

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**MADER: Biochemische Eigenschaften
und Regulation
eines humanen Transkriptionskorepressors**

von

Daniel Kramer

aus Deggendorf

2000

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinn von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Judith Johnson betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 19. 07. 2000



.....
(Daniel Kramer)

Dissertation eingereicht am 19. 07. 2000

1. Gutachter: Prof. Dr. Judith Johnson
2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 28. 11. 2000

Herzlichen Dank,

Frau Prof. Dr. Judith Johnson für die Möglichkeit dieses interessante und herausfordernde Thema am Institut für Immunologie bearbeiten zu dürfen. Während der letzten vier Jahre lernte ich insbesondere ihre Fachkenntnis, Professionalität und stete Diskussionsbereitschaft zu schätzen. Besondere Anerkennung verdient ihre Toleranz, die stets für eine lockere und entspannte Arbeitsatmosphäre sorgte.

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey für seine Hilfsbereitschaft, die wertvollen Hinweise und die Übernahme der Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie

allen Mitarbeitern des J.J. Labors, insbesondere Edith, Andrea, Anja und Rüdiger, mit deren Humor und Kollegialität so manche Niederlage im Labor leichter zu verdauen war.

Frau Ina Contag, die sich stets bemühte Ordnung in das Chaos zu bringen und damit einen aussichtslosen Kampf gegen den zweiten Hauptsatz der Thermodynamik führte.

meiner Freundin Michaela, die auch in unserer Freizeit niemals müde wurde mit mir erschöpfende Diskussionen über MADER zu führen. Ein besonderer Dank gebührt ihr für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit.

vor allem meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung und Motivation während des Studiums und der Promotion.

Abkürzungen

A	Ampere
AA	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Konservierte Domäne
cDNS	Zur mRNS komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie (1Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Minute)
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
Da	Dalton (atomare Masseneinheit = $1,660 \times 10^{-24}$ g)
dATP	Desoxy-Adenosintri-phosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintri-phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosintri-phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Ribonukleotidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Thymidintri-phosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme linked immunosorbant assay“
FACS	„Fluorescence activated cell sorting“
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdfeldbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
G-Phase	„Gap“-Phase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
h	Stunden
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertoni
M	Molar (mol/l)
mAb	Monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm

µg	Mikrogramm
min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
Mrel	relative elektrophoretische Beweglichkeit
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisations-Signal
nmol	Nanomol
Nonidet	nichtionisches Detergenz
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunden
S-Phase	Synthese-Phase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
SV40	Simian Virus 40
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (enzymatische Einheit)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt

Nukleotide:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
N	A, C, G oder T

Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Glu	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	4
3 Material.....	12
3.1 Chemikalien	12
3.2 Verbrauchsmaterial.....	15
3.3 Geräte	15
3.4 Radiochemikalien	17
3.5 Größenstandards	17
3.6 Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen	17
3.7 Biologisches Material	18
3.7.1 Zelllinien.....	18
3.7.2 Polyklonale Seren und Antikörperkonjugate.....	19
3.7.3 Monoklonale Antikörper.....	19
3.7.4 Enzyme	20
3.7.5 Bakterien.....	20
3.7.6 Plasmide	21
3.7.7 Stabile Transfektanten	22
3.7.8 Nukleinsäuren.....	22
3.7.9 Oligonucleotide	22
3.8 Medien, Puffer, Lösungen	23
3.8.1 Grundstoffe für Kulturmedien	23
3.8.2 Kulturmedien für Bakterien.....	23
3.8.3 Zellkulturmedien.....	24
3.8.4 Allgemeine Puffer und Lösungen	24
4 Methoden	25
4.1 Zellkultur	25
4.1.1 Einfrieren und Auftauen.....	25
4.1.2 Transfektion von Eukaryontenzellen	26
4.1.3 PMA Stimulation von adhärennten Zellen	27
4.1.4 Hemmung der Transkription mit Actinomycin D	28
4.1.5 Hemmung des Proteasoms mit Lactacystin.....	29
4.2 Molekularbiologische Methoden.....	30
4.2.1 Verwendung von Bakterien	30
4.2.1.1 Vermehrung von E. coli	30
4.2.1.1.1 Plattenkultur	30
4.2.1.1.2 Flüssigkultur	30
4.2.1.1.3 Glycerinkultur	30
4.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien	30

4.2.1.3 Transformation kompetenter Bakterien	31
4.2.2 Präparation und Analyse von DNS	32
4.2.2.1 Isolierung von Plasmid DNS	32
4.2.2.2 Messung der Nukleinsäure Konzentration	33
4.2.2.3 Verdau der DNS mit Restriktionsendonukleasen	34
4.2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNS	34
4.2.2.5 Isolation von DNS aus Agarosegelen	35
4.2.2.6 Southern Blot	36
4.2.3 Präparation und Analyse von RNS	37
4.2.3.1 Isolierung von Gesamt RNS	37
4.2.3.1.1 Isolierung mit Phenol-Chloroform	37
4.2.3.1.2 Isolierung durch Ionenaustausch-Chromatografie	38
4.2.3.2 Denaturierende RNS Gelelektrophorese	38
4.2.3.3 Northern-Blot	39
4.2.3.3.1 Nachweis von Gesamt RNS auf der Nylonmembran.....	39
4.2.4 Radioaktive Markierung von Nucleinsäuren	39
4.2.4.1 Radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten mit Zufallsprimern....	39
4.2.4.2 Radioaktive Endmarkierung von Oligonucleotiden	40
4.2.5 Hybridisierung von Southern- und Northern Blots	41
4.2.5.1 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNS-Fragmenten.....	41
4.2.5.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonucleotiden	41
4.2.5.3 Hybridisierung mit Express-Hyb™-Lösung	42
4.2.5.4 Entfernung der radioaktiv markierten Probe von der Membran.....	43
4.2.6 RT-PCR	44
4.2.6.1 DNase Verdau und Aufreinigung der RNS	45
4.2.6.2 cDNS Synthese.....	45
4.2.6.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	46
4.2.6.4 Quantitative RT-PCR.....	47
4.3 Proteinbiochemische Methoden	49
4.3.1 Präparation von Gesamtprotein aus Zellen	49
4.3.2 Präparation von Kernextrakten	49
4.3.3 Messung der Proteinkonzentration.....	50
4.3.4 Immunpräzipitation.....	51
4.3.4.1 Phosphatase-Verdau des Immunpräzipitats.....	52
4.3.5 Protein Gelelektrophorese.....	52
4.3.5.1 SDS PAGE.....	53
4.3.5.2 Coomassie-Färbung	55
4.3.6 Western Blot	55
4.3.6.1 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose Membranen	56
4.3.6.2 Nachweis von Gesamtprotein auf Membranen	57
4.3.6.2.1 India-Ink Färbung.....	57
4.3.6.2.2 Amido-Schwarz Färbung.....	58
4.3.6.3 Immundetektion von immobilisierten Proteinen	58
4.3.6.4 Nachweis von Phosphoproteinen auf Membranen.....	60
4.3.6.5 Nachweis von Glykoproteinen auf Membranen.....	60
4.3.6.6 Entfernung der Immunkomplexe von der Membran	61
4.3.7 Präparation von Fusionsproteinen	61

4.3.7.1 Expression von Fusionsproteinen in Bakterien.....	61
4.3.7.2 Aufreinigung von Fusionsproteinen	62
4.4 Immunologische Methoden.....	63
4.4.1 Elisa Test zur Analyse löslicher Antigene	63
4.4.2 Immunfluoreszenz	64
4.5 Computeranalysen	65
4.5.3 Sequenzanalysen.....	65
4.5.3 Strukturanalysen.....	65
4.5.4 Densitometrische Analysen	65
5 Ergebnisse.....	66
5.1 Biochemische Eigenschaften von MADER	66
5.1.1 Sequenzanalysen von MADER	66
5.1.2 Reaktivität der MADER Antikörper im Western Blot	72
5.1.3 Reaktivität der MADER Antikörper mit drop8	75
5.1.4 Spezifität der MADER-Antikörper	79
5.1.5 Untersuchungen zur Bandenheterogenität von MADER.....	82
5.1.5.1 Überprüfung der Protease-Sensitivität des MADER Proteins.....	82
5.1.5.2 Überprüfung des Ubiquitinierungsstatus des MADER-Proteins	83
5.1.5.3 Überprüfung des Glykosylierungsstatus des MADER-Proteins	84
5.1.5.4 Überprüfung des Phosphorylierungsstatus des MADER-Proteins	86
5.1.6 Konservierung der MADER Expression.....	91
5.2 Regulation der MADER Expression	94
5.2.1 MADER Protein Expression in Zelllinien	94
5.2.2 Vergleich der MADER Protein und mRNS Expression	96
5.2.3 Stabilität der MADER mRNS	103
5.2.4 Stabilität des MADER Proteins.....	106
5.3 Funktion von MADER	111
6 Diskussion	114
6.1 Reaktivität und Spezifität der MADER Antikörper	114
6.2 Heterogenität der MADER Banden im Western Blot	116
6.3 Konservierung der MADER Expression	120
6.4 Regulation der MADER Expression	121
6.5 Funktion von MADER	125
6.6 Ausblick	129
7 Literaturverzeichnis	130

1 Zusammenfassung

Obwohl weltweit das Auftreten des malignen Melanoms der Haut in den letzten Jahren dramatisch zugenommen hat, ist auf biochemischer Ebene noch relativ wenig über die daran beteiligten Moleküle bekannt. Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern, die auf Gewebeschnitten keine Reaktion mit gutartigen melanozytären Tumoren (Naevi) zeigten, jedoch stark mit malignen Melanomen reagierten, konnte durch Screening einer humanen Melanom cDNS Expressionsgenbank das 56,6 kDa Kernprotein MADER (Melanom assoziiertes delayed early response Gen) kloniert werden.

Zur biochemischen Charakterisierung des MADER-Proteins standen neun monoklonale Antikörper zur Verfügung. In Immunpräzipitationen und Western-Blot Analysen zeigten alle diese Antikörper in verschiedenen menschlichen Zelllinien ein regelmäßiges Muster von sechs bis acht Banden zwischen 56 und 65 kDa. Neben dem vollständigen MADER-Protein reagierten alle monoklonalen Antikörper auch mit der MADER Splicevariante drop8, die im C-terminalen Bereich eine Verkürzung von 64 Aminosäuren aufweist. Im Western-Blot ergaben sich auch hier mehrere immunreaktive Banden. Durch transiente Transfektion der Vollängen-MADER-cDNS, konnte gezeigt werden, dass alle Banden eine spezifische Eigenschaft des MADER-Proteins darstellen. Diese Bandenheterogenität beruht weder auf einem Protease-Abbau, noch auf Glykosylierung oder Ubiquitinierung. Ein Teil der Banden konnte einer Serin-Phosphorylierung des MADER-Proteins zugewiesen werden. Ein ähnliches Muster zeigten die monoklonalen anti-MADER Antikörper auch in nicht menschlichen Zelllinien (Maus, Ratte, Hamster, Affe), so dass es sich bei MADER um ein, in der Evolution hochkonserviertes Protein handeln dürfte.

Die MADER-Expression zeigte eine starke Melanomassoziiierung bei Antikörperfärbungen von Gewebeschnitten. Dies konnte bei der Analyse von 20 Zelllinien verschiedenen Ursprungs im Western Blot bestätigt werden. Erste Untersuchungen legten den Schluss nahe, dass diese Überexpression von MADER in Melanomzellen auf einen posttranslationalen Stabilisierungseffekt des Proteins zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden mehrere Zelllinien gleichzeitig im Western- und Northern Blot, beziehungsweise in einer quantitativen MADER RT-PCR auf ihre MADER Protein- und mRNA-Menge hin untersucht. Hierbei ergab sich eine sehr gute Korrelation zwischen der mRNA und Protein Expression. Da die MADER mRNA Halbwertszeit außerdem den gleichen Wert (2,6 h) in Zellen mit einem hohen und niedrigen MADER Spiegel aufwies, ist die Ursache für die Melanom-Überexpression von MADER in einer gesteigerten Transkription zu suchen.

Durch Phorbolsterbehandlung ließ sich eine Induktion der MADER-Expression erzielen. Die MADER-mRNA zeigte dabei nach zwei Stunden ihren Höchstwert und war nach sechs Stunden wieder auf ihrem Basalwert. Die MADER-Protein Expression erreichte hingegen nach sechs Stunden ihr Maximum und blieb selbst 48 Stunden nach Stimulationsbeginn noch deutlich erhöht. Dieser langsame Abbau deutet auf eine hohe Stabilität des MADER-Proteins hin. Da diese Kinetik dabei vom konstitutiven MADER-Level der untersuchten Zelllinien unabhängig war, trägt dieses Phänomen jedoch nicht zur Überexpression von MADER in Melanomen bei.

Vor kurzem wurde MADER unabhängig durch einen „Two-Hybrid-Screen“ als Repressor des Transkriptionsfaktors EGR-1 (early growth response 1) identifiziert und kloniert. In einigen Modellsystemen wurde gezeigt, dass EGR-1 durch Transaktivierung von Wachstums-hemmenden und Apoptose-fördernden Genen (TGF- β 1; p21; p53) als Tumorsuppressor wirken kann. Eine Überexpression von MADER könnte durch eine Hemmung dieser Funktion eine erhöhte Tumorigenität bewirken. Ein Vergleich der Expression der oben angeführten Zielgene von

EGR-1 mit der von MADER in mehreren Zelllinien ergab jedoch keine Korrelation. Möglicherweise wirkt MADER deswegen noch auf andere Signalwege ein.

2 Einleitung

In den Ländern der westlichen Welt hat sich Krebs hinter Herz-Kreislaufkrankungen zur zweithäufigsten Todesursache entwickelt. Alle Befunde sprechen dabei dafür, dass Tumore durch genetische Veränderungen entstehen. So wachsen sie normalerweise klonal, das heißt die Malignität muss von der Mutter- auf die Tochter-Zelle vererbt werden und somit genetisch fixiert sein. Außerdem bewirken die meisten bekannten Karzinogene, wie chemische Verbindungen (polycyklische Kohlenwasserstoffe, Alkylierungsmittel, Nitrosamine), pflanzliche Toxine (Aflatoxin) und ionisierende Strahlung, Mutationen in der Struktur der DNS oder ihrer Basenabfolge (Ames, 1979). Da das Auftreten der meisten soliden Tumoren logarithmisch mit dem Alter ansteigt, nimmt man an, dass dabei zwei oder mehr Mutationen für die Ausprägung des vollen malignen Phänotyps verantwortlich sind (Greenblatt et al., 1994; Vogelstein et al., 1988).

Die beschriebenen genetischen Veränderungen können sowohl durch Aktivierung als auch durch Inaktivierung kritischer Gene zu der für Krebs charakteristischen unkontrollierten Zellteilung und der Fähigkeit zur Metastasierung führen (Bishop, 1991). Im ersten Fall wird ein Gen, das stimulierend auf die Zellproliferation wirkt durch Mutationen überaktiviert. Bei einem derartigen Gen spricht man von einem Onkogen (griech.: *onkos*, Tumor), das entsprechende normale Allel wird Proto-Onkogen genannt. Onkogene haben in der Regel einen dominanten Charakter. Die Mutation eines Proto-Onkogens zum Onkogen wird bereits dann phänotypisch sichtbar, wenn nur eine der beiden Kopien des Gens im diploiden Chromosom von der Mutation betroffen ist. Die Funktionen der Proto-Onkogene sind vielfältiger Natur. Häufig sind sie Bestandteile der Mechanismen mit denen Zellen Signale aus der Umgebung, die sie zur Proliferation anregen, weiterleiten und verarbeiten. In dieser Gruppe finden sich nahezu alle Moleküle, die Teil der zel-

lulären Signaltransduktionskaskaden sind. Sie können z.B. als Serin-, Threonin- oder Tyrosinkinase die Phosphorylierung anderer Proteine bewirken (Hunter, 1987; van Etten et al., 1989). Außerdem sind sie als GTPasen (Bourne et al., 1990) oder Adapterproteine Crk (Mayer & Hanafusa, 1990) und Nck (Lee et al., 1993) essentiell für die Signalweiterleitung. Eine große Anzahl von Proto-Onkogenen sind auch als Transkriptionsfaktoren (z.B. Fos, Myc, Jun) an der Genregulation im Zellkern beteiligt (Levin, 1991).

Im zweiten Fall kommt es zu der Inaktivierung von Genen, die einen negativen, dämpfenden Einfluss auf die Zell-Proliferation ausüben. Derartige Gene bezeichnet man als Anti-Onkogene oder Tumorsuppressorgene (Sager 1989; Marshall, 1991; Knudson, 1993). Mutationen von Tumorsuppressorgenen haben häufig einen rezessiven Charakter. Bei Mutation eines Allels kann das noch verbleibende intakte Allel des anderen Chromosoms die wachstumsdämpfende Funktion weiter ausüben. Erst durch die Inaktivierung beider Allele fällt die tumorhemmende Funktion gänzlich aus. Dies ist in vielen Fällen gleichbedeutend mit einer Stimulation der Zellteilung. Tumorsuppressor-Proteine kontrollieren normalerweise hauptsächlich die Repression von Genen, deren Produkte für das Durchlaufen des Zellzyklus benötigt werden. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem Retinoblastom-Protein Rb (Benedict et al., 1990), sowie dem p53 Protein (Lane & Crawford, 1979; Harries, 1993) zu. Rb hat die Funktion eines Schalters in der Umsetzung mitogener und antimitogener Signale auf der Transkriptionsebene. Diese Funktion wird mit Hilfe des Phosphorylierungsstatus von Rb ausgeübt. Im hypophosphorylierten Zustand reprimiert Rb den Transkriptionsfaktor E2F durch Bindung und verhindert dadurch die Expression von Genen, deren Produkte zum Durchlaufen des Zellzyklus benötigt werden. Im hyperphosphorylierten Zustand hat Rb hingegen eine aktivierende Wirkung auf diese Gene. Das Tumorsuppressor Protein p53 ist ebenfalls an der Kontrolle des Übergangs von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus beteiligt. Seine Hauptaufgabe ist es den Zellen, die eine DNS-Schädigung erlitten haben, durch einen Stopp im Zellzyklus Zeit für eine

Reparatur zu geben. Diese Wirkung übt p53 dadurch aus, dass es als Transkriptionsfaktor die Expression eines anderen Regulatorproteins p21 bewirkt. Dieses Regulatorprotein von 21 kDa blockiert in der Folge durch seine Bindung die Kinaseaktivität der Cyklin abhängigen Kinase 2 (CDK2), die normalerweise durch Phosphorylierung des entsprechenden Cyklins dazu dient, die Zelle über den G1 Kontrollpunkt zu bringen (Harper, 1993).

Das Melanom (griech.: *melanosis*, schwarze Veränderung) ist ein maligner Tumor, der seinen Ausgangspunkt in Melanozyten hat. Als bösartige Neubildung dieser Pigmentzellen entstehen die meisten Melanome im Bereich der Haut. Darüber hinaus kommen sie jedoch an den Schleimhäuten, zum Beispiel des Darms und der Netzhaut des Auges vor. Da das Melanom dafür bekannt ist bereits in einem frühen Stadium und extrem häufig Metastasen zu bilden, zählt es zu den bösartigsten Tumoren überhaupt (Balch et al., 1998). Zudem nimmt das Auftreten dieser Krankheit weltweit stärker zu als das jeder anderen Krebsart (Ries et al., 1999). So stieg in den USA von 1979 bis 1996 die Zahl der Neuerkrankungen um über 130 %. Dank einer verbesserten Aufklärung und Vorsorge ging damit im selben Zeitraum nur eine Steigerung der Mortalität um 35 % einher. Ähnliche Daten findet man auch für die Bundesrepublik (Abbildung 1).

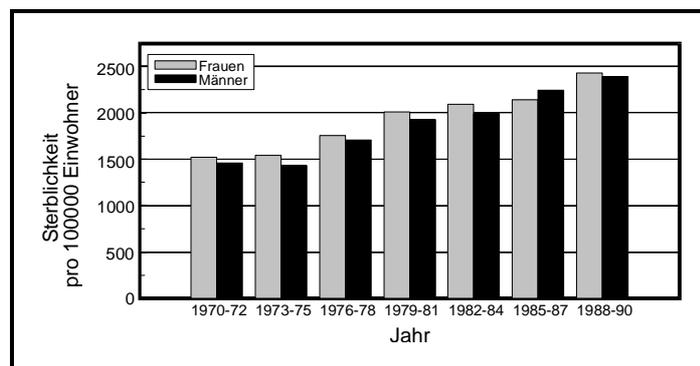


Abbildung 1: Sterblichkeit an Melanom-Erkrankungen pro 100000 Einwohner der alten Bundesländer
Daten des Robert Koch Instituts Berlin

Das maligne Melanom zeigt, wie alle Tumore, eine phasenhafte Entwicklung (Clark et al., 1984; Herlyn et al., 1987). Die neoplastische Transformation beginnt mit der unregelmäßigen Proliferation eines einzelnen Melanozyten in der basalen Zellschicht. Anschließend kommt es zur Ausbreitung dieser Zellen, die durch eine Verringerung der interzellulären Bindungskräfte gekennzeichnet sind. Hieraus entwickelt sich schließlich ein „Melanoma in situ“, das noch auf die Epidermis beschränkt ist. Der nächste Schritt ist durch die Invasion der Tumorzellen durch die Basalmembran und tief in die Dermis gekennzeichnet. Jetzt erhält der Tumor Anschluss an Blut- und Lymphgefäße, so dass es zur Aussaat von Tumorzellen und damit zur Bildung von Metastasen kommen kann. Während die Wachstumsrichtung in den Anfangsphasen noch horizontal, parallel zur epidermalen Grenzschicht abläuft, entwickelt sich nach einer gewissen Zeit schließlich eine Wachstumsphase, bei der der Tumor in vertikaler Richtung in die Tiefe wächst. Neben dem Melanom kennt man auch gutartige Neoplasien der Haut, sogenannte Naevuszellen. Naevi stammen ebenfalls von Melanozyten ab und tendieren auch dazu, Zellkluster zu bilden, wobei der Unterschied eines Naevus zu einem Melanom in dessen begrenztem Wachstum liegt.

Der beschriebene Phasenverlauf beim Übergang einer normalen Zelle in eine Tumorzelle lässt sich häufig morphologisch und zellbiologisch gut charakterisieren. Die zugrundeliegenden biochemischen Veränderungen sind ebenfalls in einer Reihe von Tumoren relativ gut erforscht. Ausführliche Untersuchungen am Kolonkarzinom (Vogelstein et al., 1988) führten beispielsweise dazu, dass den verschiedenen Stadien der Tumorprogression die entsprechenden genetischen Veränderungen zugewiesen werden konnten. Die Entwicklung des Kolonkarzinoms beginnt dabei auf molekularer Ebene mit einer Mutation im APC-Gen (adenomatöses Polyposis-Gen), setzt sich fort mit einer Überaktivierung von k-ras durch Mutationen und dem Verlust des DCC-Gens („deletion in colon carcinoma“) und führt schließlich zur Inaktivierung des p53 Tumorsuppressor-Proteins.

Im Gegensatz dazu weiß man, trotz der großen medizinischen Bedeutung und des einfachen Zugangs zu histologischen Präparaten aller bei der Melanomentwicklung auftretenden Entartungsstufen, sehr wenig über die, an der Entwicklung zur Melanomzelle beteiligten, Onkogene und Tumorsuppressorgene. Bei erblich bedingten Melanomen konnte die Mutation des Tumorsuppressorproteins p16 als prädisponierender Faktor nachgewiesen werden (Hussussian et al., 1994). Das p16 Protein verhindert normalerweise durch Komplexbildung mit der Cyclin abhängigen Kinase 4 (Cdk4) den G1/S Übergang. Aus diesem Grund spielt eine Mutation in diesem Protein wahrscheinlich eine entscheidende Rolle beim Übergang der Melanomzellen zur unkontrollierten Proliferation (Castellano et al., 1997). In anderen Untersuchungen von Melanomen wurden zusätzlich Mutationen von ras (Wagner et al., 1995) und die Überexpression von c-myc (Konstadoulakis et al., 1998) und p53 (Albino et al., 1994) beschrieben. Da diese Veränderungen aber auch in einer Vielzahl anderer Tumoren gefunden werden, können sie allein die besondere Aggressivität und Metastasierungstendenz der Melanome nicht erklären.

Ein besseres Verständnis der biochemischen Prozesse bei der Melanomprogression wäre allerdings dringend nötig um Therapieansätze zur Heilung dieser Erkrankung zu entwickeln. Ein Ansatz um Gene zu identifizieren, die eine Rolle bei der Melanomprogression spielen, bedient sich monoklonaler Antikörper. Diese werden durch Immunisierung einer Maus mit Melanomzellen gewonnen und auf Gewebeschnitten daraufhin selektioniert nicht mit gutartigen melanozytären Läsionen (Naevi) sondern nur mit Melanomgewebe zu reagieren. Die verbliebenen Antikörper erkennen deshalb Moleküle, die während der Entwicklung des Melanoms ein Hochregulation erfahren. Durch Screening einer humanen Melanom cDNA Expressionsbank mit diesen monoklonalen Antikörpern kann man die entsprechende cDNA isolieren (Abbildung 2).

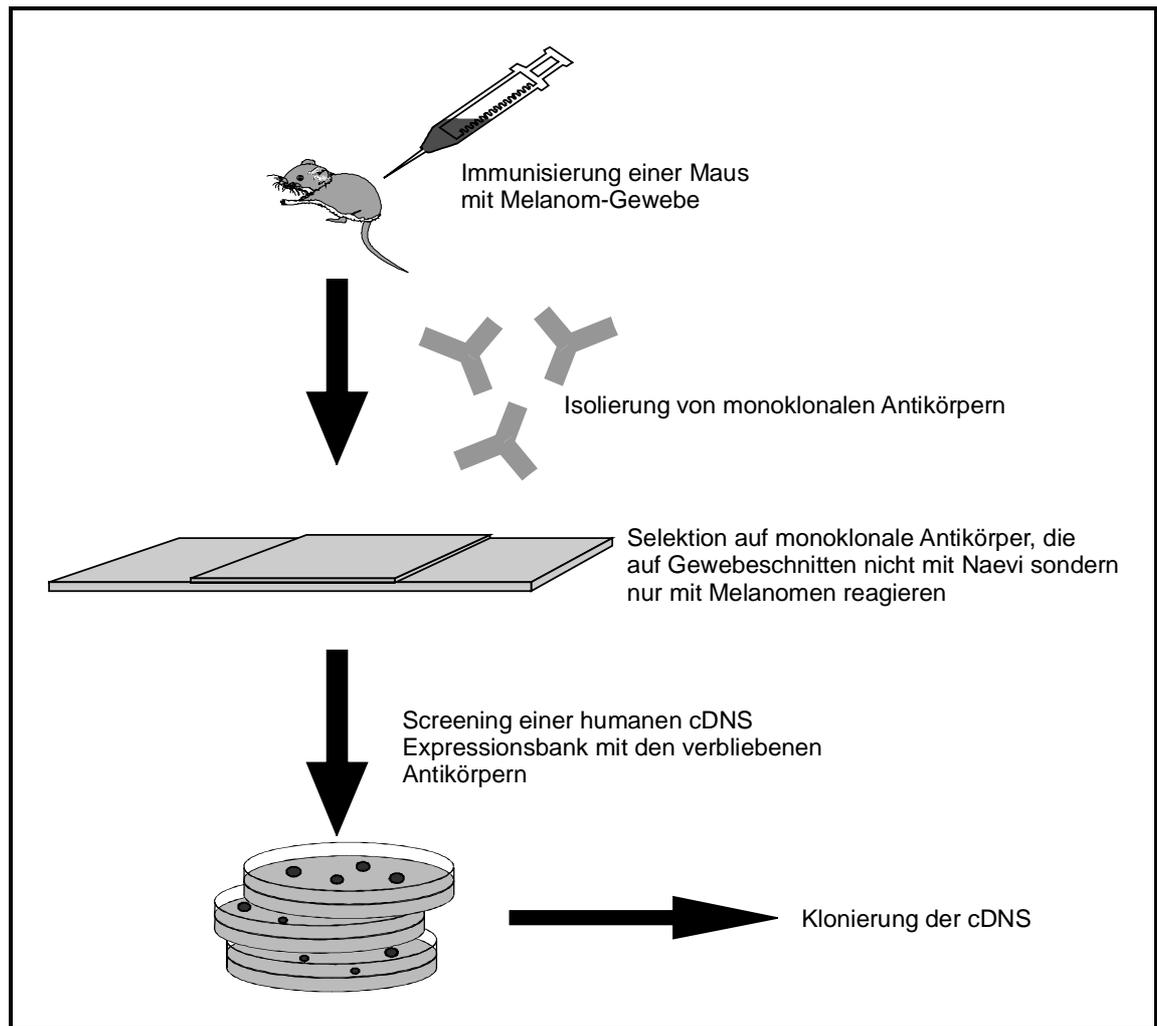


Abbildung 2: Methode zur Isolierung von cDNS Klonen, die an der Melanomprogression beteiligt sind

Ein Molekül das mit Hilfe dieses Ansatzes entdeckt wurde ist das Kernprotein MADER (Melanom assoziiertes delayed early response Gen) (Kirsch et al., 1996). Die isolierte MADER cDNS kodiert ein Protein von 525 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 56,6 kDa. Es existiert eine Splicevariante (MADER-drop8), die im C-terminalen Bereich eine Verkürzung von 64 Aminosäuren aufweist. Das Protein besitzt zwei potentielle Kernlokalisationsignale, zwei Prolin-reiche Domänen, 22 potentielle Phosphorylierungsstellen und mehrere S(T)PXX Motive, die ein Charakteristikum genregulatorischer Proteine darstellen. Während man in Northern Blots von verschiedenen menschlichen Geweben eine ubiquitäre Verteilung der MADER mRNA erkennen konnte, zeigten immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten eine deutliche

immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten eine deutliche Melanomassoziierung des MADER Proteins. So konnte eine Expression auf 37 von 42 getesteten Melanomgeweben oder deren Lymphknotenmetastasen, aber nur in einem von sechs untersuchten Naevi und niemals in normalem epidermalen Gewebe nachgewiesen werden (Kirsch et al., unveröffentlichte Ergebnisse). Auch ein Vergleich von Melanom- und Karzinomgewebe zeigte eine deutlich höhere MADER Protein Expression in Melanomen (88 % der Melanome; 36 % der Magenkarzinome; 8 % der Kolonkarzinome) (Abbildung 3).

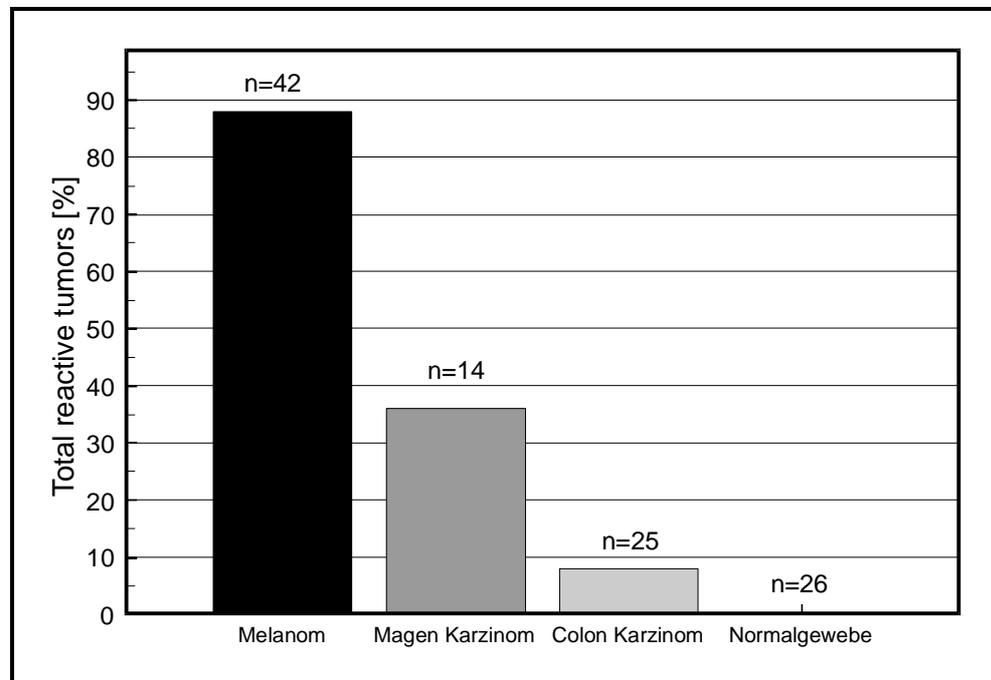


Abbildung 3: Melanomassoziierung von MADER bei immunhistochemischen Gewebefärbungen
n: Anzahl der getesteten Gewebe

Die Transkription von MADER konnte durch Stimulation mit Serum und dem Phorbolster PMA induziert werden. Hierbei wurde innerhalb von zwei Stunden ein Maximum erreicht, das etwa dem zehnfachen Basallevel entsprach. Durch Vorinkubation mit Cycloheximid, das die Proteinbiosynthese hemmt, konnte diese Steigerung der MADER Transkription vollständig inhibiert werden (Kirsch et al., 1996). Auf Grund dieser Ergebnisse ordnete man MADER in die Gruppe der

„delayed early response“ Gene ein, die die Proteine der „immediate early response“ Gene (meist Transkriptionsfaktoren) zu ihrer Expression benötigen.

Vor kurzem wurde MADER unabhängig unter dem Namen NAB2 (NGF1-A bin-ding protein 2) durch einen „Two-Hybrid-Screen“ als Korepressor des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors EGR-1 (Early Growth Response 1) identifiziert und kloniert (Svaren et al., 1996). Da EGR-1 die Transkription einer Vielzahl von Genen steuert, die an Proliferations- und Differenzierungs-Prozessen beteiligt sind, nimmt man an, dass MADER ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation dieser Abläufe spielt.

Um die MADER Expression „in vivo“ zu untersuchen wurden von Kirsch (1996) neun monoklonale Antikörper gegen rekombinantes MADER Protein generiert. Ziel dieser Arbeit war es zunächst mit Hilfe dieser Antikörper eine biochemische Charakterisierung des MADER Proteins vorzunehmen. In einem zweiten Teil sollte dann der Grund für die beobachtete Überexpression des MADER Proteins in Melanomen geklärt werden um einen Einblick in die Regulation dieses Prozesses zu erhalten.

3 Material

3.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Actinomycin D	Sigma, Deisenhofen
Agarose Typ I Low EEO	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose Typ II Medium EEO	Biozym, Hess. Oldendorf
Amido-Schwarz	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Benzamidinhydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
β -D-(+)-Glucose	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Citronensäure	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue	Roth, Karlsruhe
Dextransulfat (Natriumsalz)	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat („DEPC“)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid („DMSO“)	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Life Technologies, Eggenstein
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Gelantine	Sigma, Deisenhofen
Formamid deionisiert	Sigma, Deisenhofen

Genticin (G-418 Sulfat)	Life Technologies, Eggenstein
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Serva, Heidelberg
Hämatoxylin Lösung	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Serva, Heidelberg
HEPES	Sigma, Deisenhofen
India Ink	Winsor & Newton, London
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaisers Glyceringelantine	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
l-Glutamin	Serva, Heidelberg
Lactacystin	Sigma, Deisenhofen
Laurylsulfat („SDS“)	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Fluka, Buchs
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maltose	Sigma, Deisenhofen
Maus-Serum-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylen-Blau	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
N,N'-Dimethylformamid („DMF“)	Merck, Darmstadt
N-Acetyl-Glucosamin	Sigma, Deisenhofen
3-(N-Morpholin)-Propansulfonsäure („MOPS“)	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen

Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumnitroprussid	Sigma, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
o-Diansidindihydrochlorid	Sigma, Deisenhofen
o-Phenyldiamin	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pepstatin	Sigma, Deisenhofen
Pferdeserum	Biochrom, Berlin
Phenanthrolinmonohydrat	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid („PMSF“)	Sigma, Deisenhofen
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat („PMA“)	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglykol	Merck, Darmstadt
Protein G Plus-Agarose	Calbiochem, Bad Soden
Rinderserumalbumin („BSA“)	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure 25%	Roth, Karlsruhe
Sephadex G50	Pharmacia, Schweden
Salzsäure 37%	Merck, Darmstadt
Streptavidin-horseradish peroxidase	Amersham, Braunschweig
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
Tetramethylethyldiamin („TEMED“)	Sigma, Deisenhofen
Thymidin	Sigma, Deisenhofen
Titriplex III („EDTA“)	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan („TRIS“)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Fluka, Buchs
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Weizenkeim-Lectin Biotin gekoppelt („WGA“)	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

3.2 Verbrauchsmaterial

Blotting-Papier	GLW, Würzburg
Filmkassetten „Gevamatic“	Agfa-Gevaert, München
Fotopapier Ilfospeed Deluxe	Ilford, U.S.A.
Glaswolle	Serva, Heidelberg
Kanülen	GLW, Würzburg
Nitrozellulose Membran BA 85	Schleicher & Schüll, Dassel
Nylonmembran (Hybond N und N+)	Amersham, Braunschweig
Objektträger und Deckgläser	GLW, Würzburg
PCR-Pipettenspitzen (gestopft)	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Petrischalen	Greiner, Solingen
Pipettenspitzen (gelb, blau)	Saarstedt, Nürnberg
Quarzküvetten	Pharmacia, Schweden
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm X-Ray 90	Linhart, München
Spritzen PP	GLW, Würzburg
Zellkulturflaschen	Costar, U.S.A.
Zentrifugenröhrchen PP(50 ml; 15 ml; 10 ml)	Greiner, Solingen

3.3 Geräte

Beta-Scintilationszähler	Beckmann, U.S.A
CCD-Geldokumentation	INTAS, Göttingen
Densitometer „elscript 400“	Hirschmann, Unterhaching
Elektrophoresekammern:	
- Agarose Gele	Life Technologies, Eggenstein
- Protein Gele	Werkstatt Eigenbau
- Mighty Small	Hoefer, Schweden
FACscan	Becton & Dickenson, U.S.A.
Heizblock (Thermostat)	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschränke:	
- Steri-Cult 200	Forma Scientific, U.S.A.

