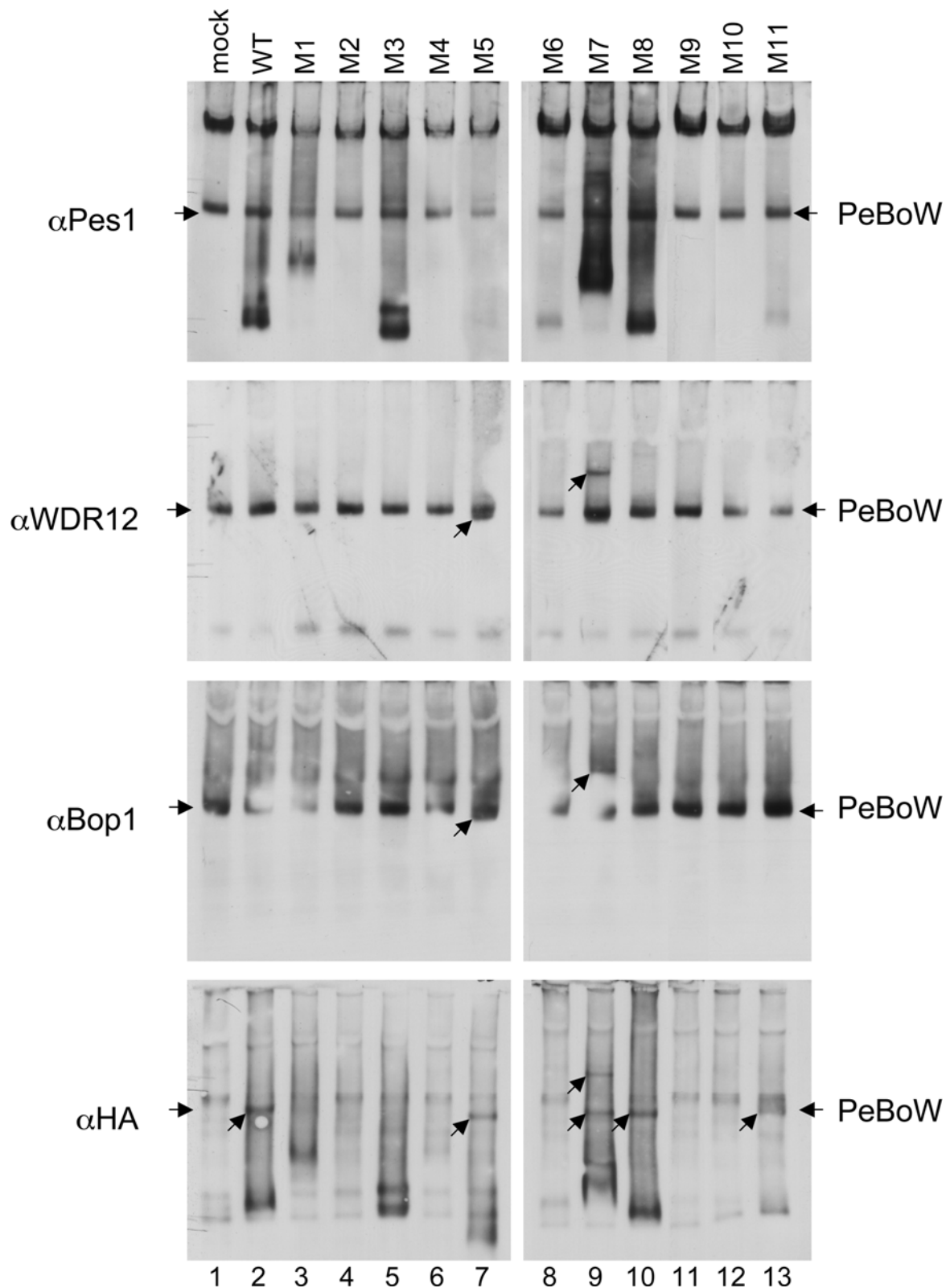
Bei der Expression von Wildtyp-Pes1 sowie der Mutanten M1, M7, M8 und M11 war in den unbehandelten Lysaten rekombinantes Protein auf Höhe des PeBoW-Komplexes nachweisbar. Mutante M5 zeigte eine Bande ungefähr auf Höhe des PeBoW-Komplexes, für eine definitive Aussage war die Qualität des Gellaufes jedoch nicht ausreichend. Mutante M3 zeigte keine Inkorporation in den Komplex, bei den Mutanten M2, M4, M6, M9 und M10 war das Signal zu schwach (Abb. 19A). Damit bestätigt die native Gelelektrophorese der TGR-1-Zelllinien die Ergebnisse aus dem Experiment mit den U2OS-Zelllinien, wobei nun auch die Inkorporation der Mutante M1 in den PeBoW-Komplex nachgewiesen werden konnte.

Bei der Behandlung von Zellysaten mit RNase A verändert sich das Laufverhalten des PeBoW-Komplexes, er verschiebt seine Position nach oben (Beobachtung Michaela Rohrmoser). In diesem Experiment ist dies besonders gut bei den Lysaten der Mutante M1 exprimierenden Zelllinien zu sehen (Abb. 19A, Mutante M1: PeBoW „Shift“). Das Laufverhalten der Pes1-Monomere war ebenfalls teilweise gegenüber RNase A sensitiv. Bei Wildtyp-Pes1 sowie den Mutanten M5, M8 und M11

verschoben sich die Banden der Monomere bei RNase Behandlung nach oben (Abb. 19A, „Shift“). Die Behandlung zeigte keinen Effekt auf das Laufverhalten der Monomere von M1, M3 und M7 (Abb. 19, kein „Shift“). Mutante M6 konnte in den unbehandelten Lysaten nicht nachgewiesen werden. Nach RNase Behandlung traten jedoch Banden auf, deren Laufhöhe in etwa der des PeBoW-Komplexes entsprachen. Bei diesen Banden könnte es sich sowohl um Monomere als auch um die in den PeBoW-Komplex inkorporierte Mutante M6 handeln. Die Laufhöhe der Banden entspricht jedoch der der RNase behandelten PeBoW-Komplexe von Mutante M7, was letztere Vermutung wahrscheinlicher macht. Damit wird wahrscheinlich auch Mutante M6 in den PeBoW-Komplex inkorporiert (Abb. 19A, vgl. RNase behandelte Lysate von M6 und M7).

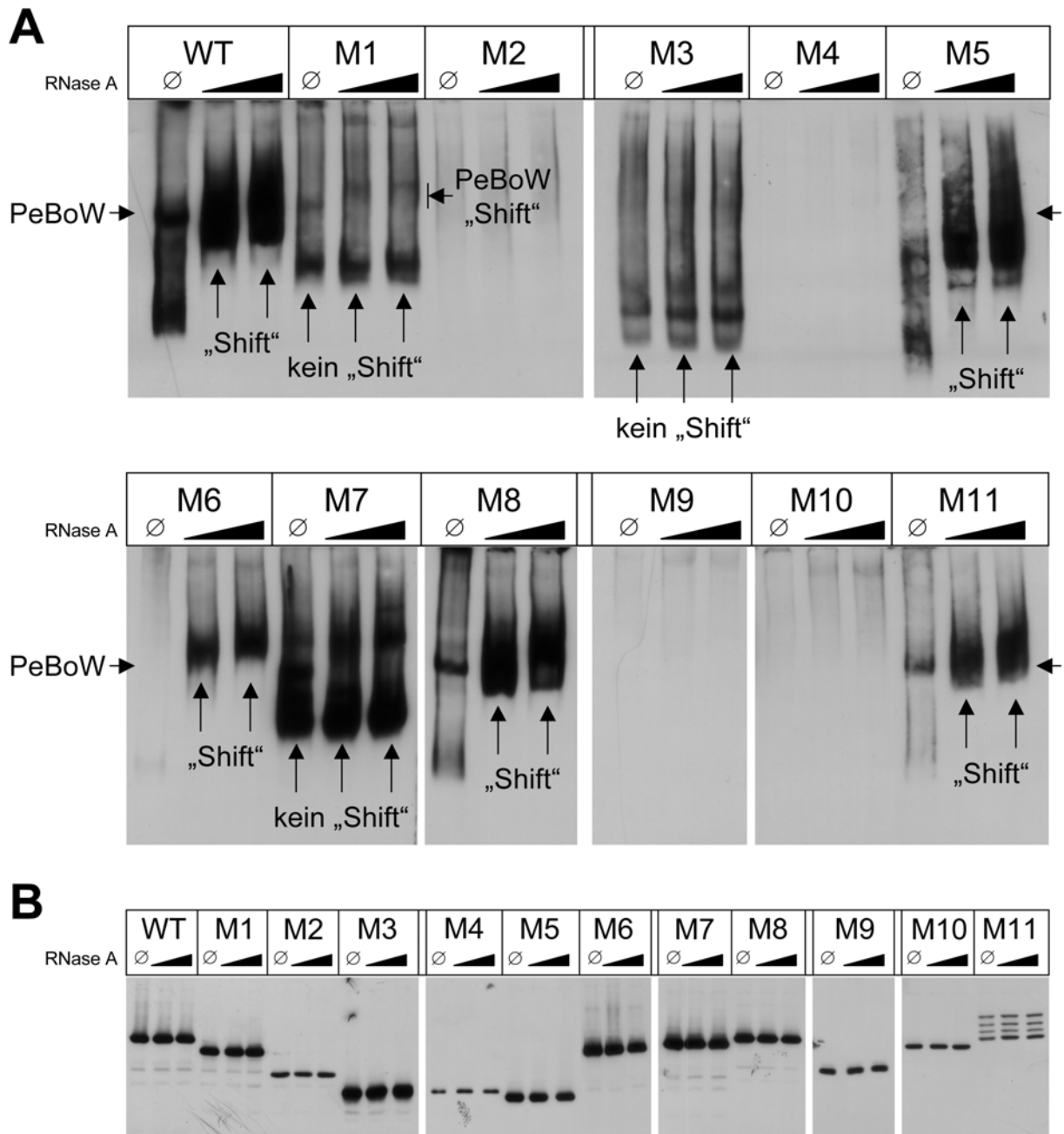
Durch dieses Experiment konnte beobachtet werden, daß sich die Pes1-Mutanten bei der nativen Gelelektrophorese in der Zugänglichkeit ihres HA-Epitops unterscheiden. Dies wird besonders bei Mutante M6 deutlich. Obwohl in allen Spuren identische Mengen an rekombinanten Protein geladen wurden (Abb. 19B), war es im unbehandelten Lysat nicht nachweisbar, zeigte aber in den RNase behandelten Lysaten ein starkes Signal (Abb. 19A). Bei Mutante M10 war das rekombinante Protein weder im unbehandelten noch in den RNase-behandelten Lysaten nachweisbar, wohingegen die ähnlich stark exprimierte Mutante M11 im unbehandelten Lysat ein schwaches und in den RNase behandelten Lysaten starke Signale gab (Abb. 19A, B).

Die native Gelelektrophorese ergab, daß für den Einbau von Pes1 in den PeBoW-Komplex nicht die gesamte NPLP-Domäne notwendig ist, die ersten 54 Aminosäuren sind hierfür entbehrlich. Von den Pes1-Mutanten verhinderte keine die Bindung von RNS durch den PeBoW-Komplex. Die Monomere von Wildtyp-Pes1 und einige seiner Mutanten waren ebenfalls in der Lage, mit RNS zu assoziieren.



**Abb. 18: Inkorporation der Pes1-Mutanten in den PeBoW-Komplex: Native Gelelektrophorese**

Proliferierende U2OS-Zelllinien wurden für 20 h mit Doxycyclin behandelt, unter nicht denaturierenden Bedingungen lysiert und die Proteinkomplexe über Polyacrylamidgele aufgetrennt. Parallele Ansätze wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen Pes1 (8E9), WDR12 (1B8), Bop1 (6H11) und das HA-Epitop (3F10) untersucht.



**Abb. 19: Native Gelelektrophorese der Pes1-Mutanten nach RNase A-Behandlung**

Proliferierende TGR-1-Zelllinien wurden für 24 h mit Doxycyclin kultiviert und unter nicht denaturierenden Bedingungen lysiert. Die Lysate wurden unbehandelt oder nach der Behandlung mit unterschiedlichen Mengen RNase A über Polyacrylamidgele aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen das HA-Epitop untersucht.