	- B5060 EK/CO ₂	Heraeus, Hanau
	- Trockeninkubator	Ehret, Emdingen
Magnetrührer		Heidolph, Kehlheim
Mikropipetten (Pipetman)		Gilson, Frankreich
Mikroskope: - Diavert		Leitz, München
	- Dialux	Leitz, München
Mischgeräte: - Vortex-Genie		Scientific Industries, U.S.A.
	- Rollmischer Mixer 5	Denley, England
Netzgeräte: - Markrodrive 1		LKB, Schweden
	- Power Supply 500 / 200	Desaga, Heidelberg
	- EPS 600	Pharmacia, Schweden
PCR-Geräte: - Robocycler		Stratagene, Heidelberg
	- Thermocycler	Biomed, München
pH-Meter PHM 62		Radiometer, Dänemark
Rotationsofen		Bachofer, Reutlingen
Schüttelinkubator CH-4103		Infors AG, Bottmingen
Spektralphotometer: - U 3200		Hitachi, Japan
	- Ultraspec 3000	Pharmacia, Schweden
Sterilwerkbank „Laminar Flow“		BSH AG, Bottmingen
UV-Transilluminator		INTAS, Göttingen
UV-Stratalinker		Stratagene, Heidelberg
Viktor 1420 Multilabel Counter		Wallac, Freiburg
Waagen: - Präzisionswaage HL 32		Mettler, Gießen
	- PL 200	Mettler, Gießen
Wasserbad		GFL, Burgwedel
Western-Blot Apparatur: Trans-Blot™-Cell		Bio-Rad, München

Zentrifugen: - Minifuge 2	Heraeus Christ, Hanau
- Rotixa RP	Hettich, Tuttlingen
- Sorvall RC-5B	DuPont, Bad Homburg
- Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
- Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus Christ, Hanau

3.4 Radiochemikalien

α - ³² P dATP (3000 Ci/mMol)	Amersham, Braunschweig
--	------------------------

3.5 Größenstandards

DNA Größenstandards: - 100 bp Leiter	Life Technologies, Eggenstein
- 1 kb Leiter	Life Technologies, Eggenstein
RNA Größenstandard	Life Technologies, Eggenstein
Rainbow-Protein Marker (14,3 - 200 kDa)	Amersham, Braunschweig

3.6 Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen

DC Protein Assay™ Kit	Bio-Rad, München
ECL™ Western-Blotting Substrat	Amersham, Braunschweig
Express Hyb™ Hybridisierungs Lösung	Clontech, Heidelberg
Complete™ Mini Protease Inhibitor Tabletten	Boehringer, Mannheim
Fix & Perm™ Cell Permeabilisation Kit	Caltag, U.S.A.
Fugene™ Transfections Reagenz	Boehringer, Mannheim
JETstar™ Plasmid Purification System	Genomed, Bad Oeyenhausen
JETsorb™ DNA Extraction System	Genomed, Bad Oeyenhausen
Protein Fusion & Purification System™	NEB, Schwalbach
Quantum RNA™ RT-PCR System	Ambion, U.S.A
RNeasy™ RNS Isolierungskit	Quiagen, Hilden
TRIzol™ RNS Isolierungskit	Life Technologies, Eggenstein

3.7 Biologisches Material

3.7.1 Zelllinien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Zelllinien von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Bethesda, Maryland) bezogen.

Zelllinien:

humanes Melanom:	A 375 II, MelHo [*] , MelIm [*] , MelWei [*] , MelJuSo [*] , Mel 888 ^{&} , SkMel 25, SbCl2 ^{&}
humanes Kolonkarzinom:	Colo 320 DM
humanes Magenkarzinom:	Kato III, AGS
humanes Mammakarzinom:	BT-20, MCF-7, SkBr3
humanes Prostatakarzinom:	DU145 [*] , PL3 [*]
humanes Zervixkarzinom:	C4-I, Caski, Hela
humane T-Zell Leukämie:	CEM, Jurkat
humane Monoblasten:	HL-60
murine Fibroblasten-Zelllinie:	LTK ⁻
Hamster Ovarial-Karzinom:	CHO-K1
Affennierenzellkarzinom:	COS-7
Ratten-Pheochromazytom-Zellen:	PC-12
humane Adenovirus	
transformierte Nierenzelllinie:	293

Herkunft der Zelllinien: ^{*} aus dem Haus

[&] M. BarEli, Houston

3.7.2 Polyklonale Seren und Antikörperkonjugate

Kaninchen Anti-Egr-1-Immunglobulin	St. Cruz Biotechnologies, U.S.A.
Kaninchen Anti-Egr-2-Immunglobulin	St. Cruz Biotechnologies, U.S.A.
Kaninchen Anti-Egr-3-Immunglobulin	St. Cruz Biotechnologies, U.S.A.
Kaninchen Anti-Maus Immunglobulin -FITC gekoppelt	Dako, Hamburg
Kaninchen Anti-Maus Immunglobulin - Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Dako, Hamburg
Schwein Anti Kaninchen Immunglobulin - Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Dako, Hamburg

3.7.3 Monoklonale Antikörper

Name	Isotyp	Spezifität	Herkunft
Muc BA 18.3	IgG1	Muc18 / MADER	Lehmann (1989)
Muc BA 18.4	IgG1	Muc 18	Lehmann (1989)
1C4	IgG1	MADER	Kirsch (1996)
1F12	IgG1	MADER	Kirsch (1996)
3B3	IgG1	MADER	Kirsch (1996)
4F2	IgG1	MADER	Kirsch (1996)
5B9	IgG1	MADER	Kirsch (1996)
5C3	IgG1	MADER	Kirsch (1996)
5E2	IgG2a	MADER	Kirsch (1996)
5H1	IgG1	MADER	Kirsch (1996)
5H3	IgG2a	MADER	Kirsch (1996)
FR 4H12	IgG1	NCA CD 66c	Daniel (1993)
anti-egr-1	IgG1	Egr-1	Milbrandt (1997)
anti-p53	IgG3	p53	Transduction Laboratories, U.S.A.
cip1 / waf1	IgG2a	p21 ^{waf}	Transduktion Laboratories, U.S.A

Name	Isotyp	Spezifität	Herkunft
CBL 231	IgG1	α -Actinin	Cymbus, U.S.A.
AC 15	IgG1	α -Actin	Sigma, Deisenhofen
W6/32	IgG2a	MHC-Klasse I	ATCC, U.S.A.
G7A5	IgG1	Proteoglycan	Immunotech, U.S.A.
gp.89.3	IgG1	ICAM-1	Hupke (1990)
1C8	IgM	Phospho-Serin	Biomol, Hamburg
4A3	IgM	Phospho-Serin	Biomol, Hamburg
4A9	IgM	Phospho-Serin	Biomol, Hamburg
4H4	IgM	Phospho-Serin	Biomol, Hamburg
1E11	IgG1	Phospho-Threonin	Biomol, Hamburg
PY20	IgG1	Phospho-Tyrosin	Amersham, Braunschweig

3.7.4 Enzyme

DNase I	Boehringer, Mannheim
DNA Polymerase (Klenow Fragment)	Life Technologies, Eggenstein
λ -Phosphatase	NEB, Schwalbach
PNGase F	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim, Life Technologies, Eggenstein, NEB, Schwalbach
Superscript II TM reverse Transkriptase	Life Technologies, Eggenstein
Taq Polymerase	Life Technologies, Eggenstein Quiagen, Hilden
TdT (Terminale Transferase)	Life Technologies, Eggenstein

3.7.5 Bakterien

DH5 α : Φ 80dlacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK-, mK+)

3.7.6 Plasmide

Folgende Vektoren wurden verwendet (Abbildung 4):

pcDNA3 (A)	Invitrogen, Niederlande
pMAL-c2 (B)	NEB, Schwalbach
pFlag-CMV-2 (C)	Eastman Kodak, U.S.A.

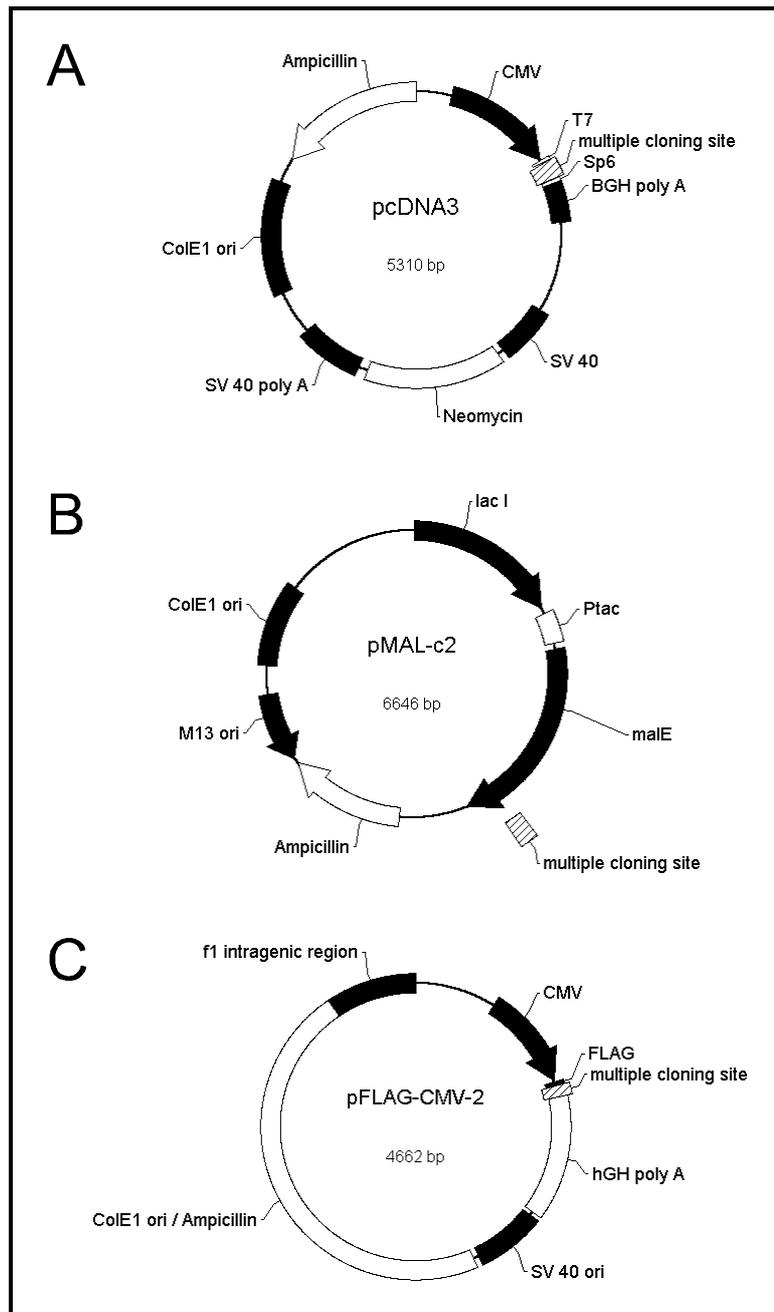


Abbildung 4: verwendete Vektoren

Folgende Konstrukte wurden verwendet:

d9-pcDNA3: MADER drop9; EcoRI in pcDNA3 (K. Kirsch)

d9-pMAL: MADER drop9; Xmn I / Bam HI in pMAL-c2 (K. Kirsch)

d9-pFLAG: MADER drop9 ; Eco RI / Bam HI in pFLAG-CMV-2 (K. Kirsch)

nab2-pcDNA3: MADER nab2; Hind III in pcDNA3 (A. Zimmermann)

3.7.7 Stabile Transfektanten

Transfektant	Empfänger Zelle	Klonierte cDNA	Vektor	Herkunft
drop 9 sense	Colo 320 DM	mader drop 9 sense	pcDNA3	K. Kirsch
drop 9 antisense	Colo 320 DM	mader drop 9 antisense	pcDNA3	K. Kirsch
drop 8 sense	Colo 320 DM	mader drop 8 sense	pcDNA3	J. Johnson
drop 8 antisense	Colo 320 DM	mader drop 8 antisense	pcDNA3	J. Johnson

3.7.8 Nukleinsäuren

Lachssperma DNA (Na-Salz, Typ III)

Life Technologies, Eggenstein

Hexanukleotide pd (N)₆

Pharmacia, Schweden

3.7.9 Oligonucleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Life Technologies, Eggenstein bezogen.

Oligonucleotide für die Erststrangsynthese:

Oligo (dT)₁₂₋₁₈

Random Primers

Oligonucleotide für die PCR:

B1 (GAPDH: 224-243): 5' AAT TCC ATG GCA CCG TCA AG 3'

B2 (GAPDH: 835-854): 5' GCC TGC TTC ACC ACC TTC TT 3'

NAB2-1S: (MADER: 395-416): 5' CTG GAG ATC ATG GCA CTT G 3'

NAB2-1AS (MADER: 661-681): 5' CCA GGC AGT GGT GAT AGC TTC 3'

Oligonucleotide für die Hybridisierung:

GAPDH: 5'CCC TGG TGA CCA GGG GGC CAA TAC GGC CCA ATC
CGT TGA CTC CGA CTT TCA CC 3'

3.8 Medien, Puffer, Lösungen**3.8.1 Grundstoffe für Kulturmedien**

Bacto-Agar	Difco, Augsburg
BBL-Trypticase Pepton	Beckton & Dickinson, Heidelberg
Casein Enzymatic Hydrolysat (N-Z Amine A)	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Life Technologies, Eggenstein
Fötales Kälberserum („FCS“)	Life Technologies, Eggenstein
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Trypton	Difco, Augsburg

3.8.2 Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium:
1,0 % Bactotrypton
0,5 % Hefeextrakt
1,0 % NaCl

LB-Agarplatten: 1,5 % Bacto-Agar in LB-Medium

3.8.3 Zellkulturmedien

<u>Zellkulturmedium:</u>	RPMI 1640 supplementiert mit: 5 % FCS 1 mM Natriumpyruvat 2 mM l-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin
<u>Einfriermedium:</u>	60 % RPMI 1640 Medium 20 % FCS 20 % DMSO

3.8.4 Allgemeine Puffer und Lösungen

<u>100 x Denhardt´s Lösung:</u>	2 % BSA 2 % Ficoll 400 2 % Polyvinylpyrrolidon in bidestilliertem H ₂ O
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM Tris 1 mM EDTA in bidestilliertem H ₂ O
<u>20 x SSC:</u>	3 M Natriumchlorid 0,3 M Natriumcitrat in bidestilliertem H ₂ O
<u>10 x PBS (pH 7,2):</u>	1,39 M Natriumchlorid 27 mM Kaliumchlorid 80 mM Dinatriumhydrogenphosphat 15 mM Kaliumdihydrogenphosphat in bidestilliertem H ₂ O
<u>10 x TBE:</u>	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA in bidestilliertem H ₂ O

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Säugetierzellen und Zelllinien wurden bei 37 °C, 6% Kohlendioxid in einem feuchten Inkubationsschrank kultiviert. Als Kulturmedium diente supplementiertes RPMI 1640 mit 5% fötalem Kälberserum („FCS“). Das verwendete FCS wurde vor der Anwendung 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert.

Alle Arbeiten wurden unter Verwendung einer Sterilbank ausgeführt. Sämtliche Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und vor der Verwendung autoklaviert oder steril filtriert (0,2 µm Porengröße).

Um adhärent gewachsene Zellen abzulösen, wurde 10 Minuten in 1 mM EDTA / PBS inkubiert. Hierbei kommt es durch EDTA zur Komplexbildung von zweiwertigen Metallkationen (Ca^{2+} ; Mg^{2+}), von denen die Zell-Adhäsion abhängt, so dass sich die Zellen durch leichtes Anklopfen von der Unterlage lösen. Die entstandene Zellsuspension wurde in der Folge bei 350 x g abzentrifugiert und entweder direkt in biochemische Experimente eingesetzt oder bei -20 °C eingefroren.

4.1.1 Einfrieren und Auftauen

Zur Kryokonservierung wurden 10^6 bis 10^7 Zellen abzentrifugiert, in 500 µl RPMI Medium resuspendiert, im gleichen Verhältnis mit Einfriermedium versetzt und bei -80 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Auf diese Weise eingefrorene Zellen wurden wieder in Kultur genommen, indem man sie im Wasserbad bei 37 °C auftaute, mit 5 ml RPMI 1640 Medium versetzte, abzentrifugierte, das Zellpellet abermals in Medium aufnahm und in eine neue Kulturflasche überführte.

Einfriermedium: 20 % FCS
20 % DMSO
in RPMI 1640 Medium

4.1.2 Transfektion von Eukaryontenzellen

Zur transienten Transfektion von Säugetierzellen wurde das Fugene™ Transfektions Reagenz (Boehringer) benutzt. Als Wirtszellen kamen vor allem Cos-7 und 293 zum Einsatz, die sich durch ihre sehr gute Transfizierbarkeit auszeichnen. In den transfizierten Vektoren stand die Expression der klonierten cDNS unter der Kontrolle des sehr effizienten CMV Promotors. Die korrekte Termination der Transkription wurde durch die SV 40 Polyadenylierungssequenz sichergestellt. Wichtig für eine kurzzeitige hohe Expression der transfizierten cDNS war außerdem der, in den Vektoren enthaltene, SV 40 Replikationsursprung, der eine episomale Replikation ermöglichte.

In einer 25 cm² Kulturflasche wurden am Vortag so viele Zellen ausgesät, dass die Konfluenz bei der Transfektion 50-80 % betrug. 500 µl Optimem I wurden mit 20 µl Fugene versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstandene Lösung gab man daraufhin tropfenweise zu 10 µg DNS, die man in einem anderen Reaktionsgefäß vorgelegt hatte. Nach einer viertelstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde diese Lösung direkt zum Zellkulturmedium der Zellen in der Kulturflasche zugetropft. Die Analyse der Expression erfolgte 48-72 h nach Transfektion im Western Blot.

4.1.4 Hemmung der Transkription mit Actinomycin D

Das von *Streptomyces antibioticus* produzierte Antibiotikum Actinomycin D (Abbildung 6) ist ein wirkungsvoller Inhibitor der Nucleinsäure-Synthese. Es intercaliert mit seinem planaren Ringsystem zwischen zwei aufeinanderfolgende GC-Paare der DNS, wodurch die freie Passage von DNS- und RNS-Polymerasen entlang der DNS verhindert wird.

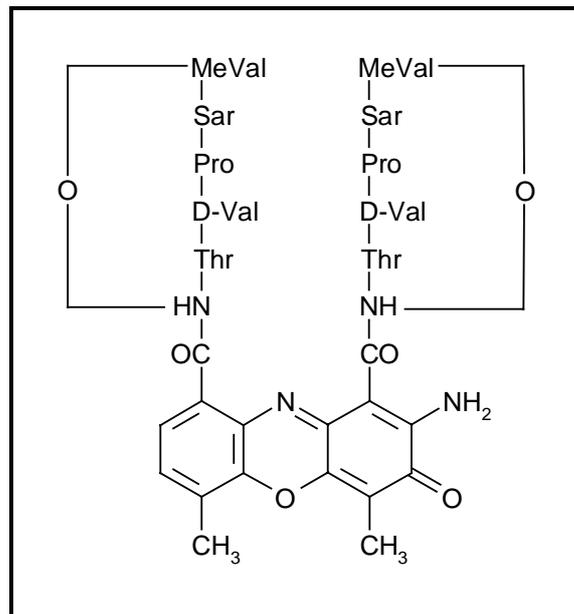


Abbildung 6: Struktur von Actinomycin D

In einer 25 cm² Kulturschale wurden so viele Zellen ausgesät, dass ihre Konfluenz am nächsten Tag ca. 80 % betrug. Um die Zellen zu synchronisieren wurde zwei- einhalb Stunden mit 20 % FCS vorstimuliert. Nach der Zugabe von 10 µg / µl Actinomycin D (1:100 aus Stammlösung 1 mg / ml in bidestilliertem Wasser) zum Medium wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen geerntet und auf ihre mRNA Expression hin untersucht.

4.1.5 Hemmung des Proteasoms mit Lactacystin

Lactacystin (Abbildung 7), das man aus Actinomyceten gewinnt, hemmt das Proteasom, indem es als Pseudosubstrat kovalent mit der Hydroxylgruppe eines Threonin-Restes im aktiven Zentrum der β -Untereinheit des Proteasoms verknüpft wird.

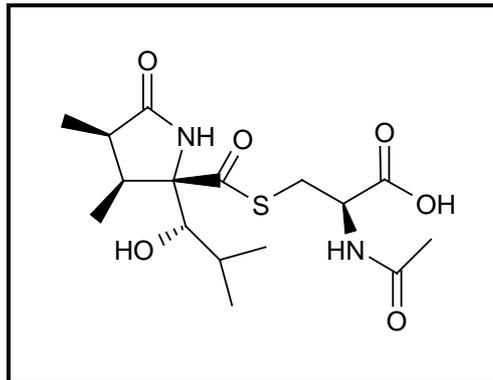


Abbildung 7: Struktur von Lactacystin

70-80 % konfluente Zellen wurden 4,5-24 h mit 0,04 mM Lactacystin in RPMI 1640 Medium (1:1000 aus Stammlösung 40 mM Lactacystin in DMSO) oder, als Kontrolle, mit der entsprechenden Menge DMSO allein behandelt. Die Auswertung erfolgte im Western-Blot.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Verwendung von Bakterien

Zur einfachen, schnellen und sicheren Vermehrung von superhelikaler Plasmid-DNS wurden transformationskompetente Bakterien des Stamms DH5 α verwendet.

4.2.1.1 Vermehrung von *E. coli*

4.2.1.1.1 Plattenkultur

Zum Vereinzeln von Bakterienkolonien wurden die Bakterien mit einer ausgeglühten Impföse auf Agarplatten ausgestrichen. Der verwendete LB-Agar wurde nach dem Autoklavieren unter Rühren auf 50 °C abgekühlt und je nach Anforderung mit Ampicillin (50 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) oder Tetracyclin (12,5 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$) versetzt und in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen konnten die Platten bei 4 °C längere Zeit aufbewahrt werden.

4.2.1.1.2 Flüssigkultur

Autoklaviertes LB-Medium wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit Bakterien angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem Schüttler (180-250 U / min) bei 37 °C. Die Konzentration der stationären Übernachtskultur der Bakterien wurde photometrisch bei 600 nm bestimmt (1 OD_{600 nm} = 8 x 10⁸ Zellen).

4.2.1.1.3 Glycerinkultur

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu versetzte man 500 μl einer Übernachtskultur mit 500 μl eines 1:1 Gemisches aus LB-Medium und 87 %igem Glycerin. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Die meisten Bakterien, darunter auch *E.coli*, nehmen DNS unter normalen Bedingungen nur sehr begrenzt auf. Um sie trotzdem wirksam zu transformieren

muss man die Zellen einer physikalischen oder chemischen Behandlung unterziehen, die ihre Fähigkeit, DNS aufzunehmen, verstärkt. Bewährt hat sich hierbei die Verwendung einer Calciumchloridlösung, die ein Ausfallen der Fremd-DNS auf den Bakterien bewirkt. Zellen, die einer derartigen Behandlung unterzogen wurden, nennt man kompetent.

100 ml LB-Medium mit 2 % Trypton wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur des erforderlichen *E.coli* Stammes angeimpft und in einem Bakterienschüttler bei 37 °C bis zu einer $OD_{650} = 0,6$ inkubiert. Nach dem Pelletieren der Zellen (10000 x g; 10 min; 4 °C) resuspendierte man den Niederschlag in 125 ml kalter 0,1 M Calciumchloridlösung. Die entstandene Suspension wurde in der Folge 20 Minuten auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend nahm man die Bakterien in 25 ml kalter 0,1 M Calciumchloridlösung auf und stellte auf 15 % Glycerin ein. Aliquots zu je 1 ml wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Um kompetente Bakterien zu transformieren wurde die Hitzeschock-Methode verwendet.

100 ng Plasmid-DNS (max. 5 µl) wurden mit 150 µl kompetenter Zellen in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß versetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock (42 °C) von einer Minute Dauer veranlasste die Bakterien die Fremd-DNS aufzunehmen. Um den Bakterien die Möglichkeit zu geben, das plasmidkodierte Antibiotikaresistenz-Protein zu exprimieren, wurden die Zellen nach Zugabe von 350 µl vorgewärmtem LB-Medium / 10 mM $MgCl_2$ eine Stunde bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde 10 min bei 1100 x g in einer Microfuge abzentrifugiert und die Bakterien nach Resuspension in 50 µl LB-Medium auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

4.2.2 Präparation und Analyse von DNS

4.2.2.1 Isolierung von Plasmid DNS

Die verwendete Präparation von Plasmid-DNS beruht auf der alkalischen Lyse mit anschließender Anionenaustauscher-Chromatographie. Fügt man zu einem Bakterienzellysate Natronlauge hinzu, so dass sich ein pH-Wert von 12-12,5 einstellt, lösen sich die Wasserstoffbrücken in der nicht superspiralisierten genomischen DNS auf, während die superhelikalen Plasmide nicht betroffen sind. Neutralisiert man in der Folge die Lösung mit Natriumacetat, lagern sich die denaturierten Stränge der Bakterien-DNS zu einer vorworrenen Masse zusammen, die man leicht abzentrifugieren kann. Erfolgte die Bakterien-Lyse zuvor mit SDS, werden auch die Proteine und die RNS unlöslich, so dass sie ebenfalls durch die Zentrifugation beseitigt werden. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNS aus dem Überstand macht man sich die Tatsache zunutze, dass Nukleinsäuren im Gegensatz zu anderen vorhandenen Verunreinigungen eine relativ hohe negative Ladung haben. Aus diesem Grund binden sie an die positiv geladenen Gruppen einer Anionenaustauscher-Säule, während die Verunreinigungen hindurchlaufen. Durch Eluation mit Hochsalzpuffer, der die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den DNS-Molekülen und dem Austauscherharz destabilisiert, kann man die Plasmid-DNS dann wiedergewinnen.

Die Plasmid-Präparation wurde mit dem Jet Star Kit (Genomed) durchgeführt. Hierzu wurden 200 ml einer Übernachtskultur bei 5000 x g abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml Lösung E1 resuspendiert. In der Zwischenzeit wurden die Ionenaustauscher-Säulen in 30 ml E4 Lösung äquilibriert. Durch Zugabe der Lösung E2 erfolgte die Lyse der Bakterien. Nach einer fünf-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die alkalische Suspension durch Zugabe von 10 ml Lösung E3 neutralisiert. Die ausgefallene bakterielle DNS zentrifugierte man zusammen mit den Proteinen bei 15000 x g für 10 Minuten bei 20 °C ab. Den klaren Überstand, der die Plasmid-DNS enthielt, gab man auf die vorbereitete Säule. Um Verunreinigungen zu entfernen wurde einmal mit 60 ml Lösung E5 gewa-

schen und die DNS schließlich mit Lösung E6 eluiert. Um die Plasmid-DNS auszufällen, versetzte man das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol. Nachdem man bei 15000 x g bei 4 °C 30 Minuten abzentrifugiert hatte, wusch man den Niederschlag mit 70 % Ethanol. Nach dem erneuten Abzentrifugieren wurde das Plasmid-DNS Pellet an der Luft getrocknet und in einer entsprechenden Menge bidestilliertem Wasser aufgenommen.

Lösung E1: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg / ml RNase

Lösung E2: 200 mM NaOH
1,0 % SDS

Lösung E3: 3,2 M Kaliumacetat / Essigsäure pH 5,0

Lösung E4: 600 mM Natriumchlorid
100 mM Natriumacetat pH 5,0

Lösung E5: 800 mM Natriumchlorid
100 mM Natriumacetat pH 5,0

Lösung E6: 1250 mM Natriumchlorid
100 mM Tris-HCl pH 8,5

4.2.2.2 Messung der Nukleinsäure Konzentration

Durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm in Quarzküvetten konnte die Konzentration einer DNS- oder RNS-Lösung in TE-Puffer bestimmt werden.

Hierbei gilt: 1 OD₂₆₀ = 50 µg / µl für doppelsträngige DNS

1 OD₂₆₀ = 40 µg / µl für einzelsträngige DNS

1 OD₂₆₀ = 40 µg / µl für RNS

1 OD₂₆₀ = 20 µg / µl für Oligonukleotide

Das Verhältnis OD₂₆₀ / OD₂₈₀ gab Aufschluss über den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren, da die aromatischen Aminosäuren Licht der Wellenlänge 280 nm absorbieren. Für reine DNS liegt der Wert des Quotienten zwischen 1,6 und 1,8; bei RNS zwischen 1,8 und 2,0.

4.2.2.3 Verdau der DNS mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsspaltungen von DNS wurden mit kommerziell erhältlichen Restriktionsenzymen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden dabei entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Die Spaltung erfolgte bei 37 °C mit 2-4 U Enzym pro µg DNS in einem Zeitraum von zwei bis vier Stunden. Das Ergebnis eines Restriktionsverdaus wurde auf Agarosegelen überprüft.

4.2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNS

Auf Grund der negativen Ladungen ihrer Phosphatgruppen können DNS-Moleküle in einem Agarosegel nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Als Trennmedium wurden 0,8 - 1,2 %ige Agarosegele verwendet. Die Agarose (Typ II Medium EEO, Biozym) wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht, auf ca. 50 °C abgekühlt und in einen Gelträger gegossen. Um die Auftragstaschen zu formen wurde vor dem Erstarren ein Kamm eingesetzt. Die Elektrophorese führte man bei einer konstanten Spannung von 50 - 80 V in Horizontalgelkammern durch. Als Laufpuffer diente 1 x TBE, das mit 0,03 µg / ml Ethidiumbromid versetzt war. Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit 1/5 Volumen Auftragspuffer gemischt. Um die Größe der Fragmente im Gel abschätzen zu können wurde zusätzlich 0,5 µg eines DNS-Größenstandards (100 bp-Leiter; 1 kb-Leiter; Life Technologies) aufgetragen. Nach der Elektrophorese konnte die aufgetrennte DNS durch die Interkalation von Ethidiumbromid unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera (INTAS) dokumentiert werden.

Auftragspuffer:

50 % Glycerin
1 mM EDTA
0,4 % Bromphenolblau
0,4 % Xylenzanol

4.2.2.5 Isolation von DNS aus Agarosegelen

Die angewandte Aufreinigung von DNS aus den Elektrophoresegelen beruht auf der Adsorption von DNS an Glasmilch und wurde mit dem Jetsorb-Kit (Genomed) durchgeführt.

Unter UV-Licht wurde die Gelbande des zu isolierenden DNS-Fragments ausgeschnitten und deren Gewicht bestimmt. Pro 100 mg Gel wurden 300 µg Puffer A1 (NaClO₄; Natriumacetat) und 10 µl Glasmilch zugegeben und 15 Minuten bei 50 °C inkubiert, um die Agarose zu schmelzen und die DNS an die Glaspartikel zu binden. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand verworfen und der Rückstand einmal mit 300 µl Puffer A1 gewaschen. Ein zweiter und dritter Waschschrift erfolgte jeweils in 300 µl Puffer A2 (Ethanol; Natriumchlorid; Tris-HCl; EDTA). Nach dem Pelletieren wurde der DNS-Glasmilch Rückstand bei Raumtemperatur getrocknet und die DNS mit 20 µl 1 x TE-Puffer eluiert.

4.2.2.6 Southern Blot

In einem Agarose-Gel aufgetrennte DNS wurde mittels Kapillartransfermethode nach Southern (1975) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) transferiert.

Hierzu wurden 20 µg DNS in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt. Die DNS im Gel wurde im Anschluss je 40 min in 0,25 N HCl depurinisiert, in 1,5 N NaCl / 0,5 N NaOH denaturiert und in 1,5 N NaCl / 0,5 M Tris-HCl pH 7,2 neutralisiert. Es wurde folgender Stapel aufgebaut:

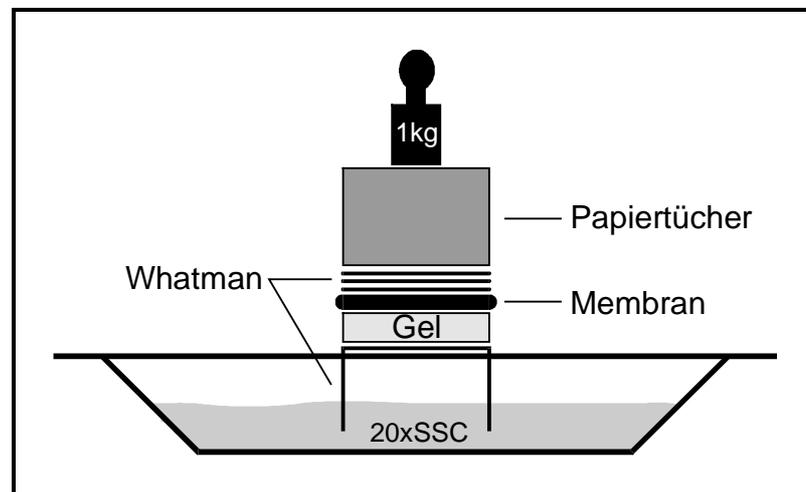


Abbildung 8: Aufbau eines Southern-Blots

Die Whatman-Filterpapiere und die Nylon-Membran wurden vor dem Transfer in 20 x SSC getränkt und alle Teile des Blots wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Luftblasen mussten durch Rollen mit einer Pipette beseitigt werden. Nach 10-20 Stunden nahm man die Membran ab und fixierte die transferierte DNS mittels UV-Strahlung (305 nm) auf der Membran.

4.2.3 Präparation und Analyse von RNS

Da RNAsen ubiquitäre und äußerst aktive Enzyme darstellen, die nur schwer zu inaktivieren sind müssen beim Umgang mit RNS besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. Für alle Arbeiten mit RNS wurden eigene, separate Lösungen, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Alle Lösungen wurden mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und vor der Verwendung autoklaviert. Bei RNS-Arbeiten wurden stets Handschuhe getragen und oft gewechselt.

4.2.3.1 Isolierung von Gesamt RNS

4.2.3.1.1 Isolierung mit Phenol-Chloroform

Die verwendete RNS-Isolierungsmethode basiert auf der „single-step“-Präparation nach Chomczynski und Sacchi (1987). Hierbei macht man sich die unterschiedliche Lokalisation von RNS, DNS und Proteinen nach der Zugabe von Phenol-Chloroform zunutze. Während sich die RNS in der wässrigen Phase ansammelt, finden sich die DNS und die Proteine in der Interphase bzw. der organischen Phase wieder.

Die Isolierung wurde mit dem TRIzol™-Reagenz (Life Technologies) durchgeführt. 5×10^6 Zellen wurden in 1 ml TRIzol resuspendiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Mischen mit 0,2 ml Chloroform und 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 x g in einer Microfuge bei 4 °C trennte sich die Suspension in eine rote organische, eine helle Interphase und eine farblose wässrige Phase. Die obere farblose Phase überführte man in ein neues Reaktionsgefäß und fällte die RNS durch zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur in 0,5 ml Isopropanol. Nachdem bei 4 °C und 12000 x g für 10 Minuten abzentrifugiert worden war, wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 1 ml 75 % Ethanol entsalzt. Nach erneuter Zentrifugation konnte das RNS-Pellet 10 Minuten an der Luft getrocknet und in 20-30 µl DEPC-Wasser gelöst werden. Die Langzeitlagerung der RNS erfolgte bei -80 °C.

4.2.3.1.2 Isolierung durch Ionenaustausch-Chromatografie

Als Alternative wurde Gesamt-RNS durch die Bindung an ein Anionenaustauscherharz isoliert.

Hierzu wurde das RNeasy™-Mini Kit (Quiagen) verwendet. 5×10^6 Zellen wurden mit 350 μ l RLT-Puffer / 1 % β -Mercaptoethanol versetzt und mit Hilfe einer 20G Kanüle homogenisiert. Nach Zugabe von 350 μ l 70 % Ethanol wurde die entstandene Suspension auf die Austauscher-Zentrifugen-Säulen geladen. Der Zentrifugation für 15 s bei 8000 x g in einer Microfuge schlossen sich drei Waschschriffe an: einmal mit 700 μ l RW1-Puffer und zweimal mit je 500 μ l RPE-Puffer. Nachdem man jeweils bei 8000 x g abzentrifugiert hatte, konnte man die RNS mit 30-50 μ l nucleasefreiem Wasser von der Säule eluieren.

4.2.3.2 Denaturierende RNS Gelelektrophorese

1,2 g Agarose (Typ II Medium EEO) wurden in 72,2 ml DEPC-Wasser aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 50 °C wurde die Lösung mit 10 ml 10 x MOPS-Puffer und 17,8 ml 37 %igem Formaldehyd versetzt und in einen Gelträger gegossen. Die RNS-Proben (15-30 μ g) wurden im Verhältnis 4:1 mit 5 x RNS-Proben-Puffer gemischt, 15 Minuten bei 65 °C inkubiert und nach dem Abkühlen auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25 V über Nacht. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS-Puffer.

10 x MOPS-Puffer:

200 mM 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
50 mM Natrium-Acetat
10 mM EDTA
in DEPC-Wasser
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

5 x RNS Proben-Puffer:

16 μ l gesättigte Bromphenolblau-Lösung
80 μ l 500 mM EDTA, pH 8,0
720 μ l 37 % Formaldehydlösung
2 ml 100 % Glycerol
3084 μ l Formamid
4 ml 10 x MOPS-Puffer
mit DEPC-Wasser auf 10 ml auffüllen

4.2.3.3 Northern-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNS in denaturierenden Agarose-Gelen erfolgte ihr Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond N; Amersham). Hierzu wurde das Gel mehrmals in DEPC-Wasser gewaschen, um überschüssiges Formaldehyd zu entfernen. Um das Gel zu äquilibrieren erfolgte im Anschluss eine 45 minütige Inkubation in 20 x SSC. Der Aufbau des Northern Blots entsprach dabei dem in 4.2.2.6 beschriebenen. Depurinierung, Denaturierung und Neutralisation sind hierbei nicht notwendig, da RNS bereits als Einzelstrang vorliegt.

4.2.3.3.1 Nachweis von Gesamt RNS auf der Nylonmembran

Um die Transfereffizienz und die Integrität der RNS abschätzen zu können wurde die Gesamt RNS nach dem Transfer auf der Nylon Membran angefärbt. Hierzu wurde die Membran nach der UV-Fixierung kurz in 2 x SSC gewaschen und 45 Sekunden in einer RNS-Färbelösung geschwenkt. Dabei traten die ribosomalen RNS-Spezies als deutlich sichtbare blaue Banden hervor. Überschüssiger Farbstoff wurde durch 2-minütiges Entfärben in DEPC-Wasser entfernt. Die Nylon Membran konnte in der Folge mit radioaktiven Proben hybridisiert werden.

RNS-Färbelösung: 0,03 % Methylblau
 0,3 M Natriumacetat pH 5,2
 in DEPC Wasser

4.2.4 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

4.2.4.1 Radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten mit Zufallsprimern

Zur effektiven Markierung von DNS-Fragmenten bedient man sich Zufalls-Hexamere, die auf Grund ihrer statistisch verteilten Sequenzen an die zu markierende, einzelsträngige DNS binden (Feinberg & Vogelstein, 1983). Die Lücken zwischen den gebundenen Hexameren werden dann durch die Klenow-Polymerase unter Einbau von radioaktiv markiertem dATP aufgefüllt.

Hierzu wurden 100 ng DNS-Fragment in 32,5 μ l Wasser für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Dem Ansatz wurden 10 μ l Oligo-Puffer, 2 μ l BSA (10 μ g / μ l), 5 μ l α -³²P-dATP (3000 Ci / mmol; Amersham) und 6 U Klenow-DNS-Polymerase (Life Technologies) hinzugefügt. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur beendete die Zugabe von 100 μ l Stopp-Puffer die Auffüllreaktion. Nicht eingebaute Nukleotide mussten in der Folge über eine Molekularsiebsäule (1 ml Sephadex G50) durch dreiminütige Zentrifugation bei 700 x g abgetrennt werden. Anschließend wurde 1 μ l des Eluats nach der Denaturierung (95 °C; 5 min) mit Scintillationsflüssigkeit versetzt und im β -Counter gemessen.

<u>Oligo-Puffer:</u>	Lösung A:B:C im Verhältnis 1:2:1
<u>Lösung A:</u>	5 μ l dCTP (100 mM) 5 μ l dGTP (100 mM) 5 μ l dTTP (100 mM) 18 μ l β -Mercaptoethanol in 1 ml 0,125 M MgCl ₂ /1,25 M Tris-HCl pH 8
<u>Lösung B:</u>	2 M HEPES pH 6,6
<u>Lösung C:</u>	90 U / ml Hexanucleotide pd(N) ₆
<u>Stopp-Puffer:</u>	20 mM NaCl 20 mM Tris-HCl pH 8,0 2 mM EDTA 0,25 % SDS 1 μ M dATP 20 μ g Bromphenolblau

4.2.4.2 Radioaktive Endmarkierung von Oligonucleotiden

Unter Verwendung des Enzyms Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TDT) wurde die Anheftung von α -³²P-dATP an das 3'-Ende der Oligonucleotide katalysiert. Hierzu wurden 10 ng Oligonucleotid eine Stunde bei 37 °C in Endlabeling-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 μ l Stopp-Puffer beendet und

das markierte Oligonukleotid durch eine Molekularsiebsäule (1 ml Sephadex G50) von nicht eingebauten Nukleotiden befreit.

<u>Endlabeling-Puffer:</u>	1 µl Oligonukleotid (10 ng)
	1 µl 1 M Natriumkakodylat
	1 µl 10 mM Kobaltchlorid
	1 µl 10 mM 2-Mercaptoethanol
	1 µl 1 µg / µl BSA
	1 µl TDT (25 U / µl)
	1 µl α - ³² P-dATP

4.2.5 Hybridisierung von Southern- und Northern Blots

4.2.5.1 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNS-Fragmenten

Die Nylonmembranen mit fixierter DNS bzw. RNS wurden kurz in 2 x SSC gewaschen und in einer Glasröhre mit 20 ml Hybridisierungslösung und 400 µg hitzedenaturierter Lachssperma-DNS bei 68 °C in einem Rotationsofen prähybridisiert. Nach zwei Stunden wurde das markierte DNS-Fragment zugegeben (4×10^7 cpm) und über Nacht hybridisiert. Das Waschen der Membran erfolgte nacheinander für je 40 Minuten bei 68 °C in SSC / 0,1 % SDS mit absteigender Salzkonzentration (3 x SSC; 1 x SSC; 0,3 x SSC; 0,1 x SSC). Der Blot wurde anschließend in Plastikfolie eingepackt und bei -80 °C einem Röntgenfilm mit Verstärkerfolie exponiert.

<u>Hybridisierungslösung:</u>	6 x SSC
	5 x Denhardt's Lösung
	0,5 % SDS

4.2.5.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden

Das Prinzip der Hybridisierung entspricht dem in 4.2.5.1 beschriebenen. Abweichend davon wurden verschiedene Hybridisierungspuffer verwendet. Zur Prähybridisierung wurde ein Prä-Hybmix (20 ml; 1 h) eingesetzt, der anschließend gegen einen Oligo-Hybmix (20 ml; 12 h) ausgetauscht wurde. Die Hybridisierungstemperatur wählte man dabei 5 °C unter der Schmelztemperatur T_m

$(T_m \approx 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T))$ des eingesetzten Oligonukleotids. Das Waschen der Membran erfolgte zweimal für je 10 Minuten in Puffer A bei der Hybridisierungstemperatur und in der Folge kurz in Puffer B bei Raumtemperatur.

Prä-Hybmix: 7 % SDS
10 x Denhardt's Lösung
20 mM Natriumphosphat
5 x SSC
50 µg / µl denaturierte Lachssperma DNS

Oligo-Hybmix: Prä-Hybmix
10 % Dextransulfat

Puffer A: 3 x SSC
5 % SDS
10 % Denhardt's Lösung
10 mM Natriumphosphat pH 7,0

Puffer B: 1 x SSC
1 % SDS

4.2.5.3 Hybridisierung mit Express-Hyb™-Lösung

Die Hybridisierung mit der Express-Hyb™-Lösung (Clontech) bietet den Vorteil die Hybridisierung an einem Tag durchführen zu können.

Die Express-Hyb-Lösung wurde kurz vor der Verwendung auf 68 °C erwärmt, um Präzipitate, die sich bei der Lagerung gebildet hatten, in Lösung zu bringen. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte dann in 10 ml Express-Hyb™-Lösung bei 68 °C für eine halbe Stunde. Anschließend gab man die radioaktiv markierte und denaturierte DNS-Sonde (2×10^7 cpm) zu 10 ml neuer Express-Hyb™-Lösung und inkubierte darin die Membran bei 68 °C für eine Stunde. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zunächst mehrere Male kurz und dann zweimal je 15 Minuten in Waschlösung 1 (2 x SSC; 0,5 % SDS) bei Raumtemperatur gewaschen. Dem schlossen sich zwei weitere Waschgänge für je 20 Minuten bei 50 °C mit Waschlösung 2 (0,1 x SSC; 0,1 % SDS) an. Die

Membran wurde in der Folge in Plastikfolie eingepackt und bei -80 °C einem Röntgenfilm exponiert.

4.2.5.4 Entfernung der radioaktiv markierten Probe von der Membran

Um Northern-Blots nacheinander mit mehreren radioaktiv markierten Sonden zu hybridisieren musste zunächst die vorhandene Sonde entfernt werden. Hierzu wurde die Membran nach der Film-Exposition in 0,5 % SDS in DEPC-Wasser bei 95 °C für 10 Minuten geschüttelt. Danach wurde die Membran noch 10 Minuten in der abkühlenden Lösung belassen, schließlich entnommen und an der Luft getrocknet. Eine längere Lagerung erfolgte in Plastikfolie bei -20 °C

4.2.6 RT-PCR

Die RT-PCR stellt eine sehr sensitive Methode dar, um RNS Moleküle nachzuweisen. Allgemein bedient man sich dabei viraler reverser Transkriptasen um die RNS in komplementäre DNS („cDNS“) umzuschreiben. Diese Enzyme benötigen einen kurzen doppelsträngigen Bereich um ihre Aufgabe erfüllen zu können. Im Normalfall verwendet man hierzu einen Oligo-dT-Primer, der mit den poly-A-Enden der eukaryontischen mRNA-Moleküle hybridisiert. Andere Möglichkeiten bestehen in der Verwendung von Random-Primern (für RNS-Moleküle ohne poly-A Ende, z.B. ribosomale RNS) oder Sequenz-spezifischen Primern. Die cDNS kann dann mit Hilfe der Polymerase Ketten-Reaktion („PCR“) vervielfältigt werden (Abbildung 9).

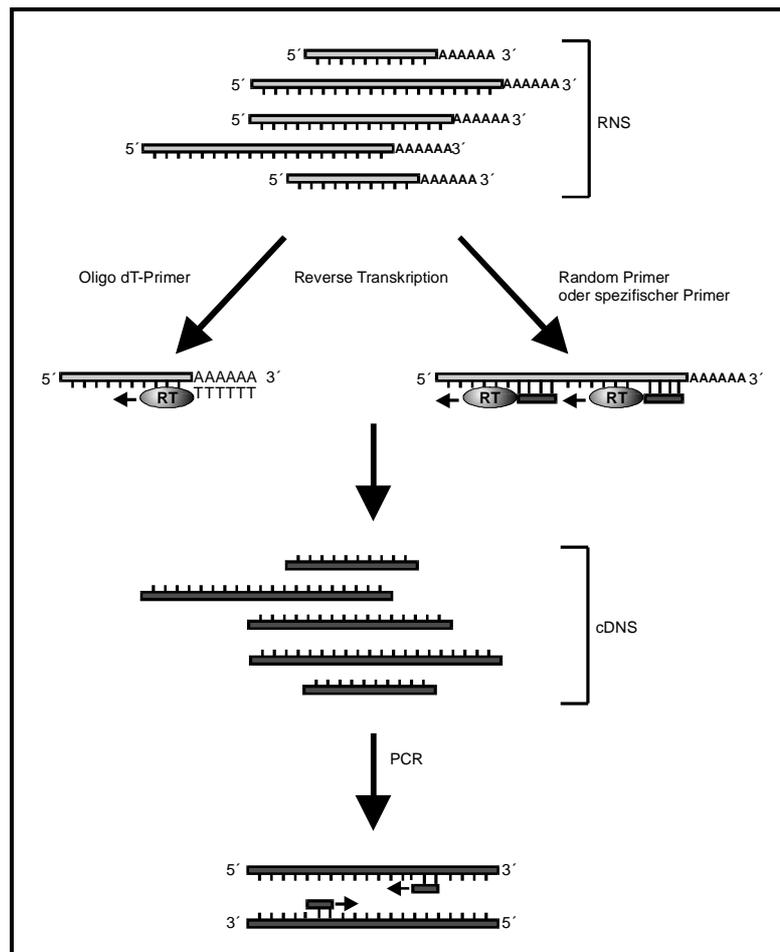


Abbildung 9: Reaktionsschritte bei der RT-PCR

4.2.6.1 DNase Verdau und Aufreinigung der RNS

Um Kontaminationen mit genomischer DNS zu vermeiden, verdaute man die Gesamt-RNS vor der cDNS-Synthese zwei Stunden mit 6 U RNase-freier DNaseI (Boehringer) / μg RNS bei 37 °C in 200 μl 1 x DNase Puffer.

Zur Aufreinigung der RNS wurde der RNase-Verdau mit 200 μl Phenol-Chloroform 3:1 vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g versetzte man die wässrige (obere) Phase 1:10 mit 3 M Natriumacetatlösung. Die Fällung der RNS erfolgte nach Zugabe von 500 μl absolutem Ethanol über Nacht bei -20 °C. Nachdem der RNS-Niederschlag bei 4 °C und 12000 x g für 15 Minuten abzentrifugiert worden war, wusch man ihn einmal mit 75 % Ethanol. Nach der erneuten Zentrifugation wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 100 μl DEPC-Wasser aufgenommen.

10 x DNase Puffer: 200 mM Tris-HCl pH 6
 50 mM Magnesiumchlorid
 in DEPC-Wasser

4.2.6.2 cDNS Synthese

Zur Herstellung von einzelsträngiger cDNS aus Gesamt-RNS wurde die SuperScript™II (RNase H⁻) Reverse Transkriptase (Life Technologies) mit ihren guten Syntheseigenschaften verwendet. Hierzu wurden 9 μl (2 μg) Gesamt RNS mit 2 μl Random Primer (200 ng; Life Technologies) für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt und danach sofort auf Eis abgeschreckt. Nach Zugabe von 4 μl 1 x Erststrang-Puffer, 2 μl 0,1 M DTT, 1 μl 10 mM dNTP-Mix und 1 μl RNasin-RNase Inhibitor (Promega) inkubierte man für 10 Minuten bei 25 °C. Die reverse-Transkription erfolgte daraufhin durch Zugabe von 1 μl SuperScript II für 50 Minuten bei 42 °C. Zur Inaktivierung des Enzyms inkubierte man dann 15 Minuten bei 70 °C.

5 x Erststrang-Puffer: 250 mM Tris-HCl pH 8,3
 375 mM KCl
 15 mM Magnesiumchlorid

4.2.6.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (Saiki et al., 1986) ist man in der Lage einen beliebigen Abschnitt in einem DNS-Molekül selektiv zu vervielfältigen. Zu Beginn der PCR werden dabei kurze strangspezifische Oligonukleotide und die DNS hybridisiert. Diese Oligonukleotide dienen als Primer für die DNS-Synthesereaktion und begrenzen den vervielfältigten Abschnitt. Zur Vervielfältigung benutzt man normalerweise die hitzestabile DNS-Polymerase I von *Thermus aquaticus* (Taq Polymerase). Dabei wird ein dreiphasiger Reaktionszyklus in einem programmierbaren Thermocycler (Robocycler; Stratagene) mehrmals durchlaufen:

1. Denaturierung der Matrize
2. Hybridisierung der Primer
3. Extension der Primer durch die Taq Polymerase

In einem Reaktionsansatz von 25 µl wurden 0,02-1 µg DNS bzw. 2 µl cDNS mit 1,5 µl Magnesiumchlorid (25 mM), 1 µl der entsprechenden Primer (10 pmol), 0,2 µl dNTPs (je 10 mM) und 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 U) in 1 x PCR-Puffer versetzt und mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet. Nach fünfminütiger Denaturierung bei 95 °C erfolgten 27-35 Zyklen:

Denaturierung: 95 °C (1 min)

Hybridisierung: $T_m - 5 \text{ °C}$ (1 min) ($T_m \approx 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$)

Elongation: 72 °C (1 min pro 1 kb)

In einem letzten Zyklus wurde 10 Minuten auf 72 °C erhitzt, um eine Fertigstellung aller, in der Synthese befindlichen, Fragmente sicher zu stellen.

Um Fehlhybridisierungen der Primer an die DNS zu verhindern, wurden alle Ansätze bis zum Denaturierungsschritt bei 95 °C auf Eis gehalten („simplified hot

Am Anfang folgt die PCR dem erwarteten Bild. Nach zunehmender Zykluszahl weicht die PCR jedoch von einem linearen Verhalten ab und geht in einen Sättigungsbereich über. Gründe hierfür sind hauptsächlich die Verknappung von Reagenzien während der PCR (Nukleotide; Primer; Taq-Polymerase).

Um quantitative Aussagen treffen zu können musste bei der durchgeführten RT-PCR zunächst der lineare Bereich festgestellt werden. Hierzu erstellte man serielle Verdünnungen der Ausgangs cDNS (unverdünnt; 1:10; 1:100; 1:1000). Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde dann so gewählt, dass zumindest das Produkt von drei Verdünnungen im Agarosegel zu erkennen war. Die Auftragung der optischen Dichte dieser PCR-Produkte gegen die jeweilig eingesetzte RNS-Menge ergab dann zwischen mindestens zwei Punkten einen linearen Zusammenhang.

Um die Varianz der Amplifikation zwischen verschiedenen Reaktionsgefäßen oder der Menge an aufgetragenem PCR-Produkt auf das Agarosegel ausgleichen zu können wurde mit einem endogenen Standard gearbeitet. Dies geschah mit Hilfe des Quantum-RNA™-Kit (Ambion). Hierbei wurde in einer multiplex-PCR die 18S-ribosomale RNS als interner Standard koamplifiziert. Dies hat den Vorteil, dass die ribosomale RNS zwischen verschiedenen Geweben die geringste Varianz zeigt. Der Nachteil besteht darin, dass die 18S-mRNS in jeder Zelle eine deutlich höhere Expression zeigt als die untersuchten mRNS-Spezies. Für quantitative Messungen muss der interne Standard jedoch etwa im gleichen Umfang exprimiert werden wie die untersuchte mRNS. Das Quantum-RNA™ Kit begegnet diesem Problem indem es modifizierte 18S-Primer, sogenannte Competimer, benutzt, deren 3'-Bereich so blockiert ist, dass die Taq-Polymerase sie nicht weiter verlängern kann. Durch Mischen von 18S-Primern mit einer zunehmenden Menge von 18S-Competimern konnte man so die Menge an 18S-PCR-Produkt der PCR-Produktmenge der untersuchten mRNS angleichen.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Präparation von Gesamtprotein aus Zellen

Zur Lyse von Säugetierzellen genügt normalerweise die Zugabe eines Detergeniums (hier NP 40), das den Fettsäureanteil der Plasmamembran durch Emulgation zerstört. Der verwendete Lyse Puffer enthielt zusätzlich Natriumorthovanadat und Natriumfluorid als Phosphatase-Inhibitoren. Um Proteasen zu inhibieren, wurde eine Complete Protease Inhibitor Coctail Tablette zugegeben und alle Arbeitsschritte wurden stets unter Eiskühlung ausgeführt.

1×10^7 Zellen wurden pelletiert, mit PBS gewaschen und in 1 ml Lyse Puffer resuspendiert. Um die Viskosität der Suspension durch die freigesetzte genomische DNS zu verringern behandelte man das Lysat 15 s mit Ultraschallpulsen aus einem Branson Cell Disruptor. In der Folge wurde das Lysat eine halbe Stunde bei 4 °C geschüttelt. Nachdem 30 Minuten bei 19000 x g von unlöslichen Bestandteilen abzentrifugiert worden war, nahm man den klaren Überstand ab und verwendete ihn für die Immunpräzipitation oder direkt für die SDS-PAGE.

<u>Lyse Puffer:</u>	50 mM Tris HCl pH 7,4
	200 mM NaCl
	2 mM EDTA
	0,5 % NP 40
	10 mM NaF
	2 mM Na ₃ VO ₄
+ Protease Inhibitor:	1 Tablette Complete™ Mini auf 10 ml Puffer

4.3.2 Präparation von Kernextrakten

Um nähere Informationen über die intrazelluläre Verteilung der untersuchten Proteine zu erhalten, wurden Proteinrohextrakte der Kern- und Cytoplasmafraktion hergestellt. Alle Arbeiten wurden hierbei mit eisgekühlten Puffern bei 4 °C ausgeführt.

1×10^7 Zellen wurden bei 550 x g abzentrifugiert und das entstandene Pellet zwei mal mit PBS gewaschen. Nach dem Resuspendieren der nassen Zellmasse im fünffachen Volumen Puffer A inkubierte man zehn Minuten auf Eis. Dem erneuten Abzentrifugieren bei 550 x g folgte die Zugabe der dreifachen Menge Puffer A / 0,5 % NP40. Um die Kerne freizusetzen wurde die Suspension mehrere Male durch eine 21G Kanüle gezogen. Dies wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Hierzu gab man 1 μ l Homogenisat zu 2 μ l 0,2 % Trypanblau. Wenn ca. 80 % der Kerne gefärbt waren wurde zehn Minuten bei 1100 x g abzentrifugiert. Der Überstand stellte die Cytoplasmafraktion dar. Die Kerne wurden mit 200 μ l Puffer A + 200 μ l Puffer B versetzt und durch eine 20G Kanüle resuspendiert. Um die unlöslichen Reste der Kernmembran zu entfernen wurde nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis in einer Microfuge bei maximaler Drehzahl abzentrifugiert. Der klare Überstand bildete die Kernfraktion. Beide Fraktionen wurden in die Proteinbestimmung und die SDS-PAGE eingesetzt.

Puffer A: 10 mM HEPES pH 7,9
1,5 mM MgCl₂
10 mM KCl

Puffer B: 20 mM HEPES pH 7,9
420 mM NaCl
1,5 mM MgCl₂
0,2 mM EDTA

4.3.3 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration beruht auf der Methode von Lowry (1951). In einem ersten Schritt bildet sich hierbei im alkalischen Milieu ein Komplex aus Cu²⁺ und den freien Elektronenpaaren der Stickstoffatome in den Peptidbindungen der Proteine. Als Folge davon wird das Cu²⁺ zum Cu⁺ reduziert. Im zweiten Schritt reduziert dieses Cu⁺ die Heteropolysäure H₃[PMo₁₂O₄₀] im Folin Reagenz zu tiefblauen, kolloidalen Mischoxiden des vier- sechswertigen

Molybdäns („Molybdänblau“). Die Absorbtion dieser Lösung bei 750 nm ist zu der eingesetzten Proteinmenge proportional.

Die Lowry Proteinbestimmung wurde mit dem DC-Protein Assay Kit der Firma Bio-Rad durchgeführt. Hierzu wurden 100 µl Lysat mit 500 µl Lösung A (alkalische Kupfersulfatlösung) und 10 µl 1 % SDS Lösung versetzt. Nach Zugabe von 4 ml Lösung B (Folin Reagenz) inkubierte man für 15 Minuten und konnte danach die Absorbtion der Proben bei 750 nm im Photometer messen. Als Standard diente Rinderserumalbumin in einer bekannten Konzentration.

4.3.4 Immunpräzipitation

Durch die Immunpräzipitation erreicht man eine Anreicherung von Proteinen aus dem Gesamtzelllysat. Hierzu bedient man sich monoklonaler Antikörper, die unter einer Vielzahl von Proteinen nach der Lyse spezifisch ihr Antigen erkennen. Um die resultierenden Antigen-Antikörper Komplexe aus der Lösung abtrennen zu können, mussten die Komplexe an eine feste Phase gekoppelt werden. Dazu verwendete man Protein G, das an Agarose gekoppelt ist. Protein G, ein Membranprotein aus Staphylococccen, bindet spezifisch die Fc-Regionen von Maus IgG1-Antikörpern ohne die Antigen-Antikörper Bindung zu beeinflussen.

Der Überstand aus 4.3.1 wurde zweimal je eine Stunde mit 50 µl Maus-Serum-Agarose bei 4 °C inkubiert, um Proteine, die unspezifisch an Agarose oder an Fc-Regionen von Maus-Antikörpern binden, aus dem Lysat zu entfernen. Nach der Zugabe von 100 µl Hybridomüberstand (ca. 2 µg Antikörper) folgte eine einstündige Inkubation bei 4 °C auf dem Rollmischer. Hierbei entstand der Antigen-Antikörper-Komplex. Durch die Zugabe von 30 µl Protein G+Agarose / PBS und Inkubation über Nacht konnte dieser Komplex an die Protein G+Agarose-Festphase gebunden und am nächsten Morgen leicht bei 600 x g abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand fünf mal mit kaltem Ly-

se-Puffer gewaschen und in den Phosphataseverdau oder in die SDS-PAGE eingesetzt.

4.3.4.1 Phosphatase-Verdau des Immunpräzipitats

Um Rückschlüsse über den Phosphorylierungsgrad der präzipitierten Proteine zu erhalten wurde das Immunpräzipitat mit einer Phosphatase verdaut. Hierzu wurde λ -Phosphatase verwendet, ein 25 kDa Enzym aus *E.coli*, das Phosphatgruppen unspezifisch von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten abspaltet.

Das gewaschene Immunpräzipitat wurde in 50 μ l Phosphatase-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 500 U λ -Phosphatase wurde die Suspension eine Stunde bei 30 °C leicht geschüttelt. Als Kontrolle wurde die Inkubation in reinem PBS durchgeführt. Nach dem Abzentrifugieren und Waschen in Lyse Puffer wurde das verdaute Immunpräzipitat in die SDS-PAGE eingesetzt.

Phosphatase-Puffer:

50 mM Tris-HCl
5 mM Dithiothreitol
2 mM Mangandichlorid
100 μ g / ml BSA
in bidestilliertem Wasser

4.3.5 Protein Gelelektrophorese

In einem elektrischen Gleichstromfeld wandern Proteine in Richtung der Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von den pK-Werten ihrer geladenen Gruppen und von der Molekülgröße. Als Auftrennungsmedium verwendet man auf dem Gebiet der Proteinbiochemie meist Acrylamidgele.

4.3.5.1 SDS PAGE

Bei der verwendeten Variante der Gelelektrophorese handelt es sich um die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) und Ornstein und Davis (1976). Durch die Beladung der Proteine mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat („SDS“) werden hierbei die Protein-Eigenladungen so effektiv überdeckt, dass eine Auftrennung nur von der Molekülmasse abhängig ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Trenngelen von 7,5 %, 10 % und 12,5 %, sowie mit Sammelgelen von 3 % Acrylamidgehalt gearbeitet. Neben Minigelen (10 x 8 x 0,75 cm Breite x Höhe x Tiefe) kamen auch Standardgele (15 x 14 x 1,5 cm) zum Einsatz. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Nach dessen vollständiger Polymerisation (ca. 2 h) wurde es mit dem Sammelgel überschichtet und die Auftragstaschen durch einen Kamm geformt. Nach etwa einer Stunde wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und die Gelapparatur mit Laufpuffer gefüllt. Immunpräzipitate wurden mit 40 µl 2 x Probenpuffer und 40 µl Wasser versetzt. Flüssige Proben wurden im Verhältnis fünf Teile Probe zu einem Teil 6 x Probenpuffer eingesetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 95 °C lud man die Proben auf das Gel und trennte sie bei 15 mA konstanter Stromstärke über Nacht auf.

<u>Trenngel:</u>	Acrylamid	7,5 %	10 %	12,5 %
	Bisacrylamid	0,20 %	0,20 %	0,20 %
	Tris-HCl pH 8,8	0,40 M	0,40 M	0,40 M
	SDS	0,11 %	0,11 %	0,11 %
	TEMED	0,06 %	0,06 %	0,06 %
	APS	0,03 %	0,03 %	0,03 %
	in bidestilliertem Wasser			

<u>Sammelgel:</u>	Acrylamid	3,00 %
	Bisacrylamid	0,08 %
	Tris-HCl pH 6,8	0,125 M
	SDS	0,10 %
	TEMED	0,05 %
	APS	0,10 %
	in bidestilliertem Wasser	

Laufpuffer: Tris $4,95 \times 10^{-4}$ M
Glycin $3,83 \times 10^{-5}$ M
SDS $3,50 \times 10^{-3}$ M
in bidestilliertem Wasser

2 x Probenpuffer: 2,0 ml 20 % SDS
2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
2,0 ml Glycerol
0,31 g Dithiothreitol
0,2 mg Bromphenolblau
mit bidestilliertem Wasser auf 10 ml

2 x Probenpuffer
nicht reduzierend: 2,0 ml 20 % SDS
2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
2,0 ml Glycerol
19,0 mg Jodacetamid
0,2 mg Bromphenolblau
mit bidestilliertem Wasser auf 10 ml

6 x Probenpuffer: 1,0 g SDS
7,0 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
3,0 ml Glycerol
0,93 g Dithiothreitol
1,2 mg Bromphenolblau
mit bidestilliertem Wasser auf 10 ml

4.3.5.2 Coomassie-Färbung

Um Proteine direkt im Gel sichtbar zu machen wurde eine kolloidale Coomassie Färbung durchgeführt. Hierbei wird das Gel in einer sauren Methanollösung eingelegt, wodurch die Proteine durch Denaturierung im Gel fixiert werden. Nach Zugabe des Farbstoffs bilden sich dann tiefblaue Komplexe. Überschüssiger Farbstoff muss durch Waschen in einer verdünnten Methanollösung entfernt werden. Die Empfindlichkeit dieses Proteinnachweises liegt bei etwa 30 ng.

Die Coomassie Färbung wurde mit Roti-Blue (Roth) durchgeführt. Das Gel wurde eine Stunde in 200 ml Fixierlösung und anschließend über Nacht in 200 ml Färbelösung geschwenkt. Zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff wurde solange in Entfärbelösung geschüttelt, bis der Gelhintergrund wieder klar wurde.

<u>Fixierlösung:</u>	158 ml Wasser
	2 ml Orthophosphorsäure
	40 ml Methanol

<u>Färbelösung:</u>	120 ml Wasser
	40 ml Methanol
	40 ml Roti-Blue

<u>Entfärbelösung:</u>	50 ml Methanol
	150 ml Wasser

4.3.6 Western Blot

Die Methode des „Western Blottings“ nach Towbin und Gordon (1979) erweitert die Nachweismöglichkeiten für die in Gelen aufgetrennten Fraktionen, da die auf der Membranoberfläche adsorbierten Proteine leicht auch für große Liganden, wie Antikörper, zugänglich sind.

4.3.6.1 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose Membranen

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen erfolgte auf Nitrocellulose-Membranen und wurde mit Hilfe Trans-Blot™Cell Nassblot-Apparatur der Firma Bio-Rad durchgeführt.

Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer genommen und das Sammelgel abgetrennt. Es wurde folgendes Sandwich aufgebaut (Abbildung 11):

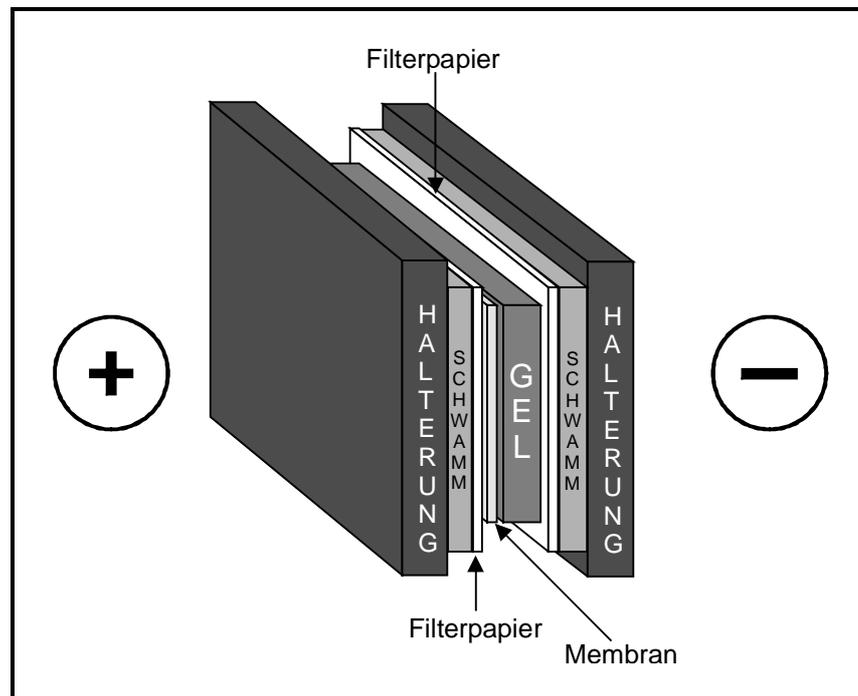


Abbildung 11: Aufbau des Western-Blots

Die verwendeten Filterpapiere, Schwämme und die Nitrocellulosemembran wurden zehn Minuten vor dem Blot in einer ausreichenden Menge Transfer-Puffer getränkt, um einen ungehinderten Stromfluss zu gewährleisten. Aus dem gleichen Grund wurden eventuell vorhandene Luftblasen durch Rollen mit einer Pipette beseitigt. Der Transfer wurde 100 Minuten bei einer Stromstärke von 1,5 A unter Wasserkühlung durchgeführt.

4.3.6.2 Amido-Schwarz Färbung

Eine andere Möglichkeit um alle Proteine auf der Nitrocellulose-Membran anzufärben ist die Amido-Schwarz Färbung. Da während der Färbung / Entfärbung Isopropanol verwendet wird, ist diese Methode jedoch nicht für eine nachfolgende Immundetektion geeignet. Die Empfindlichkeit entspricht etwa der India-Ink Färbung.

Die Nitrocellulosemembran wurde eine Minute in 100 ml Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte durch Inkubation in Entfärbelösung über Nacht. Die Membran konnte danach in destilliertem Wasser gelagert oder an der Luft getrocknet werden.

Amido-Schwarz Färbelösung: 0,1 % Amido-Schwarz
25 % Isopropanol
10 % Eisessig

Amido-Schwarz Entfärbelösung: 15 % Isopropanol
10 % Eisessig
in bidestilliertem Wasser

4.3.6.3 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Nach dem Transfer, beziehungsweise nach der India-Ink Färbung, wurde die Nitrocellulose-Membran eine Stunde in Blocking-Lösung geschwenkt, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Nach der Zugabe eines entsprechend verdünnten Primärantikörpers mit Spezifität für das zu detektierende Protein wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit PBS / 0,1 % Tween gewaschen. Anschließend ließ man den, in Blocking-Lösung verdünnten, Sekundärantikörper für eine Stunde binden. Die verwendeten Sekundärantikörper waren dabei kovalent mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Nach fünf Waschsritten mit PBS / 0,1 % Tween wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

Hierbei katalysiert Meerrettich-Peroxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophtalat und elementarem Stickstoff (Abbildung 12). Die Reaktionsprodukte entstehen dabei in einem angeregten Zustand. Beim Übergang in den Grundzustand geben sie die freiwerdende Energie als Licht der Wellenlänge 428 nm ab, das man auf einem Röntgenfilm auffangen kann.

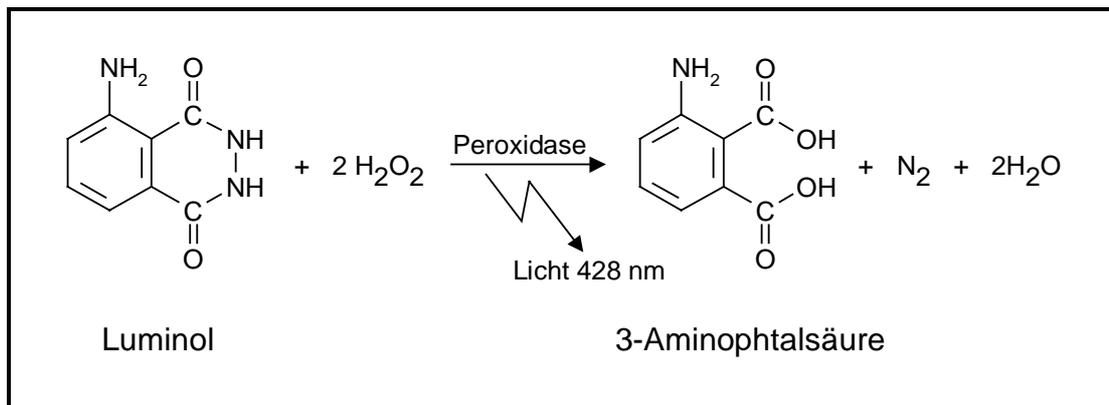


Abbildung 12: Reaktionsschema der Chemilumineszenzreaktion

Der Chemilumineszenznachweis wurde mit dem ECL-Substrat (Amersham) durchgeführt. Hierzu wurden 10 ml Lösung 1 (Luminol) mit 10 ml Lösung 2 (Wasserstoffperoxid) gemischt und die Membran eine Minute darin geschüttelt. Nach dem Entfernen von überschüssigem Substrat durch ein Papiertuch wurde die Membran zwischen zwei Overhead-Folien gegeben und je nach Signalstärke 30 Sekunden bis 15 Minuten einem X-Ray 90 Film exponiert.

Blocking-Lösung:

5 % Magermilchpulver
0,1 % Tween-20
in PBS

den 2 ml IPTG-Lösung zugegeben und für weitere zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nachdem man die Zellen 20 Minuten bei 4000 x g abzentrifugiert hatte, nahm man den Rückstand in 40 ml Säulen-Puffer auf. Um die Bakterien zu lysieren wurden sie über Nacht bei -20 °C eingefroren, am nächsten Tag langsam aufgetaut und für 2 min mit Ultraschallpulsen (15 s) aus einem Sonifier behandelt. Durch eine halbstündige Zentrifugation bei 9000 x g wurden Zelltrümmer entfernt. Der Überstand wurde mit Säulen-Puffer auf eine Protein-Konzentration von ca. 2,5 µg / µl verdünnt.

IPTG-Lösung: 1,41 g IPTG
in 50 ml bidestilliertem Wasser

Säulen-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,4
200 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM Natriumazid
1 mM DTT
in bidestilliertem Wasser

4.3.7.2 Aufreinigung von Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung des MBP-Fusionsproteins bedient man sich der Bindung des Maltose bindenden Proteins an Amylose-Resin im Rahmen einer Affinitätschromatographie.

20 ml Amylose-Resin wurden in eine 50 ml Spritze gegossen und mit 160 ml Säulen-Puffer äquilibriert. In der Folge wurde der verdünnte Überstand, der das Fusionsprotein enthielt, auf die Säule geladen. Nach dem Waschen mit 160 ml Säulen-Puffer eluierte man das Fusionsprotein mit 60 ml Eluationspuffer, wobei man Fraktionen von je 3 ml sammelte und bei 280 nm im Photometer auf ihren Proteingehalt untersuchte.

Eluationspuffer: Säulen-Puffer + 10 mM Maltose

4.4 Immunologische Methoden

4.4.1 Elisa Test zur Analyse löslicher Antigene

Mit Hilfe des ELISA (enzyme linked immuno sorbant assay) Tests kann man die Konzentration löslicher Antigene bestimmen oder die Spezifität von Antikörpern überprüfen.

Hierzu wurden 1-10 µg Antigen in 100 µl PBS an die PVC Oberfläche einer 96-Loch Mikrotiter-Platte gebunden, indem man eine Stunde bei Raumtemperatur inkubierte. Um unspezifische Bindungen zu verhindern blockte man die Vertiefungen in der Folge eine Stunde in 1 % BSA. Nachdem man 5 x kurz in PBS / 0,1 % Tween gewaschen hatte, erfolgte die einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper. Fünfmaliges Waschen in PBS / 0,1 % Tween entfernte nicht gebundene Antikörper. Um die gebundenen Primärantikörper nachweisen zu können gab man 100 µl eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (rabbit anti-mouse Ig) in einer geeigneten Verdünnung (PBS / Tween / 10 % FCS) zu und inkubierte abermals eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachdem man 12 x in PBS / 0,1 % Tween gewaschen hatte, erfolgte der Nachweis durch Zugabe von 100 µl Substratlösung. Die Peroxidase katalysiert hierbei die Umsetzung des zunächst farblosen Substrats zu einem orange-roten Niederschlag. Nach 30 Minuten konnte das Ergebnis bei 450 nm abgelesen werden.

Substrat-Lösung: 2 mg / ml Orthophenyldiamin
in 0,1 M Citrat-Puffer
0,2 µl / ml 30 % H₂O₂

Citrat-Puffer: 65 ml 0,1 M Natriumcitrat
35 ml 0,1 M Citronensäure

4.4.2 Immunfluoreszenz

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz wird angewandt, um die Verteilung der untersuchten Antigene in der Zelle zu bestimmen. Hierbei bedient man sich monoklonaler Antikörper, die als biochemische Sonden in der Zelle spezifisch ihr Antigen binden. Zur Detektion gibt man einen Sekundär-Antikörper zu, der kovalent mit Fluorescein gekoppelt ist und bei Bestrahlung mit blauem Licht grün fluoresziert. Wenn es sich bei dem zu untersuchenden Antigen um ein zytoplasmatisches Protein handelt muss die Zelle zuvor fixiert und permeabilisiert werden, um das Eindringen der Antikörper in die Zelle zu ermöglichen. Für qualitative Aussagen erfolgt die Untersuchung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop; für quantitative Aussagen werden sie durchflusszytometrisch am FACscan (Fluoreszenz aktivierter Zell Scanner) gemessen.

5×10^6 lebende Zellen wurden bei $350 \times g$ abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Der Rückstand wurde zur Fixierung in $50 \mu\text{l}$ Lösung A (Fix & Perm, Caltag) resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS ($650 \times g$) permeabilisierte man das Zellpellet mit $50 \mu\text{l}$ primären Antikörper / $50 \mu\text{l}$ Lösung B. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde der Rückstand erneut dreimal gewaschen und danach 30 Minuten mit einem FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-gekoppelten Sekundärantikörper, der 1:25 in 2 % BSA / PBS verdünnt war, versetzt. Nach drei weiteren Waschschritten resuspendierte man die Zellen in $200 \mu\text{l}$ 1 % Paraformaldehyd / PBS und konnte sie sofort am Fluoreszenzmikroskop oder FACscan untersuchen oder sie für einige Wochen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln lagern.

4.5 Computeranalysen

4.5.1 Sequenzanalysen

Sequenzanalysen wurden lokal mit dem Programm Gene Runner (Hastings Software) sowie online mit den Programmen FASTA (Pearson & Lipman, 1988) und BLAST (Altschul et al., 1990) durchgeführt.

4.5.2 Strukturanalysen

Strukturelle Untersuchungen der Protein-Sequenzen wurden mit dem Programm Gene Runner (Hastings Software) sowie online mit den Programmen Helix-Start Server (Juretic et al., 1998), Predict Protein (Bairoch et al., 1997) und Self Optimized Prediction Method (Geourjon & Deleage, 1995) durchgeführt.

4.5.3 Densitometrische Analysen

Die densitometrischen Auswertungen von gescannten Elektrophoresegelen und Blots erfolgten mit den Programmen Sigma Gel (SPSS Science), ImageQuant NT (Molecular Dynamics) und Scion Image (Scion Software).

MADER besitzt zwei konservierte Domänen (CD1 Aminosäure-Position 35-113 und CD2 Aminosäure-Position 267–356). Diese Domänen wurden zuerst in NAB1 (NGF1-A Binding Protein 1), einem konstitutiv exprimierten Repressor von EGR-1 identifiziert. Die CD1-Domäne vermittelt hierbei die Bindung von NAB1 und MADER an die Repressordomäne R1 von EGR-1. Die Funktion der CD2 Domäne ist derzeit noch nicht geklärt.

MADER enthält 23 potentielle Phosphorylierungsstellen (Abbildung 13). Davon entfallen 17 Phosphorylierungsstellen auf Serin-, vier auf Threonin- und zwei auf Tyrosin-Reste. Bei den beteiligten Kinasen handelt es sich um die cAMP-abhängige Kinase (3x), Protein Kinase C (9x), Kasein Kinase 2 (11x) und Tyrosin Kinase (2x). Auffällig ist, dass sich die meisten Phosphorylierungsstellen dabei in drei Clustern ansammeln: Am N-Terminus, in der ersten Prolin-reichen Domäne und in der CD2 Domäne.