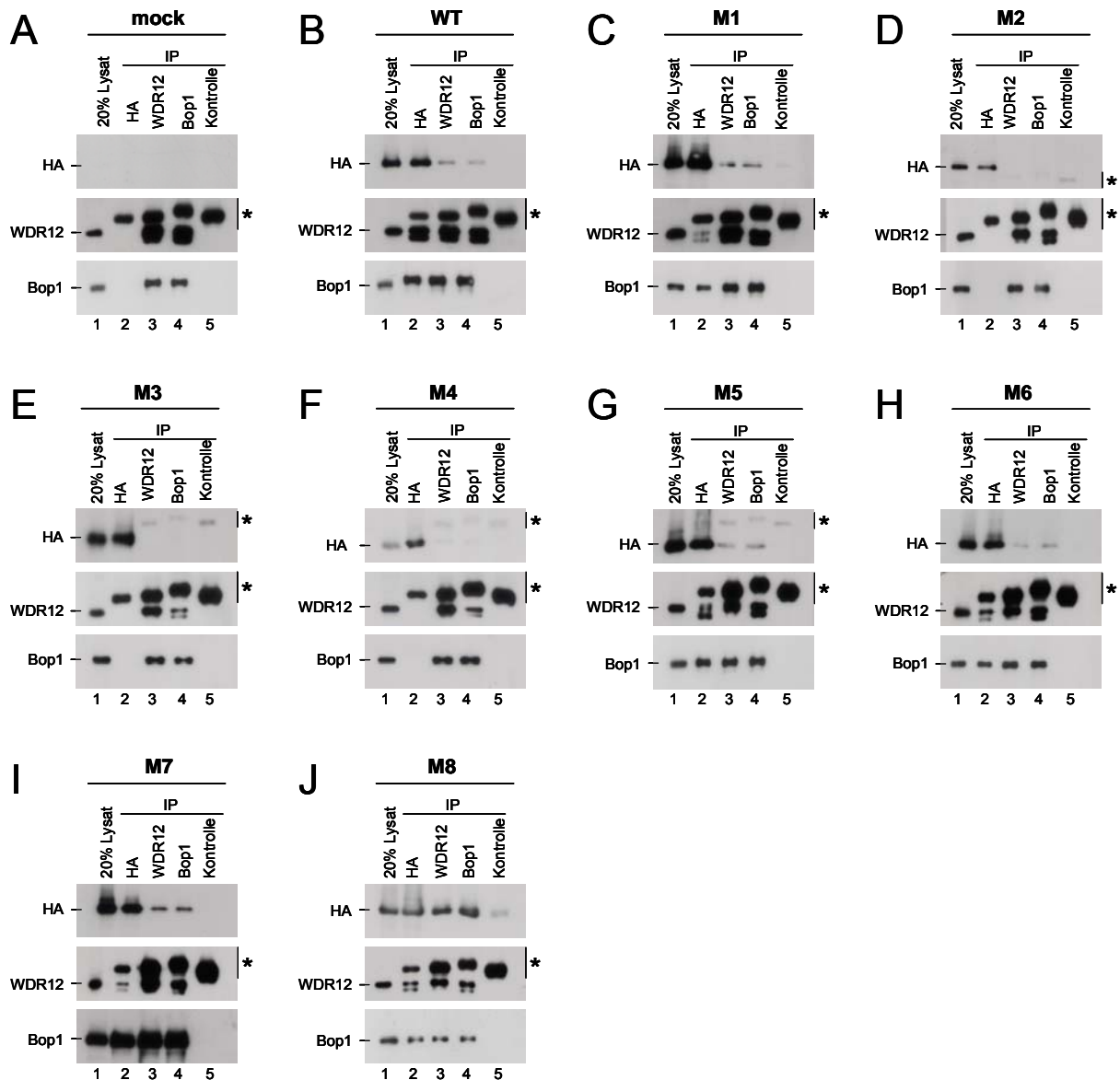


#### 4.2. Co-Immunpräzipitationen

Die Inkorporation der Pes1-Mutanten in den PeBoW Komplex wurde neben der nativen Gelelektrophorese auch über Immunpräzipitationen (IP) untersucht. Hierfür wurden entsprechende U2OS-Zelllinien für 20 h mit Doxycyclin kultiviert. Die Präzipitation erfolgte durch Antikörper gegen die Komponenten des PeBoW-Komplexes Bop1 und WDR12, die Pes1-Mutanten wurden mit Antikörpern gegen ihr HA-Epitop präzipitiert. Eine Isotyp-Kontrolle wurde mitgeführt.

Die Luziferase-exprimierende mock-Zelllinie zeigte keinerlei Reaktivität gegenüber den HA-Antikörpern (Abb. 20A, oberes Feld). Weder WDR12 noch Bop1 konnten in der IP gegen das HA-Epitop nachgewiesen werden (Spur 2). WDR12 und Bop1 präzipitierten sich über den endogenen PeBoW Komplex gegenseitig (Spur 3 und 4). Der Kontrollantikörper war nicht in der Lage, WDR12 oder Bop1 zu präzipitieren (Spur 5). Das rekombinante Wildtyp-Pes1-Protein wurde sowohl über sein HA-Epitop präzipitiert, als auch mit WDR12 und Bop1 copräzipitiert (Abb. 20B, oberes Feld). Die Präzipitation des HA-Epitops führte zu einer Copräzipitation von WDR12 und Bop1 (Spur 2). Das rekombinante Wildtyp-Protein wird somit in den PeBoW-Komplex eingebaut. Bei der Immunpräzipitation von Pes1 zeigte sich eine Tendenz, die auch bei den Immunpräzipitationen der Mutanten zu beobachten war: der Antikörper gegen das HA-Epitop präzipitiert neben einer großen Menge rekombinantes Proteins auch große Mengen WDR12 und Bop1. Im Gegensatz dazu wurde nur wenig rekombinantes Protein mit WDR12 oder Bop1 copräzipitiert. Offensichtlich enthält 20 h nach Induktion der Vektoren nur ein geringer Teil der PeBoW-Komplexe das rekombinante Protein.

Die N-terminal um 54 Aminosäuren verkürzte Mutante M1 wurde über WDR12 und Bop1 copräzipitiert. Sie war ihrerseits auch in der Lage, WDR12 und Bop1 zu copräzipitieren (Abb. 20C, oberes Feld und Spur 2). Die Mutanten M2 und M3, deren N-Termini um 154 bzw. 249 Aminosäuren verkürzt sind, wurden nicht mit WDR12 und Bop1 copräzipitiert. Beide Mutanten waren auch nicht zur Copräzipitation von WDR12 und Bop1 in der Lage (Abb. 20D und E, jeweils oberes Feld und Spur 2). Während die N-terminale Verkürzung um 54 Aminosäuren in Mutante M1 immer noch einen Einbau des Proteins in den PeBoW-Komplex ermöglicht, verhindert eine Erweiterung der Deletion auf 154 bzw. 249 Aminosäuren den Einbau der Mutanten M2 bzw. M3.



**Abb. 20: Inkorporation der Pes1-Mutanten in den PeBoW-Komplex: Immunpräzipitation**

Die angegebenen U2OS-Zelllinien wurden subkonfluent ausplattiert, und 20 h mit Doxycyclin induziert. Nach der Lyse wurde eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen das HA-Epitop (3F10), WDR12 (1B8), Bop1 (6H11) und mit einer Isotypkontrolle durchgeführt. Die Präzipitate wurden mit Antikörpern gegen das HA-Epitop (3F10), WDR12 (1B8) und Bop1 (6H11) untersucht. Die in jeder Spur aufgetragenen Mengen entsprechen dem gleichen Volumen Lysat, bzw. 20% davon. Die Sternchen bezeichnen die schweren Ketten der verwendeten Antikörper.

Die Deletion des mittleren Bereiches von Pes1 in Mutante M4, der die BRCT-Domäne enthält, verhinderte eine Copräzipitation von WDR12 und Bop1 mit dem rekombinanten Protein. Mit WDR12 und Bop1 wurden jedoch minimale Mengen der Mutante M4 copräzipitiert. (Abb. 20F, oberes Feld und Spur 2). Da der Unterschied zwischen der Copräzipitation des HA-Epitops mit WDR12 bzw. Bop1 und der

Isotypkontrolle gering war und die Mutante M4 WDR12 und Bop1 nicht copräzipitierte, wird M4 höchstwahrscheinlich nicht in den Komplex eingebaut.

M5, die zweite dominant-negative Mutante, war in der Lage, WDR12 und Bop1 zu copräzipitieren und wurde ihrerseits von WDR12 und Bop1 copräzipitiert. Gleiches gilt für die Mutanten M6, M7 und M8. Somit werden die Mutanten M5 bis M8 in PeBoW inkorporiert (Abb. 20G bis J, jeweils oberes Feld und Spur 2).

Die Untersuchung der Mutanten M9, M10 und M11 mit der Immunpräzipitation war nicht erfolgreich, da ihr Expressionsniveau in U2OS-Zellen zu gering war.

Über die Immunpräzipitation konnten zwei Bereiche identifiziert werden, die für die Inkorporation in den PeBoW-Komplex essentiell sind: Der Bereich zwischen Position 54 und 154, ggf. auch bis Position 249 und der Mittelteil des Proteins, welcher die BRCT-Domäne enthält. Damit deckt sich das Ergebnis der Immunpräzipitation mit dem der nativen Gelelektrophorese.

## Diskussion

Beim Durchlaufen des Zellzyklus muß die eukaryontische Zelle wachsen, d.h. an Masse zunehmen. Der Zellzyklus kann in verschiedene Phasen unterteilt werden, der Übergang von einer Phase auf die nächste wird über die Zellzyklusmaschinerie bewerkstelligt, und durch verschiedene Kontrollpunkte überwacht. Dieses Prinzip ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert, ebenso wie die Notwendigkeit, die Ribosomenbiogenese als den energieaufwendigsten Prozeß des Wachstums mit der Progression durch den Zellzyklus zu koordinieren. Dies läßt sich über mehrere Mechanismen bewerkstelligen. Eine Möglichkeit besteht in der Messung der translationalen Kapazität der Zelle, was in der Hefe bei der Synthese von Cln3p verwirklicht ist. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Proteinen in mehreren essentiellen Prozessen. Nop7p, ein essentielles Protein in der Ribosomenbiogenese, verfügt beispielsweise über eine BRCT-Domäne, die zuerst als für die Funktion des Tumorsuppressors BRCA1 essentielle Domäne beschrieben wurde. Ähnliche Domänen wurden in Proteinen identifiziert, die in der DNS Schadenskontrolle, Reparatur und Replikation eine Rolle spielen. Viele der BRCT-Domänen enthaltenden Proteine haben eine Bindungsaktivität für Phosphopeptide. Das deutet darauf hin, daß BRCT-Domänen phosphorylierungsabhängige Protein-Protein Interaktionen vermitteln, wie sie an Zellzyklus-Kontrollpunkten und in der DNS-Reparatur eine zentrale Rolle spielen. Es ist verlockend zu spekulieren, daß die BRCT-Domäne von Pes1 vielleicht eine ähnliche Rolle spielen könnte, um so nukleoläre Prozesse mit der Zellzykluskontrolle und DNS-Synthese zu verbinden. Tatsächlich ist Nop7p, das im Komplex mit Ytm1p und Erb1p vorliegt, nicht nur für die Reifung der pre-rRNS essentiell, sondern auch für die Replikation. Darüber hinaus weist die Assoziation von Nop7p mit Cdc28p, der Cdk der Hefe, sowie mit Mec1p und Dun1p, zwei Proteinen mit Funktion in den Kontrollpunkten, auf weitere Funktionen von Nop7p in der Zellzykluskontrolle hin (Adams *et al.*, 2002; Du und Stillman, 2002; Oeffinger *et al.*, 2002). Dies macht den Komplex um Nop7p zu einem interessanten Kandidaten für einen Koordinator von Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle. Die Ribosomenbiogenese stellt einen hochkonservierten Prozeß dar, was eine Konservierung der Kontrollfunktion von Nop7p wahrscheinlich macht. In Säugern existiert mit Pes1 ein mit Nop7p zu 40% identisches Protein, das mit WDR12 und Bop1, den Homologen von Ytm1p und Erb1p, den sogenannten

PeBoW-Komplex bildet. Es konnte gezeigt werden, daß dominant-negative Mutanten von Bop1, aber auch von WDR12 und Pes1, die Prozessierung der ribosomalen RNS blockieren und die Zellen im Zyklus arretieren (Hölzel *et al.*, 2005; Lapik *et al.*, 2004; Pestov *et al.*, 2001b; Strezoska *et al.*, 2002). Wie der Komplex der Hefe scheint der PeBoW-Komplex damit eine Rolle in der Koordination von Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle innezuhaben. Die starke Konservierung des Komplexes in der Evolution legt nahe, daß seine Beteiligung an weiteren zellulären Prozessen jenseits der Ribosomenbiogenese ebenfalls von der Hefe bis zum Menschen konserviert sein könnte.

Um die Rolle von Pes1 in der Zelle näher zu beleuchten, sollen hier zunächst die Interaktionen des Pes1-Homologs Nop7p beschrieben und ihre Rolle an der Transformation betrachtet werden. Danach folgt die Diskussion der Ergebnisse aus der Mutationsanalyse und der Wirkungsweise der dominant-negativen Mutanten.

### 1. Komplexe von Nop7p

Die Rolle des PeBoW-Komplexes in der Ribosomenbiogenese, die fehlende katalytische Aktivität seiner Komponenten und das Vorhandensein von Interaktionsdomänen – WD40-Motive und BRCT-Domäne – legen den Schluß nahe, daß der PeBoW-Komplex seine Funktion vor allem über die Vermittlung von Interaktionen ausübt. Die Betrachtung seiner Interaktionspartner sollte daher Aufschluß über die zellulären Prozesse geben, an denen er beteiligt ist. Bedauerlicherweise ist nur wenig über die Interaktionspartner von Pes1, WDR12 oder Bop1 in Säugern bekannt. Die Interaktionen von Nop7p, Ytm1p und Erb1p sind durch die gute experimentelle Zugänglichkeit der Hefe weit besser untersucht. Die kürzlich durchgeführte Untersuchung des Hefe-Interaktoms durch Krogan *et al.* lieferte mehr als 1300 Interaktionen von Nop7p, die bislang jedoch noch nicht komplett aufgearbeitet wurden (Krogan *et al.*, 2006). Die Daten von Krogan *et al.* wurden der BioGRID-Datenbank (<http://thebiogrid.org>) zugeleitet. Die bestätigten und prozessierten Interaktionen geben zur Zeit jedoch ein eher lückenhaftes Bild von den Komplexen wieder, an denen Nop7p beteiligt ist. Beispielsweise wird Nog2p nur als Interaktionspartner von Nop7p beschrieben, obwohl das Protein im Nukleolus mit den ribosomalen pre-60S Partikeln assoziiert und für deren Export essentiell ist (Du und

Stillman, 2002; Gavin *et al.*, 2006). Nach dem von Miles *et al.* vorgeschlagenen Modell zur Bildung des trimeren Komplexes in der Hefe werden die einmal gebildeten Komplexe wiederverwendet und dissoziieren nicht (Miles *et al.*, 2005). Damit sollten auch Ytm1p und Erb1p mit Nog2p interagieren. Einige der bekannten Interaktionen von Nop7p sollen hier diskutiert werden, da die starke Konservierung des PeBoW-Komplexes in der Evolution Aufschluß über die Prozesse geben kann, an denen der PeBoW-Komplex in Säugern beteiligt sein könnte.