Zwei potentielle Kernlokalisierungssignale lassen sich in der Proteinsequenz identifizieren (Abbildung 13). Ein „bipartite“ Kernlokalisierungssignal (Robbins et al, 1991) findet sich bei Aminosäure-Position 296 (**RK YSIIYGRFDS KRREG**). Die Sequenz besteht dabei aus zwei basischen Resten, 10 Aminosäuren Zwischenraum und einer erneuten basischen Region aus 5 Aminosäuren. Das zweite putative Kernlokalisierungssignal in MADER an Position 373 (**PLKKLKQ**) entspricht dem des SV-40 Large T Antigens (Kalderon et al., 1984). Entscheidend dabei ist eine Aminosäureabfolge, die mit einem Prolin beginnt und nach spätestens drei Aminosäuren von einem basischen Segment aus drei Lysin-Resten gefolgt wird.

Um eventuelle Transmembrandomänen aufzuspüren wurde eine Hydrophobizitäts-Analyse nach Kyte und Doolittle (1982) durchgeführt. In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass MADER nur wenige und sehr kurze hydrophobe Bereiche aufweist. Da Transmembran-Domänen in der Regel größere hydrophobe Bereiche

darstellen, ist dies, zusammen mit den beschriebenen Kerntransport-Sequenzen, eine Bestätigung der experimentellen Lokalisation von MADER im Kern (Kirsch, 1996).

Neben der Vollängen cDNS wurde von Kirsch (1996) auch drop8, eine Splice-Variante von MADER, beschrieben. Dem MADER-drop8 Protein fehlen im Vergleich zum vollständigen Protein 64 Aminosäuren im C-terminalen Bereich (Aminosäureposition 446-509). MADER-drop8 verliert dadurch eine ThreoninPhosphorylierungsstelle der Kasein Kinase 2 und einen Teil der zweiten Prolin-reichen Domäne (Abbildung 13).

Eine Sekundärstruktur-Analyse der MADER-Proteinsequenz wurde mit dem Algorithmus von Juretic et. al (1998) durchgeführt. Die Genauigkeit dieser Vorhersage-Methode beträgt bis zu 84 %. Wie man der Abbildung 14 entnehmen kann, ist die einzige Sekundärstruktur, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit vorausgesagt wird die alpha-Helix.

Dieser Strukturtyp konzentriert sich dabei in zwei großen Bereichen, die sich N-terminal und etwa in der Mitte des Proteins befinden. Weitere kürzere alpha-Helices erkennt man weiter in Richtung des C-Terminus.

Interessanterweise decken sich die beiden großen alpha-helikalen Bereiche fast vollständig mit den konservierten Domänen CD1 und CD2 (Abbildung 14).

Um die Sekundärstrukturen der CD1 und CD2 Domänen näher zu charakterisieren, wurden sie aus diesem Grund mit drei weiteren Sekundärstrukturvorhersage-Programmen analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in einer Consensus-Vorhersage vereint (Abbildung 15). Hierbei zeigt sich, dass auch mit den Algorithmen dieser Programme beide konservierten Domänen als hauptsächlich alpha-helikal prognostiziert werden. So ergibt die Consensus-Vorhersage sowohl für CD1, als auch für CD2 einen 75 %igen Anteil der alpha-Helix an der Sekundärstruktur.

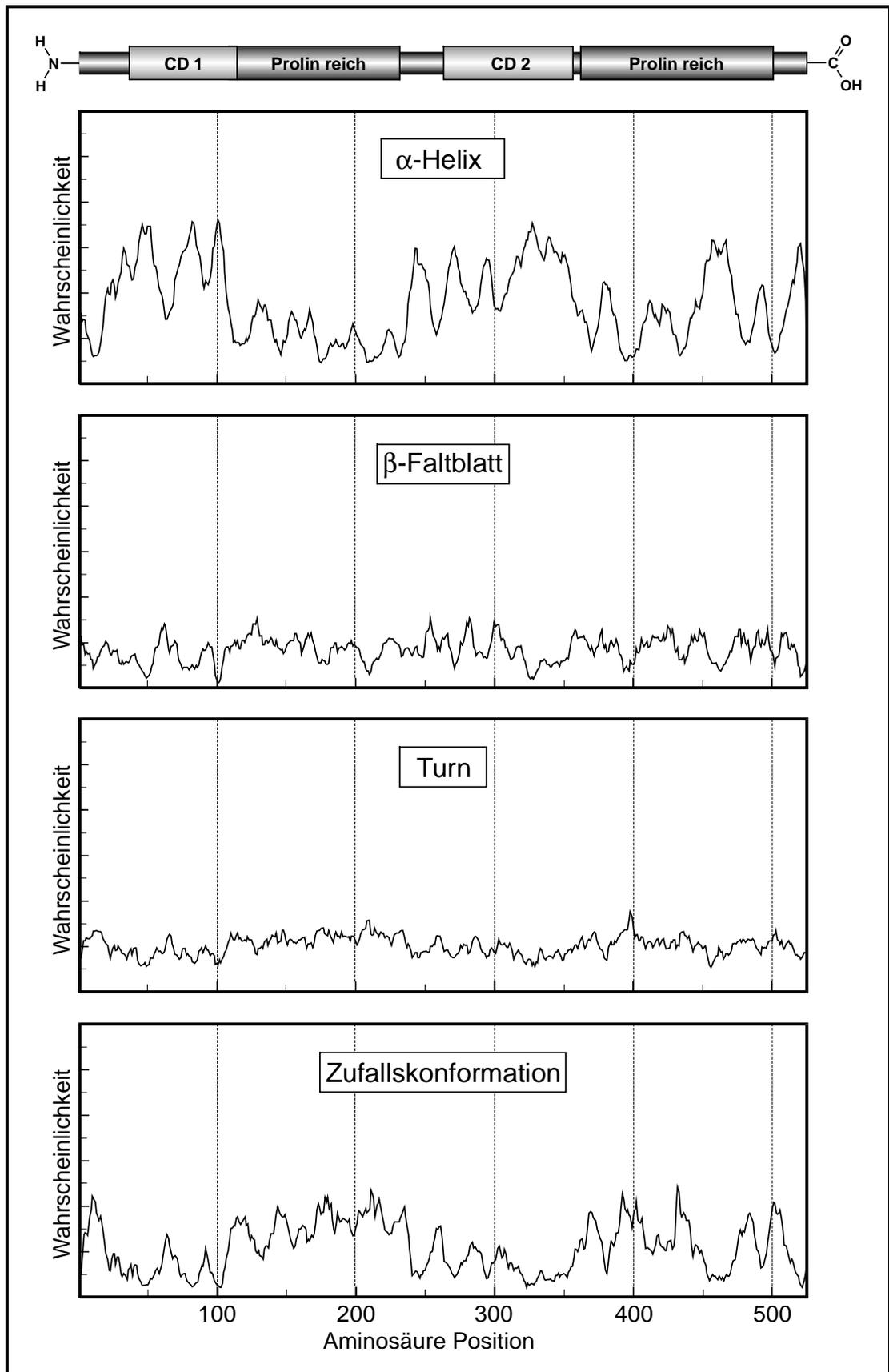


Abbildung 14: Sekundärstruktur-Analyse von MADER nach Juretic et al. (1998)

In Abbildung 16 wurde die MADER Proteinsequenz nach amphipatischen alpha-Helices, die häufig an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind, durchsucht. Bei dieser Art von alpha-Helix sind geladene und unpolare Aminosäureseitenketten auf entgegengesetzten Seiten der Helix positioniert. Die Abbildung zeigt einen Blick von oben auf die Helixachse. Die Aminosäuren sind dabei jeweils 100° voneinander entfernt, da 3,6 Aminosäuren auf eine ganze Windung einer Helix kommen.

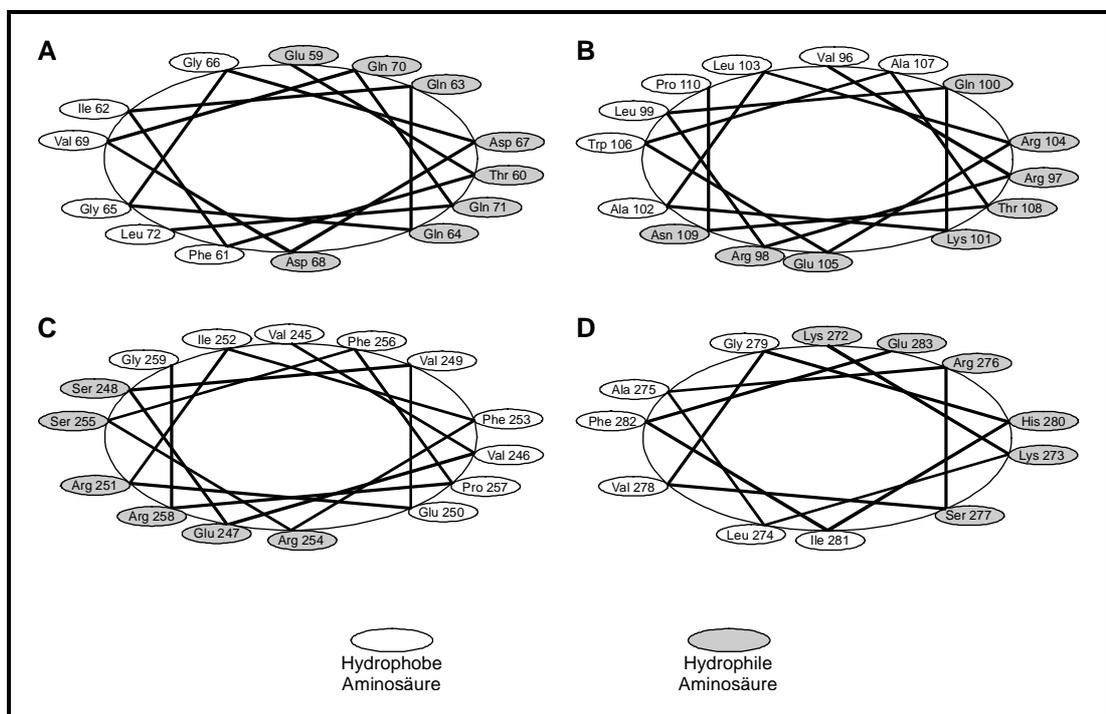


Abbildung 16: Darstellung der potentiellen amphipatischen Alpha-Helices in MADER

Das Ergebnis der Analyse zeigt vier potentielle amphipatische alpha-Helices in MADER. Zwei davon liegen in der CD1 Domäne (**A** Aminosäureposition 59-72 und **B** 96-110). Die weiteren finden sich kurz vor (**C** Aminosäureposition 245-258), beziehungsweise in der CD2 Domäne (**D** Aminosäureposition 272-283). Die Positionen aller potentiellen amphipatischen Helices decken sich dabei mit Regionen einer hohen Helixwahrscheinlichkeit (Abbildung 14).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die konservierten Domänen CD1 und CD2 in MADER größtenteils aus alpha-Helices bestehen und die Interaktion von MADER mit EGR-1 eventuell über die amphipatischen alpha-Helices in CD1 erfolgen könnte.

5.1.2 Reaktivität der MADER Antikörper im Western Blot

Von Kirsch (1996) wurden neun monoklonale Antikörper gegen bakteriell exprimiertes, rekombinantes MADER-Protein generiert. Diese Antikörper wurden eingesetzt um die biochemischen Eigenschaften von MADER näher zu beleuchten. Hierzu wurde das MADER-Immunpräzipitat eines Antikörpers im Western Blot mit allen anderen als Blotting Antikörper inkubiert (Abbildung 17).

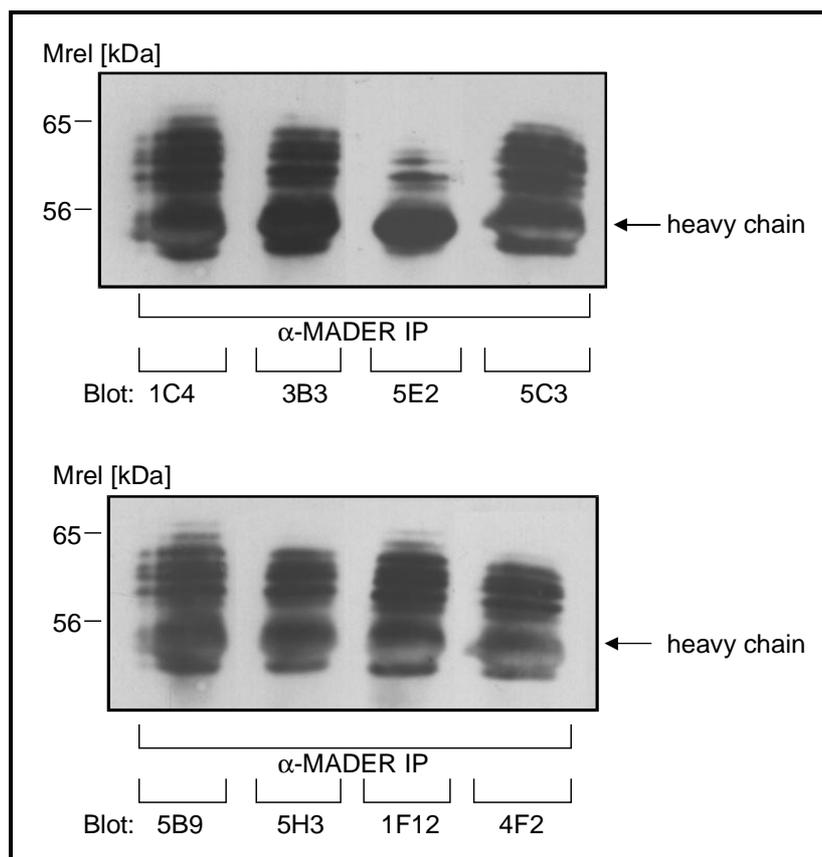


Abbildung 17: Reaktivität der MADER Antikörper mit einem MADER Immunpräzipitat der Melanomzelllinie MelJuSo im Western Blot

Präzipitierender Antikörper:
 α -MADER 5H1

Blotting Antikörper:
 α -MADER 1C4; 3B3; 5E2;
5C3; 5B9; 5H3; 1F12; 4F2

Pfeil: Schwere Kette des präzipitierenden Antikörpers

Überraschenderweise erhält man hierbei im Western Blot nicht nur eine Bande beim errechneten Molekulargewicht von 56 kDa, sondern eine Reihe von Banden

zwischen 56 und 65 kDa. Alle monoklonalen MADER Antikörper liefern hierbei das gleiche Bandenmuster. Eine Inkubation des Immunpräzipitats mit einer Isotypkontrolle zeigt hingegen nur das Signal der schweren Kette des präzipitierenden Antikörpers (Abbildung 18).

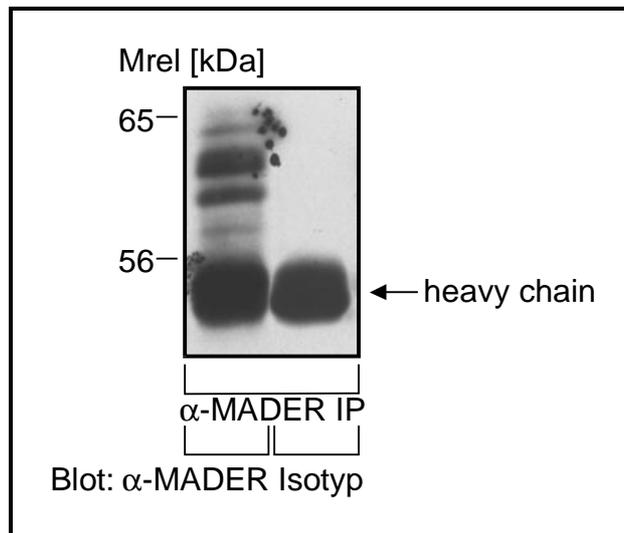


Abbildung 18: Inkubation eines MADER Immunpräzipitats der Melanomzelllinie MelJuSo mit einer Isotypkontrolle im Western Blot

Präzipitierender Antikörper: α -MADER 5H1

Blotting Antikörper: α -MADER 1C4; Isotyp FR4H12

Pfeil: Schwere Kette des präzipitierenden Antikörpers

Ursprünglich wurde MADER mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (18.3), den man durch die Immunisierung einer Maus mit Melanomzellen gewann, aus einer Melanom cDNS Expressionsgenbank isoliert. Im Gegensatz dazu wurden die neun zuvor beschriebenen Antikörper gegen rekombinantes Bakterien Protein generiert. Um zu überprüfen, ob dieser ursprüngliche Antikörper (18.3) das gleiche Bandenmuster liefert wurde er ebenfalls als Präzipitationsantikörper in einer Western Blot Analyse eingesetzt. Um zusätzlich sicherzustellen, dass die beobachtete Bandenheterogenität ihre Ursache nicht in der Immunpräzipitation hat wurde als Vergleich zusätzlich 100 μ g Gesamtzelllysate auf das SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 19 A).

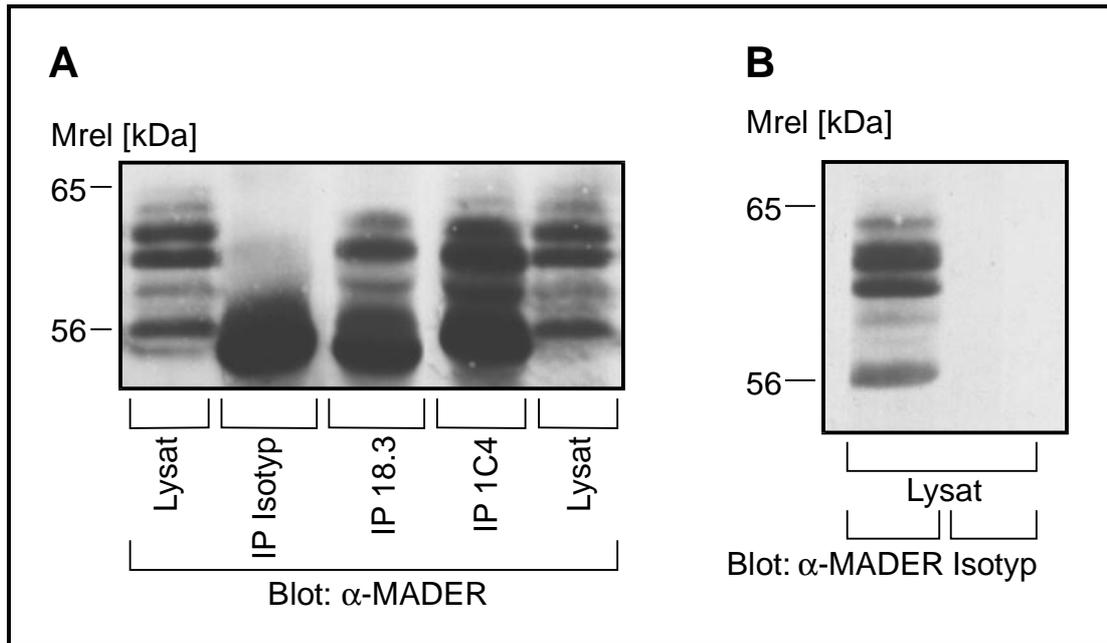


Abbildung 19: Reaktivität der Antikörper 18.3 und 1C4 als Präzipitationsantikörper im Western Blot und Vergleich von Immunpräzipitation und Gesamtzelllysate (A) Isotypkontrolle eines Gesamtzelllysats (B) Aufgetragene Gesamtproteinmenge: je 100 μ g; Blotting Antikörper: α -MADER 1C4; Isotyp FR4H12

In Abbildung 19 erkennt man, dass sowohl der ursprüngliche MADER-Antikörper 18.3 als auch der, gegen rekombinantes Protein generierte, Antikörper 1C4 als Präzipitationsantikörper im Western Blot dasselbe Bandenmuster liefern. Eine Immunpräzipitation mit einem Isotyp-Antikörper zeigt im Blot hingegen nur die schwere Kette des Präzipitationsantikörpers. Der Vergleich Immunpräzipitation-Gesamtzelllysate zeigt, dass das Bandenmuster absolut identisch ist. Eine Inkubation einer Gesamtzelllysate-Spur im Western Blot mit einem Isotypantikörper liefert wiederum keine immunreaktive Bande (Abbildung 19 B).

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die beobachtete Bandenheterogenität von MADER weder ein Artefakt der, gegen rekombinantes Bakterienprotein generierten, MADER-Antikörper darstellt, noch ihren Ursprung in der durchgeführten Immunpräzipitation hat.

Eine weitere Erklärung für das Auftreten mehrerer immunreaktiver Banden im Western Blot ist das Vorkommen verschiedener Untereinheiten eines Proteins, die mit Disulfidbrücken verknüpft sind. Eine Möglichkeit dies zu überprüfen besteht im Lauf von SDS-Gelen unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen.

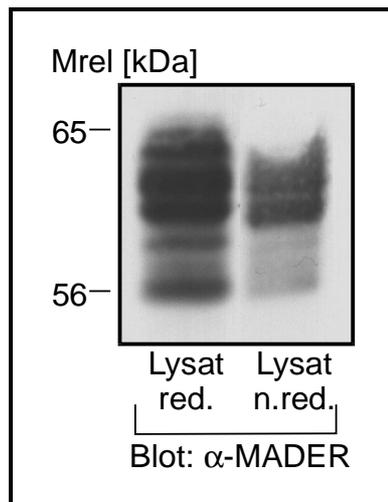


Abbildung 20: Vergleich zwischen reduzierendem und nicht reduzierendem SDS Gel

Western Blot mit je 100 µg Gesamtproteinmenge

Blotting Antikörper: α-MADER 1C4

In Abbildung 20 erkennt man, dass auch in der Gelspur, die unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt wurde, die gleiche Bandenheterogenität auftritt, wie in der reduzierenden Spur. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Banden, die von den MADER Antikörpern im Western Blot erkannt werden, nicht durch Untereinheiten von MADER zustande kommen, die im nativen Zustand durch Disulfid-Brücken verknüpft sind.

5.1.3 Reaktivität der MADER Antikörper mit drop8

Neben der vollständigen MADER cDNS wurde von Kirsch (1996) auch die Spleiße-Variante MADER drop8 aus einer humanen Melanom cDNS Expressionsgenbank isoliert. In den durchgeführten Immunpräzipitationen und Western Blot Analysen konnte keine Spur des 64 Aminosäuren kürzeren MADER drop8 festgestellt werden.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Antikörper ein Epitop erkennen, das auf den 64 Aminosäuren liegt, die der MADER drop8 Variante fehlen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass MADER drop8 in den untersuchten Zellen eine zu geringe Expression zeigt, um im Western Blot detektiert werden zu können.

Zur Klärung dieser Fragen wurden stabile MADER drop8 Transfektanten, die die klonierte cDNS in sense- und antisense-Richtung enthielten, in der Zelllinie Colo 320 DM hergestellt. Diese MADER drop8 Transfektanten wurden in der Folge in der cytoplasmatischen Immunfluoreszenz auf die Reaktivität der MADER Antikörper untersucht.

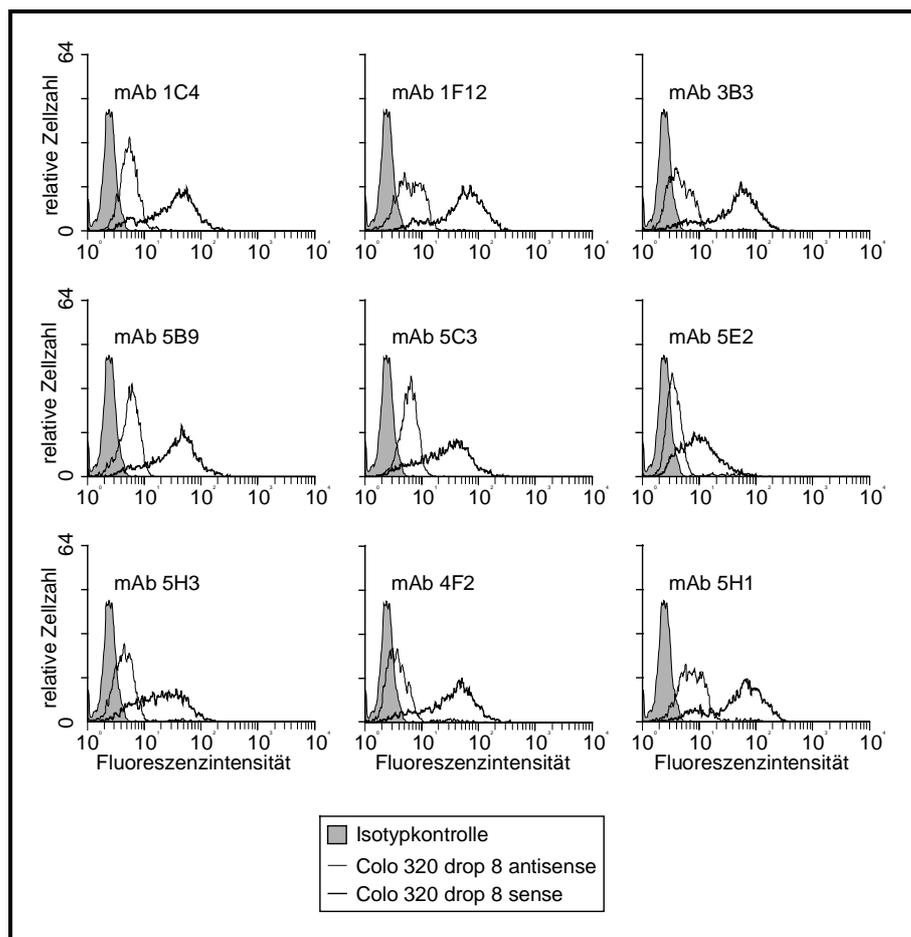


Abbildung 21: Reaktivität der MADER Antikörper mit den drop8 Transfektanten in der cytoplasmatischen Immunfluoreszenz

Isotypkontrolle: Colo 320 drop8 antisense Zellen mit mAb FR4H12

Abbildung 21 zeigt, dass alle MADER Antikörper stark mit dem drop8 sense Transfektanten reagieren. Alle Antikörper weisen auch eine geringere Reaktion mit dem Colo 320 drop8 antisense Transfektanten auf. Dabei handelt es sich um das endogen vorhandene MADER-Protein der Zelllinie Colo 320 DM. Dies zeigt, dass das Epitop der MADER Antikörper nicht auf dem Bereich liegen kann, der der MADER-drop8 Variante fehlt. Zwischen den Antikörpern existieren leichte Unterschiede in der Bindungsaffinität. Interessanterweise band der Antikörper 5E2, der auch in den Western Blot Analysen eine geringe Reaktivität gegen denaturiertes Protein zeigte, hier ebenfalls nur schwach an natives endogenes MADER und an das Produkt der transfizierten drop8 cDNS (Abbildung 22).

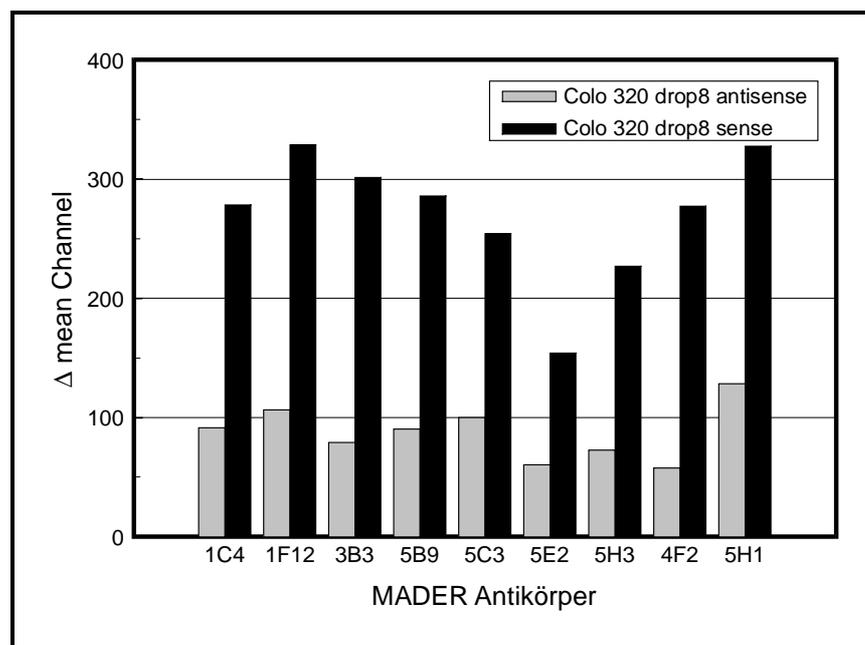


Abbildung 22: Vergleich der Reaktivität der MADER Antikörper mit drop8 Transfektanten im FACS
 Δ Mean Channel: Mean Channel α -MADER Antikörper - Mean Channel Isotyp FR4H12

Da alle anderen monoklonalen MADER Antikörper sowohl im Western Blot als auch in der Immunfluoreszenz eine ähnliche Reaktivität aufwiesen wurden alle weiteren Analysen stets mit dem Antikörper 1C4 ausgeführt.

Um die biochemischen Eigenschaften von MADER-drop8 zu untersuchen wurden Zelllysate der drop8 Transfektanten in Western Blot Analysen eingesetzt. Zur Angleichung der erhaltenen Signalstärke wurden hierbei unterschiedliche Gesamtproteinmengen auf das SDS-Gel aufgetragen.

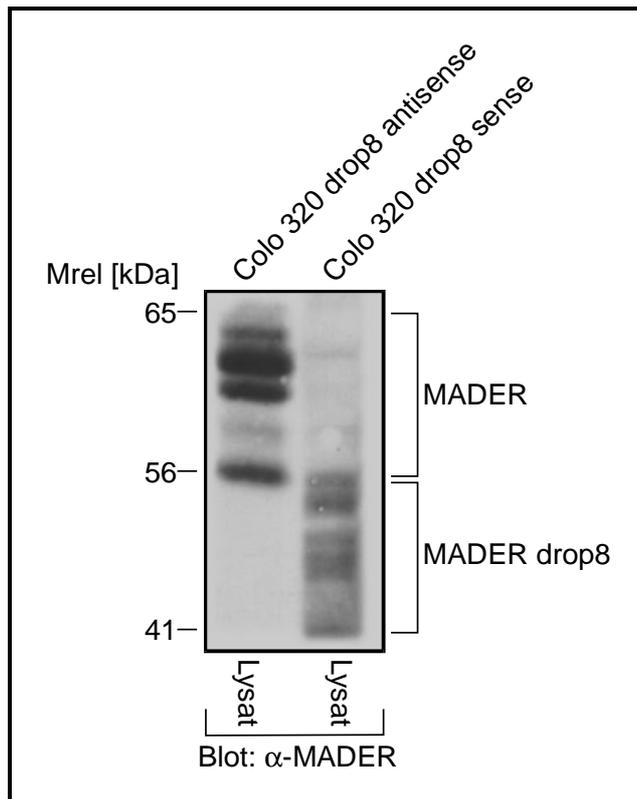


Abbildung 23: Analyse der drop8 Transfektanten im Western Blot

Aufgetragene Gesamtproteinmenge:
100 µg Colo 320 drop8 antisense
50 µg Colo 320 drop8 sense

Blotting Antikörper: α-MADER 1C4

In Abbildung 23 erkennt man, dass auch die MADER drop8 cDNS im Western Blot mehrere immunreaktive Banden liefert. Da MADER-drop8 64 Aminosäuren im Vergleich zum vollständigen MADER Protein fehlen, sind diese Banden erwartungsgemäß nach kleineren Molekulargewichten verschoben. Das Bandenmuster des drop8-antisense Transfektanten entspricht hingegen dem des endogenen MADER der Zelllinie Colo 320DM.

5.1.4 Spezifität der MADER-Antikörper

Da alle MADER Antikörper stets mehrere Banden in den durchgeführten Western-Blot Analysen lieferten, musste zunächst sichergestellt werden, dass dies nicht auf möglichen Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit anderen Proteinen beruht.

Hierzu wurde zunächst das MADER Protein als Fusionsprotein mit dem Maltosebindenden-Protein (MBP) in Bakterien produziert und über eine Resin-Säule aufgereinigt. Die Überprüfung der Reaktivität des isolierten MADER-MBP Fusionsproteins mit den MADER Antikörpern erfolgte im ELISA (Abbildung 24).

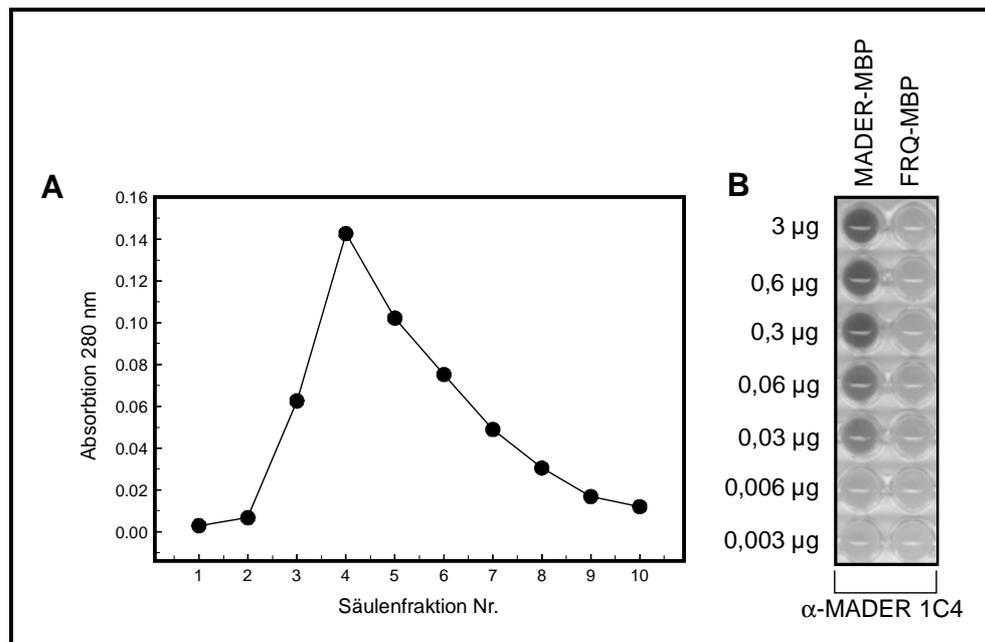


Abbildung 24: MADER-MBP: Säulenelutionsprofil (A) und Reaktivität im ELISA (B)

Die Fraktion 4, die den höchsten Proteingehalt aufwies, wurde dazu zusammen mit einem irrelevanten MBP-Fusionsprotein (FRQ-MBP) in abnehmenden Mengen an eine ELISA-Platte gebunden und auf die Reaktivität mit dem MADER Antikörper 1C4 hin getestet. Die Abbildung 24 zeigt deutlich die spezifische Reaktionsfähigkeit des isolierten MADER-MBP Fusionsproteins mit dem MADER Antikörper 1C4.

Um die Spezifität der MADER-Antikörper in der Immunfluoreszenz festzustellen wurde die Fraktion 4 des isolierten MADER-MBP Fusionsproteins im 20-fachen Überschuss mit einem MADER Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. Hierdurch sollten alle Bindungsstellen des MADER-Antikörpers abgesättigt sein und in der Immunfluoreszenz kein Signal mehr liefern. Als Kontrolle wurde die Vorinkubation auch mit derselben Menge eines irrelevanten MBP-Fusionsproteins (FRQ-MBP) durchgeführt (Abbildung 25).

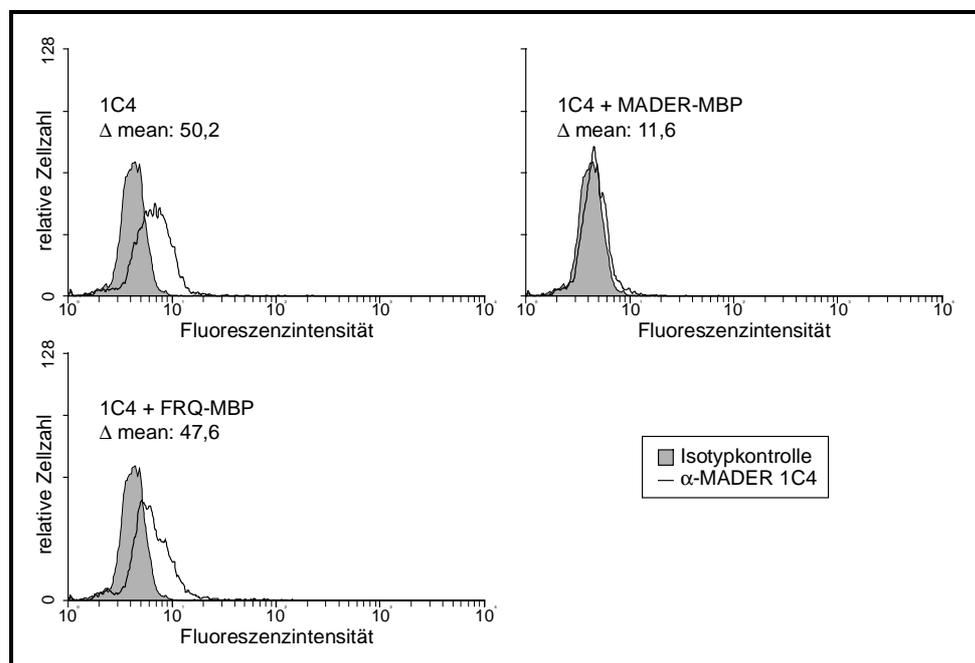


Abbildung 25: *Kompetition der MADER Antikörper mit MADER-MBP im FACS*
 $\Delta \text{Mean Channel: Mean Channel } 1C4 - \text{Mean Channel Isotypkontrolle FR4H12}$

In der FACS Analyse erkennt man, dass man die Reaktivität des MADER Antikörpers durch die Vorinkubation mit dem MADER-MBP Fusionsprotein tatsächlich nahezu vollständig inhibieren kann. Diese Inhibition hat ihren Grund nicht in der zugegebenen Proteinmenge, da eine Vorinkubation mit der gleichen Menge an irrelevantem FRQ-MBP keine Inhibition bewirkt. Dies beweist die spezifische Reaktivität der MADER Antikörper mit einem Epitop der MADER-Proteinsequenz.

Um zu klären ob alle im Western Blot detektierten Banden wirklich auf eine Reaktion der Antikörper mit MADER zurückzuführen sind wurde die Zelllinie Cos-7 transient mit der vollständigen MADER cDNS transfiziert und ihr Lysat im Western Blot untersucht (Abbildung 26).

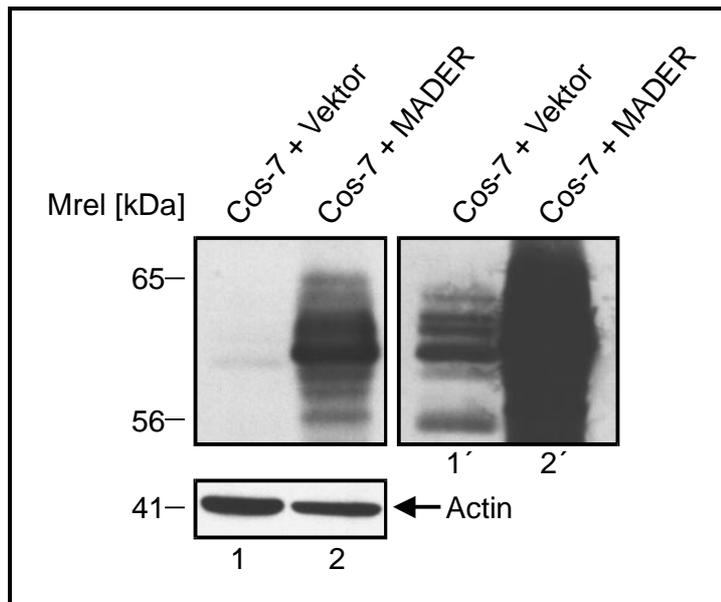


Abbildung 26: Transiente Transfektion der MADER cDNS in Cos-7 Zellen.

Western Blot mit je 100 µg Gesamtproteinmenge

Blotting Antikörper: α-MADER 1C4; α-Actin

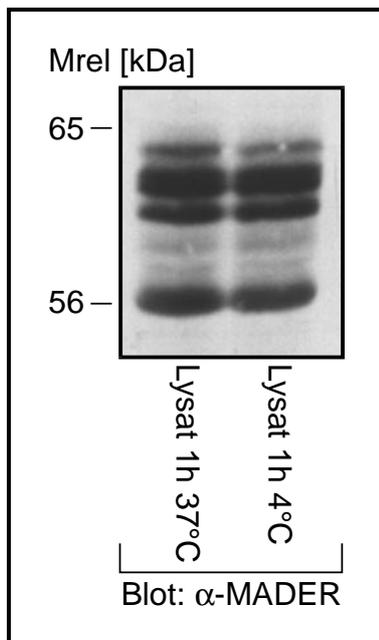
In Spur zwei des resultierenden Blots erkennt man, dass das Produkt der transfizierten MADER cDNS tatsächlich auch mehrere Banden zwischen 56 und 65 kDa liefert. Dies ist nicht auf die Transfektion an sich zurückzuführen, da die Transfektion des leeren Vektors kein Signal liefert (Spur 1). Durch das Blotting mit einem Antikörper gegen Actin wird außerdem bestätigt, dass auch die aufgetragene Proteinmenge in Spur 1 und 2 etwa die gleiche ist. In den Spuren 1' und 2' wurden die gleichen Spuren nur länger dem Röntgenfilm exponiert, um das endogene MADER Protein der Zelllinie Cos-7 (Spur 1') mit dem Produkt der transfizierten cDNS (Spur 2) vergleichen zu können. Dieser Vergleich ergibt, dass das Bandenmuster identisch ist. Dies beweist, dass tatsächlich alle beobachteten Banden auf eine Reaktion der Antikörper mit dem MADER-Protein zurückzuführen sind. Da die transfizierte cDNS der „reifen“ mRNS entspricht, können die Banden außerdem keine Splice-Produkte von MADER darstellen.

5.1.5 Untersuchungen zur Bandenheterogenität von MADER

Die Ergebnisse von 5.1.4 verdeutlichen, dass alle im Western Blot zu erkennen- den Banden spezifisch für das MADER-Protein sind. Aus diesem Grund wurde in der Folge nach den Ursachen dieses Phänomens gesucht.

5.1.5.1 Überprüfung der Protease-Sensitivität des MADER Proteins

Eine Möglichkeit, die das Auftreten von mehreren Banden erklären würde, ist ein Protease-Abbau. MADER könnte ein sehr stark Protease-sensitives Protein sein und die auftretenden Banden entsprechen Bruchstücken des intakten Proteins, die immer noch das Epitop für die Antikörper tragen.



*Abbildung 27: Test der Protease-Sensitivität des MADER-Proteins
Western Blot mit je 100 µg Gesamtproteinmenge*

Blotting Antikörper: α-MADER IC4

Um zu untersuchen, ob ein Protease Abbau für die beobachtete Bandenheterogenität verantwortlich ist, wurden Zelllysate der Melanomzelllinie MelJuSo verglichen, die man entweder eine Stunde auf Eis oder bei 37 °C inkubierte. Durch die Inkubation bei 37 °C sollten den Proteasen die optimalen Bedingungen zur Verfügung gestellt werden um das MADER Protein zu verdauen. Das entstandene Bandenmuster wurde dann im Western Blot verglichen (Abbildung 27).

Als Ergebnis des Protease-Tests kann man feststellen, dass die Vorinkubation des Lysats bei 37 °C für eine Stunde keinen Unterschied im Bandenmuster zu dem auf Eis gehaltenen Lysat ergibt. Dies ist als starker Hinweis darauf zu werten, dass die beobachteten MADER Banden im Western Blot nicht Ursache eines Protease-Abbaus sind.

5.1.5.2 Überprüfung des Ubiquitinierungsstatus des MADER-Proteins

In Eukaryontenzellen werden viele Proteine, die für den Abbau im Proteasom vorgesehen sind mit dem Molekül Ubiquitin markiert. Häufig kommt es dabei zu einer Multiubiquitinierung des Zielproteins. Hierbei werden entweder mehrere Lysinreste mit Ubiquitin verknüpft oder ein vorhandener Ubiquitinrest dient als Substrat für eine weitere Ubiquitinierung. Nach diesem Mechanismus können lineare oder verzweigte Ubiquitin-Konjugate am Zielprotein erzeugt werden. Dies führt je nach Anzahl der verknüpften Ubiquitin Moleküle zu einer entsprechenden Erhöhung der Masse des Proteins und einer verminderten Beweglichkeit im SDS-Gel.

Um zu überprüfen, ob das Bandenmuster von MADER im Western Blot auf unterschiedliche Ubiquitinierungsstufen des MADER Proteins zurückzuführen ist, wurden Zellen 4,5 Stunden mit Lactacystin, einem Inhibitor des Proteasoms, behandelt. Hierdurch sollte es zu einer verstärkten Ubiquitinierung und damit zu einer Änderung des Bandenmusters im Western Blot kommen. Als Kontrolle für die erfolgreiche Inhibition des Proteasoms wurde der Western Blot ebenfalls mit einem Antikörper gegen p53 inkubiert. Von diesem Tumorsuppressorprotein ist bekannt, dass es über das Proteasom abgebaut wird. Eine Inhibition des Proteasoms sollte deswegen zu einer Anhäufung des zellulären p53 Proteins führen.

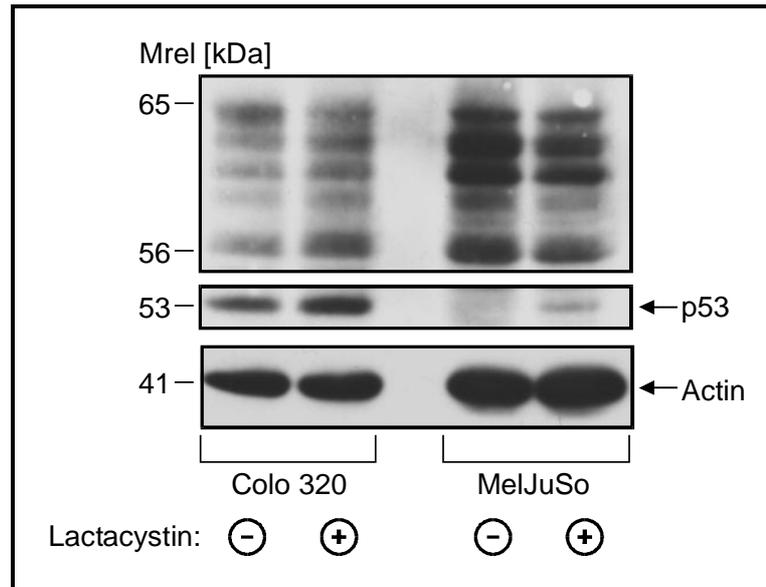


Abbildung 28: Inhibition des Proteasoms mit Lactacystin. Western Blot mit je 100 µg Gesamtproteinmenge
Blotting Antikörper: α -MADER 1C4; α -p53; α -Actin

In Abbildung 28 erkennt man, dass die Behandlung der Zelllinien Colo 320 DM (Kolonkarzinom) und MelJuSo (Melanom) mit Lactacystin keine Änderung des Bandenmusters ergibt. Die Zunahme des p53 Signals, trotz gleichem Actin-Signals, in den Spuren, die mit Lactacystin behandelt wurden, zeigt, dass die Proteasominhibition erfolgreich war. Dies belegt, dass Ubiquitinierung wohl keinen Beitrag zum Bandenmuster von MADER im Western Blot hat. Außerdem scheint der Abbau des MADER Proteins generell nicht über das Proteasom zu erfolgen, da es in den jeweiligen Spuren nicht zu einer Anhäufung des MADER-Proteins kommt. Dies ist auch bei einer längeren Inkubation (24 Stunden) mit Lactacystin nicht der Fall (Daten nicht gezeigt).

5.1.5.3 Überprüfung des Glykosylierungsstatus des MADER-Proteins

Nicht nur eukaryontische Oberflächenproteine sondern auch viele Kernproteine sind an Serin- oder Threonin-Resten über Sauerstoffbrücken kovalent mit dem Zucker N-Acetyl-Glukosamin verknüpft. In vielen Fällen geschieht dies an mehreren Positionen im gleichen Protein. Da sich hierbei, je nach Anzahl der verknüpften Zucker, das Molekulargewicht in Stufen erhöht, könnte auch Glykosy-

lierung eine mögliche Erklärung der beobachtbaren Banden von MADER im Western Blot sein. Um dies zu klären wurde ein MADER Immunpräzipitat im Western Blot mit einem biotinyliertem Lectin (Weizenkeim-Agglutinin), das eine hohe spezifische Affinität zu N-Acetyl-Glukosamin aufweist, inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von Streptavidin-Peroxidase (Abbildung 29).

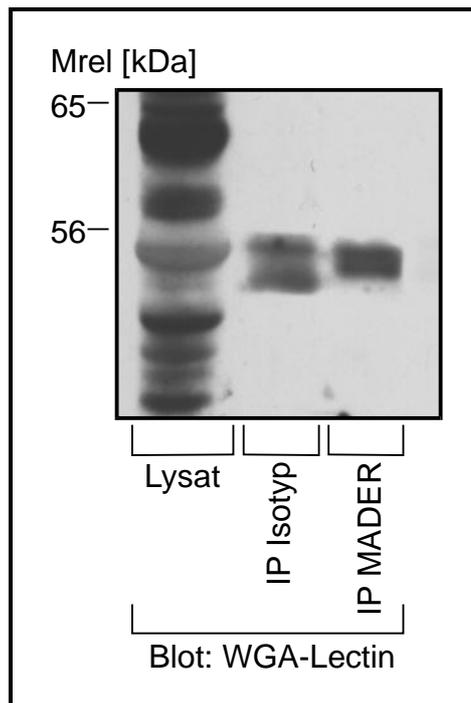


Abbildung 29: Glykosylierungstest durch Blotting eines MADER Immunpräzipitats mit Weizenkeimagglutinin
Präzipitationsantikörper: α -MADER 5H1; Isotyp FR4H12

Im resultierenden Blot (Abbildung 29) erkennt man neben der Reaktivität des Lectins WGA mit dem Gesamtzelllysat, das als Positiv-Kontrolle diente, nur eine Reaktion mit der schweren Kette des präzipitierenden MADER Antikörpers. Dies wird durch die Präzipitation mit einer Isotypkontrolle bestätigt. Das beobachtete Signal der schweren Ketten erklärt sich aus ihrer bekannten Glykosylierung. Dieses Ergebnis beweist, dass das MADER Protein nicht glykosyliert ist und das Bandenmuster deshalb auf anderen Ursachen beruhen muss.

5.1.5.4 Überprüfung des Phosphorylierungsstatus des MADER-Proteins

MADER weist in seiner Proteinsequenz 23 potentielle Phosphorylierungsstellen auf. Es ist bekannt, dass phosphorylierte Proteine eine verringerte Beweglichkeit im SDS-Gel zeigen, was seine Ursache vermutlich in einer größeren Hydratisierung der Phosphatreste hat. Aus diesem Grund erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die verschiedenen immunreaktiven Banden von MADER im Western Blot unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen entsprechen.

Um abschätzen zu können ob Phosphorylierung tatsächlich beteiligt ist, wurde das MADER Immunpräzipitat mit einer Phosphatase behandelt und danach auf veränderte Beweglichkeit im Western Blot hin untersucht. Die verwendete λ -Phosphatase weist dabei eine breite Wirkspezifität auf. Sie spaltet Phosphat-Gruppen sowohl von Serin-, als auch von Threonin und Tyrosin-Resten ab (Abbildung 30).

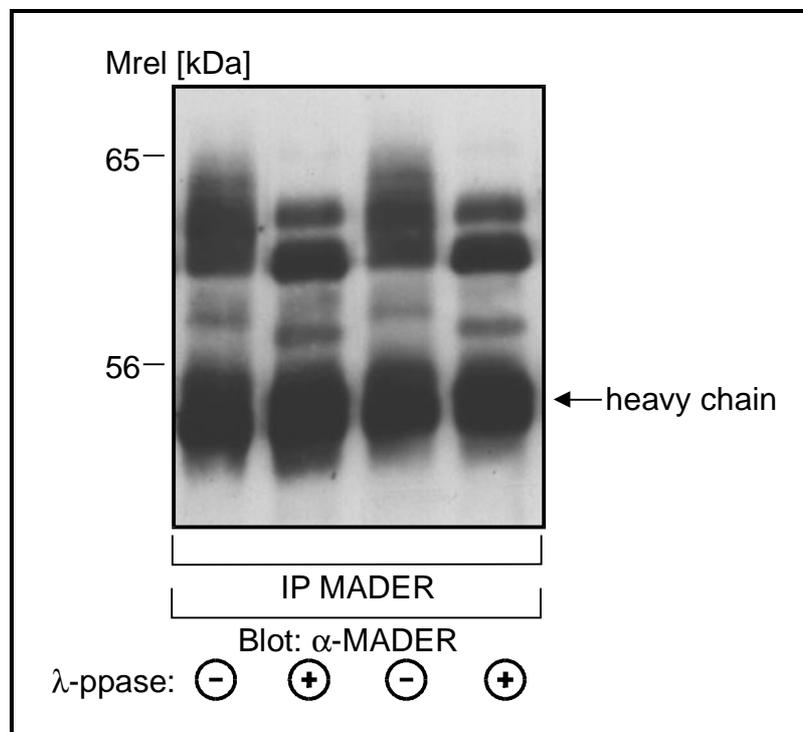


Abbildung 30: Phosphataseverdau des MADER-Immunpräzipitats und Analyse im Western Blot
Präzipitationsantikörper: α -MADER 5H1
Blotting Antikörper: α -MADER 1C4

In Abbildung 30 kann man feststellen, dass der durchgeführte Phosphatase-Verdau des MADER Immunpräzipitats tatsächlich einen Einfluss auf die relativen Beweglichkeiten der Banden im Western Blot hat. So laufen in der unverdauten Spur mehrere Banden zwischen 60 und 65 kDa. Nach dem Phosphatase-Verdau vereinen sich diese zu zwei stärkeren Banden. Außerdem fällt auf, dass eine Bande bei ca. 58 kDa in der unverdauten Gelspur nach dem Verdau eine größere Mobilität im SDS-Gel besitzt und jetzt bei einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 57 kDa läuft. Dies zeigt, dass Phosphorylierung definitiv am beobachteten Bandenmuster von MADER im Western Blot beteiligt ist.

Um genauere Aussagen über die phosphorylierten Reste im MADER Protein zu erhalten, wurde ein MADER-Immunpräzipitat im Western Blot mit Antikörpern gegen Phospho-Serin, Phospho-Threonin und Phospho-Tyrosin inkubiert.

Abbildung 31 zeigt das Experiment mit den Antikörpern gegen Phospho-Threonin und Phospho-Tyrosin.

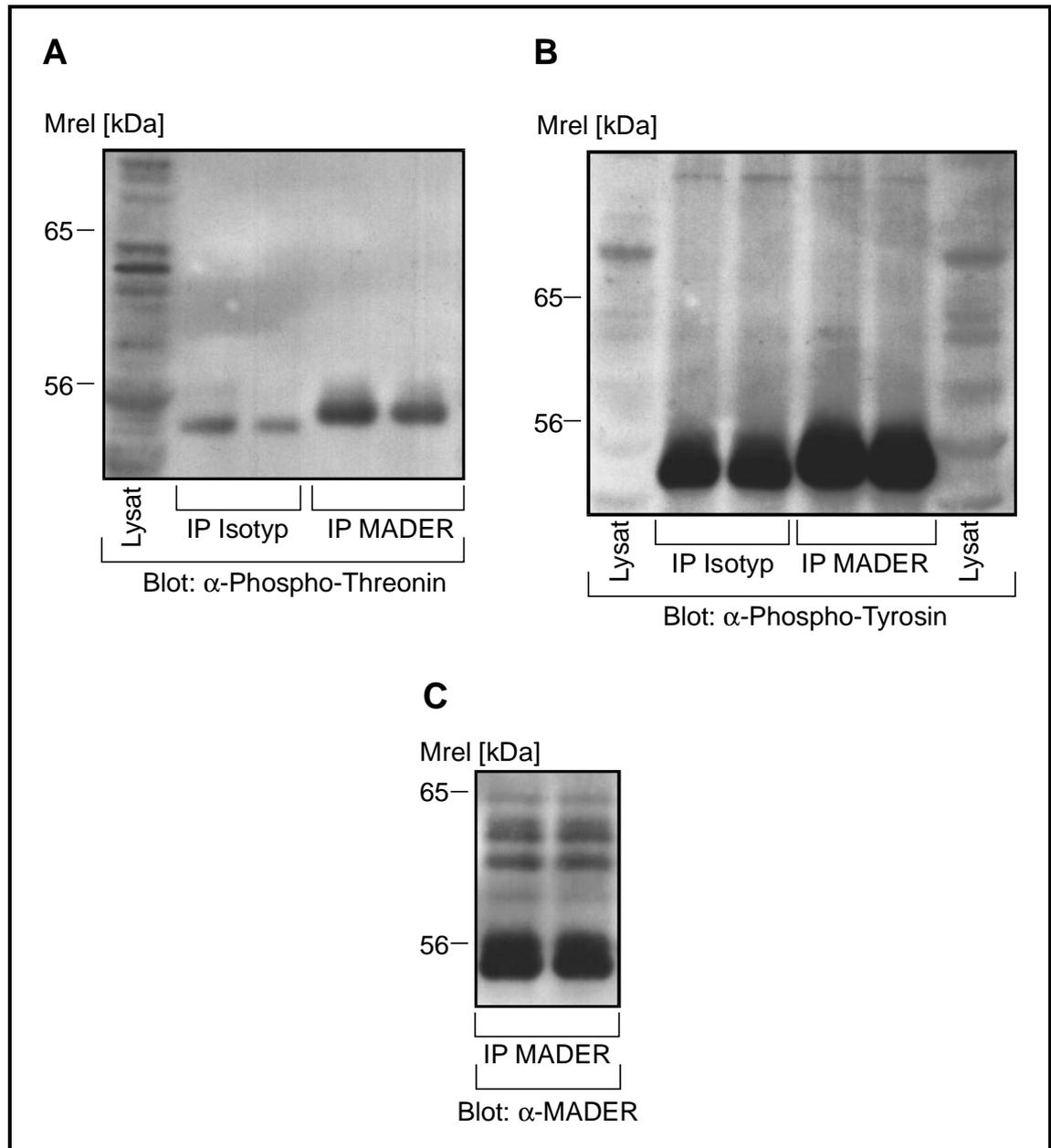


Abbildung 31: Inkubation des MADER Immunpräzipitats mit Antikörpern gegen Phospho-Threonin (A), Phospho-Tyrosin (B) und MADER (C)
 Präzipitationsantikörper: α -MADER 5H1; Isotyp FR4H12
 Blotting Antikörper: α -MADER 1C4; α -Phospho-Threonin; α -Phospho-Tyrosin

Als Ergebnis des durchgeführten Experiments erkennt man, dass weder Antikörper gegen Phospho-Threonin (A) noch gegen Phospho-Tyrosin (B) ein anderes Signal als das der schweren Kette des präzipitierenden Antikörpers liefern. Dies wird durch die Präzipitation mit einem Isotypantikörper bestätigt. Die jeweiligen Antikörper reagieren jedoch mit mehreren Banden eines Gesamtzelllysats, das als

Positivkontrolle diene. Die Inkubation des gleichen Immunpräzipitats mit dem MADER Antikörper (C) zeigt hingegen die bekannten Banden zwischen 56 und 65 kDa. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass die Phosphorylierung des MADER-Proteins keine Threonin- oder Tyrosin Reste betrifft.

Führt man dasselbe Experiment mit Antikörper gegen Phospho-Serin Reste durch, so ergibt sich folgendes Bild (Abbildung 32):

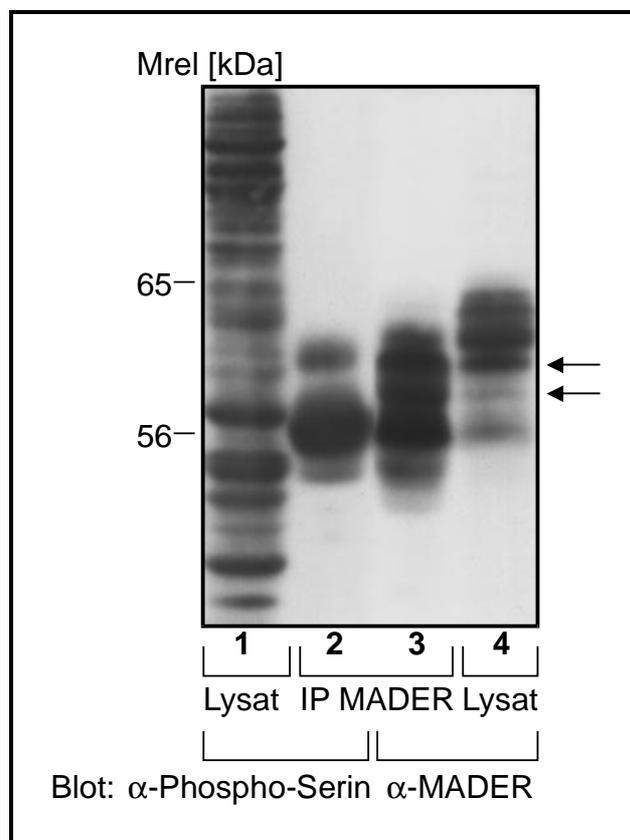


Abbildung 32: Inkubation des MADER Immunpräzipitats mit Antikörper gegen Phospho-Serin und MADER Präzipitationsantikörper: α -MADER 5H1
Blotting Antikörper: α -MADER 1C4; α -Phospho-Serin

In Spur 2 des resultierenden Blots ist eine deutliche Reaktion des MADER Immunpräzipitats mit den Anti-Phospho-Serin Antikörpern zu sehen. Im Vergleich mit den Spuren 3 und 4 in denen das MADER Immunpräzipitat beziehungsweise ein Gesamtzelllysate mit dem MADER Antikörper inkubiert wurde, erkennt man

zumindest zwei gemeinsame Banden, die eine Serin-Phosphorylierung aufweisen (Pfeile in Abbildung 32).

Trennt man ein Gesamtzelllysats in die Cytoplasma- und Kernfraktion und setzt diese in einen Western Blot mit einem MADER Antikörper ein, so erhält man interessanterweise die Anreicherung einer Bande in der Kernfraktion (Pfeil in Abbildung 33), die ebenfalls ein Signal mit den Phospho-Serin Antikörpern lieferte (vgl. erster Pfeil von oben in Abbildung 32).

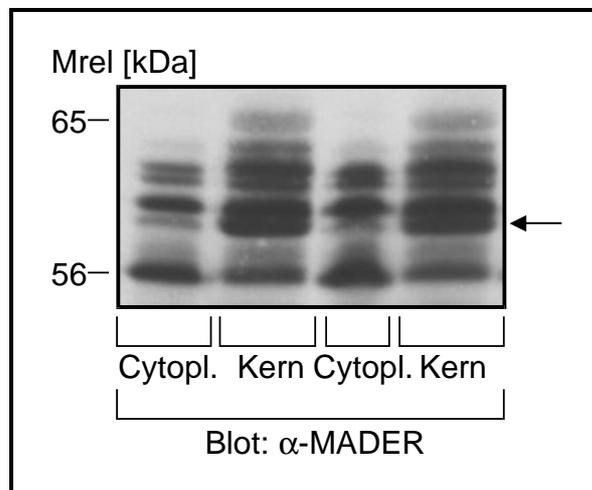


Abbildung 33: Western Blot der Trennung eines Gesamtzelllysats in die Cytoplasma- und Kernfraktion
Aufgetragene Gesamtproteinmenge: je 100 µg
Blotting Antikörper: α-MADER 1C4

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Banden zwischen 56 und 65 kDa, die man im MADER Western Blot stets erhält, zumindest teilweise auf Serin-Phosphorylierungen des MADER-Proteins zurückzuführen sind. Da sich eine dieser Banden in der Kernfraktion anreichert, scheint der Kernimport mit einer erhöhten Serin-Phosphorylierung des MADER-Proteins einherzugehen.

5.1.6 Konservierung der MADER Expression

Bisherige Untersuchungen zeigten eine ubiquitäre Verteilung der MADER Expression in allen getesteten menschlichen Zelllinien. Um zu überprüfen, ob eine MADER Expression auch in Zellen anderer Spezies nachzuweisen ist, wurden vier nicht menschliche Zelllinien (Affe, Ratte, Hamster, Maus) zunächst in der RT-PCR mit Primern, die der humanen Sequenz entsprachen, auf Vorhandensein der MADER mRNS hin untersucht (Abbildung 34).

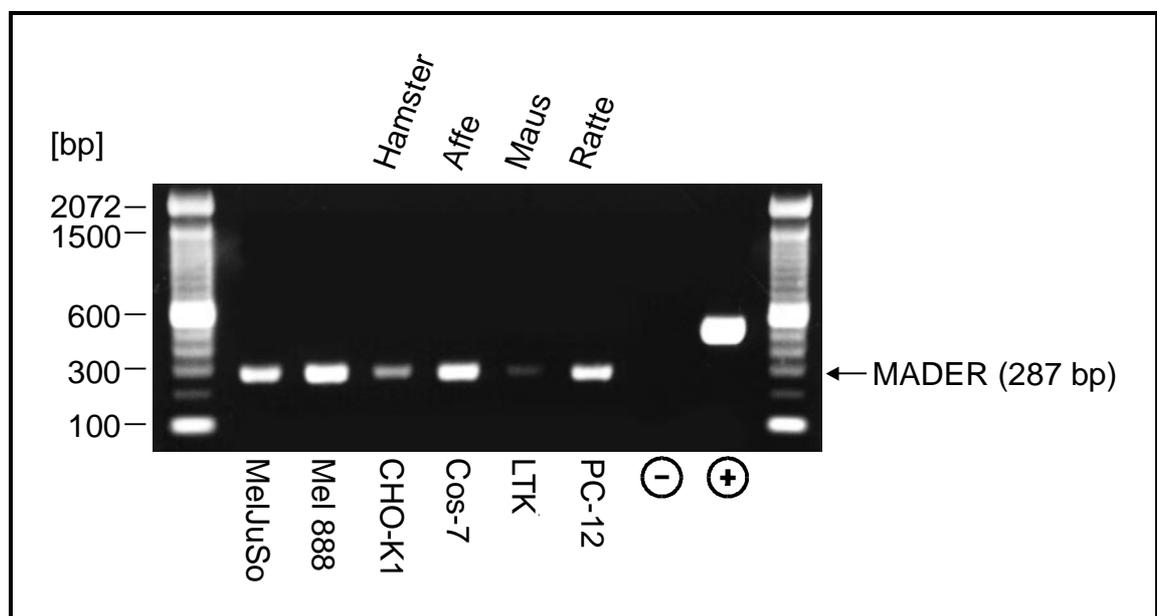


Abbildung 34: MADER RT-PCR von nicht-menschlichen Zelllinien

Die Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR lässt erkennen, dass neben den menschlichen Zelllinien Mel 888 und MelJuSo auch Zellen der anderen Spezies die MADER mRNS aufweisen.

Um die Frage zu beantworten, ob die MADER Antikörper auch mit dem Protein der nicht menschlichen Spezies reagieren, wurde zunächst eine cytoplasmatische Immunfluoreszenz durchgeführt und durchflusszytometrisch ausgewertet (Abbildung 35).

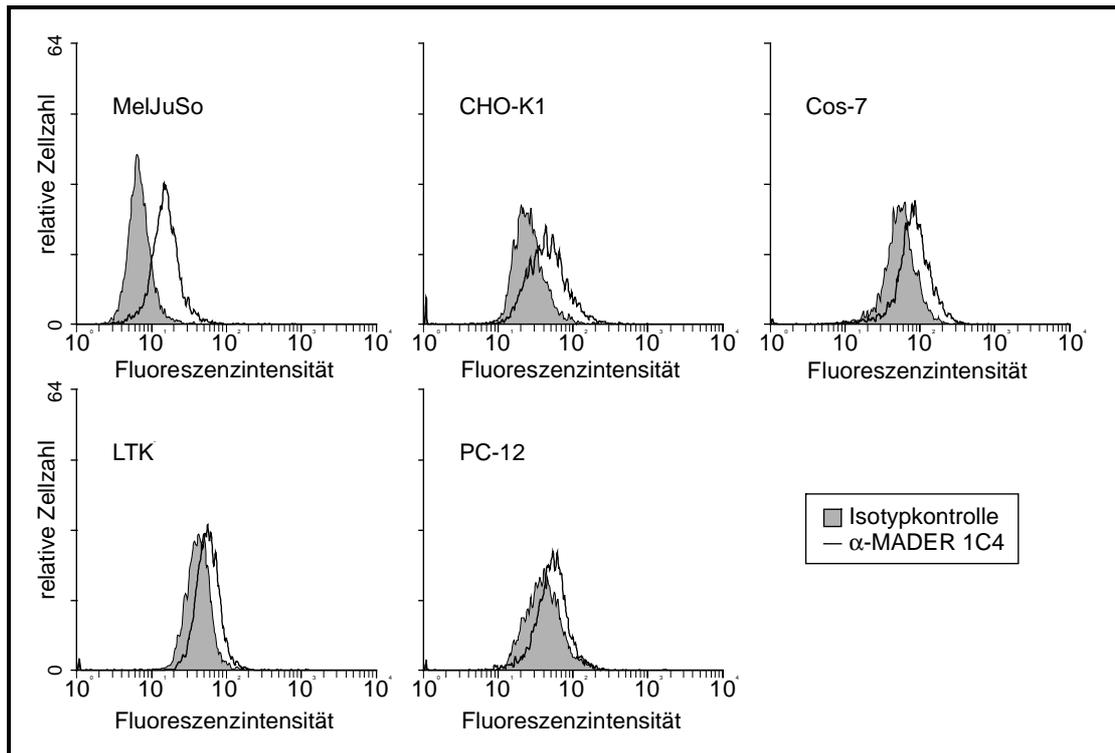


Abbildung 35: FACS-Analyse der MADER Expression in nicht menschlichen Zelllinien
Isotypantikörper: FR4H12

Die FACS-Analyse ergab, dass die MADER Antikörper auch das MADER Protein der Spezies Affe, Ratte, Hamster und Maus erkennen. Die Reaktivität ist dabei jedoch deutlich geringer als mit dem menschlichen MADER der Melanomzelllinie MelJuSo (Abbildung 35). Dies könnte entweder auf eine geringere Expression von MADER in den untersuchten Zellen dieser Spezies hindeuten, oder auf eine geringere Affinität der MADER Antikörper gegenüber dem nichtmenschlichen Protein. Da die Zellen der nichtmenschlichen Spezies auch in der RT-PCR geringere Signalintensitäten lieferten, spricht dies allerdings für eine geringere Expression von MADER in diesen Zellen.

Um die biochemischen Eigenschaften des MADER-Proteins in den nichtmenschlichen Zelllinien zu untersuchen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Zum Ausgleich unterschiedlicher Expressionsstärke von MADER in den einzelnen Spezies wurden dabei verschiedene Mengen Gesamtzelllysat aufgetragen (Abbildung 36).

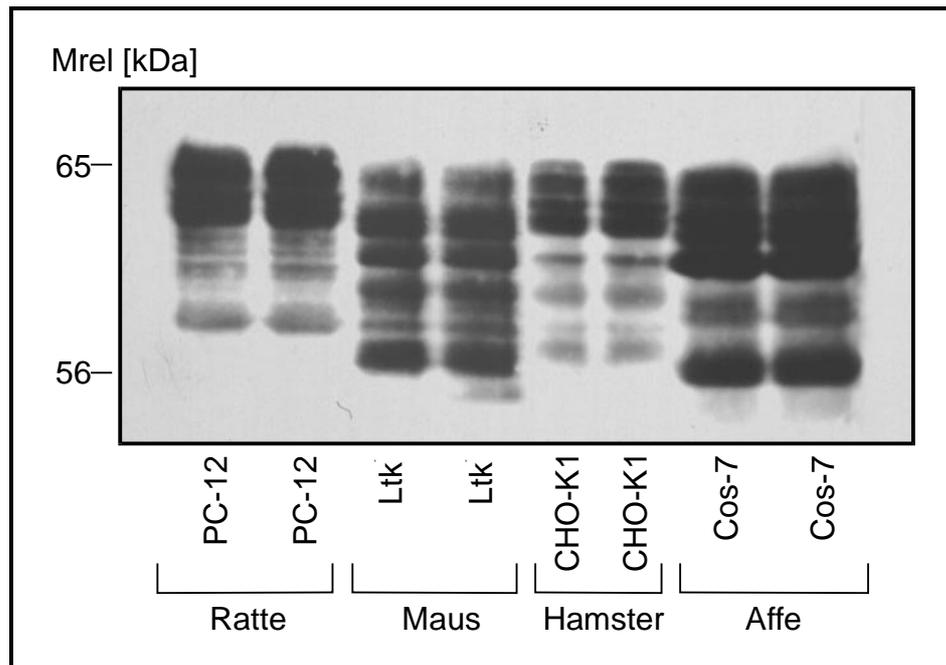


Abbildung 36: MADER Western Blot der nichtmenschlichen Zelllinien
 Aufgetragene Gesamtproteinmenge: PC-12 und Ltk: 150 μ g; Cos-7 und CHO-K1: 120 μ g
 Blotting Antikörper: α -MADER 1C4

Der MADER Western Blot von Gesamtzelllysaten der nichtmenschlichen Zelllinien (Abbildung 36) liefert auch hier mehrere immunreaktive Banden. Das Bandenmuster zwischen den Spezies unterscheidet sich jedoch teilweise deutlich voneinander. So läuft das MADER-Protein der Zelllinien PC-12 und CHO-K1 bei höheren Molekulargewichten. Außerdem scheint die Anzahl der Banden zwischen den Spezies verschieden zu sein. Dies könnte auf verschiedene posttranslationale Modifizierungen oder Sequenzunterschiede von MADER hinweisen. Das Muster der Affenzelllinie Cos-7 entspricht dabei dem der zuvor untersuchten menschlichen Zelllinien (vgl. Abbildung 26).

Da der letzte gemeinsame Vorfahre von Mensch, Affe, Ratte, Hamster und Maus vor ca. 105 Millionen Jahre lebte scheint MADER ein in der Evolution hoch konserviertes Protein darzustellen. Dies deutet auf eine äußerst wichtige Funktion von MADER hin.

5.2 Regulation der MADER Expression

5.2.1 MADER Protein Expression in Zelllinien

Auf immunhistochemischen Färbungen von Geweben zeigte die MADER Protein Expression eine starke Melanomassoziation (siehe Abbildung 3). Da sich Expressionsstudien in Zelllinien leichter gestalten, musste zunächst überprüft werden, ob sich auch dort eine Melanomassoziation der MADER Protein Expression feststellen lässt.

Aus diesem Grund wurden 20 Zelllinien verschiedenen Ursprungs im Western Blot auf ihre MADER Protein Menge getestet und die densitometrisch ermittelten Werte in Abbildung 37 aufgetragen.

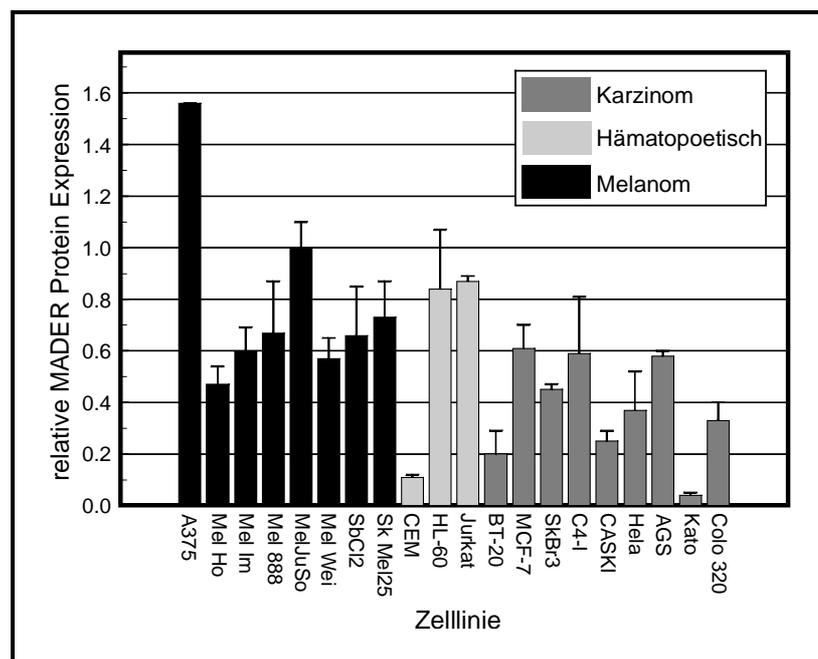


Abbildung 37: Durchschnittliche MADER Protein Expression in verschiedenen Zelllinien (Ursprung der Zelllinien: siehe 3.7.1)

Die Werte erhielt man, indem jeweils 100 µg Gesamtzelllysat auf das SDS Gel auftrug. Die Normalisierung auf die tatsächlich pro Spur geladene Proteinmenge erfolgte zusätzlich mit der India-Ink gefärbten Transfermembran. Alle Zelllinien

wurden überdies mindestens zweimal auf ihre MADER Expression hin untersucht. Abbildung 38 zeigt beispielhaft einen der durchgeführten Western Blots mit der India-Ink gefärbten Membran als Auftragskontrolle.