### **1.1. An der Ribosomenbiogenese und der Zellzyklusprogression beteiligte Interaktionspartner**

Als Komplex mit essentieller Funktion in der Ribosomenbiogenese interagiert der PeBoW-Komplex erwartungsgemäß mit einer Vielzahl von ribosomalen Proteinen und Prozessierungsfaktoren. Die an der Ribosomenbiogenese beteiligten Interaktionspartner von Nop7p decken sich mit den von Dez *et al.* postulierten Komplexen (Dez und Tollervey, 2004). Hinzu kommen noch einige andere Proteine, wie Naf1p und Nhp2p, die für die Assemblierung bzw. Funktion von H/ACA-snoRNPs verantwortlich sind, oder auch Rrs1p, das am Export der Ribosomen aus dem Nukleolus beteiligt ist. Die Interaktionen mit Srp1p und Kap95p, zwei Proteine mit Funktion im Proteinimport in den Nukleus, sowie Nup116p, einer Untereinheit des Kernporenkomplexes, spiegeln möglicherweise die Importroute von Nop7p in den Kern wieder (Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006; Krogan *et al.*, 2004; Rout *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2005).

Bei der Isolation des Komplexes aus Nop7p, Ytm1p und Erb1p wurde eine Interaktion des Komplexes mit Cdc28p, Mec1p und Dun1p, der Hefe Cdk und zwei Kontrollpunktproteinen, beschrieben (Du und Stillman, 2002). Möglicherweise sind diese Interaktionen Teil eines Mechanismus, der bei Störungen in der pre-rRNS Prozessierung den Zellzyklus negativ reguliert.

## 1.2. An der Replikation beteiligte Interaktionspartner

Die Beteiligung von Nop7p an der Replikation ist schon seit einiger Zeit bekannt. Du *et al.* zeigten die Interaktion von Nop7p mit den „Origin Recognition Complex“-Proteinen Orc1p, Orc2p und Orc3p sowie dem „Minichromosome Maintenance“-Protein Mcm6p. Die vier Proteine sind in der BioGRID-Datenbank nur als Interaktionspartner von Nop7p beschrieben, experimentelle Daten legen jedoch die Interaktion des gesamten trimeren Komplexes mit diesen vier Proteinen nahe (Du und Stillman, 2002).

In Eukaryonten enthält jedes rDNS-Element einen Replikationsursprung. In der Hefe arretiert Fob1p die Replikationsgabel, um einen Konflikt zwischen Replikation und rDNS-Transkription zu verhindern. Fob1p interagiert im Yeast-two-hybrid Experiment mit Nog1p, das sowohl als Bestandteil des großen Nop7p-Komplexes beschrieben, als auch in der Immunpräzipitation von Orc1p identifiziert wurde. Daraus schlossen Du *et al.*, daß Nop7p an der Koordination von Transkription und Replikation des rDNS-Locus in der Hefe beteiligt sein könnte (Du und Stillman, 2002). In diesem Fall wäre zu erwarten, daß die Interaktion von Nop7p und dem ORC-Komplex nur in der Nähe des Nukleolus stattfindet. Eine Funktion von Nop7p an der Replikation konnte durch die Verwendung einer thermosensitiven Mutante identifiziert werden. Die Depletion von Nop7p in Zellen, die in der frühen S-Phase arretiert waren, hatte ein verlangsamtes Durchlaufen der S-Phase nach Aufhebung des Arrestes zur Folge. Die Inhibition der Replikation ist unabhängig von einem Effekt der Nop7p-Depletion auf die Ribosomenbiogenese, da die Depletion eines anderen Prozessierungsfaktors die Replikation nicht beeinträchtigte. Du *et al.* vermuteten, daß über eine Koordination von Transkription und Replikation des rDNS-Lokus der hohe Bedarf an Ribosomen in proliferierenden Zellen sichergestellt werden könnte (Du und Stillman, 2002).

## 1.3. Interaktionspartner mit Funktion in der Mitose und der Organisation des Zytoskeletts

Die Mitose bildet den Abschluß des Zellzyklus. In der M-Phase werden die Chromosomen gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt bzw. bei der Knospung der

Hefe zwischen Mutter- und Tochterzelle aufgeteilt. In der Hefe konnte Rrb1p als Interaktionspartner von Nop7p und Erb1p identifiziert werden. Eine thermosensitive Mutante von Rrb1p blockierte die Metaphase/Anaphase-Transition. Dieser Phänotyp konnte durch Überexpression von *RPL3*, einer Komponente der 60S ribosomalen Untereinheit und ebenfalls Interaktionspartner von Nop7p, supprimiert werden, wie auch durch eine Überexpression von *ERB1* und *ORC6* (Killian *et al.*, 2004). Die Entsprechung des PeBoW-Komplexes in der Hefe scheint für den korrekten Ablauf der Mitose notwendig zu sein. Eine Rolle des PeBoW-Komplexes in der Mitose konnte auch in Säugerzellen nachgewiesen werden. Die Depletion von Pes1, Erb1, Orc6, dem *RRB1*-Homolog GRWD und Rpl3 über siRNS resultierte in einem Anstieg an aberranten Mitosen. Die Überexpression von Bop1 rief einen ähnlichen Effekt hervor (Killian *et al.*, 2004; Killian *et al.*, 2006). Es ist bekannt, daß der PeBoW-Komplex auch in Actinomycin D behandelten, d.h. in der Metaphase arretierten Zellen stabil ist, und daß Pes1 und WDR12 während der M-Phase wie viele nukleoläre Proteine an der Oberfläche der kondensierten Chromosomen lokalisieren (M. Rohrmoser bzw. M. Hölzel, persönliche Kommunikation; Lerch-Gaggl *et al.*, 2002). Somit steht zu erwarten, daß auch Bop1 in der Mitose an den Chromosomen lokalisiert. Möglicherweise spielen die Komponenten des PeBoW-Komplexes eine Rolle bei der korrekten Bindung des Spindelapparates an die Chromosomen. In der Hefe wurden mit Bni1p, Nap1p und Pds5p mehrere Proteine als Bindungspartner für Nop7p identifiziert, die an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind. Bni1p spielt eine Rolle in der Orientierung der mitotischen Spindel, Nap1p interagiert mit dem M-Phase-Cyclin Clb2p und wird für die Regulation der Mikrotubulus-Dynamik während der Mitose benötigt, während Pds5p eine Rolle in der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Schwesterchromatidkondensation spielt (Davierwala *et al.*, 2005; Krogan *et al.*, 2006).

Es ist unklar, ob diese Interaktionen eine Funktion von Nop7p widerspiegeln, oder ob sie eine Konsequenz der allgemeinen Lokalisation nukleolärer Proteine in der Mitose darstellen. Trifft letzteres zu, wäre der Phänotyp der Pes1-Depletion und Bop1-Depletion bzw. -Überexpression das Ergebnis einer Störung im Aufbau der perichromosomalen Schicht aus den nukleolären Proteinen. Für diese Deutung der Daten spricht, daß die Depletion des ribosomalen Proteins Rpl3 ebenfalls zum Auftreten aberranter Mitosen führt. Da dieser Phänotyp auch durch Depletion von



Orc6 hervorgerufen wird, kommt eine Störung in der Replikation ebenfalls als Ursache für die aberranten Mitosen in Frage (Killian *et al.*, 2004).

#### **1.4. An der Modifikation der Chromatinstruktur beteiligte Interaktionspartner**

In der Hefe konnten zwei Interaktionspartner von Nop7p identifiziert werden, die eine Rolle in der Modifikation der Chromatinstruktur spielen. Swd3p, ein Mitglied der WD40  $\beta$ -Propeller Superfamilie, ist eine essentielle Untereinheit des COMPASS (Set1C) -Komplexes. Der Komplex methyliert Histon H3 an Lysin 4 und ist für das transkriptionelle Silencing nahe der Telomere notwendig. Hta1p stellt einen von zwei beinahe identischen Histon H2A-Subtypen dar (Du und Stillman, 2002; Ho *et al.*, 2002).

Eine Funktion von Pes1 bei der Modifikation der Chromatinstruktur konnte auch in Säugern nachgewiesen werden. Zhang *et al.* zeigten über die artifizielle Rekrutierung von Pes1 an ein Chromosom, daß Pes1 die Dekondensation von Chromatin zu induzieren vermag. Diese Fähigkeit wurde auf die BRCT-Domäne von Pes1 eingegrenzt (Zhang *et al.*, 2005). In einer Zelle sind nicht alle rRNS-Gene aktiv. Die rDNS an den Nucleolar Organizer Regions (NOR) wird unter anderem über Positionseffekte durch Heterochromatin inaktiviert (Guillen *et al.*, 2004). Eine mögliche Funktion der Chromatindekondensation durch Pes1 besteht in der Etablierung bzw. Aufrechterhaltung der rDNS-Transkription an aktiven NORs. Ob dies direkt durch die Rekrutierung eines entsprechenden Chromatin-modifizierenden Komplexes durch Pes1 geschieht, oder indirekt über die Rekrutierung weiterer nukleolärer Faktoren ist bislang eine offene Frage.

#### **1.5. Die Interaktionspartner von Nop7p legen eine Beteiligung des Proteins in einem weiten Spektrum zellulärer Prozesse nahe**

Die Rolle von Nop7p in Ribosomenbiogenese, Replikation, Mitose und Chromatin-Modifikation wurde explizit untersucht und die Beteiligung von Nop7p an diesen Prozessen belegt. Für Nop7p sind weitere Interaktionspartner beschrieben, die eine Beteiligung von Nop7p an weiteren zellulären Prozessen nahelegen. Diese umfassen

unter anderem Cka1p, Cka2p und Ckb2p, zwei katalytische und eine regulatorische Untereinheit der Casein Kinase II. Zu den Zielen dieser Kinase zählen Transkriptionsfaktoren und alle RNS-Polymerasen (Ho *et al.*, 2002). Es ist fraglich, in welchem Zusammenhang diese Interaktion von Nop7p zu sehen ist. Sie könnte zum einen einfach eine Konsequenz aus der Interaktion von CKII mit RNS-Polymerase I darstellen, deren Transkript, die 35S pre-rRNS, unter Mitwirkung von Nop7p prozessiert wird. Zum anderen könnte die Interaktion von Nop7p und CKII auf einen weiteren zellulären Prozeß mit Beteiligung von Nop7p hinweisen.

Weitere Interaktionspartner von Nop7p, sind Spt5p und Ela1p, die an der Elongation der Transkription beteiligt sind, sowie die an der Translation beteiligten Proteine Tif2p und Tif5p (Gavin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006; Lindstrom *et al.*, 2003). Mit Sop4p und Dss4p interagiert Nop7p mit Proteinen, die am Proteintransport über das endoplasmatische Retikulum mitwirken (Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006). Eine Reihe mitochondrialer Proteine wurden ebenfalls als Interaktionspartner von Nop7p identifiziert. Rrf1p ist als Recycling-Faktor der mitochondrialen Ribosomen für die Proteinsynthese und respiratorische Funktion der Mitochondrien essentiell. Mss1p spielt eine Rolle bei der Reifung der tRNS. Mam33p ist an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt (Harnpicharnchai *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die für Nop7p beschriebenen Interaktionen auf eine Beteiligung des Proteins an vielen zellulären Prozessen hindeuten. Über die exakte Funktion dieser Beteiligung kann jedoch keine definitive Aussage getroffen werden.

## 2. Pes1 und Transformation

Die Transformation von Zellen beruht auf dem Eintreten onkogener Ereignisse, wie z.B. Deregulation der *myc*-Expression oder Inaktivierung von p53. Seit kurzem wird auch eine Deregulation der Ribosomenbiogenese als onkogenes Ereignis diskutiert (Ruggero und Pandolfi, 2003). Die Grundlage hierfür ist, daß Veränderungen des Nukleolus ein verlässliches Zeichen der Transformation darstellen und daß einige Tumorsuppressoren wie z.B. p53 die Aktivität der für die Ribosomenbiogenese verantwortlichen RNS-Polymerasen I und III negativ regulieren. Zudem findet man in

Tumoren häufig eine Überexpression ribosomaler Proteine vor (Cairns und White, 1998; Ferrari *et al.*, 1990; Gani, 1976; Kondoh *et al.*, 2001; Loging und Reisman, 1999; Zhai und Comai, 2000). Experimentelle Daten belegen, daß auch Pes1 eine Rolle in der Transformation von Zellen spielen könnte.

Kinoshita *et al.* konnten zeigen, daß in einem Modellsystem der Transformation von Astrozyten in der Maus die Expression von Pes1 im Rahmen der Transformation ansteigt. Darüber hinaus wurde in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 eine weit stärkere Pes1-Expression festgestellt als in humanen Brustepithelzellen (Kinoshita *et al.*, 2001). Kinoshita *et al.* schlossen daraus auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Pes1-Expression und Transformation. Tatsächlich konnte eine transformierende Wirkung von Pes1-Überexpression auf Mausembryofibroblasten gezeigt werden, gemessen an der Induktion von Softagarwachstum (Maiorana *et al.*, 2004; Prisco *et al.*, 2004).