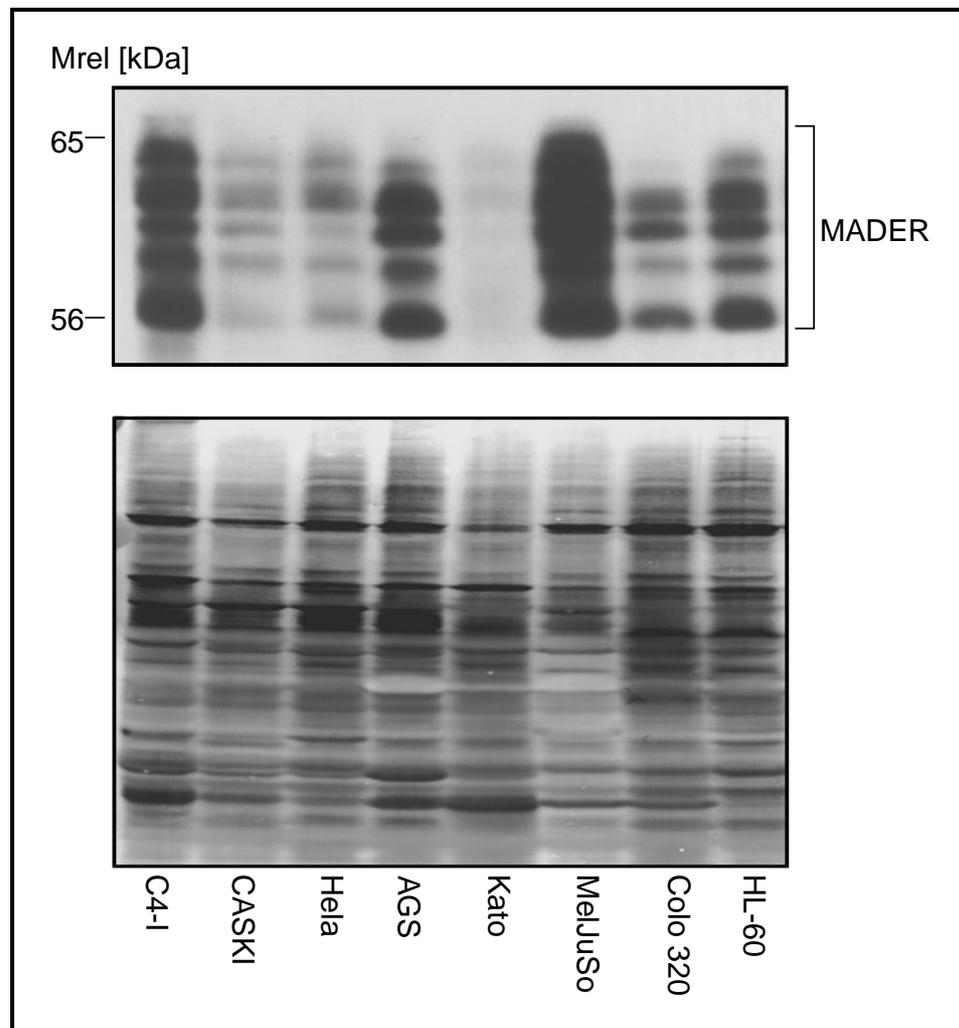


Abbildung 38: Beispiel eines MADER Western Blots (oben) von verschiedenen Zelllinien mit India-Ink Auftragskontrolle (unten)

Aufgetragene Gesamtproteinmenge: je 100 μ g; Blotting Antikörper: α -MADER 1C4

In Abbildung 37 erkennt man, dass auch die MADER Protein Expression der Melanomzelllinien im Mittel über der der untersuchten Karzinomzelllinien liegt. Den größten MADER Protein Level zeigen dabei A375 und MelJuSo. Eine ähnlich hohe MADER Protein Expression erkennt man bei zwei der drei getesteten hämatopoetischen Zelllinien. Dies bestätigt, dass auch auf der Ebene der Zelli-

nien eine Melanomassoziiierung der MADER Protein Expression vorliegt. In Abbildung 38 wird zusätzlich deutlich, dass alle Zelllinien dabei im Western Blot die gleichen bekannten Banden zwischen 56 und 65 kDa liefern.

5.2.2 Vergleich der MADER Protein und mRNA Expression

Die Expression des MADER Proteins zeigt, sowohl auf Geweben, als auch in Zelllinien eine deutliche Melanomassoziiierung. Für die gesteigerte MADER Protein Expression dieser Zellen kommen zwei Möglichkeiten in Frage. Einerseits könnte in den Melanomzellen eine erhöhte Menge der MADER mRNA vorhanden sein (Regulation auf der mRNA Ebene) oder das MADER Protein besitzt dort eine größere Stabilität (Regulation auf der Proteinebene).

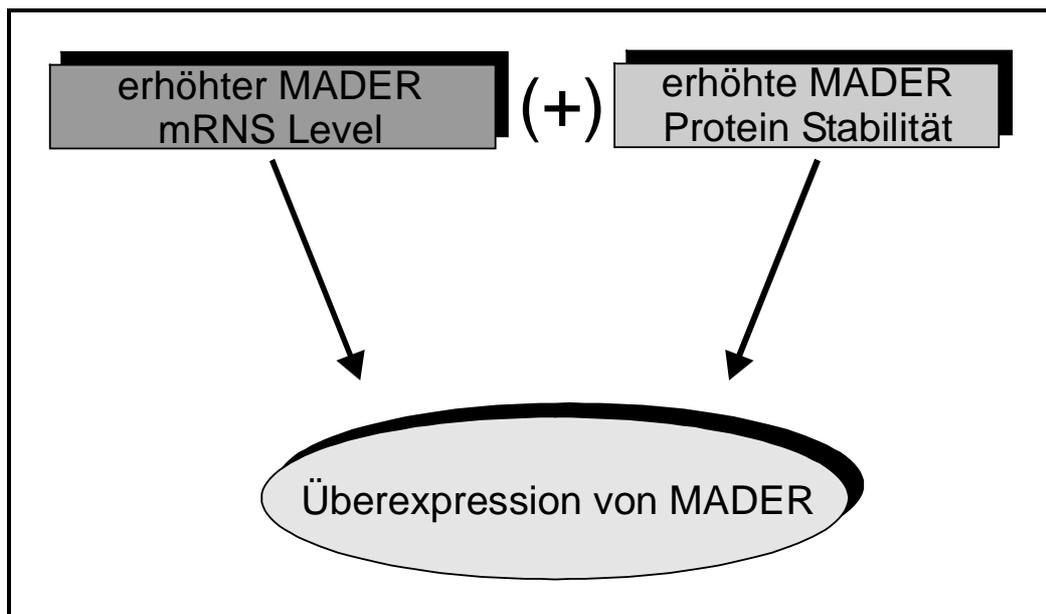


Abbildung 39: Mögliche Gründe für die Überexpression des MADER Proteins in den Melanomzellen

Um zu untersuchen, ob die Regulation der MADER Expression auf Protein- oder mRNA-Ebene erfolgt, wurden aus verschiedenen Zelllinien gleichzeitig Gesamt-Protein und Gesamt-RNS präpariert und ihre Expression im Western- beziehungsweise Northern-Blot miteinander verglichen (Abbildung 40, Abbildung 41).

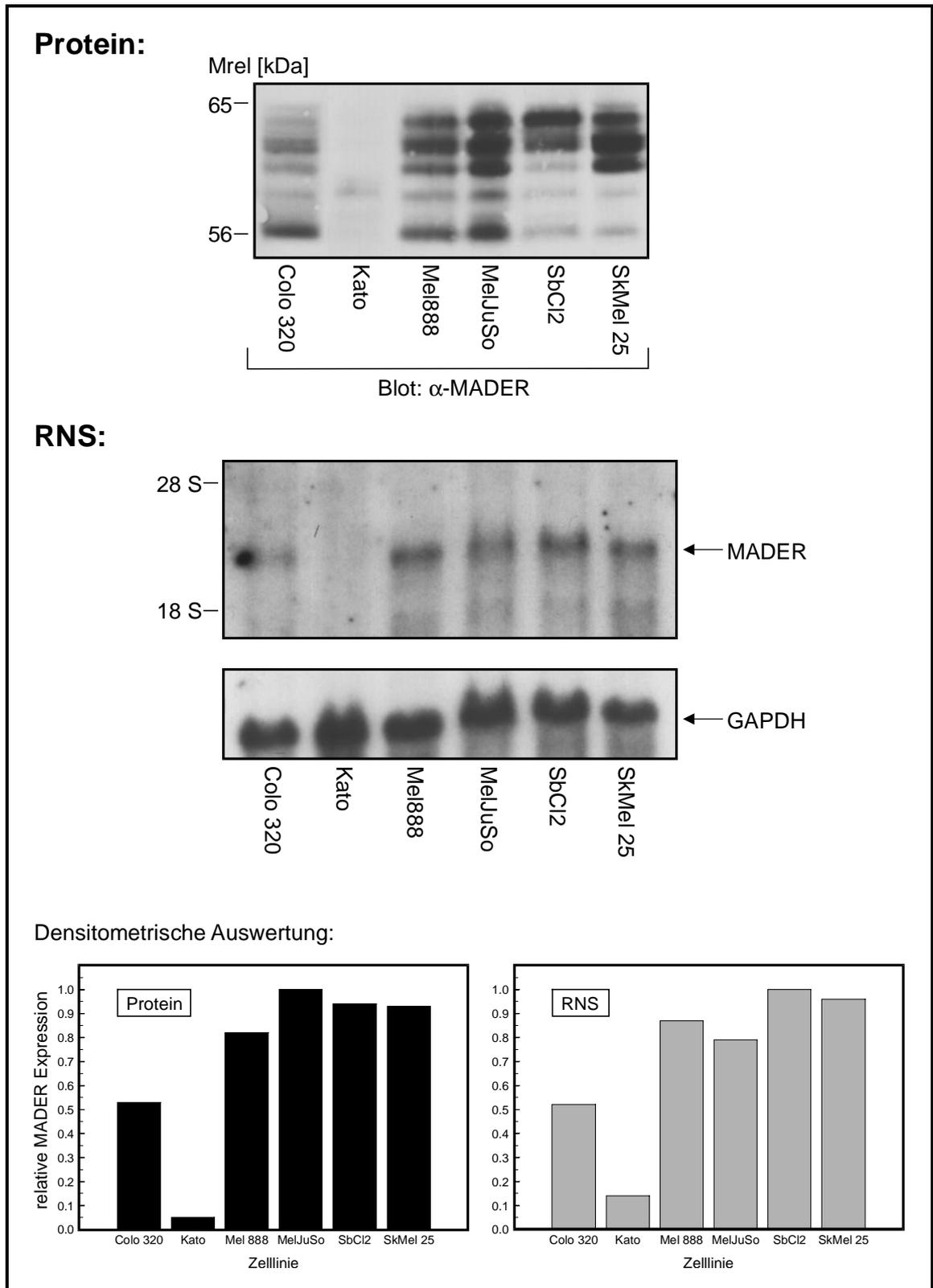


Abbildung 40: Vergleich der MADER Expression im Western- und Northern Blot (1)
 Aufgetragene Proteinmenge: je 100 μ g; Aufgetragene RNS-Menge: je 30 μ g
 Blotting Antikörper: α -MADER 1C4; Northern Blot-Sonde: MADER PfIMI-cDNS Fragment (819 bp)

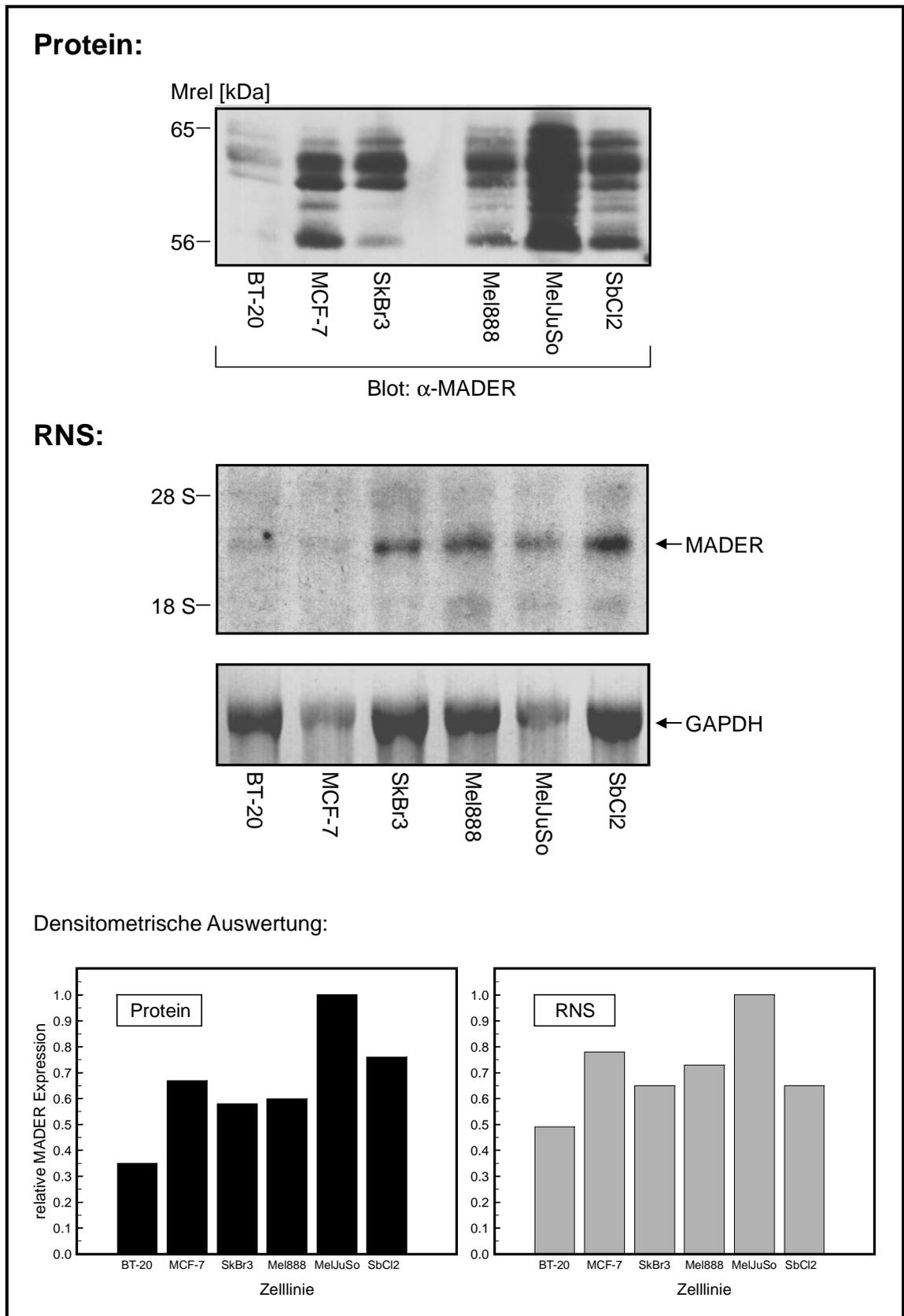


Abbildung 41: Vergleich der MADER Expression im Western- und Northern Blot (2)
 Aufgetragene Proteinmenge: je 100 μ g; aufgetragene RNS Menge: je 30 μ g; Blotting Antikörper: α -MADER 1C4
 Northern Blot-Sonde: MADER PfIMI-cDNS Fragment (819 bp)

Die densitometrischen Auswertungen der durchgeführten Western- und Northern-Blots ergibt eine gute Korrelation zwischen der MADER Protein- und mRNA-Menge in den jeweiligen Zelllinien.

Da die MADER mRNA in den Zellen eine sehr geringe Expression aufzuweisen scheint, waren die Northern Blots zum Teil nur unter großen Schwierigkeiten auszuführen und meist schwierig zu quantifizieren. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des Quantum RNA™ Kits (Ambion) eine quantitative MADER RT-PCR etabliert. Hierzu musste zunächst der lineare Bereich dieser PCR durch serielle Verdünnungen der eingesetzten RNS bei unveränderter Zyklenzahl bestimmt werden (Abbildung 42).

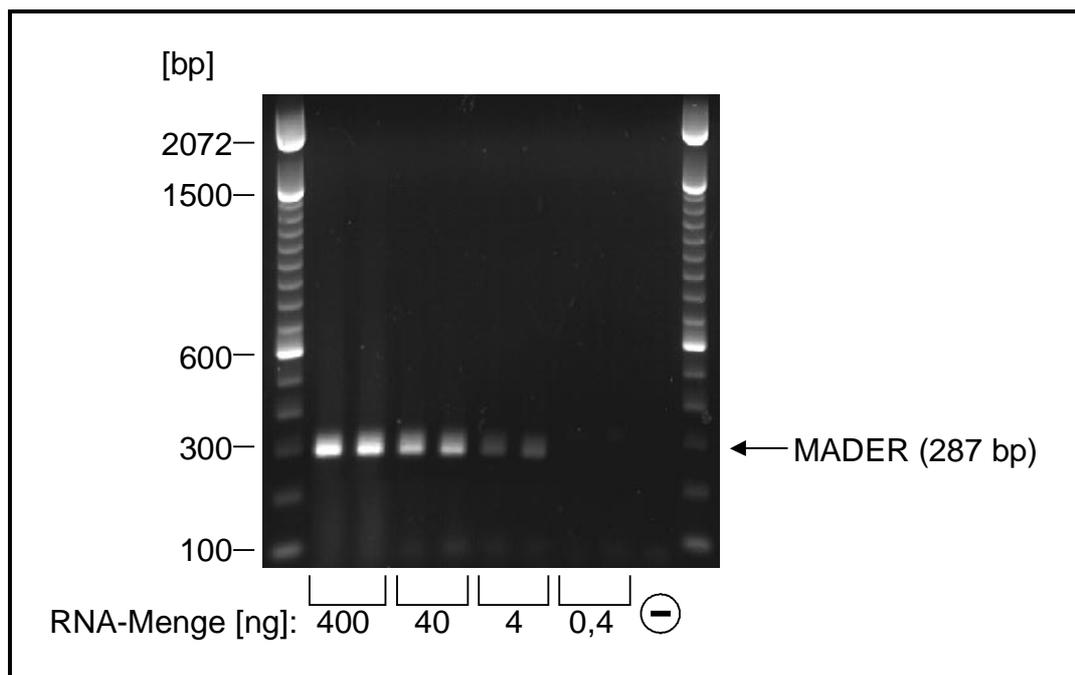


Abbildung 42: Test des linearen Bereiches der MADER RT-PCR (30 Zyklen) durch serielle RNS-Verdünnungen

Die densitometrisch ermittelten Signalintensitäten wurden in der Folge in einem Diagramm gegen die eingesetzte RNS Menge aufgetragen um den Verlauf der MADER RT-PCR und damit ihren linearen Bereich abschätzen zu können (Abbildung 43).

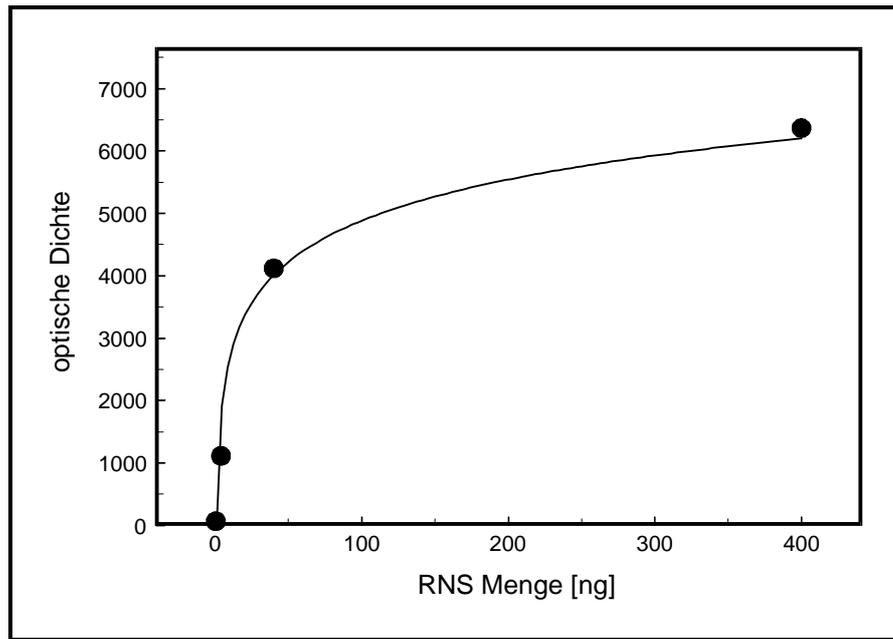


Abbildung 43: Graphische Darstellung des Verlaufs der MADER RT-PCR

Der Abbildung 43 kann man entnehmen, dass die MADER RT-PCR bis zu einer eingesetzten RNS-Menge von etwa 30 ng im linearen Bereich bleibt und dann in einen Sättigungsbereich übergeht.

Um die Unterschiede in der Amplifikation zwischen verschiedenen Reaktionsgefäßen oder in der, auf das Agarose-Gel aufgetragenen, Menge auszugleichen wurde die 18 S ribosomale RNS als endogener Standard in einer multiplex PCR mitamplifiziert. Für quantitative Aussagen muss die Expression dieses endogenen Standards etwa der MADER-Expression entsprechen. Um dies zu erreichen wurden die 18 S Primer mit einer zunehmenden Menge an 18 S CompetimernTM versetzt und das resultierende Signal mit dem von MADER verglichen. Bei den Competimern handelt es sich um modifizierte 18S Primer, deren 3'-Ende blockiert ist, so dass die Taq-Polymerase sie nicht verlängern kann.

Bei der Durchführung des Versuchs wurden zwei cDNS Verdünnungen (RNS-Menge 20 ng und 2 ng) des zuvor bestimmten linearen Bereiches verwendet (Abbildung 44).

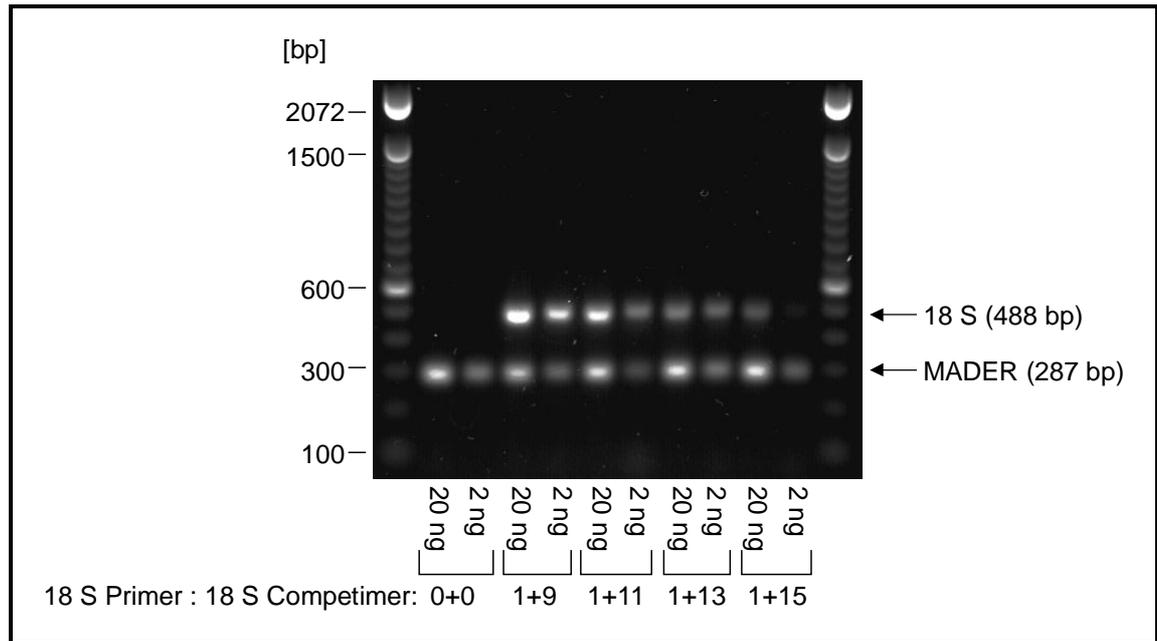


Abbildung 44: Angleichung des 18 S Signals an das MADER Signal in der RT-PCR (30 Zyklen)

In der Abbildung 44 wird deutlich, dass erst bei einem Verhältnis von 1+11 Primer : Competimer das 18 S Signal etwa dem von MADER in der RT-PCR entspricht. Für alle durchgeführten quantitativen MADER RT-PCR Versuche wurden deshalb 20 ng RNS und ein 18S Primer : Competimer Verhältnis von 1+11 eingesetzt.

Mit Hilfe der, auf diese Weise etablierten, quantitativen MADER RT-PCR wurden in der Folge neun Zelllinien abermals auf ihre MADER mRNS und Proteinexpression hin untersucht. Aus den 20 zuvor getesteten Zelllinien wurden dabei diejenigen Melanom- und Karzinomzelllinien ausgewählt, die eine auffällig hohe, beziehungsweise niedrige MADER Expression aufwiesen. Um zu zeigen, dass dabei etwa gleiche Mengen Protein auf das SDS Gel geladen wurden, erfolgte zusätzlich eine Inkubation der Transfermembran mit einem Antikörper gegen Aktin. Die Amplifikation einer MADER cDNS in der PCR diente als Positivkontrolle für die richtige Größe der entstandenen MADER Signale (Abbildung 45).

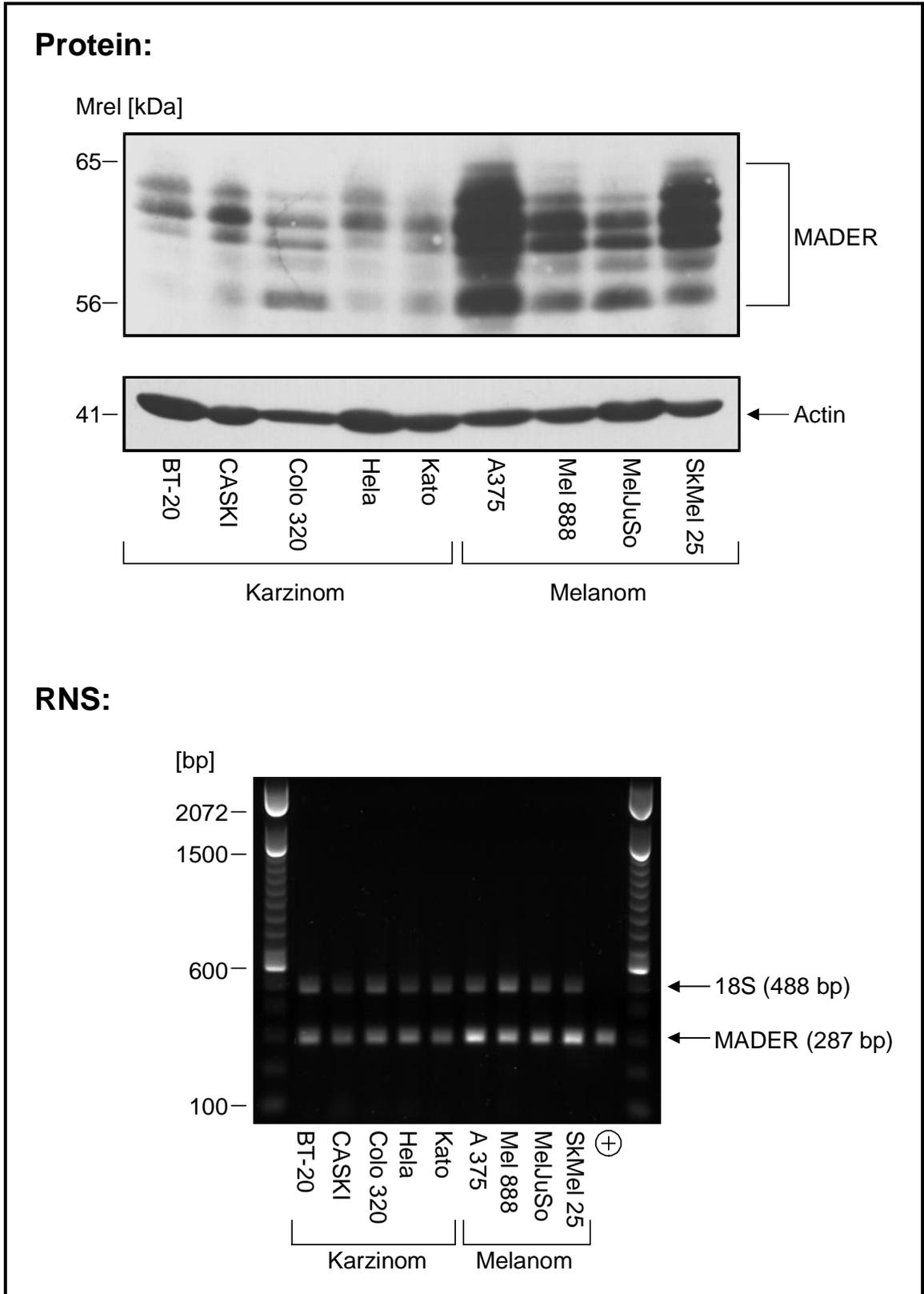


Abbildung 45: Vergleich der MADER Expression im Western Blot und der quantitativen RT-PCR
 +: MADER cDNS; Aufgetragene Gesamtproteinmenge: je 100 µg; Blotting Antikörper: α-MADER 1C4; α-Actin

Als Ergebnis von Abbildung 45 erkennt man, dass die Melanomzelllinien, die die höhere MADER Proteinexpression aufweisen als die Karzinomzelllinien, auch die stärkeren Signale in der quantitativen RT-PCR liefern. Die Zelllinien A375 und SkMel 25 zeigen dabei in beiden Analysen die höchste MADER-Expression. Zusammen mit den Ergebnissen der Northern Blots beweist dies, dass der Grund der Überexpression von MADER in den Melanomzellen hauptsächlich auf einem erhöhten mRNA Level beruht.

5.2.3 Stabilität der MADER mRNA

Die durchgeführten Experimente belegen, dass die Regulation der MADER Expression auf der Ebene der mRNA erfolgt. Dies könnte seine Ursache entweder in einer erhöhten Transkription des MADER Gens oder in einer größeren Stabilität der MADER mRNA haben (Abbildung 46).

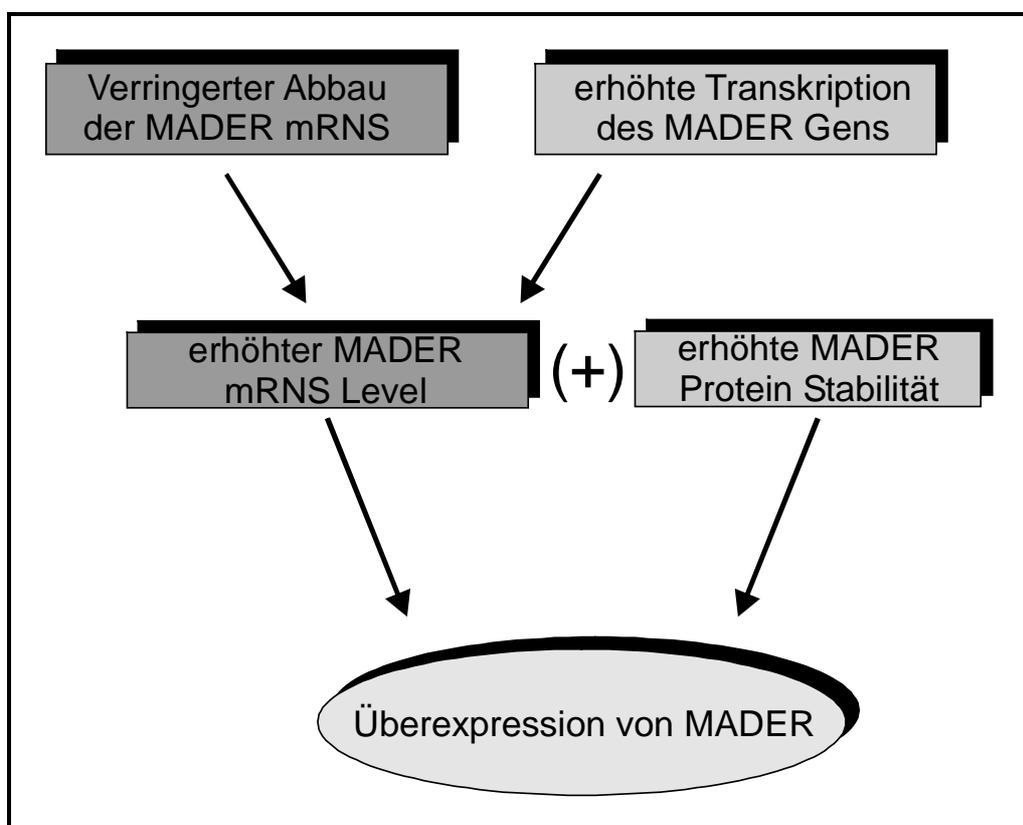


Abbildung 46: Mögliche Gründe für einen hohen MADER mRNA Level

Um diesen Punkt näher zu beleuchten wurde die Halbwertszeit der MADER mRNS in zwei Zelllinien (MelJuSo und Colo 320), die eine hohe, beziehungsweise geringe MADER Expression aufweisen, bestimmt. Um die Zellen zu synchronisieren erfolgte hierzu eine zweieinhalbstündige Vorstimulation der Zellen mit 20 % FCS. In der Folge wurden sie dann über verschiedene Zeiten dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D ausgesetzt. Die Analyse der MADER mRNS zu diesen Zeitpunkten erfolgte mit der quantitativen RT-PCR.

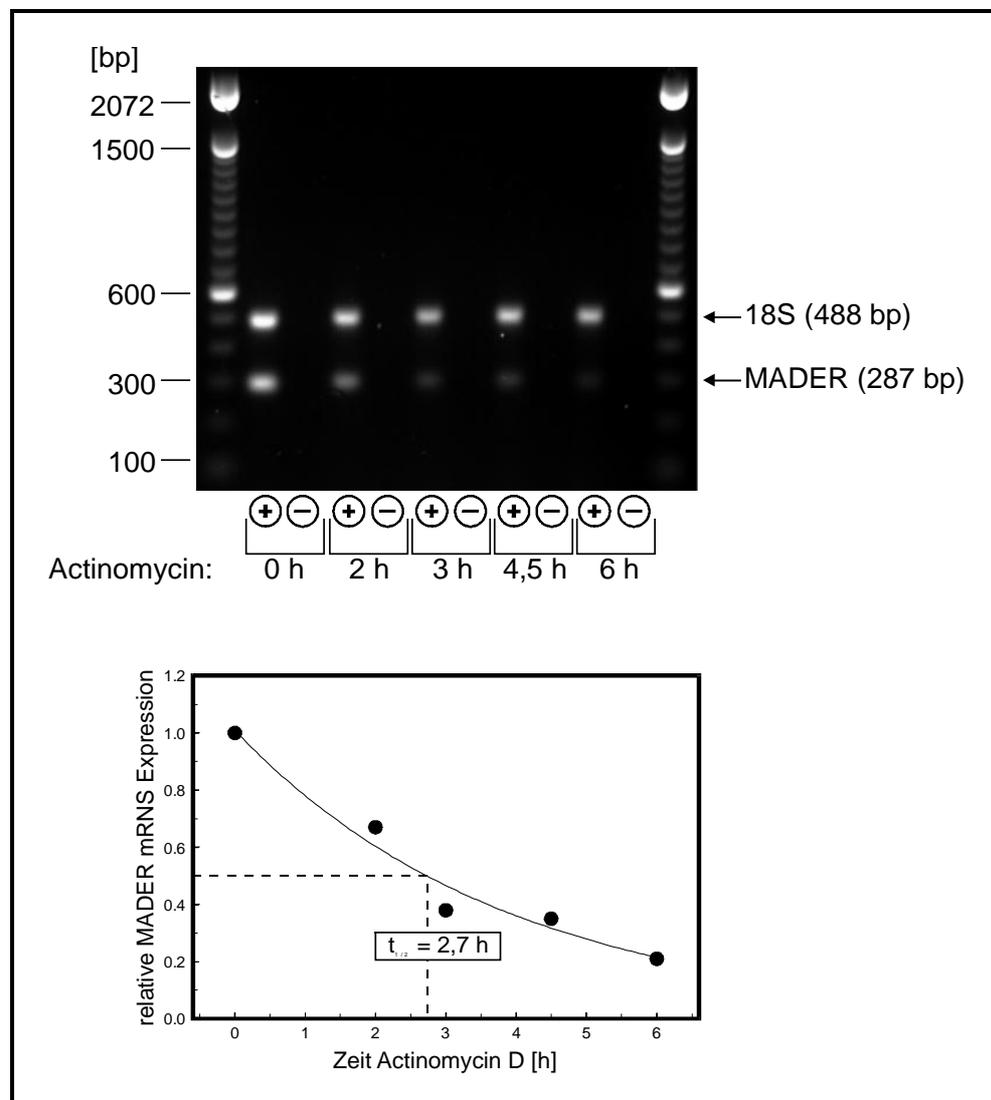


Abbildung 47: Bestimmung der MADER mRNS Halbwertszeit der Melanomzelllinie MelJuSo
+/-: Reverse Transkription mit / ohne Reverse Transkriptase

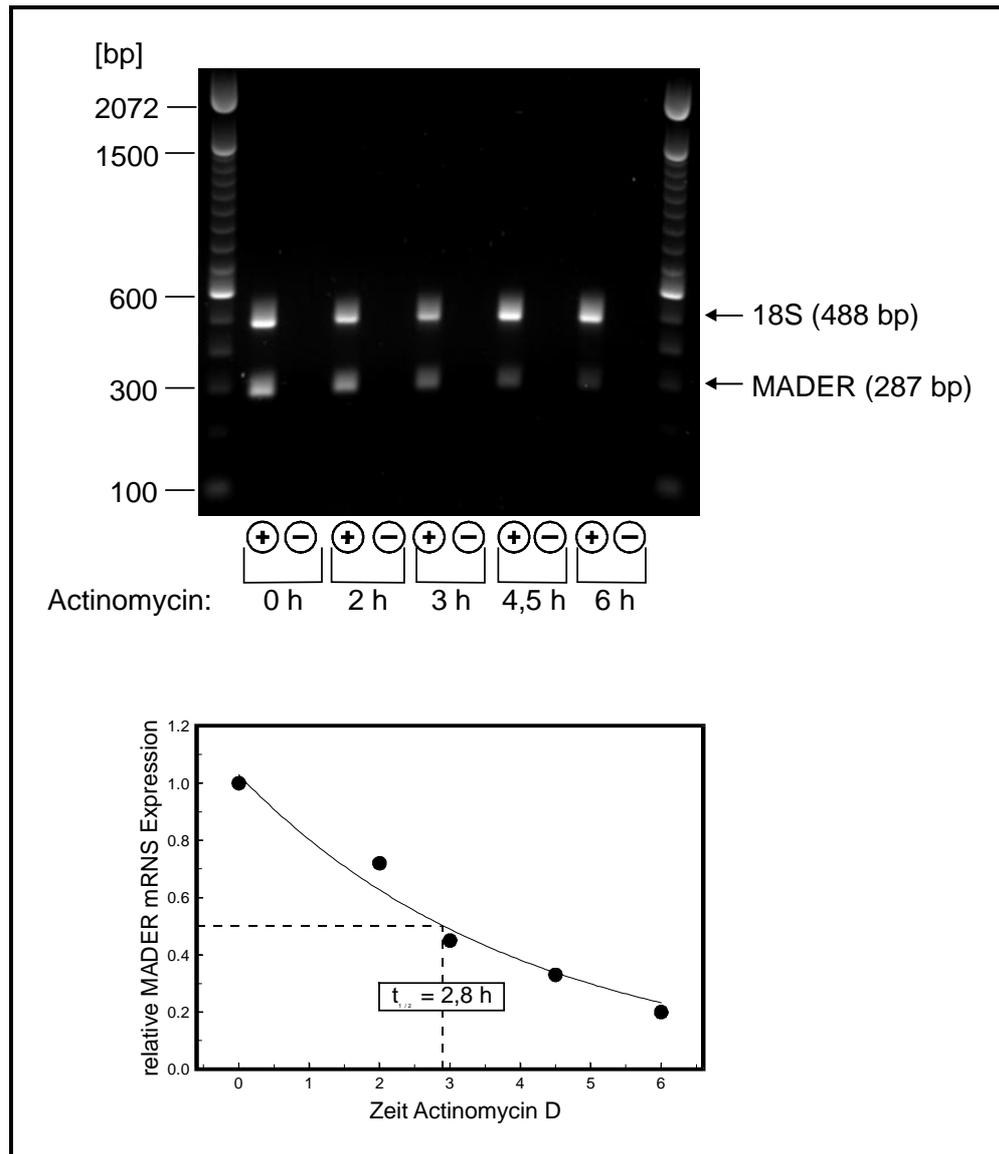


Abbildung 48: Bestimmung der MADER mRNA Halbwertszeit der Karzinomzelllinie Colo 320
+/-: Reverse Transkription mit / ohne Reverse Transkriptase

Die densitometrischen Werte der erhaltenen, normalisierten MADER Signale wurden gegen die verstrichene Zeit nach Actinomycin-Zugabe aufgetragen. Aus der berechneten Ausgleichskurve vom Typ $y = a * e^{-b * x}$ konnte die Halbwertszeit nach $t_{1/2} = \ln 2 / b$ berechnet werden. In Abbildung 47 und Abbildung 48 sieht man, dass die Halbwertszeit in beiden untersuchten Zelllinien unabhängig von der Höhe ihrer MADER mRNA Expression etwa den gleichen Wert (MelJuSo 2,7 h; Colo 320 2,8 h) aufweist. Dies beweist, dass die MADER-Überexpression

in den Melanomzellen nicht auf einer größeren Stabilität der MADER mRNS sondern nur auf einer erhöhten Transkription beruht.