Über welche Mechanismen könnte die Expression von Pes1 die Transformation von Zellen herbeiführen? Die Interaktionen von Nop7p können ggf. Aufschluß über transformationsrelevante Prozesse mit Beteiligung von Pes1 geben. Die Funktion von Pes1 in der Mitose hat den augenscheinlichsten Bezug auf die Transformation. Die Depletion von Pes1 oder Bop1p führen zum Auftreten aberranter Mitosen. Die Überexpression von Bop1 – möglicherweise auch die Überexpression von Pes1 – ruft ebenfalls aberrante Mitosen hervor. Aberrante Mitosen haben chromosomale Instabilität zur Folge, was auch in vielen Tumoren zu beobachten ist (Killian *et al.*, 2004; Killian *et al.*, 2006). Ein Mechanismus der Transformation durch erhöhte Pes1-Expression bestünde demnach in der Induktion chromosomaler Instabilität, was das Auftreten weiterer onkogener Ereignisse wie Translokationen begünstigen würde.

Die vermutete Funktion von Nop7p bei der Koordination von Replikation und Ribosomenbiogenese stellt einen weiteren Aspekt mit Bezug auf die Transformation dar (Du und Stillman, 2002). In primären Säugerzellen, nicht jedoch in Tumor- und immortalisierten Zellen, initiiert die Replikation in Foci nahe des Nukleolus. Diese Foci beinhalten transkribierte rDNA, wie über die Colokalisation von UBF gezeigt werden konnte (Kennedy *et al.*, 2000). Du *et al.* schlossen daraus, daß in Tumorzellen der Mechanismus zur Koordination von Replikation und Ribosomenbiogenese gestört sein muß (Du und Stillman, 2002). Die Störung könnte auf der verstärkten Pes1-Expression in transformierten Zellen beruhen. In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung von Interesse, daß die Expression von

Pes1 die Dekondensation von Chromatin induziert (Zhang *et al.*, 2005). Falls Pes1 in immortalisierten Zellen nicht nur im Umfeld der Nukleoli sondern genomweit an die ORC-Komplexe rekrutiert wird, könnte dies zu einer weitreichenden Dekondensation des Chromatins führen. Die Konformation des Chromatins hat in Eukaryonten eine bedeutende Funktion in der Genregulation, die Dekondensation könnte zur Deregulierung der Expression von Protoonkogenen führen und so ein onkogenes Ereignis darstellen.

Einen weiteren Beitrag zur Transformation durch Pes1 könnte in einer Interaktion mit Casein Kinase II (CKII) bestehen, wie sie für Nop7p beschrieben wurde. CKII ist ein positiver Regulator des Wnt-Signalwegs und ihre Überexpression führt zu Tumorprädisposition (Seldin *et al.*, 2005).

### **3. Effekt der ektopischen Pes1-Expression**

Das endogene Pes1-Protein ist als Bestandteil des PeBoW-Komplexes an der Prozessierung der pre-rRNS beteiligt. Rekombinant exprimiertes Wildtyp-Pes1 wurde ebenfalls in den PeBoW-Komplex inkorporiert, lokalisierte wie das endogene Protein nukleolär und seine Expression hatte keinen Einfluß auf die Prozessierung der pre-rRNS. Das rekombinante Wildtyp-Pes1 ist somit biologisch voll aktiv. Seine Expression bewirkte jedoch eine Verminderung der Zellzahl im Proliferationsexperiment. Pes1 spielt in diversen Prozessen eine Rolle, der Effekt der Pes1-Expression im Proliferationsexperiment beruht wahrscheinlich auf der Störung dieser zellulären Prozesse durch eine erhöhte Menge an Pes1-Protein.

Die Expression von Pes1 bewirkt keine Apoptose, wie die Untersuchung induzierter Kulturen auf tote Zellen ergab. Eine Arretierung der Zellen konnte im BrdU/light-Versuch nicht nachgewiesen werden. Sie kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, da die Markierung proliferierender Zellen mit BrdU über einen langen Zeitraum zu ungenau ist, um eine schwache Inhibition der Zellzyklusprogression gut aufzulösen. Das Zellzyklusprofil zeigte jedoch keinen Anstieg der Zellenzahlen in der G0/G1- bzw. G2-Phase, was der Induktion eines Zellzyklusarrestes widerspricht. Eine Akkumulation von p53 wurde im Western Blot nicht festgestellt, aber in der Immunfluoreszenz gegen p53 zeigten 8,9% der Zellen eine Akkumulation von p53 24 h nach Induktion von Wildtyp-Pes1 (Grimm *et al.*, 2006). Dieser Prozentsatz liegt

nahe genug an den geforderten 10%, um den Phänotyp der Pes1-Expression im Proliferationsexperiment zu erklären (s. Ergebnisteil). Über p53 kann sowohl Apoptose als auch ein Zellzyklusarrest induziert werden. Die in der quantitativen RT-PCR festgestellte p21 Induktion spricht jedoch gegen die Apoptose, da für p21 in vielen Systemen eine antiapoptotische Wirkung demonstriert werden konnte (Gartel und Tyner, 2002).

#### 4. Funktionelle Domänen von Pes1

Aus der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse der Pes1-Mutanten konnte die Bedeutung verschiedener Bereiche von Pes1 für die Lokalisation des Proteins, seine Inkorporation in den PeBoW-Komplex und seine Funktion in der pre-rRNS Prozessierung bestimmt werden. Während der Entstehung dieser Arbeit veröffentlichten Lapik *et al.* eine Untersuchung von Pes1-Mutanten, die über transposonabhängige Insertion von 19 Aminosäuren generiert worden waren. Diese Zufallsmutanten wurden auf die Fähigkeit selektiert, einen reversiblen Zellzyklusarrest zu induzieren, um über den Insertionsort die Funktion wichtiger Domänen von Pes1 definieren zu können (Lapik *et al.*, 2004). Die Ergebnisse beider Mutagenesen lassen eine detaillierte Aussage über die funktionellen Bereiche von Pes1 zu (Abb. 21A).

##### 4.1. Die NPLP-Domäne

Pes1 verfügt über eine N-terminale NPLP-Domäne von etwa 250 Aminosäuren Länge, die bei den pescadillo-artigen Proteinen aller Eukaryoten auftritt. Bei den Pes1-Mutanten M1, M2 und M3 wurde die NPLP-Domäne in unterschiedlichem Maße deletiert. Die Deletion von 54 Aminosäuren in der Mutante M1 führte zu einem starken dominant-negativen Phänotyp in der pre-rRNS Prozessierung und Proliferation. Die Inkorporation des Proteins in den PeBoW-Komplex war nicht betroffen, wie die Daten aus der Immunpräzipitation und der nativen Gelelektrophorese zeigten. Die Verteilung des Proteins auf dem Sucrose-Gradienten unterstützt diesen Befund (Grimm *et al.*, 2006). Die Insertionsmutagenese bestätigt

die Bedeutung der N-terminalen 54 Aminosäuren für die Funktion von Pes1. Die Insertion von 19 Aminosäuren nach Position 39 (Pes1-tn14) bzw. 50 (Pes1-tn13) führt ebenfalls zu einem dominant-negativen Phänotyp, ohne die nukleoläre Lokalisation oder Interaktion mit Bop1 zu beeinträchtigen. Damit ist der Bereich zwischen Position 1 und 54 für die nukleoläre Lokalisation und den Einbau von Pes1 in den PeBoW-Komplex entbehrlich, trägt aber eine essentielle Funktion für die Prozessierung der pre-rRNS.

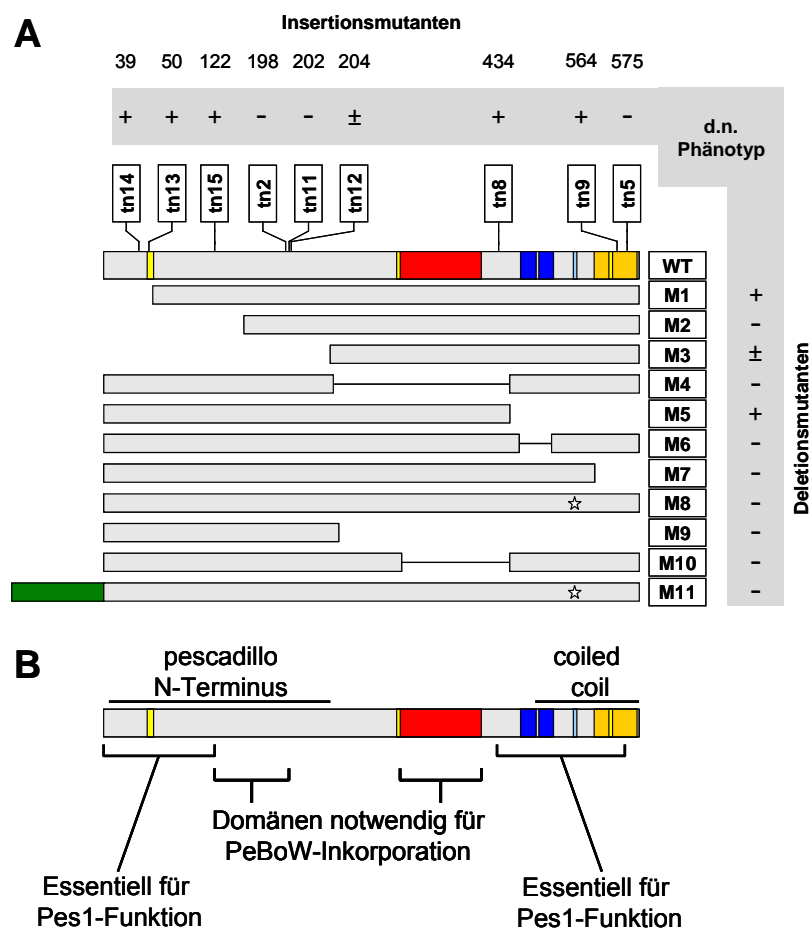
Die Deletion der N-terminalen 154 bzw. 249 Aminosäuren in den Mutanten M2 und M3 erlaubt noch einen Transport der Proteine in den Nukleus, ein Transport in den Nukleolus findet jedoch nicht statt. Damit einhergehend zeigen sich beide Proteine unfähig, Bop1 und WDR12 zu co-präzipitieren. Die Insertion in Pes1-tn15 liegt im deletierten Bereich von Mutante M2 und ruft einen dominant-negativen Phänotyp hervor, beeinträchtigt die Interaktion mit Bop1 bzw. die nukleoläre Lokalisation des Proteins jedoch nicht. Die Interaktionsdomäne für Bop1 wurde über die Insertionsmutanten Pes1-tn2, Pes1-tn11 und Pes1-tn9 identifiziert, die eine Insertion nach Position 198, 202 und 204 des Pes1-Proteins trugen. Die ersten beiden Mutationen zerstörten die Interaktion von Pes1 mit Bop1 im Yeast two hybrid-Versuch, bei Pes1-tn9 war die Interaktion abgeschwächt. Damit erstreckt sich der für die pre-rRNS Prozessierung essentielle Bereich der NPLP-Domäne nicht nur bis Position 54, sondern mindestens bis Position 122, während die Domäne für die Bop1-Interaktion zwischen Position 122 und 154 beginnt und sich etwa bis Position 204 erstreckt (Abb. 21B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die N-terminale Hälfte der NPLP-Domäne für die Funktion von Pes1 essentiell ist, während die C-terminale Hälfte essentiell für die nukleoläre Lokalisation des Proteins und dessen Inkorporation in den PeBoW-Komplex ist.

#### **4.2. Die BRCT-Domäne**

Neben der NPLP-Domäne ist auch die BRCT-Domäne ein Bestandteil der meisten pescadillo-artigen Proteine, sie fehlt nur in einigen niederen Organismen wie *Plasmodium falciparum*. In Mutante M4 wurde der mittlere Bereich von Pes1

einschließlich der BRCT-Domäne (BRCA1 C-terminal) deletiert, was die nukleoläre Lokalisation und die Inkorporation der Mutante in den PeBoW-Komplex verhinderte. Die Deletion in Mutante M10 umgrenzt die BRCT-Domäne enger als in M4 und verhindert ebenfalls nukleoläre Lokalisation des Proteins. Die BRCT-Domäne scheint damit von essentieller Bedeutung für die Interaktion von Pes1 mit WDR12 und Bop1 zu sein. Dies wird durch den Befund unterstützt, daß Punktmutationen in Wildtyp-Pes1, die die Funktion der BRCT-Domäne zerstören, auch die Copräzipitation von WDR12 und Bop1 sowie die nukleoläre Lokalisation der Mutanten verhindern (M. Hölzel, Publikation in Vorbereitung).



**Abb. 21: Zusammenfassung der Pes1-Mutagenesen**

(A) Übersicht über die bekannten Pes1-Mutanten und ihren Phänotyp. Die Deletionsmutanten wurden in dieser Arbeit generiert, die Insertionsmutanten in Lapik *et al.* 2004 veröffentlicht. (B) Definition der funktionellen Bereiche von Pes1. Zugrunde liegen die kombinierten Informationen der Insertions- und Deletionsmutagenese.

Wie interagieren Pes1, Bop1 und WDR12 im PeBoW-Komplex? Es ist anzunehmen, daß, analog zur Hefe, Pes1 mit Bop1, nicht aber mit WDR12 interagiert. Die Interaktion von Pes1 und WDR12 erfolgt demnach indirekt über die Interaktion beider Proteine mit Bop1 (Miles *et al.*, 2005). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, daß alle Pes1-Mutanten entweder mit Bop1 und WDR12 interagieren, oder mit keinem der beiden Proteine. Für die Interaktion mit Bop1 sind sowohl der N-terminale Teil der NPLP-Domäne als auch die BRCT-Domäne essentiell. Damit stellt sich die Frage, ob beide Domänen mit Bop1 interagieren. Alternativ könnte eine der beiden Domänen für die Interaktion von Pes1 mit Bop1 verantwortlich sein, während die andere Domäne diese Interaktion positiv reguliert. Die Hefehomologe beider Proteine zeigen *in vitro* jedoch Affinität zueinander, was eine positive Regulation ihrer Interaktion überflüssig erscheinen läßt. Die Daten aus den *in vitro* Experimenten müssen jedoch nicht zwingend die Situation *in vivo* widerspiegeln. Nach dem Modell von Miles *et al.* assoziieren in der Hefe Nop7p, Ytm1p und Erb1p bei der Bildung des trimeren Komplexes sequentiell mit den 66S preribosomalen Partikeln. Falls dieses Modell zuträfe, fände die spontane Assoziation von Nop7p und Erb1p in der Zelle nicht statt (Miles *et al.*, 2005).

Die essentielle Bedeutung der BRCT-Domäne für die nukleoläre Lokalisation von Pes1 jedoch wird dadurch in Frage gestellt, daß die NPLP-Domäne in Abwesenheit der BRCT-Domäne ebenfalls in der Lage ist, nukleolär zu lokalisieren. Eine Erklärung für dieses Phänomen bietet das Modell, daß der N-Terminus für die nukleoläre Lokalisation verantwortlich ist und der C-Terminus Information für den Export des Proteins aus dem Nukleolus trägt, während die BRCT-Domäne die Balance zwischen den von beiden Domänen ausgehenden Signalen und damit die Lokalisation des Proteins bestimmt.

Die Theorie wurde über die Mutation der BRCT-Domäne der Mutante M5 getestet. Die Deletion des C-Terminus kombiniert mit der Mutation der BRCT-Domäne hatte eine diffuse nukleoplasmatische Lokalisation von Pes1 zur Folge, was die Theorie widerlegte. Das Protein besteht jedoch nicht nur aus NPLP- und BRCT-Domäne, es umfaßt noch den Bereich zwischen diesen beiden Domänen. Letzterer könnte ebenfalls Einfluß auf die Lokalisation von Pes1 nehmen. Alternativ wäre die nukleoläre Lokalisation des NPLP-Fragments darüber zu erklären, daß es aufgrund seiner geringen Größe den Nukleolus unspezifisch durch Diffusion betritt und dort über Wechselwirkung mit Interaktionspartnern von Pes1 angereichert wird.



Aus der Hefe ist eine Interaktion der BRCT-Domäne von Nop7p mit der katalytischen Domäne der bispezifischen Phosphatase Yvh1p bekannt. Yvh1p ist für das Wachstum der Hefe von Bedeutung, die Deletion des Gens hat einen langsam wachsenden Phänotyp zur Folge. Dieser kann sowohl durch Expression des humanen Orthologs DUSP12/hYVH1 als auch durch Überexpression von *NOP7* kompensiert werden. Yvh1p ist jedoch nicht in der Lage, mit dem vollständigen Nop7p zu interagieren. Die Komplementation der Deletion von *YVH1* durch die Überexpression von *NOP7* macht eine Interaktion beider Proteine *in vivo* jedoch wahrscheinlich, ihre Interaktion könnte über Modifikation von Nop7p gesteuert werden (Sakumoto *et al.*, 2001). Die Existenz einer Phosphatase, die spezifisch mit der BRCT-Domäne von Nop7p interagiert, legt den Schluß nahe, daß die BRCT-Domäne zu irgendeinem Zeitpunkt für diese Phosphatase zugänglich sein muß. Falls das Ziel von Yvh1p das in den Komplex inkorporierte Nop7p ist, kann die Interaktion zwischen Nop7p und Erb1p nicht über die BRCT-Domäne ablaufen. Alternativ könnte auch freies Nop7p das Ziel der Phosphatase sein, dessen Einbau in den PeBoW-Komplex über Dephosphorylierung seiner BRCT-Domäne reguliert wird, oder aber einer Subpopulation von Nop7p, die als Monomer eine Funktion in der Zelle ausübt. Die Interaktion von Pes1 mit einem Ortholog von Yvh1p konnte in Säugerzellen bislang nicht gezeigt werden.

#### 4.3. Der C-Terminus

Der C-Terminus von Pes1 enthält zwei saure Bereiche, ein Konsensus-SUMOylierungsmotiv und NLS-Sequenzen. Die Deletion des C-Terminus in Mutante M5 führte zu einem starken dominant-negativen Effekt auf die Zellproliferation und die pre-rRNS Prozessierung. Ähnlich wie M1 lokalisierte Mutante M5 im Nukleolus, war in der Lage Bop1 und WDR12 cozipitieren und inhibierte die Prozessierung der 36S und 32S pre-rRNS. Die beiden Mutanten unterschieden sich jedoch in ihrem Effekt auf die Reifung der 12S pre-rRNS. Während die Menge der 12S pre-rRNS bei Mutante M1 vermindert war, war sie bei Mutante M5 unverändert. Das deutet auf eine Inhibition der Prozessierung der 12S pre-rRNS durch die Mutante M5 hin, während sie bei Expression der Mutante M1 weiter prozessiert wurde. Die hierfür zu Grunde gelegten Daten stammen aus einer Northern Blot Analyse der Gesamt-RNS.

Dabei wurde die RNS nur zu einem Zeitpunkt auf ihren Gehalt an 12S pre-rRNS untersucht, weshalb nichts über die Kinetik des Absinkens der 12S pre-rRNS in den M1-exprimierenden Zellen ausgesagt werden kann. Man kann nicht unterscheiden, ob die Menge an 12S pre-rRNS unbeeinträchtigt prozessiert wurde und so schnell auf das beobachtete Niveau fiel, oder ob M1 auf ihre Prozessierung inhibitorisch wirkte und so der Gehalt an 12S pre-rRNS langsam aber kontinuierlich absank, bis er 30 h nach Induktion den beobachteten Stand erreichte. Zudem hemmte Mutante M1 die Reifung der 28S rRNS stärker als Mutante M5. Der Unterschied in der Menge an 12S pre-rRNS bei Expression von M1 und M5 kann so auch über die unterschiedliche Prozessierungsgeschwindigkeit der 32S pre-rRNS, und damit der unterschiedlich starken Neubildung von 12S pre-rRNS erklärt werden. Damit ist nicht gänzlich ausgeschlossen, daß die Mutante M1 ebenfalls die Prozessierung der 12S pre-rRNS inhibiert, wenn auch weniger stark als M5.

Der dominant-negative Phänotyp von Mutante M5 beweist die essentielle Bedeutung des C-Terminus für die pre-rRNS Prozessierung. Die teilweise Deletion des C-Terminus in den Mutanten M6 und M7 sowie die Mutation des Konsensus-SUMOylierungsmotivs in Mutante M8 ist jedoch nicht ausreichend, um Pes1 einen dominant-negativen Phänotyp zu verleihen. Dies ist insofern verwunderlich, als daß die Insertion bei Pes1-tn9 einen dominant-negativen Phänotyp verursacht, obwohl die Mutation die gleiche Region betrifft wie die Deletion in der phänotyplosen Mutante M7.

Die Daten zeigen, daß Pes1 an der Reifung der ribosomalen 60S Untereinheit beteiligt ist, und daß die Mutante M5 neben der Prozessierung der 32S pre-rRNS auch die Reifung der 12S pre-rRNS inhibiert. Damit wird die C-terminale Domäne für die Prozessierung der 12S und 32S pre-rRNS benötigt, wohingegen die NPLP-Domäne bei der Prozessierung der 12S pre-rRNS keine bzw. eine weniger gewichtige Rolle zu spielen scheint. Die Bereiche, die innerhalb des C-Terminus für die pre-rRNS Prozessierung essentielle Funktionen tragen, konnten mit den existierenden Mutanten nicht eindeutig identifiziert werden.

## 5. Koordination von Zellzyklus und Ribosomenbiogenese

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Expression der dominant-negativen Pes1-Mutanten M1 und M5 die Prozessierung der pre-rRNS stört, p53 induziert und einen Zellzyklusarrest herbeiführt. Der Zellzyklusarrest beruht auf der Induktion von p53, da die p53-Akkumulation mit der Induktion des Cdk-Inhibitors p21 einhergeht und die Coexpression des E6-Proteins der Induktion des Arrests entgegenwirkt. Über welchen Mechanismus werden Ribosomenbiogenese und Zellzyklusregulation in Säugerzellen miteinander koordiniert? Mit dem „Mdm2-Sequestration“- und dem „Riding the ribosome“-Modell (Abb. 22A und 22B) wurden zwei einander nicht ausschließende Modelle vorgeschlagen. Hauptakteure beider Modelle sind Mdm2 und p53. Der Tumorsuppressor p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Antwort auf viele Arten zellulären Stresses induziert wird. Mdm2 ist eine Ubiquitinligase, die p53 bindet, dessen Transaktivierung inhibiert und über Ubiquitinierung für die Proteasom-abhängigen Abbau von p53 sorgt (Boyd *et al.*, 2000; Stommel *et al.*, 1999; Tao und Levine, 1999a). In der Zelle wird p53 konstitutiv exprimiert und seine Akkumulation bzw. Aktivität über Mdm2 negativ reguliert. Da p53 unter anderem auch die Expression von Mdm2 induziert, reguliert sich die Mdm2-Menge über negative Rückkopplung über p53 selbst. Im klassischen Fall der p53 Aktivierung wird die Bindung von Mdm2 an p53 durch p19ARF inhibiert, das Mdm2 im Nukleolus bindet und so eine Stabilisierung von p53 ermöglicht (Tao und Levine, 1999b; Weber *et al.*, 1999). Bei der Koordination von Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle erfolgt die Akkumulation von p53 jedoch unabhängig von p19ARF, wie durch eine p53 Induktion nach Inhibition der pre-rRNS Prozessierung in ARF *-/-* Zellen durch Expression der dominant-negativen Mutanten WDR12 $\Delta$ NLE und Bop1 $\Delta$  gezeigt wurde (Hölzel *et al.*, 2005).

Das „Mdm2-Sequestration“-Modell geht davon aus, daß eine Störung in der Ribosomenbiogenese zu einem verminderten Bedarf an ribosomalen Proteinen (rProteine) führt, die daraufhin akkumulieren. Die Akkumulation freier rProteine hemmt die Aktivität von Mdm2, was den Abbau von p53 verhindert und so eine p53-Antwort auslöst. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß einige ribosomale Proteine, L5, L11 und L23, in der Lage sind, Mdm2 zu binden und seine Funktion zu inhibieren (Dai und Lu, 2004; Dai *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2004; Lohrum *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

Das „Riding the ribosome“-Modell postuliert eine nukleoläre Exportroute für p53 in das Zytoplasma, wo es abgebaut wird. Der Export erfolgt hierbei über die Assoziation von Mdm2-p53-Komplexen mit den preribosomalen Partikeln. Bildlich gesprochen „reiten“ die Mdm2-p53 Komplexe bei ihrem Transport auf den Ribosomen in das Zytoplasma, wovon sich der Name des Modells ableitet. Bei ungestörter Ribosomenbiogenese werden viele preribosomale Partikel zur finalen Reifung in das Zytoplasma exportiert, es ist damit ausreichend Kapazität vorhanden, um die Menge an p53 in der Zelle niedrig zu halten. Bei einer Störung der Ribosomenbiogenese sinkt die Zahl der exportierten preribosomale Partikel und damit des coexportierten p53. Die Blockierung des Exports von p53 verhindert den Abbau des Proteins und führt somit zu einer Akkumulation von p53 (Sherr und Weber, 2000).