Im Mittel aller durchgeführten Experimente (n=4) ergab sich die MADER mRNS-Halbwertszeit zu 2,6 +/- 0,1 h

5.2.4 Stabilität des MADER Proteins

Mit Hilfe der gezeigten Experimente konnte nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass zusätzlich die Proteinstabilität neben einer erhöhten Transkription einen geringen Einfluss auf die MADER Expression besitzt. Um dies zu überprüfen wurden PMA-Stimulationen der Zelllinien MelJuSo (hohe MADER Expression) und Colo 320 (geringe MADER Expression) durchgeführt. Aus Untersuchungen von Kirsch (1996) war bekannt, dass es sich bei MADER um ein aktivierbares Gen handelt. Eine Behandlung der Zelllinien MelJuSo und SkMel 2 mit dem Phorbolster PMA führte dabei zu einer deutlichen Erhöhung der MADER mRNS Expression, die nach zwei Stunden ihr Maximum erreichte. Nach vier Stunden nahm die Expression um etwa 50% ab und lag nach sechs Stunden fast wieder auf ihrem Basallevel (Abbildung 49).

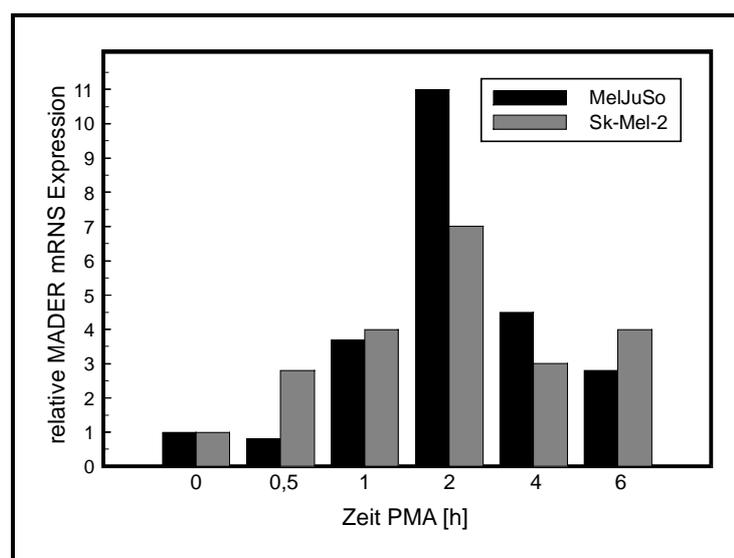


Abbildung 49: Kinetik der MADER mRNS Expression nach PMA Stimulation in den Zelllinien MelJuSo und SkMel 2 (nach Kirsch 1996)

Auf der Proteinebene ergab sich dabei folgendes Bild:

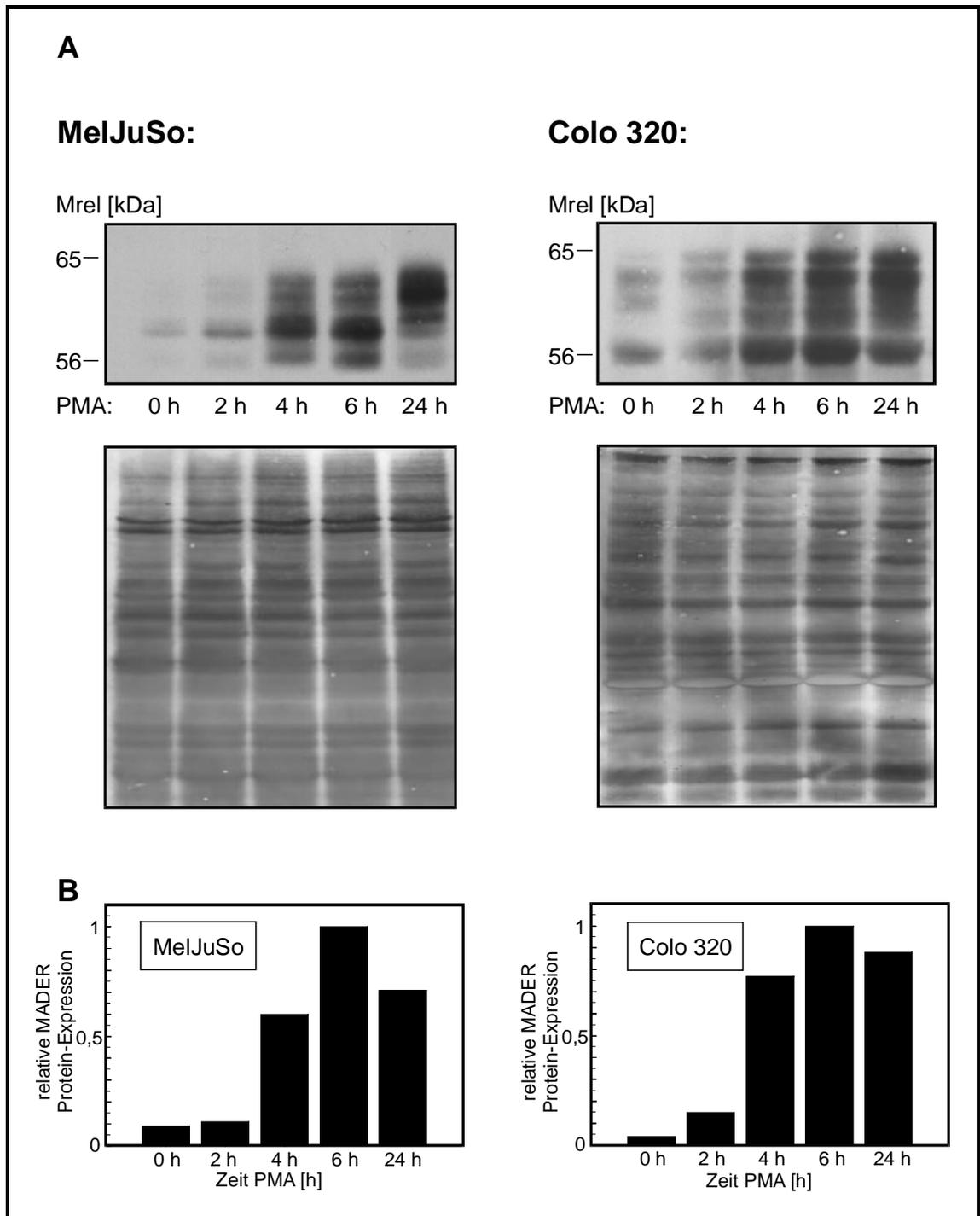


Abbildung 50: Kinetik der MADER Proteinexpression nach Stimulation mit PMA in den Zelllinien MelJuSo und Colo 320

A: Western Blot mit India Ink Auftragskontrolle B: Densitometrische Auswertung
 Aufgetragene Proteinmenge: je 50 μ g; Blotting Antikörper: α -MADER 1C4

In Abbildung 50 zeigt sich, dass der Höchstwert der Proteinexpression dem der mRNA mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa vier Stunden folgt. Der Peak der Protein Expression schwankte dabei aber bei einzelnen Experimenten zwischen sechs und 24 Stunden. Dies ist wahrscheinlich auf wechselnde Zellkulturbedingungen zurückzuführen, da die MADER Expression auch durch Serum stimulierbar ist. Der Mittelwert aller durchgeführten PMA Stimulationen lag jedoch bei sechs Stunden (Abbildung 51).

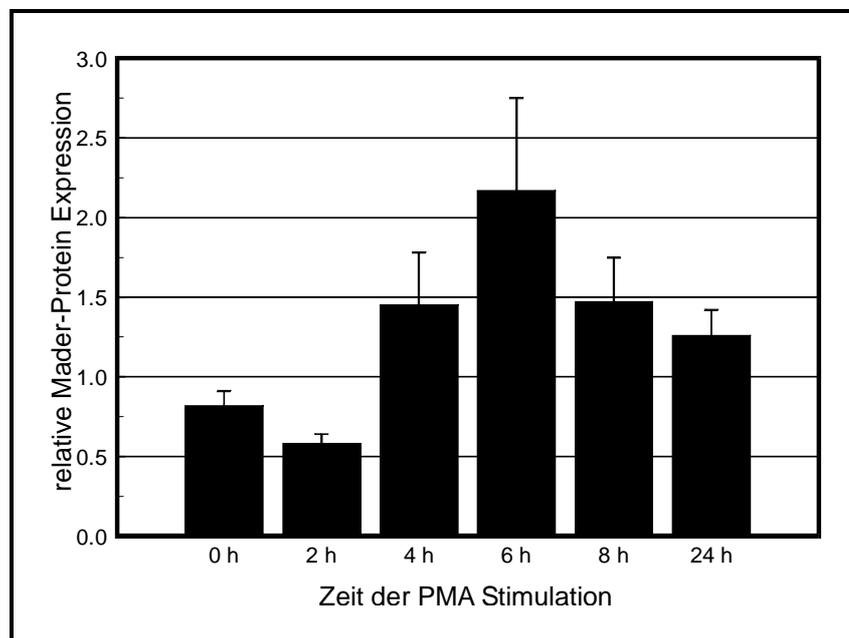


Abbildung 51: Mittelwerte(n=9) der MADER Protein Expression nach PMA Stimulation der Zelllinie MelJuSo

Nach dem Erreichen dieses Höchstwertes erfolgt der Abbau des Proteins aber anscheinend langsamer als der der entsprechenden mRNA. Während die mRNA Expression nämlich nach sechs Stunden annähernd wieder auf den Basalwert sinkt, zeigt die Proteinexpression auch nach 24 Stunden eine deutliche Erhöhung, die etwa dem Niveau nach vier Stunden PMA Stimulation entspricht. Diese Kinetik zeigt dabei keinen Unterschied zwischen den Zellen mit einer hohen konstitutiven MADER Protein Expression (MelJuSo) und denjenigen mit einer geringen (Colo 320) (siehe Abbildung 50). Dies deutet auf eine hohe Proteinstabilität von

MADER hin. Um dies genauer zu untersuchen wurde die PMA Stimulation auf 48 Stunden ausgedehnt (Abbildung 52).

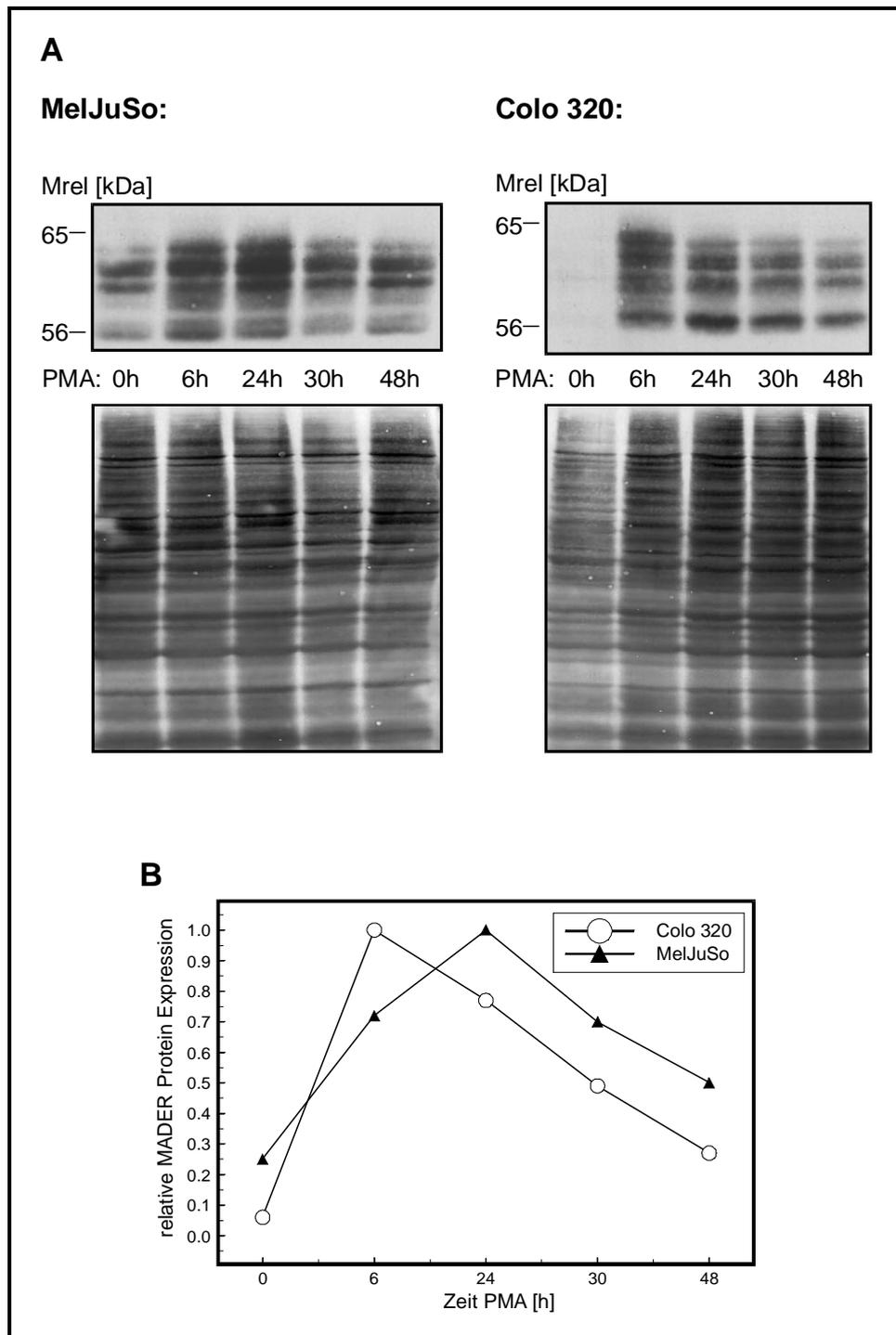


Abbildung 52: 48-stündige PMA Stimulation der Zelllinie MelJuSo und Colo 320

A: Western Blot mit India Ink Auftragskontrolle B: Densitometrische Auswertung; Aufgetragene Gesamtproteinmenge: je 50 µg; Blotting Antikörper: α-MADER 1C4

In Abbildung 52 wird deutlich, dass selbst 48 Stunden nach PMA Stimulation noch eine deutlich erhöhte MADER Protein Expression vorliegt. Obwohl der Höchstwert der Expression sich in dem gezeigten Experiment zwischen Colo 320 (6 Stunden) und MelJuSo (24 Stunden) unterscheidet, erfolgt der Abbau des MADER Proteins in beiden Zelllinien anscheinend mit der gleichen Halbwertszeit. Dies ist deutlich am parallelen Verlauf der Kurven in Abbildung 52 B nach Erreichen des jeweiligen Höchstwerts erkennbar.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass das MADER Protein eine hohe Stabilität besitzen muss. Dies liefert jedoch augenscheinlich keinen Beitrag zur Überexpression in den Melanomzellen, da auch Zellen mit einer geringen konstitutiven MADER Protein Expression die gleiche hohe MADER Protein-Stabilität aufweisen.

5.3 Funktion von MADER

MADER bindet mit seiner CD1 Domäne an den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor EGR-1 und reprimiert ihn dadurch. EGR-1 vermittelt die Transkription einer Vielzahl von Genen, die eine Rolle in der Differenzierung oder Proliferation spielen. Unter den Genen, die ein direktes Ziel von EGR-1 sind befinden sich unter anderem TGF- β 1 und p53. Diese beiden Proteine sind für ihre anti-tumorigene Wirkung bekannt. Diesen Effekt erreichen sie hauptsächlich durch die Transkription des p21 Proteins, das als Inhibitor der Cyklin abhängigen Kinase 2 (CDK2) für einen Stopp in der G2 Phase des Zellzyklus sorgt. Als Modell für den Beitrag, den eine Überexpression von MADER zu der Tumorgenizität der Melanomzellen liefern könnte, ließe sich deshalb vermuten, dass es dadurch zu einer verminderten Funktion von EGR-1 und damit in der Folge zu einer geringeren Transkription von TGF- β 1, p53 und p21 kommt (Abbildung 53).

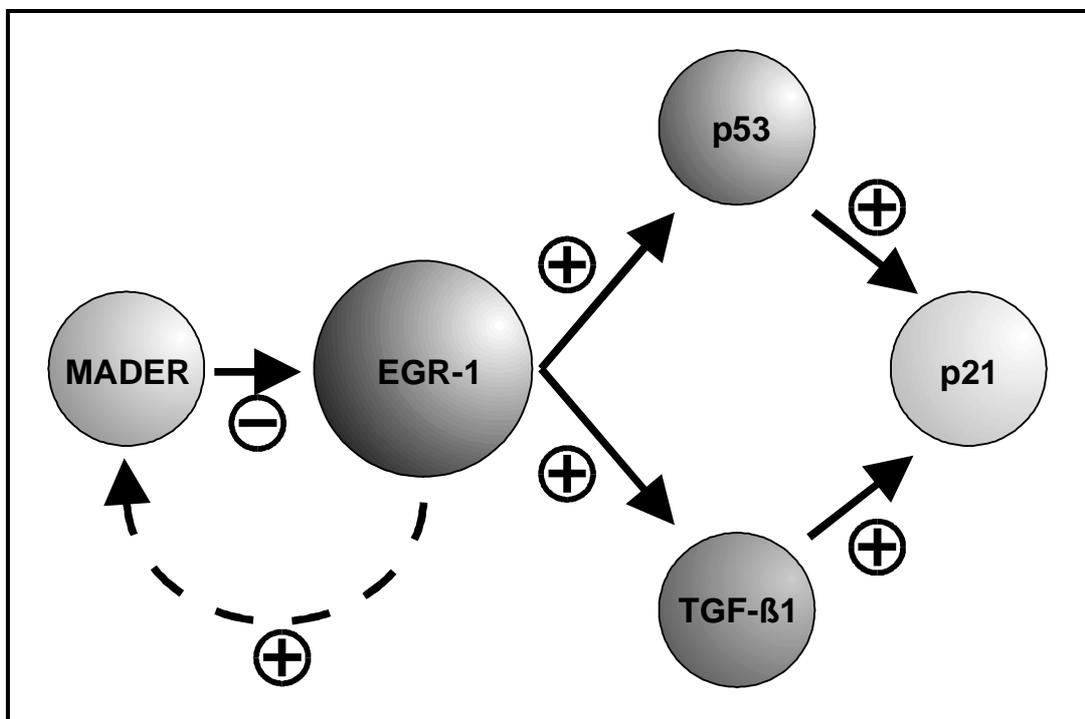


Abbildung 53: Modell der Funktion von MADER

Um zu überprüfen, ob dieses Modell zutrifft, wurden Zelllinien, die eine konstitutiv hohe, beziehungsweise niedrige MADER Protein Expression aufweisen, auf ihren Gehalt an p53 und p21 im Western Blot untersucht (Abbildung 54).

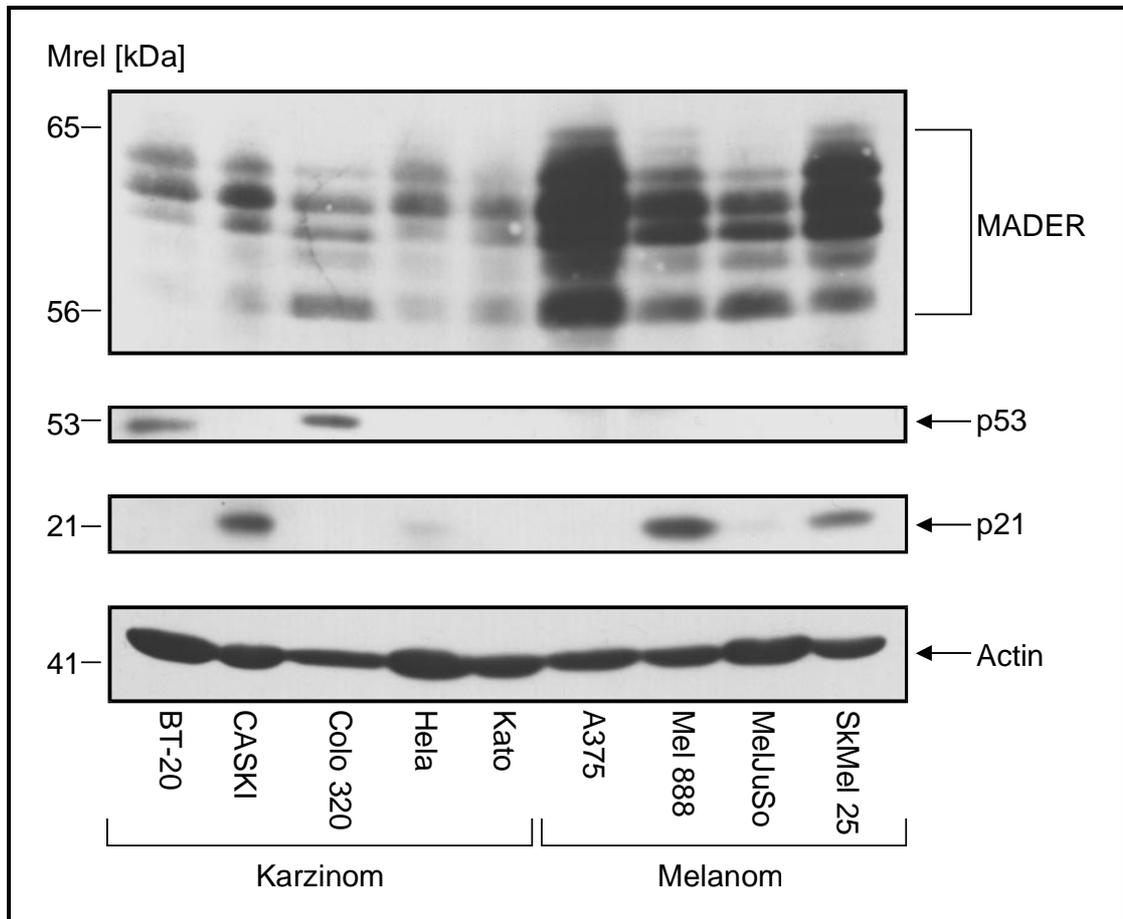


Abbildung 54: Expression von p53 und p21 in Zelllinien mit einem hohen bzw. niedrigem MADER Protein Level
Western Blot mit je 100 µg Gesamtprotein
Blotting Antikörper: α-MADER 1C4; α-p53; α-p21; α-Actin

In Abbildung 54 erkennt man, dass es in den untersuchten Zelllinien keine Korrelation zwischen der konstitutiven Expression von MADER und p21 oder p53 zu geben scheint. So zeigen nur die Zelllinien BT-20 und Colo 320 eine positive Reaktion mit dem verwendeten p53 Antikörper. Der p21 Antikörper reagiert hingegen sowohl mit den Zelllysaten von Zelllinien mit einem hohen konstitutiven MADER Level (Mel 888 und SkMel 25) als auch einem geringen (CASKI und HeLa).

Bei TGF- β 1 handelt es sich um einen löslichen Faktor, der von den Zellen ins Medium sezerniert wird. Aus diesem Grund wurde zur Überprüfung des TGF- β 1 Levels in diesen Zelllinien eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Hierzu musste wie in 5.2.2 beschrieben zunächst der lineare Bereich dieser PCR und das Verhältnis von 18S Primer : 18S Competimer bestimmt werden. Es ergab sich folgendes Ergebnis:

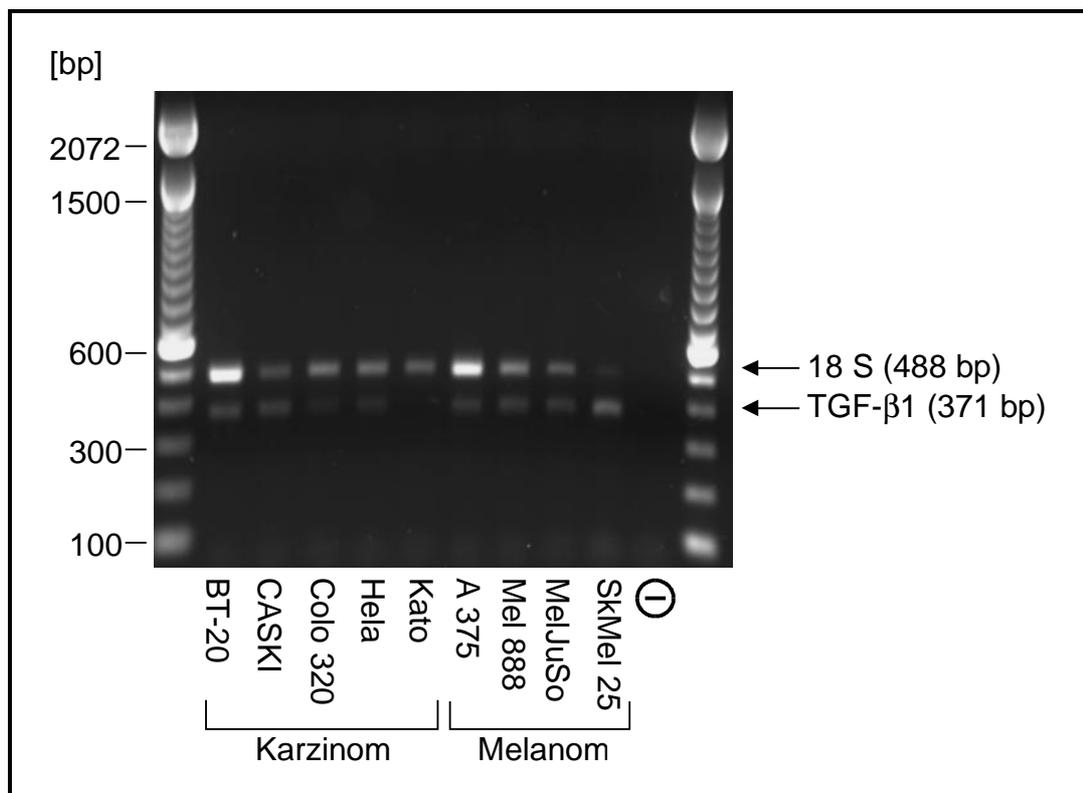


Abbildung 55: Quantitative TGF- β 1 RT-PCR (27 Zyklen) in Zelllinien mit hohem oder geringem MADER Level

Nach Abbildung 55 existiert ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Expression von TGF- β 1 und dem konstitutiven MADER Level in den untersuchten Zelllinien (vergleiche Abbildung 54). Zusammenfassend muss man feststellen, dass man das aufgestellte Modell der Funktion von MADER mit den durchgeführten Experimenten nicht bestätigen kann.

6 Diskussion

Um neue Gene zu identifizieren, die eine Rolle bei der Melanomprogression spielen wurde die Antigenexpression auf Naevus- und Melanomzellen durch monoklonale Antikörper miteinander verglichen. Das Protein MADER (Melanom assoziiertes delayed early response Gen), das durch diesen „Screen“ entdeckt wurde, ist in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten stark überexprimiert und gehört damit zu den wenigen Proteinen, die eine starke Assoziation mit bösartigen Melanomen zeigen. Untersuchungen von Kirsch (1996) zeigten, dass MADER zur Gruppe der „delayed early response Gene“ gehört und für ein 56 kDa Kernprotein kodiert, über dessen Funktion bisher die Repression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors EGR-1 bekannt ist (Svaren et al., 1996). EGR-1 vermittelt, als Antwort auf externe Stimuli, die Transkription einer Vielzahl von Genen, die an Proliferations- und Differenzierungsvorgängen beteiligt sind. Da MADER selbst mehrere Sequenzmerkmale eines genregulatorischen Proteins aufweist lässt sich die Vermutung anstellen, dass es ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation dieser Zellvorgänge spielt.

Ziel dieser Arbeit war es die biochemischen Eigenschaften des MADER-Proteins näher zu beleuchten und die Gründe für seine Überexpression in den Melanomzellen zu erforschen.

6.1 Reaktivität und Spezifität der MADER Antikörper

Um die „in vivo“ Expression von MADER zu untersuchen wurden von Kirsch (1996) neun monoklonale Antikörper gegen rekombinantes MADER-Protein hergestellt. Diese Antikörper wurden in Immunpräzipitations- und Western Blot Experimenten eingesetzt, um die biochemischen Eigenschaften des MADER-Proteins zu ermitteln.

Hierbei zeigte sich, dass alle neun monoklonalen Antikörper im Western Blot eines MADER-Immunpräzipitats eine Reihe von sechs bis acht nahe benachbarter Banden zwischen 56 und 65 kDa erkennen. Dies ist kein Artefakt der durchgeführten Immunpräzipitation, da die Reaktivität mit einem Gesamtzellysate das gleiche Bandenmuster liefert. Mitgeführte Isotypkontrollen für den Präzipitations- und Blotting-Antikörper ergeben hingegen keine immunreaktiven Banden. Dies zeigt, dass die beobachteten Banden nicht auf unspezifischen Bindungen der Antikörper mit dem Fc-Teil beruhen. Im Vergleich der Reaktivität des Antikörpers 18.3, der aus der ursprünglichen Immunisierung von Mäusen mit Melanomzellen stammt, mit den Antikörpern gegen bakteriell exprimiertes rekombinantes MADER-Protein ergibt sich das identische Bandenmuster. Aus diesem Grund scheidet auch eine Kreuzreaktivität gegen bakterielle Proteine als Erklärung der Bandenheterogenität aus.

Alle neun monoklonalen Antikörper reagieren auch mit der Splicevariante MADER-drop8, sowohl in der cytoplasmatischen Immunfluoreszenz, als auch im Western Blot. Da in allen untersuchten Zellen keine Spur des endogenen MADER-drop8 Proteins auszumachen war, wurden diese Versuche mit stabilen drop8 Transfektanten durchgeführt. Hierbei zeigte auch das drop8 Expressionsprodukt im Western Blot mehrere Banden, obwohl die drop8 cDNS durch reverse Transkription aus der „reifen“ mRNA gewonnen wurde. Deshalb kommen auch weitere MADER Splicevarianten für dieses Phänomen nicht in Frage.

Inkubiert man die MADER Antikörper mit einem Überschuss an rekombinantem MADER-Protein, so kann man ihre nachfolgende Reaktivität in der cytoplasmatischen Immunfluoreszenz vollständig inhibieren. Dies zeigt, dass die Reaktivität spezifisch gegen ein Epitop der MADER-Proteinsequenz gerichtet sein muss.

Eine mögliche Erklärung für die Reaktivität der MADER Antikörper mit mehreren Banden wäre deswegen eine Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen, die ein ähnliches Epitop wie das MADER-Protein besitzen. Durch die Tatsache, dass alle neun monoklonalen Antikörper und der ursprüngliche Antikörper 18.3 das

vollkommen identische Bandenmuster liefern, wird dies jedoch unwahrscheinlich. Da auch die transfizierte MADER-drop8 cDNS im Western Blot mehrere immunreaktive Banden ergibt, könnte man daraus schließen, dass dies ebenfalls ein starkes Gegenargument für eine Beteiligung anderer Proteine ist.

Transfiziert man die vollständige MADER cDNS transient in Cos-7 Zellen und überprüft das Lysat im Western Blot, so ergeben sich die gleichen Banden, wie man sie bei einer längeren Exposition des Röntgenfilms vom endogenen MADER-Protein erhält. Dies ist der Beweis, dass alle beobachteten Banden tatsächlich auf eine Reaktion der Antikörper mit dem MADER Protein zurückzuführen sind und eine spezifische Eigenschaft des MADER-Proteins darstellen.

6.2 Heterogenität der MADER Banden im Western Blot

Das MADER-Protein hat, wie gezeigt, die interessante biochemische Eigenschaft im Western Blot mehrere Banden zwischen 56 und 65 kDa aufzuweisen. Ein Proteaseabbau scheint dabei nicht beteiligt zu sein, da man durch eine einstündige Inkubation des Lysats bei 37 °C oder durch das Weglassen von Proteaseinhibitoren im Lysepuffer keine Änderung des Bandenmusters erreichen kann. Da alle Banden bei einem höheren Molekulargewicht laufen als das theoretische, aus der cDNS berechnete (56,6 kDa), ist die wahrscheinlichste Erklärung das Vorliegen von posttranslationalen Modifizierungen.

Eine Möglichkeit besteht in der Ubiquitinierung. In Eukaryonten werden viele Proteine, die für den Abbau im Proteasom vorgesehen sind mit dem 76 Aminosäure großen Protein Ubiquitin markiert (Ciechanover, 1994). Die Bindung erfolgt dabei an interne Lysin-Reste des Zielproteins. In vielen Fällen ist das ubiquitinierte Protein abermals Ziel für eine weitere Ubiquitinierung. Diese Multiubiquitinierung führt entweder zu linearen und verzweigten Ubiquitin-Ketten oder zur Markierung mehrerer Lysin-Reste in einem Protein. Häufig erkennt man dabei in SDS-Gelen eine Gruppe von nah benachbarten Banden bei zunehmenden

Molekulargewichten. Bekannt ist dies beispielsweise für das Cyklin-D1 (Langenfeld et al, 1997). Die Hemmung des Proteasoms durch Lactacystin führt dabei zu einer Veränderung des Bandenmusters, das seinen Grund in einer erhöhten Ubiquitinierung hat. Die Analyse von MADER in Zellen, die mit Lactacystin in DMSO behandelt wurden, ergab jedoch im Western Blot keinen Unterschied im Bandenmuster zu Zellen, die nur dem Lösungsmittel ausgesetzt waren. Die Ubiquitinierung liefert deshalb keinen Beitrag zu den im Western Blot auftretenden Banden.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Glykosylierung. Seit kurzem ist bekannt, dass auch viele eukaryontische cytosolische- und Kern-Proteine in einer glykosylierten Form vorliegen. Dabei werden interne Serin- und Threonin-Reste über Sauerstoffbrücken kovalent mit einem Molekül des Zuckers N-Acetylglukosamin verknüpft (Hart, 1997). Dies geschieht oft an mehreren Aminosäuren gleichzeitig in einem Protein und scheint der Phosphorylierung der gleichen Reste entgegenzuwirken (Kelly et al., 1993). Unter den Kernproteinen bei denen eine Glykosylierung nachgewiesen werden konnte befinden sich unter anderen c-myc (Chou et al., 1995) und p53 (Shaw et al., 1996). In einigen Fällen führt diese Glykosylierung mehrerer interner Serin- und Threonin-Reste zu einer Leiter von Banden bei größeren Molekulargewichten im SDS-Gel (Jackson & Tjian, 1988). Durch das Blotting mit Biotin markiertem Weizenkeimagglutinin (WGA), das eine hohe Affinität für N-Acetylglukosamin aufweist, lassen sich diese glykosylierten Proteine leicht im Western Blot detektieren. Bei der Inkubation eines MADER Immunpräzipitats mit WGA im Western Blot ergab sich dabei jedoch nur eine Reaktivität mit der glykosylierten schweren Kette des präzipitierenden Antikörpers, so dass auch eine multiple Glykosylierung mit N-Acetylglukosamin als Grund für die Banden zwischen 56 und 65 kDa ausscheidet.

Die posttranslational erfolgende Phosphorylierung von Proteinen durch spezifische Kinasen ist der weitverbreitetste Mechanismus zur Regulation von Proteinaktivitäten. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Phosphorylierung genregula-

torischer Proteine in den Eukaryonten, die hauptsächlich an Serin- und Threonin-Resten erfolgt. Die Phosphorylierung führt dabei zu einer verminderten Beweglichkeit der betroffenen Proteine im SDS-Gel. Bekannt ist dies unter anderem für die Regulator-Proteine Rb (Benedict et al., 1990) und p107 (Xiao et al., 1995). Für andere Proteine, wie den Transkriptionsfaktor E2F-4 (Ginsberg et al., 1994; Beijersbergen et al., 1994) ist beschrieben, dass multiple Phosphorylierungsstufen zu mehreren langsamer laufenden Banden im SDS-Gel führen.

Aus den durchgeführten Sequenzanalysen weiß man, dass MADER 23 potentielle Phosphorylierungsstellen aufweist, wovon die meisten (21) auf Serin (17)- und Threonin (4)-Reste entfallen. Der durchgeführte Verdau eines MADER Immunpräzipitats mit einer λ -Phosphatase, die Phosphat-Gruppen sowohl von Serin- als auch von Threonin- und Tyrosin-Resten abspaltet, zeigte, dass Phosphorylierung zumindest am Bandenmuster von MADER im Western Blot beteiligt ist. Durch den Verdau konnte nämlich die Anzahl der MADER-Banden von sechs bis acht auf drei bis vier intensitätsstärkere reduziert werden. Außerdem zeigte eine Bande eine deutlich erhöhte Mobilität im SDS-Gel. Da das MADER-Protein bei der Immunpräzipitation noch in seiner nativen gefalteten Form vorliegt, bedeutet dieses Ergebnis nicht zwangsläufig, dass die restlichen Banden nicht auch Phosphorylierungsstufen darstellen. Möglicherweise sind diese Phosphorylierungsstellen im gefalteten Protein räumlich nicht für die Phosphatase zugänglich.

Das Blotting des MADER Immunpräzipitats im Western Blot mit Antikörpern gegen Phospho-Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste ergab nur im Fall der Phospho-Serin-Antikörper zwei immunreaktive Banden. Dies zeigt definitiv, dass zumindest diese Banden auf eine Serin-Phosphorylierung von MADER zurückzuführen sind. Die negative Reaktivität der restlichen MADER Banden mit dem Phospho-Serin Antikörper sowie die gänzlich fehlende Reaktivität der Phospho-Threonin und Tyrosin Antikörper bedeutet nun ebenfalls nicht, dass in diesen Fällen keine Phosphorylierung vorliegt. Alle erhältlichen Antikörper gegen

phosphorylierte Aminosäuren erkennen nämlich stets ein Epitop, das neben dem phosphorylierten Rest auch noch 6-8 Aminosäuren in seiner Umgebung enthalten muss.

Möglicherweise könnten die restlichen Banden aber auch durch andere kovalente Modifikationen zustande kommen. In Frage kämen dabei die Acetylierung von Histidin- oder Lysin-Resten oder die ADP-Ribosylierung von Arginin-Resten. Die Bedeutung dieser Modifikationen für Regulationsprozesse ist derzeit aber noch kaum verstanden.

Die Analyse mehrerer Zelllinien mit den MADER Antikörpern in der Immunfluoreszenz ergab stets eine starke Kernfärbung. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der Sequenzanalyse, die für MADER nur kurze hydrophobe Bereiche und zwei potentielle Kernlokalisierungssignale liefert. Bei einer Auftrennung eines Gesamtzelllysats in die Kern- und Cytoplasma/Membran-Fraktion ergab sich im MADER Western Blot die Anreicherung einer Bande, die nach den zuvor beschriebenen Ergebnissen auf eine Serin-Phosphorylierung des MADER-Proteins zurückzuführen ist. Offenbar geht deshalb der Kernimport des MADER-Proteins mit einer erhöhten Serinphosphorylierung einher. Es ist in diesem Zusammenhang bekannt, dass die Regulation des Kernimports häufig über die Phosphorylierung des zu importierenden Proteins gesteuert wird (Nigg et al., 1991). Eine besondere Bedeutung kommt dabei den Serin-Phosphorylierungsstellen der Kasein Kinase 2 zu, die sich in unmittelbarer Nähe (ca. 30 AS) der Kernlokalisierungssignale befinden (Churchill, 1991; Meisner, 1991). Im MADER-Protein sind sowohl das Bipartite-NLS (Robbins et al., 1991) als auch das SV-40-NLS (Kalderon et al., 1984) direkt von je zwei Serin-Phosphorylierungsstellen der Kasein Kinase 2 umgeben. Eventuell sind einige dieser Stellen für die beobachtete Anreicherung der Serin-Phosphorylierung des MADER-Proteins in der Kernfraktion verantwortlich.