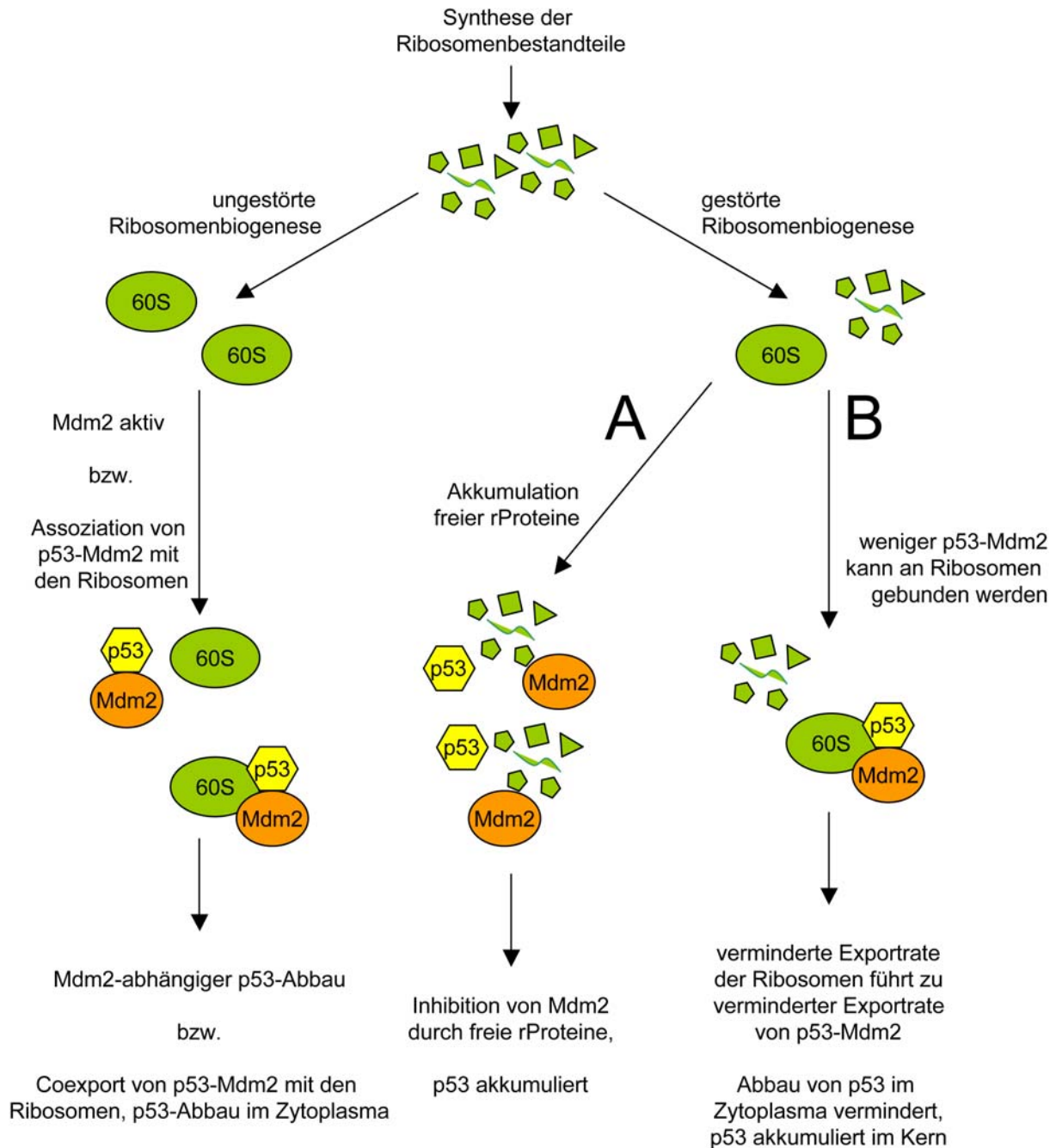
Dieses Modell wird durch den Befund gestützt, daß zum einen p53-Mdm2-Komplexe in Verbindung mit den ribosomalen Proteinen L5 und L11 gefunden wurden und zum anderen p53 kovalent mit der 5,8S rRNS verknüpft werden kann (Fontoura *et al.*, 1997; Fontoura *et al.*, 1992; Lohrum *et al.*, 2003; Marechal *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2003). Das Modell wird dadurch weiter unterstützt, daß die Inhibition des nukleären Exports zur Akkumulation von p53 im Kern führt. Dabei ist unklar, ob p53 für seine Assoziation mit den preribosomalen Partikeln den Nukleolus betreten muß, oder ob die Assoziation während der Passage der ribosomalen Untereinheiten durch den Nukleus erfolgt. Die Präsenz von p53 im Nukleolus konnte kürzlich demonstriert werden, als eine Permeabilisierung das meiste zytoplasmatische p53 eliminierte, p53 im Nukleolus aber weiterhin nachweisbar war (Rubbi und Milner, 2003).

Die Induktion eines Zellzyklusarrestes erfolgt durch eine p53-Antwort. Über p53 kann in jeder Phase des Zellzyklus ein Arrest ausgelöst werden. Die Überexpression von p53 oder die Störung der Ribosomenbiogenese durch Depletion des rProteins L23 bzw. durch Expression der dominant-negativen Mutanten WDR12 $\Delta$ NLE und Bop1 $\Delta$  führt zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase (Diller *et al.*, 1990; Hölzel *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 1992; Pestov *et al.*, 2001b). Die Aktivierung der Cdk2-Cyclin E-Komplexe wird als Schlüsselereignis beim Durchschreiten des Restriktionspunktes und damit für den Eintritt in den Zellzyklus angesehen. Die Inaktivierung von Cdk2-Cyclin E durch den Cdk-Inhibitor p21 verhindert so die S-Phasenprogression (Harper *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1993). Die Pes1-Mutanten M1 und M5 inhibierten die Ribosomenbiogenese und induzierten sowohl p21 als auch einen p53 abhängigen

Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Damit sind die experimentellen Daten im Einklang mit den oben beschriebenen Modellen.

## **6. Korrelation von dominant-negativen Phänotyp und Inkorporation der Pes1-Mutanten in den PeBoW-Komplex**

Die Störung der Ribosomenbiogenese bildet sowohl im „Mdm2-Sequestration“- als auch im „Riding the ribosome“-Modell die Ursache für die Induktion eines Zellzyklusarrestes. Die Modelle unterscheiden sich nur darin, wie diese Störung gemessen wird. In der Säugerzelle sind Pes1, WDR12 und Bop1, den Daten der nativen Gelelektrophorese zur Folge, quantitativ im PeBoW-Komplex inkorporiert, freie Monomere sind in der Zelle kaum nachzuweisen. Das bedeutet, daß die Proteine ihre Funktion in der Ribosomenbiogenese im Rahmen des PeBoW-Komplexes wahrnehmen. Alle bislang bekannten dominant-negativen Mutanten von Pes1 werden in den PeBoW-Komplex inkorporiert. Damit ist anzunehmen, daß der Einbau der dominant-negativen Mutanten in den Komplex eine Voraussetzung für ihren Effekt auf die Ribosomenbiogenese darstellt. Lapik *et al.* konnten diese Vermutung bestätigen, indem sie eine dominant-negative Insertionsmutante von Pes1 mit einer zweiten Mutation kombinierten, die die Interaktion mit Bop1 verhinderte. Die so entstandene Doppelmutante lokalisierte nicht mehr nukleolär und verlor die Fähigkeit, Bop1 zu copräzipitieren sowie ihren dominant-negativen Phänotyp (Lapik *et al.*, 2004). Der Zusammenhang von Inkorporation in den PeBoW-Komplex und Ausbildung eines dominant-negativen Phänotyps wird auch durch die Mutanten M1, M2 und M3 belegt. In allen drei Mutanten ist der für die Funktion essentielle Bereich der NPLP-Domäne deletiert. In Mutante M1 ist die Interaktion mit Bop1 noch intakt, was die Ausbildung des dominant-negativen Phänotyps ermöglicht. Die Mutanten M2 und M3 sind nicht mehr in der Lage, mit Bop1 zu interagieren, was die Ausbildung dominant-negativen Phänotyps unterbindet. Die Deletion der funktionell essentiellen Domäne kommt also nur bei Inkorporation der Mutante in den PeBoW-Komplex zum Tragen. Trotzdem zeigt die stark exprimierte Mutante M3 eine moderate Auswirkung auf die Prozessierung, was wahrscheinlich auf das Austitrieren von Prozessierungsfaktoren unabhängig vom PeBoW-Komplex zurückzuführen ist.



**Abb. 22: Modelle der Koordination von Zellzykluskontrolle und Ribosomenbiogenese**

Eine funktionierende Ribosomenbiogenese verhindert eine Akkumulation freier ribosomaler Proteine (rProteine) bzw. sorgt für eine hohe Exportrate von Ribosomen vom Nukleolus in das Zytoplasma, was eine Aktivierung von p53 verhindert. (A) „Mdm2-Sequestration“-Modell: eine gestörte Ribosomenbiogenese verursacht eine Akkumulation freier rProteine. Einige dieser Proteine, wie L5, L11 und L23, binden und inaktivieren Mdm2 und verhindern so den Abbau von p53, welches somit akkumuliert. (B) „Riding the ribosome“-Modell: Mdm2-p53-Komplexe werden mit den unreifen ribosomalen 60S-Untereinheiten aus dem Kern ins Zytoplasma coexportiert, wo p53 abgebaut wird. Bei verminderter Ribosomenbiogenese ist der Export und damit der Abbau von p53 vermindert, was zu einer Akkumulation von p53 führt.

Die Mutanten M1 und M5 induzieren eine p53 Antwort in proliferierenden TGR-1-Zellen, nicht aber in serumgehungerten Zellen. Dies wurde dahingehend gedeutet, daß die Ribosomenbiogenese in ruhenden Zellen weit weniger aktiv ist als in proliferierenden Zellen, und daß die Störung dieser schwachen Ribosomenbiogenese nicht für die Induktion einer p53 Antwort ausreicht. Eine alternative Erklärung beruht auf der Inkorporation der Mutanten in den PeBoW-Komplex als Voraussetzung für einen dominant-negativen Phänotyp. Aufgrund der Spezifität der Antikörper gegen die humanen Proteine kann keine Aussage über den Gehalt gehungerter Rattenfibroblasten an Pes1, WDR12 und Bop1 gemacht werden. Im Northern Blot wurde die mRNA der Proteine jedoch nachgewiesen (Hölzel *et al.*, 2005). Man kann davon ausgehen, daß eine gehungerte Zelle über PeBoW-Komplexe verfügt. Da diese Komplexe vor der Induktion der Pes1-Mutanten gebildet wurden, enthalten sie das endogene Pes1 und sind damit funktionell. Falls diese endogenen Komplexe für Ribosomenbiogenese in geringem Umfang ausreichen, könnte die Zelle auf die Neubildung von PeBoW-Komplexen verzichten. Die rekombinant exprimierten Pes1-Mutanten würden nicht in die neuassemblierten Komplexe inkorporiert und wären so nicht zur Ausbildung eines dominant-negativen Phänotyps in der Lage.

#### **7. Die Inkorporation in den PeBoW-Komplex und die nukleoläre Lokalisation der Pes1-Mutanten bedingen sich gegenseitig**

Die Inkorporation der Pes1-Mutanten in den PeBoW-Komplex ist nicht nur für die Ausbildung eines dominant-negativen Phänotyps Voraussetzung, sie ist weiterhin für eine nukleoläre Lokalisation der Proteine essentiell. Bei allen untersuchten Mutanten – Insertions- als auch Deletionsmutanten – war nukleoläre Lokalisation stets mit der Interaktion mit Bop1 korreliert. Keine der diffus nukleoplasmatisch lokalisierenden Mutanten zeigte eine Interaktion mit Bop1. Beide Ereignisse, die Akkumulation von Pes1 im Nukleolus und die Interaktion von Pes1 mit Bop1, scheinen sich somit gegenseitig zu bedingen und können nicht unabhängig voneinander eintreten. Es ist nicht zu klären, ob die Interaktion von Pes1 und Bop1 die Voraussetzung für eine nukleoläre Akkumulation von Pes1 darstellt oder umgekehrt. Möglicherweise repräsentiert die gegenseitige Abhängigkeit von nukleolärer Lokalisation und Bop1-

Interaktion Ereignisse beim Aufbau des PeBoW-Komplexes. Falls Bop1 vor Pes1 mit den preribosomalen Partikeln assoziiert, könnte Pes1 über die Interaktion mit Bop1 im Nukleolus gebunden werden. Für eine nukleoläre Akkumulation von Pes1 sind damit zwei Prozesse notwendig: der Transport in den Nukleolus und die Bindung von Bop1. Die Störung eines dieser zwei Prozesse würde eine nukleoläre Lokalisation von Pes1 verhindern.

## **8. Ausblick**

Die Rolle des Nukleolus bei der Regulation des Zellzyklus ist ein relativ junges Themengebiet. Auch die Bedeutung der Deregulation der Ribosomenbiogenese bzw. der Expression an ihr beteiligter Faktoren als onkogenes Ereignis liegt noch weitestgehend im Dunkeln. Die Erforschung dieser Themengebiete könnte bedeutende Erkenntnisse über die Verknüpfung basaler zellulärer Prozesse mit der Zellzykluskontrolle erbringen. Über die Definition neuer diagnostischer Marker könnten auch in der klinischen Diagnostik Fortschritte erzielt werden.

Der Komplex um Nop7p spielt seinen Interaktionspartnern nach zu urteilen in einem weiten Spektrum zellulärer Prozesse eine Rolle, einige davon mit deutlichem Bezug zur Transformation. Es gilt nun, die Beteiligung von Pes1 an diesen Prozessen zu verifizieren und zu klären, welche Funktion es dabei innehat. Die Literatur bestätigt, daß Pes1 eine essentielle Rolle in der Mitose spielt und transformierende Wirkung auf Zellen hat. In dieser Arbeit wurde eine Palette von Mutanten geschaffen, mit deren Hilfe geklärt werden könnte, welche Domänen von Pes1 hierbei eine Rolle spielen.



## Zusammenfassung

Proliferation erfordert die Koordination des Zellwachstums mit der Zellzyklusmaschinerie. Daten aus der Hefe belegen eine Funktion des Komplexes aus Nop7p, Ytm1p und Erb1p in der Ribosomenbiogenese, dem energieaufwendigsten Prozeß des Wachstums, und der Replikation. Die Beteiligung an diesen Schlüsselprozessen des Zellzyklus läßt die Vermutung zu, daß dieser Komplex eine Funktion bei der Koordination von Wachstum und Zellzyklusprogression innehat. In Säugern existiert ein trimere Komplex, der sogenannte PeBoW-Komplex, der sich aus Pes1, WDR12 und Bop1 zusammensetzt, die einen hohen Grad an Homologie mit Nop7p, Ytm1p und Erb1p aufweisen. Der PeBoW-Komplex ist in Säugern an der Ribosomenbiogenese beteiligt, spielt eine Rolle in der Mitose, und dominant-negative Mutanten seiner Komponenten inhibieren die Zellzyklusprogression. Die Koordinatorfunktion des Komplexes scheint von der Hefe bis zum Menschen konserviert zu sein.

In dieser Arbeit wurden Deletionsmutanten von Pes1 generiert und auf ihren Effekt auf die Zellzyklusprogression und die pre-rRNS Prozessierung hin untersucht. Die Expression zweier dieser Mutanten, Pes1 M1 mit einer N-terminalen und Pes1 M5 mit einer C-terminalen Deletion, induzierte einen reversiblen Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Beide Mutanten zeigten zudem einen dominant-negativen Effekt auf die Prozessierung der 36S und 32S pre-rRNS. Mutante M5 blockierte zusätzlich die Reifung des 12S Vorläufers. Sowohl Mutante M1 als auch Mutante M5 induzierten eine p53-Akkumulation in proliferierenden, nicht jedoch in serumgehungerten Zellen, was eine Abhängigkeit der p53-Antwort von einer aktiven Ribosomenbiogenese nahelegt. Die p53-Antwort zog eine Akkumulation des Cdk-Inhibitors p21 nach sich, und die Coexpression des E6-Proteins schwächte den von M1 und M5 hervorgerufenen Zellzyklusarrest merklich ab. Die p53 Antwort konnte damit als Ursache des Zellzyklusarrests ausgemacht werden. Über native Gelelektrophorese und Immunpräzipitationen der Pes1-Mutanten konnten die BRCT-Domäne und ein Teil der NPLP-Domäne als essentielle Domänen für die Inkorporation von Pes1 in den PeBoW-Komplex bestimmt definiert werden. Die erhobenen Daten legen Inkorporation in den PeBoW-Komplex als Voraussetzung für die nukleoläre Lokalisation, wie auch für die Ausbildung eines dominant-negativen Phänotyps der Pes1-Mutanten nahe.

## Literaturverzeichnis

- Adams, C. C., Jakovljevic, J., Roman, J., Harnpicharnchai, P., and Woolford, J. L., Jr. (2002). **Saccharomyces cerevisiae nucleolar protein Nop7p is necessary for biogenesis of 60S ribosomal subunits.** *Rna* 8, 150-165.
- Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985). **The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice.** *Nature* 318, 533-538.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., and Pestell, R. G. (1995). **Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions.** *J Biol Chem* 270, 23589-23597.
- Allende, M. L., Amsterdam, A., Becker, T., Kawakami, K., Gaiano, N., and Hopkins, N. (1996). **Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development.** *Genes Dev* 10, 3141-3155.
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E., and Yaniv, M. (2000). **Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression.** *Embo J* 19, 2056-2068.
- Bandara, L. R., Buck, V. M., Zamanian, M., Johnston, L. H., and La Thangue, N. B. (1993). **Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F.** *Embo J* 12, 4317-4324.
- Blagosklonny, M. V., and Pardee, A. B. (2002). **The restriction point of the cell cycle.** *Cell Cycle* 1, 103-110.
- Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J. M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., *et al.* (2005). **Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system.** *Nucleic Acids Res* 33, e137.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). **Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27.** *Embo J* 18, 5321-5333.
- Bowman, L. H., Rabin, B., and Schlessinger, D. (1981). **Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells.** *Nucleic Acids Res* 9, 4951-4966.
- Boyd, S. D., Tsai, K. Y., and Jacks, T. (2000). **An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53.** *Nat Cell Biol* 2, 563-568.
- Cairns, C. A., and White, R. J. (1998). **p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription.** *Embo J* 17, 3112-3123.

- Charpentier, A. H., Bednarek, A. K., Daniel, R. L., Hawkins, K. A., Laflin, K. J., Gaddis, S., MacLeod, M. C., and Aldaz, C. M. (2000). **Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action.** *Cancer Res* 60, 5977-5983.
- Colombo, E., Bonetti, P., Lazzerini Denchi, E., Martinelli, P., Zamponi, R., Marine, J. C., Helin, K., Falini, B., and Pelicci, P. G. (2005). **Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability.** *Mol Cell Biol* 25, 8874-8886.
- Cross, F. R. (1995). **Starting the cell cycle: what's the point?** *Curr Opin Cell Biol* 7, 790-797.
- Cross, F. R., and Blake, C. M. (1993). **The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28.** *Mol Cell Biol* 13, 3266-3271.
- Dai, M. S., and Lu, H. (2004). **Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5.** *J Biol Chem* 279, 44475-44482.
- Dai, M. S., Zeng, S. X., Jin, Y., Sun, X. X., David, L., and Lu, H. (2004). **Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition.** *Mol Cell Biol* 24, 7654-7668.
- Davierwala, A. P., Haynes, J., Li, Z., Brost, R. L., Robinson, M. D., Yu, L., Mnaimneh, S., Ding, H., Zhu, H., Chen, Y., *et al.* (2005). **The synthetic genetic interaction spectrum of essential genes.** *Nat Genet* 37, 1147-1152.
- Dez, C., and Tollervey, D. (2004). **Ribosome synthesis meets the cell cycle.** *Curr Opin Microbiol* 7, 631-637.
- Diller, L., Kassel, J., Nelson, C. E., Gryka, M. A., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Ozturk, M., Baker, S. J., Vogelstein, B., and *et al.* (1990). **p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas.** *Mol Cell Biol* 10, 5772-5781.
- Dobrev, G., Dambacher, J., and Grosschedl, R. (2003). **SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression.** *Genes Dev* 17, 3048-3061.
- Du, Y. C., and Stillman, B. (2002). **Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis.** *Cell* 109, 835-848.
- Eilers, M., Schirm, S., and Bishop, J. M. (1991). **The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene.** *Embo J* 10, 133-141.
- Eisenman, R. N. (2001). **Deconstructing myc.** *Genes Dev* 15, 2023-2030.
- Ekholm, S. V., and Reed, S. I. (2000). **Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle.** *Curr Opin Cell Biol* 12, 676-684.

- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., *et al.* (2005). **Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype.** *N Engl J Med* 352, 254-266.
- Fatica, A., and Tollervey, D. (2002). **Making ribosomes.** *Curr Opin Cell Biol* 14, 313-318.
- Ferrari, S., Manfredini, R., Tagliafico, E., Rossi, E., Donelli, A., Torelli, G., and Torelli, U. (1990). **Noncoordinated expression of S6, S11, and S14 ribosomal protein genes in leukemic blast cells.** *Cancer Res* 50, 5825-5828.
- Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F. B., Pan, Z. Q., Harper, J. W., Elledge, S. J., O'Donnell, M., and Hurwitz, J. (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.
- Fontoura, B. M., Atienza, C. A., Sorokina, E. A., Morimoto, T., and Carroll, R. B. (1997). **Cytoplasmic p53 polypeptide is associated with ribosomes.** *Mol Cell Biol* 17, 3146-3154.
- Fontoura, B. M., Sorokina, E. A., David, E., and Carroll, R. B. (1992). **p53 is covalently linked to 5.8S rRNA.** *Mol Cell Biol* 12, 5145-5151.
- Galaktionov, K., Chen, X., and Beach, D. (1996). **Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc.** *Nature* 382, 511-517.
- Gani, R. (1976). **The nucleoli of cultured human lymphocytes. I. Nucleolar morphology in relation to transformation and the DNA cycle.** *Exp Cell Res* 97, 249-258.
- Gartel, A. L., and Tyner, A. L. (1999). **Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene.** *Exp Cell Res* 246, 280-289.
- Gartel, A. L., and Tyner, A. L. (2002). **The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis.** *Mol Cancer Ther* 1, 639-649.
- Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., *et al.* (2006). **Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery.** *Nature* 440, 631-636.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., *et al.* (2002). **Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes.** *Nature* 415, 141-147.
- Gjerset, R. A. (2006). **DNA damage, p14ARF, Nucleophosmin (NPM/B23), and cancer.** *J Mol Histol*.

- Grimm, T., Holzel, M., Rohrmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2006). **Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex.** *Nucleic Acids Res* 34, 3030-3043.
- Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., and Pandolfi, P. P. (2005). **Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis.** *Nature* 437, 147-153.
- Guillen, A. K., Hirai, Y., Tanoue, T., and Hirai, H. (2004). **Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees.** *Chromosome Res* 12, 225-237.
- Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G., and Baldwin, A. S., Jr. (1999). **NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1.** *Mol Cell Biol* 19, 5785-5799.
- Haque, J., Boger, S., Li, J., and Duncan, S. A. (2000). **The murine Pes1 gene encodes a nuclear protein containing a BRCT domain.** *Genomics* 70, 201-210.
- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C. J., *et al.* (2001). **Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates.** *Mol Cell* 8, 505-515.
- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., and *et al.* (1995). **Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21.** *Mol Biol Cell* 6, 387-400.
- Helin, K., Harlow, E., and Fattaey, A. (1993). **Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein.** *Mol Cell Biol* 13, 6501-6508.
- Herber, B., Truss, M., Beato, M., and Muller, R. (1994). **Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter.** *Oncogene* 9, 2105-2107.
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F., *et al.* (2000). **Identification of CDK4 as a target of c-MYC.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2229-2234.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., and Strauss, M. (1999). **NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition.** *Mol Cell Biol* 19, 2690-2698.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., *et al.* (2002). **Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry.** *Nature* 415, 180-183.

- Hölzel, M., Rohrmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G. W., and Eick, D. (2005). **Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation.** *J Cell Biol* 170, 367-378.
- Iritani, B. M., and Eisenman, R. N. (1999). **c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13180-13185.
- Jefferies, H. B., Fumagalli, S., Dennis, P. B., Reinhard, C., Pearson, R. B., and Thomas, G. (1997). **Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k.** *Embo J* 16, 3693-3704.
- Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., and Zhang, Y. (2004). **Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23.** *Mol Cell Biol* 24, 7669-7680.
- Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N., and Gallant, P. (1999). **Drosophila myc regulates cellular growth during development.** *Cell* 98, 779-790.
- Kennedy, B. K., Barbie, D. A., Classon, M., Dyson, N., and Harlow, E. (2000). **Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells.** *Genes Dev* 14, 2855-2868.
- Killander, D., and Zetterberg, A. (1965). **A quantitative cytochemical investigation of the relationship between cell mass and initiation of DNA synthesis in mouse fibroblasts in vitro.** *Exp Cell Res* 40, 12-20.
- Killian, A., Le Meur, N., Sesboue, R., Bourguignon, J., Bougeard, G., Gautherot, J., Bastard, C., Frebourg, T., and Flaman, J. M. (2004). **Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability.** *Oncogene* 23, 8597-8602.
- Killian, A., Sarafan-Vasseur, N., Sesboue, R., Le Pessot, F., Blanchard, F., Lamy, A., Laurent, M., Flaman, J. M., and Frebourg, T. (2006). **Contribution of the BOP1 gene, located on 8q24, to colorectal tumorigenesis.** *Genes Chromosomes Cancer*.
- Kinoshita, Y., Jarell, A. D., Flaman, J. M., Foltz, G., Schuster, J., Sopher, B. L., Irvin, D. K., Kanning, K., Kornblum, H. I., Nelson, P. S., *et al.* (2001). **Pescadillo, a novel cell cycle regulatory protein abnormally expressed in malignant cells.** *J Biol Chem* 276, 6656-6665.
- Kondoh, N., Shuda, M., Tanaka, K., Wakatsuki, T., Hada, A., and Yamamoto, M. (2001). **Enhanced expression of S8, L12, L23a, L27 and L30 ribosomal protein mRNAs in human hepatocellular carcinoma.** *Anticancer Res* 21, 2429-2433.

- Krek, W., Livingston, D. M., and Shirodkar, S. (1993). **Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members.** *Science* 262, 1557-1560.
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., *et al.* (2006). **Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature* 440, 637-643.
- Krogan, N. J., Peng, W. T., Cagney, G., Robinson, M. D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D. P., *et al.* (2004). **High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes.** *Mol Cell* 13, 225-239.
- Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T. M., Ojala, P. M., Meek, D., and Laiho, M. (2004). **Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation.** *Cancer Cell* 5, 465-475.
- Lafontaine, D., and Tollervey, D. (2001). Ribosomal RNA. In *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Land, H., Chen, A. C., Morgenstern, J. P., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1986). **Behavior of myc and ras oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts.** *Mol Cell Biol* 6, 1917-1925.
- Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1983). **Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes.** *Nature* 304, 596-602.
- Langdon, W. Y., Harris, A. W., Cory, S., and Adams, J. M. (1986). **The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice.** *Cell* 47, 11-18.
- Lapik, Y. R., Fernandes, C. J., Lau, L. F., and Pestov, D. G. (2004). **Physical and functional interaction between Pes1 and Bop1 in mammalian ribosome biogenesis.** *Mol Cell* 15, 17-29.
- Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L., and Nevins, J. R. (1997). **Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F.** *Nature* 387, 422-426.
- Lerch-Gaggl, A., Haque, J., Li, J., Ning, G., Traktman, P., and Duncan, S. A. (2002). **Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation.** *J Biol Chem* 277, 45347-45355.
- Lin, D., Shields, M. T., Ullrich, S. J., Appella, E., and Mercer, W. E. (1992). **Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to or near the restriction point in late G1 phase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9210-9214.

- Lindstrom, D. L., Squazzo, S. L., Muster, N., Burckin, T. A., Wachter, K. C., Emigh, C. A., McCleery, J. A., Yates, J. R., 3rd, and Hartzog, G. A. (2003). **Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins.** *Mol Cell Biol* 23, 1368-1378.
- Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G., and Evan, G. I. (1995). **A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins.** *Nucleic Acids Res* 23, 1686-1690.
- Loging, W. T., and Reisman, D. (1999). **Elevated expression of ribosomal protein genes L37, RPP-1, and S2 in the presence of mutant p53.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8, 1011-1016.
- Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M., and Vousden, K. H. (2003). **Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11.** *Cancer Cell* 3, 577-587.
- Maden, B. E. (1990). **The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 39, 241-303.
- Maiorana, A., Tu, X., Cheng, G., and Baserga, R. (2004). **Role of pescadillo in the transformation and immortalization of mammalian cells.** *Oncogene* 23, 7116-7124.
- Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J. C., and Levine, A. J. (1994). **The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes.** *Mol Cell Biol* 14, 7414-7420.
- Melese, T., and Xue, Z. (1995). **The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome.** *Curr Opin Cell Biol* 7, 319-324.
- Miles, T. D., Jakovljevic, J., Horsey, E. W., Harnpicharnchai, P., Tang, L., and Woolford, J. L., Jr. (2005). **Ytm1, Nop7, and Erb1 form a complex necessary for maturation of yeast 66S preribosomes.** *Mol Cell Biol* 25, 10419-10432.
- Nal, B., Mohr, E., Silva, M. I., Tagett, R., Navarro, C., Carroll, P., Depetris, D., Verthuy, C., Jordan, B. R., and Ferrier, P. (2002). **Wdr12, a mouse gene encoding a novel WD-Repeat Protein with a notchless-like amino-terminal domain.** *Genomics* 79, 77-86.
- Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K., and Futcher, A. B. (1988). **The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog.** *Embo J* 7, 4335-4346.
- Neufeld, T. P., and Edgar, B. A. (1998). **Connections between growth and the cell cycle.** *Curr Opin Cell Biol* 10, 784-790.



- Niculescu, A. B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S. I. (1998). **Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication.** *Mol Cell Biol* 18, 629-643.
- Oeffinger, M., Leung, A., Lamond, A., and Tollervey, D. (2002). **Yeast Pescadillo is required for multiple activities during 60S ribosomal subunit synthesis.** *Rna* 8, 626-636.
- Ohtsubo, M., and Roberts, J. M. (1993). **Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts.** *Science* 259, 1908-1912.
- Pardee, A. B. (1989). **G1 events and regulation of cell proliferation.** *Science* 246, 603-608.
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). **Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion.** *Mol Cell* 3, 565-577.
- Perez-Roger, I., Kim, S. H., Griffiths, B., Sewing, A., and Land, H. (1999). **Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1).** *Embo J* 18, 5310-5320.
- Pestov, D. G., Grzeszkiewicz, T. M., and Lau, L. F. (1998). **Isolation of growth suppressors from a cDNA expression library.** *Oncogene* 17, 3187-3197.
- Pestov, D. G., and Lau, L. F. (1994). **Genetic selection of growth-inhibitory sequences in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12549-12553.
- Pestov, D. G., Stockelman, M. G., Strezoska, Z., and Lau, L. F. (2001a). **ERB1, the yeast homolog of mammalian Bop1, is an essential gene required for maturation of the 25S and 5.8S ribosomal RNAs.** *Nucleic Acids Res* 29, 3621-3630.
- Pestov, D. G., Strezoska, Z., and Lau, L. F. (2001b). **Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition.** *Mol Cell Biol* 21, 4246-4255.
- Planas-Silva, M. D., and Weinberg, R. A. (1997). **The restriction point and control of cell proliferation.** *Curr Opin Cell Biol* 9, 768-772.
- Planta, R. J., and Mager, W. H. (1998). **The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 14, 471-477.
- Polymenis, M., and Schmidt, E. V. (1997). **Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast.** *Genes Dev* 11, 2522-2531.
- Polymenis, M., and Schmidt, E. V. (1999). **Coordination of cell growth with cell division.** *Curr Opin Genet Dev* 9, 76-80.

- Prisco, M., Maiorana, A., Guerzoni, C., Calin, G., Calabretta, B., Voit, R., Grummt, I., and Baserga, R. (2004). **Role of pescadillo and upstream binding factor in the proliferation and differentiation of murine myeloid cells.** *Mol Cell Biol* 24, 5421-5433.
- Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1993). **Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts.** *Genes Dev* 7, 1559-1571.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., and Reed, S. I. (1994). **Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system.** *Mol Cell Biol* 14, 1669-1679.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B. T. (2000). **The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism.** *J Cell Biol* 148, 635-651.
- Rozenki, J., Crain, P. F., and McCloskey, J. A. (1999). **The RNA Modification Database: 1999 update.** *Nucleic Acids Res* 27, 196-197.
- Rubbi, C. P., and Milner, J. (2003). **Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses.** *Embo J* 22, 6068-6077.
- Ruggero, D., and Pandolfi, P. P. (2003). **Does the ribosome translate cancer?** *Nat Rev Cancer* 3, 179-192.
- Sakumoto, N., Yamashita, H., Mukai, Y., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2001). **Dual-specificity protein phosphatase Yvh1p, which is required for vegetative growth and sporulation, interacts with yeast pescadillo homolog in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biochem Biophys Res Commun* 289, 608-615.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). **The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53.** *Cell* 63, 1129-1136.
- Schlosser, I., Holzel, M., Hoffmann, R., Burtscher, H., Kohlhuber, F., Schuhmacher, M., Chapman, R., Weidle, U. H., and Eick, D. (2005). **Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line.** *Oncogene* 24, 520-524.
- Schlosser, I., Holzel, M., Murnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U. H., and Eick, D. (2003). **A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing.** *Nucleic Acids Res* 31, 6148-6156.
- Schoenenberger, C. A., Andres, A. C., Groner, B., van der Valk, M., LeMeur, M., and Gerlinger, P. (1988). **Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription.** *Embo J* 7, 169-175.

- Schuhmacher, M., Staeger, M. S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U. H., Bornkamm, G. W., Eick, D., and Kohlhuber, F. (1999). **Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division.** *Curr Biol* 9, 1255-1258.
- Seldin, D. C., Landesman-Bollag, E., Farago, M., Currier, N., Lou, D., and Dominguez, I. (2005). **CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumorigenesis.** *Mol Cell Biochem* 274, 63-67.
- Sherr, C. J., and Weber, J. D. (2000). **The ARF/p53 pathway.** *Curr Opin Genet Dev* 10, 94-99.
- Stommel, J. M., Marchenko, N. D., Jimenez, G. S., Moll, U. M., Hope, T. J., and Wahl, G. M. (1999). **A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking.** *Embo J* 18, 1660-1672.
- Strezoska, Z., Pestov, D. G., and Lau, L. F. (2000). **Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5. 8S RRNA processing and 60S ribosome biogenesis.** *Mol Cell Biol* 20, 5516-5528.
- Strezoska, Z., Pestov, D. G., and Lau, L. F. (2002). **Functional inactivation of the mouse nucleolar protein Bop1 inhibits multiple steps in pre-rRNA processing and blocks cell cycle progression.** *J Biol Chem* 277, 29617-29625.
- Sugimoto, M., Kuo, M. L., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (2003). **Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing.** *Mol Cell* 11, 415-424.
- Tao, W., and Levine, A. J. (1999a). **Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3077-3080.
- Tao, W., and Levine, A. J. (1999b). **P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6937-6941.
- Thomas, G. (2000). **An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation.** *Nat Cell Biol* 2, E71-72.
- Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). **Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm.** *Trends Cell Biol* 13, 255-263.
- Volarevic, S., Stewart, M. J., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., Grompe, M., Kozma, S. C., and Thomas, G. (2000). **Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6.** *Science* 288, 2045-2047.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). **The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA.** *Nature* 369, 574-578.

- Warner, J. R. (1999). **The economics of ribosome biosynthesis in yeast.** Trends Biochem Sci 24, 437-440.
- Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Bar-Sagi, D. (1999). **Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53.** Nat Cell Biol 1, 20-26.
- Weinberg, R. A. (1995). **The retinoblastoma protein and cell cycle control.** Cell 81, 323-330.
- Yang, P. K., Hoareau, C., Froment, C., Monsarrat, B., Henry, Y., and Chanfreau, G. (2005). **Cotranscriptional recruitment of the pseudouridylsynthetase Cbf5p and of the RNA binding protein Naf1p during H/ACA snoRNP assembly.** Mol Cell Biol 25, 3295-3304.
- Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Grone, H. J., Schutz, G., and Grummt, I. (2005). **Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis.** Mol Cell 19, 77-87.
- Zetterberg, A., Larsson, O., and Wiman, K. G. (1995). **What is the restriction point?** Curr Opin Cell Biol 7, 835-842.
- Zhai, W., and Comai, L. (2000). **Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53.** Mol Cell Biol 20, 5930-5938.
- Zhang, H., Fang, Y., Huang, C., Yang, X., and Ye, Q. (2005). **Human pescadillo induces large-scale chromatin unfolding.** Sci China C Life Sci 48, 270-276.
- Zhang, H., Xiong, Y., and Beach, D. (1993). **Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes.** Mol Biol Cell 4, 897-906.
- Zhang, Y., Wolf, G. W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W. A., and Xiong, Y. (2003). **Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway.** Mol Cell Biol 23, 8902-8912.

---

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

5'/3'-ETS	5'/3'-External Transcribed Spacer - externe transkribierte Sequenz
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bHLH-LZ	basische Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper Domäne
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C-	Carboxy-
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
d	Tag(e)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxynukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid(e)
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol ( <i>threo</i> -1,4-Dimercapto-2,4-butanol)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein - verbessertes grün fluoreszierendes Protein
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
FACS	Fluorescence activated cell sorter/ Durchflußzytometer
FCS	Forwardscatter/
G	Guanidin
G1	Gap-Phase 1
G2	Gap-Phase 2
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin-Epitop
HRP	Meerrettichperoxidase
ITS-1/2	Internal Transcribed Spacer 1/2 - interne transkribierte Sequenz 1/2
kb	kilo Basenpaar(e)
kD	kilo Dalton
Lsg.	Lösung
Max	Myc-assoziiertes Faktor X

---

min	Minute(n)
mock	Vektorkontrolle
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNS	Boten-RNS
myc	Myeloblastom
N-	Amino-
NPM	Nucleophosmin
Nt	Nukleotid(e)
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei X nm Wellenlänge
ORF	open reading frame, Leseraster
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pre-rRNS	Vorläufer rRNS
Rb	Retinoblastom
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rProtein	ribosomales Protein
rRNS	ribosomale RNS
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S-Phase	DNS-Synthesephase
siRNS	„small interfering RNA“
SDS	NatriumdodecylSulfat
SSC	Sidescatter/Seitwärtsstreuung oder Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Einheit(en)
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Thomas Christian Grimm
Geburtstag	1. März 1977
Geburtsort	Donauwörth
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Beethovenstrasse 1 86438 Kissing

---

### Schulbildung

Sept. 1983 - Aug. 1987 Volksschule Hammerschmiede (Augsburg)

Sept. 1987 - Aug. 1996 Holbein-Gymnasium Augsburg

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Wehrersatzdienst

Aug. 1996 - Aug. 1997 Zivildienst in der Tagespflege Langemarckstraße  
(Sander'sche Stiftung, Augsburg)

### Berufsausbildung

Sept. 1997 - Okt. 2002 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Hauptfach: Genetik

Nebenfächer: Mikrobiologie, Immunologie und Biochemie

Diplomarbeit im Fach Genetik in der AG Bandlow (LMU München)

Abschluß: Diplom

### Promotion

Feb. 2003 - Dez. 2006 Promotion an der GSF in München, Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, AG Eick

---

**Publikationsliste**

Hölzel M, Rohrmoser M, Schlee M, Grimm T, Harasim T, Malamoussi A, Gruber-Eber A, Kremmer E, Hiddemann W, Bornkamm GW, Eick D. (2005). **Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation.** J Cell Biol. 170, 367-78.

Grimm T, Hölzel M, Rohrmoser M, Harasim T, Malamoussi A, Gruber-Eber A, Kremmer E, Eick D. (2006). **Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex.** Nucleic Acids Res. 34, 3030-43.

Hölzel M, Grimm T, Rohrmoser M, Malamoussi A, Harasim T, Gruber-Eber A, Kremmer E, Eick D. (2006). **The BRCT domain of mammalian Pes1 is crucial for nucleolar localization and rRNA processing.** Veröffentlichung akzeptiert bei Nucleic Acids Res.

Rohrmoser M, Hölzel M, Grimm T, Malamoussi A, Harasim T, Orban M, Gruber-Eber A, Kremmer E, Eick D. (2006). **Interdependency of Pes1, Bop1, and WDR12 controls the assembly of the PeBoW complex required for maturation of the large ribosomal subunit.** Veröffentlichung in Vorbereitung.



---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt hierbei den Angehörigen und ehemaligen Angehörigen des Eick-Labors für die vielen hilfreichen Diskussionen, Rat und Tat: Michael Hölzel, Michaela Rohmoser, Anastassia Malamoussi, Thomas Harasim, Anita Gruber-Eber, Rob Chapman, Martin Heidemann, Mathias Orban, Isabel Schlosser, Martin Schlee, und Dirk Eick.

Dankeschön auch an Elisabeth Kremmer und ihre Gruppe für die umfangreiche Unterstützung unserer Projekte mit Antikörpern und Materialien.

Danke auch an Reinhard Mailhammer für die tatkräftige Hilfe bei den LightCycler-Experimenten.

Vielen Dank auch an Stefan Müller (Max-Planck Institut, Martinsried) für die Unterstützung bei der Untersuchung der SUMOylierung von Pes1 sowie an die Arbeitsgruppe von Gernot Längst (LMU, München) für die Diskussionen rund um den Nukleolus.

Schlußendlich gilt mein Dank auch der gesamten KMolBi für die gute Zusammenarbeit und die aufmunternden Worte zur rechten Zeit. Allen bisher nicht genannten „GSFlern“ möchte ich dafür danken, daß sie ein reibungsloses Arbeiten ermöglichten, und nicht zuletzt durch ihre freundliche und hilfsbereite Art ein sehr angenehmes Betriebsklima schufen.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt worden ist.

München, den 24. August 2006

Thomas Grimm