6.3 Konservierung der MADER Expression

In mehreren menschlichen Zelllinien zeigte MADER auf niedrigem Niveau eine ubiquitäre Verteilung der mRNA (Kirsch, 1996). Bei entsprechenden Western Blot Analysen konnte das MADER-Protein ebenfalls in allen (20) getesteten menschlichen Zelllinien verschiedenen Gewebeursprungs nachgewiesen werden. Die Bandenzahl und das Bandenmuster zwischen 56 und 65 kDa war dabei in allen Experimenten stets identisch, obwohl sich die Intensitätsverteilung innerhalb der Banden zwischen verschiedenen Zellen teilweise unterschied. Dies zeigt, dass alle untersuchten menschlichen Zellen die gleichen posttranslationalen Modifizierungen des MADER-Proteins aufweisen. Zwischen verschiedenen Zellen unterscheidet sich jedoch offensichtlich der Beitrag den die einzelnen Modifizierungen zur Bandenheterogenität leisten.

Genomische Southern-Blot Analysen mit DNS aus Affe, Ratte, Maus, Huhn und Hefe lieferten einen Hinweis darauf, dass das MADER-Gen auch zwischen Spezies konserviert zu sein scheint (Kirsch et al., 1996). Die RT-PCR von RNA der Spezies Affe, Maus, Ratte und Hamster mit Primern für menschliches MADER zeigt, dass diese Zellen nicht nur das MADER-Gen besitzen sondern auch die MADER mRNA exprimieren. Im MADER Western Blot ergaben sich auch mit Lysaten dieser Spezies mehrere immunreaktive Banden im Bereich zwischen 56 und 65 kDa. Das Bandenmuster des MADER-Proteins zwischen den einzelnen nichtmenschlichen Zelllinien unterschied sich jedoch teilweise deutlich, wobei sich das Muster der Affenzellen mit dem der untersuchten menschlichen Zellen deckte. Die beobachtbaren Unterschiede könnten dabei auf Veränderung der posttranslationalen Modifizierungen (z.B. Phosphorylierungen) oder Sequenzunterschieden des MADER-Proteins beruhen. Vom MADER-Protein der Maus ist bekannt, dass es ebenfalls aus 525 Aminosäuren besteht und sich nur in 25 Aminosäuren vom menschlichen Protein unterscheidet, wobei kein Aminosäureaustausch in den beiden konservierten Domänen zu finden ist (Svaren et al., 1996).

Die ubiquitäre Verteilung der MADER Expression in allen menschlichen und nichtmenschlichen Zellen belegt, dass MADER in der Evolution hochkonserviert wurde. Dies wird im Allgemeinen nur bei Proteinen beobachtet, die eine essentielle Funktion in der Zelle ausführen.

6.4 Regulation der MADER Expression

Obwohl in Northern-Blot Analysen die MADER mRNA auf basalem Level in allen untersuchten Geweben und Zelllinien gefunden wurde, konnte in immunhistochemischen Färbungen von Gewebeschnitten nur vereinzelt eine Reaktion der MADER Antikörper mit Normalgewebe oder anderen Tumorgeweben festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten Melanome eine gleichmäßig starke MADER-Überexpression (Kirsch et al., 1996). Dies konnte bei der Analyse der MADER-Protein Expression verschiedener Zelllinien im Western Blot bestätigt werden. Auch hier ist die MADER-Protein Expression der untersuchten Melanomzelllinien im Mittel deutlich höher als die der Karzinomzelllinien. Da sich in ersten Untersuchungen (Kirsch, 1996) der MADER mRNA-Level von Melanomzelllinien nicht wesentlich von dem der Karzinomzelllinien unterschied, wurde zunächst angenommen, dass die Überexpression des MADER-Proteins in den Melanomen auf eine erhöhte Proteinstabilität in diesen Zellen zurückzuführen ist. Vom Tumorsuppressorprotein p53, das wie MADER schwach ubiquitär exprimiert wird, ist bekannt, dass seine Überexpression in vielen Tumoren auf eine erhöhte Proteinstabilität zurückzuführen ist (Maltzmann und Czyzyk, 1986). Ausgelöst wird dies in vielen Fällen durch Punktmutationen (Levine, 1993).

Ein direkter Vergleich verschiedenener Zelllinien im Northern- und Western Blot in dieser Arbeit zeigte jedoch eindeutig eine Korrelation zwischen dem MADER mRNA- und Protein-Level. Dies beweist, dass die Überexpression des MADER-Proteins in den Melanomen auf der Transkriptionsebene begründet sein muss. Der Widerspruch zu den älteren Ergebnissen beruht dabei wahrscheinlich auf

dem Umstand, dass damals die Protein- und mRNA Analysen nicht gleichzeitig mit der gleichen Zellpopulation durchgeführt wurden.

Die aktuelle mRNA Konzentration, die für die Translation zur Verfügung steht, wird sowohl von der Neusynthese als auch von der Abbaurrate bestimmt. Dem spezifischen Abbau von mRNA-Molekülen kommt auf diese Weise eine wichtige Funktion bei der zell- und gewebespezifischen Genexpression zu (Sachs, 1993). Die Stabilität verschiedener mRNA-Moleküle kann dabei sehr unterschiedliche Werte annehmen. So findet man in Eukaryonten im selben Zelltyp mRNA-Moleküle mit einer Halbwertszeit von 20 Minuten neben solchen mit einer Halbwertszeit von 24 h (Peltz et al., 1991). Da bis zum heutigen Zeitpunkt außer dem 5'Cap und dem poly-A Schwanz keine stabilisierenden Sequenzen in mRNA-Molekülen entdeckt werden konnten, nimmt man an, dass der mRNA-Abbau nur durch die Anzahl und Funktionalität von destabilisierenden Sequenzen bedingt wird. Eine Schlüsselrolle kommt dabei der RNS-Sequenz AUUUA im 3'untranslatierten Bereich einer mRNA zu. Es wird angenommen, dass die Anwesenheit dieser Sequenz den Abbau des poly-A-Schwanzes fördert (Shaw & Kamen, 1986).

Aus den oben genannten Gründen stellte sich die Frage, ob die größere MADER mRNA (und Protein) Menge in den Melanomzellen auf einer erhöhten Transkription des MADER Gens oder einem verringerten Abbau der mRNA in diesen Zellen beruht. Für die Onkogene c-fos und c-myc ist beispielsweise bekannt, dass die Erhöhung ihrer mRNA Menge bei der Transformation in einen malignen Phänotyp durch eine größere Stabilität ihrer jeweiligen mRNA erreicht wird (Schiavi et al., 1992). Die Analyse der Stabilität der MADER mRNA erfolgte in dieser Arbeit durch die Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit mit Hilfe des Transkriptioneninhibitors Actinomycin D. Hierbei ergab sich im Mittel ein Wert von 2,6 h +/- 0,1 h. Dies korreliert gut mit der Kinetik der MADER mRNA-Expression nach PMA-Stimulation. Dort ging die MADER mRNA, zwei Stunden nach Erreichen des Höchstwertes (100 %) auf ca. 65 % zurück (Kirsch, 1996). Die MADER mRNA Halbwertszeit zeigte den gleichen Wert in Zelllinien mit

DER mRNA Halbwertszeit zeigte den gleichen Wert in Zelllinien mit einem hohen- und einem niedrigen konstitutiven MADER-Level. Aufgrund dieses Ergebnisses kann die Überexpression von MADER in den Melanomzellen nicht auf einer erhöhten mRNA Stabilität sondern nur auf einer vermehrten Transkription beruhen.

Die Regulation der Expression des MADER-Proteins erfolgt, wie eben erläutert, auf Transkriptionsebene. Um jedoch ausschließen zu können, dass die MADER-Proteinstabilität dennoch einen, wenn auch geringen, Beitrag zu diesem Prozess liefert, wurde die MADER-Proteinkinetik nach PMA-Stimulation eingehender untersucht. Im Mittel mehrerer Experimente zeigte das MADER-Protein dabei den höchsten Expressionswert sechs Stunden nach der Zugabe des Phorbolesters. Der Höchstwert der mRNA-Expression nach PMA-Stimulation wurde hingegen nach zwei Stunden erreicht. Die zeitlich Verzögerung von vier Stunden wird dabei augenscheinlich benötigt, um die mRNA aus dem Kern zu den Ribosomen zu transportieren und dort in das Protein zu übersetzen. Während jedoch die MADER mRNA nach sechs Stunden beinahe den Basalwert wieder erreicht hat, ist der MADER-Protein-Level selbst 48 Stunden nach Stimulationsbeginn noch deutlich erhöht. Diese Kinetik ist dabei sowohl in Zelllinien mit einer geringen als auch einer hohen konstitutiven MADER Expression zu beobachten. Dies zeigt, dass das MADER-Protein eine hohe Stabilität aufweist. Diese Eigenschaft liefert aber offensichtlich keinen Beitrag zu der Überexpression von MADER in den Melanomzellen, da sie auch in anderen Zelllinien mit einem geringen konstitutiven MADER-Protein Level beobachtet werden kann. Die hohe MADER-Protein Stabilität liefert auch die Erklärung für die Beobachtung, dass aufgrund des sehr geringen MADER mRNA-Levels die Detektion im Northern Blot nur schwer zu realisieren war, während der MADER-Protein-Nachweis im Western Blot keine Probleme bereitete.

Um schnell auf veränderte Bedingungen reagieren zu können, zeichnen sich regulatorische Proteine normalerweise durch eine kurze Protein-Halbwertszeit aus,

während Strukturproteine nur sehr langsam abgebaut werden. So weist die RNA-Polymerase I eine sehr kurze Halbwertszeit von 1,3 h auf, während man für das „housekeeping“ Protein GAPDH in den selben Zellen einen Wert von 130 h findet (Dice & Goldberg, 1975). Der regulierte Abbau der kurzlebigen Proteine wird dabei vor allem durch bestimmte Signalsequenzen vermittelt. Diese Signale markieren das jeweilige Protein als Ziel für eine Ubiquitinierung die schließlich zum Abbau im Proteasom führt. Die Halbwertszeit vieler Proteine ist dabei einfach von ihrer N-terminalen Aminosäure abhängig (Varshavsky, 1996). So wirken beispielsweise die Aminosäuren Arginin, Lysin, Phenylalanin, Leucin, Tryptophan und Tyrosin in dieser Position sowohl in Bakterien als auch in Eukaryonten äußerst destabilisierend und ergeben Halbwertszeiten von nur 2-3 Minuten. Da Proteine normalerweise mit einem N-terminalen Methionin synthetisiert werden und es sich dabei um eine stabilisierende Aminosäure handelt, sind in der Zelle Methionin-Aminopeptidasen vorhanden, die diesen Rest selektiv abspalten können, so dass der zweiten Aminosäure eine besondere Bedeutung zukommt. In Hefe konnte allerdings festgestellt werden, dass die Aminopeptidase das primäre Methionin nur dann abspaltet, wenn auch die sekundäre Aminosäure eine stabilisierende Wirkung aufweist. Ob dies für alle Eukaryonten zutrifft ist noch nicht bekannt. Es gibt daneben Hinweise auf andere Merkmale, die bei der Auswahl zum Abbau eine wichtige Rolle spielen. So werden sogenannte PEST-Proteine, die reich an Prolin (P), Glutamin (E), Serin (S) und Threonin (T) sind, sehr schnell abgebaut (Rogers et al., 1986). Obwohl unklar ist, wie die PEST-Proteine erkannt werden erfolgt die Degradation dabei wohl ebenfalls im Proteasom und ist von der Markierung des Proteins mit Ubiquitin abhängig.

Die hohe Stabilität des MADER-Proteins scheint dem Dogma zu widersprechen, dass regulatorische Proteine durch eine geringe Stabilität gekennzeichnet sind. Die Beobachtung, dass eine Inhibition des Proteasoms keine Anreicherung des MADER-Proteins zur Folge hat, lässt den Schluss zu, dass sein Abbau nicht über diesen Weg, sondern eventuell lysosomal erfolgen könnte. Der Protein Verdau im

Lysosom ist dabei meist unselektiv und unterliegt keinen bekannten Regulationsmechanismen. Möglicherweise erfolgt die Regulation der Funktion des MADER-Proteins deshalb nicht durch seine Proteinkonzentration, sondern durch posttranslationale Modifizierungen. In Frage kämen dabei vor allem Phosphorylierungen.

6.5 Funktion von MADER

Durch einen Hefe-Two-Hybrid-Screen konnte MADER als Interaktionspartner von EGR-1 (early growth response 1), EGR-2 und EGR-3 identifiziert werden (Svaren et al., 1996; Svaren et al., 1998). Bei den Proteinen der EGR-Familie handelt es sich um eine Reihe wichtiger Transkriptionsfaktoren, die alle zu den immediate early response Genen gehören. Ihre DNA-Bindungsdomäne besteht dabei aus je drei Zinkfinger-Motiven vom Typ C2H2 (Klug & Rhodes, 1987). Bei diesem DNA-Bindungsmotiv wird ein Zinkatom in einem tetraedrischen Komplex von zwei Cysteinresten eines beta-Faltblatts und zwei Histidinresten einer alpha-Helix koordiniert (Abbildung 56).

EGR-1 spielt eine zentrale Rolle bei der Transkription von Genen, die als Antwort auf das Einwirken von verschiedenen Mitogenen (z.B. Nerve Growth Factor; Serum) oder von Stress (z.B. Verletzungen) exprimiert werden (Milbrandt, 1987; Gashler und Sukhatme, 1995). Funktionell wirkt EGR-1 dabei vor allem auf Differenzierungs- und Proliferationsprozesse, sowie die Apoptose ein (Nair et al., 1997). So lassen sich während der Embryonalentwicklung in Knochen, Gelenkknorpeln und bestimmten Hirnarealen erhöhte EGR-1 Protein Level feststellen. In der Melanomzelllinie A375 konnte gezeigt werden, dass EGR-1 für die Induktion der Apoptose durch eine erhöhte Calciumkonzentration in diesen Zellen essentiell ist. Diese Funktion übt EGR-1 durch die Transaktivierung des p53 Promotors aus (Nair et al., 1997).

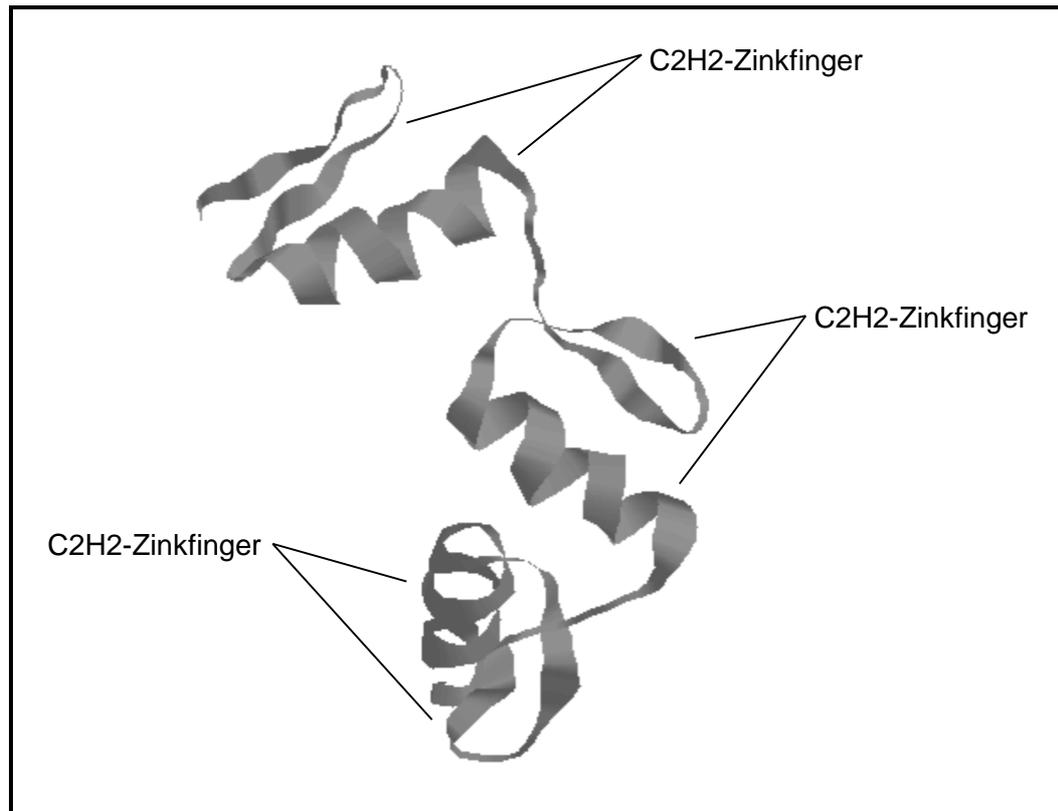


Abbildung 56: Röntgenstrukturanalyse des Transkriptionsfaktors EGR-1 nach Peveltich & Pabo (1991)

MADER bindet mit der CD1 Domäne an die hochkonservierte R1 Domäne von EGR-1. Die in dieser Arbeit durchgeführten Sekundärstrukturanalysen lassen den Schluss zu, dass diese Interaktion auf Seiten von MADER dabei über eine amphipatische alpha-Helix erfolgt. Dieser Strukturtyp findet sich häufig bei Protein-Protein Interaktionen von genregulatorischen Proteinen, wie beispielsweise der Bindung des humanen Transkriptionsfaktors IIB an das TATA-bindende Protein (Ha et al., 1993). Durch die Bindung an EGR-1 kommt es in der Folge zu einer Repression der Transaktivierungsfähigkeit dieses Transkriptionsfaktors. MADER erreicht dies nicht durch eine Inhibition der DNS Bindung von EGR-1 sondern verhindert wahrscheinlich seine Interaktion mit dem basalen Transkriptionskomplex (Svaren et al., 1998). Dass der Einfluss von MADER auf EGR-1 tatsächlich funktionelle Bedeutung hat, beweisen Transfektionen von MADER in PC-12 Zellen, bei denen eine NGF induzierte Differenzierung nicht mehr möglich ist (Qu et al., 1998). In Reporter Assays eines Plasmids, in dem die Expressi-

sion des Luciferase-Gens unter der Kontrolle von drei EGR-1 Sites stand, zeigte sich in stabilen MADER Transfektanten ebenfalls eine hemmende Wirkung von MADER auf die EGR-1 induzierte Transkription (Zimmermann, Manuskript in Bearbeitung).

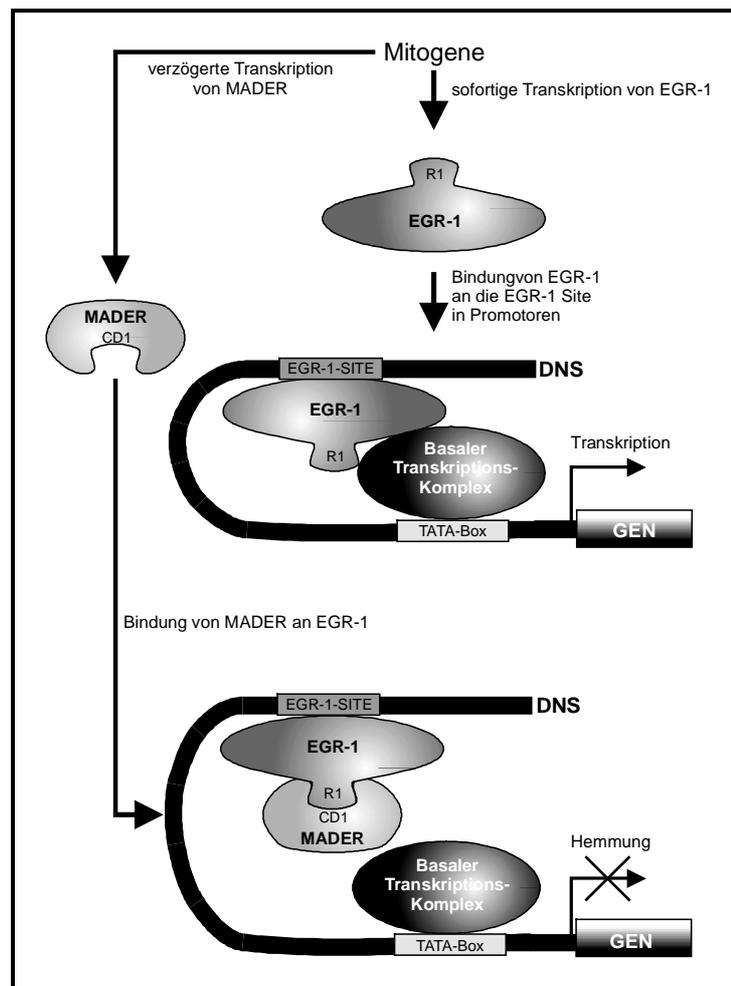


Abbildung 57: Normale Funktion von MADER

Die Expression von MADER wird von den gleichen Mitogenen stimuliert, die auch zu einem erhöhten EGR-1 Spiegel führen. Da MADER ein delayed early response Gen ist erfolgt seine Expression allerdings mit einer leichten zeitlichen Verzögerung. MADER selbst besitzt in seinem Promotorbereich Bindungsstellen für EGR-1 (Gerlinger, Manuskript in Bearbeitung). Aus diesem Grund besteht seine normale Funktion wahrscheinlich darin im Sinne einer negativen Rück-

kopplung eine überschießende EGR-1 Aktivierung durch externe Stimuli zu verhindern (Abbildung 57).

In einer Reihe menschlicher Tumoren wurde festgestellt, dass eine verminderte Expression von EGR-1 *in vivo* für die Tumorprogression von Bedeutung sein könnte. So findet man bei vielen akuten myelotischen Leukämie-Erkrankungen die Deletion des chromosomalen Bereiches, der das EGR-1 Gen enthält (Le Beau et al., 1993). Eine stark verminderte EGR-1 Expression wurde außerdem bei vielen untersuchten Lungentumoren beschrieben (Levin et al., 1995). Hinweise für die daran beteiligten molekularen Mechanismen konnten durch Untersuchungen an Zelllinien gewonnen werden. So zeigte sich an der Fibrosarcomzelle HT1080, dass eine Überexpression von EGR-1 mit einer verringerten Tumorgenizität im Hinblick auf eine geringere Wachstumsrate dieser Zellen in Soft-Agar und eine verminderte Foci-Bildung einhergeht (Huang et al., 1995). Diese antitumorigene Wirkung erreicht EGR-1, indem es die Synthese von wachstumshemmenden Proteinen steigert und die Apoptose fördert (Liu et al., 1996, Huang et al., 1998). Die Induktion der TGF- β -1 Expression führt dabei zur Transkription des Tumorsuppressors p21, der in der Folge einen Stopp in der G1-Phase des Zellzyklus bewirkt (Miyazi et al., 1998; de Belle et al., 1999). Eine Hemmung der Bcl-2 Expression und Induktion der p53 Expression durch EGR-1 bewirkt andererseits eine Erhöhung der Apoptoserate (Nair et al., 1997).

Aus diesen Merkmalen von EGR-1 können Rückschlüsse auf die Rolle der starken Überexpression von MADER in Melanomzellen gezogen werden. Durch die Verringerung der Konzentration von aktivem EGR-1 könnte MADER einerseits die Hemmung seiner antitumorigenen Wirkung erreichen, andererseits könnte die proapoptotische Wirkung von EGR-1 durch MADER gehemmt und dadurch die Malignität der Tumorzellen gesteigert werden. Analysen der potentiellen Zielgene TGF- β 1, p53 und p21 in dieser Arbeit ergaben jedoch keinerlei Korrelation mit der Höhe der MADER Expression in verschiedenen Zelllinien. Wahrscheinlich wirkt MADER in den Melanomzellen deshalb hauptsächlich auf andere Pro-

teinfaktoren und Signalwege ein. In Frage kämen dabei unter anderen EGR-2 und EGR-3. Über die Auswirkung einer Disregulation dieser Proteine auf das Tumorstadium ist zur Zeit kaum etwas bekannt.

6.6 Ausblick

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Ursache der Überexpression von MADER in den Melanomzellen in einer gesteigerten Transkription liegt. Dies könnte einerseits auf einer Aktivierung des MADER-Promotors durch entsprechende Transkriptionsfaktoren beruhen, andere Möglichkeiten wären Mutationen im Promotorbereich oder ein veränderter Methylierungsstatus in den stromaufwärts gelegenen regulatorischen DNS-Elementen. Durch eine weitere Untersuchung dieser Faktoren würden deshalb nähere Einblicke in die Signalwege und deren Disregulation in den Melanomzellen möglich werden.

Auch die Aufklärung der Funktion einer Überexpression von MADER in den Melanomzellen bedarf noch weiterer Untersuchungen. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Interaktion von MADER mit den anderen Mitgliedern der EGR-Transkriptionsfaktorfamilie gelegt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Albino, A.P., Vidal, M.J., McNutt, N.S, Shea, C.R., Prieto, V.G., Nanus, D.M., Palmer, J.M., Hayward, N.K. (1994) Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma, *Melanoma Res.* 4: 35-45
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Ames, B.N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer, *Science* 249: 970-971
- Bairoch, A., Bucher, P., and Hofman, K. (1997) The PROSITE database, its status in 1997, *Nucl. Acid Res.* 25: 217-221
- Balch, C.M., Houghton, A.N., Sober, A.J., Soong, S.J. (1998) *Cutaneous Melanoma*, Quality Medical publishing Inc., St Louis, USA
- Beijersbergen, R.I., Kerkhoven, R.M., Zhu, L., Carlee, L., Voorhoeve, M. and Bernards, R. (1994) E2F4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 in vivo, *Genes & Development* 8: 2680-2690
- Benedict, W.F., Xu, H.J., Hu, S.X. (1990) Role of the retinoblastom gene in the initiation and progression of human cancer, *J. Clin. Invest.* 85: 988-993
- Bishop, J.M. (1989) Molecular themes in oncogenesis, *Cell* 64: 235-248
- Bourne, R.H., Sanders, D.A., McCormic, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions, *Nature* 348: 125-132

- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162: 156-159
- Chou, T.-Y., Dang, C.V., Hart, G.W. (1995) Glycosylation of the c-MYC transactivation domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 4417-4421
- Churchill, M.E.A. and Travers, A.A. (1991) Protein motifs that recognize structural features of DNA, *Trends Biochem. Sci.* 16: 92-97
- Ciechanover, A. (1994) The Ubiquitin-Proteasom-Pathway, *Cell* 79: 13-21
- Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Epstein, M.E., Greene, M.H., and Van Horn, M. (1984) A study of tumor progression. The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanom, *Hum. Pathol.* 15: 1147-1165
- Daniel, S., Nagel, G., Johnson, J.P., Lobo, F.M., Hirn, M., Jantscheff, P., Kuroki, M., von Kleist, S., and Grunert, F. (1993) Determination of the specification of monoclonal antibodies recognizing members of the CEA family using a panel of transfectants, *Int. J. Cancer* 55: 303-310
- De Belle., J, Huang, R.P., Fan, Y., Liu, C., Mercola, D., and Adamson, E.D. (1999) p53 and EGR-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells but Egr-1 counteracts p53-dependent apoptosis, *Oncogene* 18: 3633-3642
- Deleage, G. and Roux, B. (1987) An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction, *Prot. Engng.* 1: 289-294
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal. Biochem.* 132: 6-13

- Gashler, A. and Sukathme, V.P. (1995) Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 50: 191-224
- Georjon, C. and Deleage, G. (1995) SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by prediction from multiple alignments, *Comput. Applic. Biosci.* 11: 681-684
- Gibrat, J.F., Garnier, J., Robson, B. (1987) Further developments of protein secondary structure prediction using information theory, *J. Mol. Biol.* 198: 425-443
- Ginsberg, D., Vairo, G., Chittenden, T., Xiao, Z.-X., Xu, G., Wyder, K.L., DeCaprio, J.A., Lawrence, J.B., and Livingston, D. (1994) E2F4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107, *Genes & Development* 8: 2665-2679
- Goldberg, A.L., Dice, J.F., and St.John, A.C. (1974) Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells, *Annu. Rev. Biochem.* 42: 835-869
- Greenblatt, M.S., Benett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis, *Cancer Res.* 54: 4855-4864
- Ha, I., Roberts, S., Maldano, E., Sun, X., Kim, L.U., Green, M., Reinberg, D. (1993) Multiple functional domains of human transcription factor IIB: distinct interactions with two general transcription factors and RNA polymerase II, *Genes Dev.* 6: 1021-1032
- Harper, J.W. (1993) The p21 CDK-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell* 75: 808-816

- Harries, C.C. (1993) p53: at the crossroads of the molecular carcinogenesis and risk assesment, *Science* 262: 1980-1981
- Hart, G.W. (1997) Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 66: 315-335
- Herlyn, M., Clark, W.H., Rodeck, U., Mancianti, M.L., Jambrosic, J., and Koprowski, H. (1990) In vitro properties of human melanoma cells metastatic in nude mice, *Cancer Res.* 50: 2296-2302
- Huang, R.P., Fan, Y., Peng, A. Zeng, Z.L., Reed, J.C., Adamson, E.D., and Boynton, A.L. (1998) Suppression of human fibrosarcoma cell growth by transcription factorE gr-1, involves down regulation of Bcl-2, *Int. J. Cancer* 77: 880-886
- Huang, R.P., Liu, C.T., Fan, Y., Mercola, D., and Adamson, E.D. (1995) Egr-1 negativly regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain, *Cancer Res.* 55: 5054-5062
- Hunter, T. (1987) Thousands and one protein kinases, *Cell* 49: 1-4
- Hussussian, C.J., Struewing, J.P., Goldstein, A.M., Higgins, P.A., Ally, D.S., Sheahan, M.D., Clark, W.H., Tucker, M.A., Dracopoli, N.C. (1994) Germline p16 mutations in familial melanoma, *Nat. Genet.* 8: 15-21
- Jackson, S.P. and Tjian, R. (1988) O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation, *Cell* 55: 125-133
- Juretic, D. and Lucin, A. (1998) The preference functions method for predicting protein helical turns with membran propensity, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 38: 575-585

- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.T., and Smith, A.E. (1984) Sequence requirements for nuclear localisation of simian virus 40 large T antigen, *Nature* 311: 33-38
- Kelly, W.G., Dahmus, M.E., Hart, G.W. (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc, *J. Biol. Chem.* 268: 10416-10424
- Kirsch, K.H, Korradi, Y., and Johnson, J.P. (1996) Mader, a novel nuclear protein overexpressed in human melanomas, *Oncogene* 12: 963-971
- Kirsch, K.H. (1996) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des melanomassoziierten mader-Gens, *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Klug, A. and Rhodes, D. (1987) Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52: 473-482
- Knudson, A.G. (1993) Antioncogenes and human cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 10914-10921
- Konstadoulakis, M.M., Vezeridis, M., Hatziyianni, E., Karakousis, C.P., Cole, B., Bland, K.I., Wanebo, H.J. (1998) Molecular oncogene markers and their significance in cutaneous malignant melanoma, *Ann. Surg. Oncol.* 5: 253-260
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157: 105-132
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bakterioophage T4, *Nature* 227: 680-685

- Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells, *Nature* 278: 261-263
- Langenfeld, J., Kiyokawa, H., Sekula, D., Boyle, J., and Dmitrovsky, E. (1997) Posttranslational regulation of cyclin D1 by retinoic acid: A chemoprevention mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 12070-12074
- Le Beau, M.M., Espinosa, R., Neumann, W.L., Stock, W., Roulston, D., Larson, R.A., Keinanen, W., Westbrook, C. (1993) Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5484-5488
- Lee, C.H., Li, W., Nishimura, M., Zhou, M., Batzer, A.G., Myers, M.G., White, M.F., Schlesinger, J. and Skolnik, E.J. (1993) NCK associated with the SH2 domain docking protein IRS-1 in insulin stimulated cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 11713-11717
- Lehmann, J.M. (1989) Biochemische und molekulare Charakterisierung der im malignen Melanom überexprimierten Moleküle MUC 18, MUC 54 und Modul 18, *Dissertation*, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Levin, B. (1991) Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors, *Cell* 64: 303-312
- Levin, W.J., Baynor, R.B., Press, M.F., Sukhatme, V.P., Boone, T.C., Reissmann, P.T., Figlin, R.A., Holmes, E.C., Souza, L.M., Salmon, D.J. (1995) Expression patterns of immediate early transcription factors in human non-small cell lung cancer, *Oncogene* 11: 1261-1269
- Levine, A.J. (1993) The tumor suppressor genes, *Annu. Rev. Biochem.* 62: 623-625

- Liu, C., Calogero, A., Ragona, G., Adamson, E., and Mercola, D. (1996) EGR-1, the reluctant suppression factor, *Crit. Rev. In Oncogen.* 7: 101-125
- Liu, C., Yao, J., de Belle, I., Huang, R.-P., Adamson, E., and Mercola, D. (1999) The Transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor beta 1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1, *J. Biol. Chem.* 274: 4400-4411
- Liu, C.T., Adamson, E.D., and Mercola, D. (1996) Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 11831-11836
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Maltzman, W. and Czyzyk, L. (1984) UV irradiation stimulates level of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells, *Mol. Cell Biol.* 4: 1689-1694
- Marshall, C.J. (1991) Tumor suppressor genes, *Cell* 64: 313-326
- Mayer, B.J. and Hanafusa, H. (1990) Association of the v-crk oncogene product with phosphotyrosine containing proteins and protein kinase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2638-2642
- Mechta-Grigoriou, F., Garel, S., Charnay, P. (2000) Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain, *Development* 127: 119-128

- Meisner, H. and Czech, M.P. (1991) Phosphorylation of transcriptional factors and cell-cycle dependent proteins by casein kinase II, *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 474-483
- Milbrandt, J., (1987) A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulator factor, *Science* 238: 797-799
- Miyazi, M., Ohashi, R., Tsuji, T., Mihara, K., Gohda, E., Namba, M. (1998) Transforming growth factor-beta 1 stimulates or inhibits cell growth via down- or up-regulation of p21/Waf1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246: 873-880
- Nair, P., Muthukkumar, S., Sells, S.F., Han, S.S., Sukathme, V.P., and Rangnekar, V.M. (1997) Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53, *J. Biol. Chem.* 272: 20131-20138
- Nigg, E.A., Baeurle, P.A., and Lüthmann, R. (1991) Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms, *Cell* 66: 15-22
- Ornstein, L., Davis, B.J. (1976) A microgel system for disc elektrophoresis, *Anal. Biochem.* 72: 485-490
- Pavletich, N.P., and Pabo, C.O. (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif-268 (EGR-1)-DNA complex at 2.1 Å, *Science* 252: 809-817
- Pearson, W.R., and Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444-2448
- Peltz, S.W., Brewer, G., Bernstein, P., Hart, P.A., and Ross, J. (1991) Regulation of mRNA turnover in eukaryotic cells, *Crit. Rev. Euc. Gene Expr.* 1: 99-126

- Qu, Z., Wolfrain, L.A., Svaren, J., Ehrenguber, M.U., Davidson, N. and Milbrandt, J. (1998) The transcriptional corepressor NAB2 inhibits NGF-induced differentiation of PC12 Cells, *J. Cell Biol.* 142: 1075-1082
- Ries, L.A.G., Kosary, C.L., Hankkey, B.F., Miller, B.A., Clegg, L., Edwards, B.K. (eds) (1999), *SEER Cancer Statistics Review, 1973-1996*, National Cancer Institute, Bethesda, USA
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A., and Dingwall, C. (1991) Two independent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence, *Cell* 64: 615-623
- Rogers, S., Wells, R., and Rechensteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science* 234: 364-368
- Sachs, A.B. (1993) Messenger RNA Degradation in Eukaryotes, *Cell* 74: 413-421
- Sager, R. (1989) Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise, *Science* 246: 1406-1412
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Ehrlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239: 487-491
- Schiavi, S.C., Belasco, J.G., and Greenberg, M.E. (1992) Regulation of proto-oncogene mRNA stability, *Biochim. Biophys. Acta* 1114: 95-106

- Shaw, G. and Kamen, R. (1986) A conserved AU-sequence from the 3'untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation, *Cell* 46: 659-667
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., Iggo, R. (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: Evidence for a role for O-glycosylation, *Oncogene* 12: 921-930
- Silverman, E.S., Khachigian, L.M., Santiago, F.S., Williams, A.J., Lindner, V., and Collins, T. (1999) Vascular Smooth Muscle Cells Express the Transcriptional Corepressor NAB2 in Response to Injury, *American Journal of Pathology* 155: 1311-1317
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.* 98: 503-510
- Svaren, J., Apel, E.D., Simburger, K.S., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J. Copeland, N.A., and Milbrandt, J. (1997) The Nab2 and Stat6 Genes Share a Common Transcription Termination Region, *Genomics* 41: 33-39
- Svaren, J., Sevetson, B.R., Apel, E.D., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., and Milbrandt, J. (1996) NAB2, a corepressor of NGFI-A (EGR-1) and KROX20, is induced by proliferative and differentiative stimuli, *Mol. Cell. Biol* 16: 3545-3553
- Svaren, J., Sevetson, B.R., Golda, T., Stanton, J., Swirnoff, A.H., and Milbrandt, J. (1998) Novel mutants of NAB corepressors enhance activation by EGR transactivators, *EMBO J.* 17: 6010-6019
- Towbin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4350-4354

- Van Etten, Jackson, P., Baltimore D. (1989) The mouse typeIV c-abl gene product is a nuclear protein and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localisation, *Cell* 58: 669-678
- Varshavsky, A. (1992) The N-end rule, *Cell* 69: 725-735
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, V., White, R., Smits, A.M., Bos, L.J. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development, *N. Engl. J. Med.* 319: 525-532
- Wagner, S.N., Ockenfels, H.M., Wagner, C., Hofler, H., Goos, M. (1995) RAS gene mutations: a rare event in nonmetastatic primary malignant melanoma, *J. Invest. Dermatol.* 104: 868-871
- Xio, Z.-X., Ginsberg, D., Ewen, M., and Livingston, D.M. (1995) Regulation of the retinoblastoma protein-related protein p107 by G1 cyclin-associated kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 4633-4637

Publikationen

Veröffentlichungen:

Kirsch, K.H., **Kramer, D.M.**, Borelli, S. and Johnson, J.P. (2000) The melanoma associated molecule mader, is a phosphorylated nuclear protein with multiple isoforms, Submitted

Kramer, D.M., Kirsch, K.H., and Johnson, J.P. (2000) Regulation of mader/NAB2 expression in human melanomas, in Vorbereitung

Kongressbeiträge:

Zimmermann, A., **Kramer, D.M.**, Kirsch, K.H., Johnson, J.P. Human melanomas overexpress the transcriptional regulator mader: consequences for growth and metastasis formation, Poster presentation, *VII International Congress of the Metastasis Research Society*, 7.-10. October, 1998

Kramer, D.M. und Johnson, J.P. MADER: Biochemische Eigenschaften und Regulation eines humanen Transkriptionsrepressors, Vortrag, *BIOLOG 99*, 20. November 1999

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Daniel Markus Kramer

* 13.04.1968 in Deggendorf

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung

1974 - 1979

Grund- und Hauptschule an der Balanstraße, München

1979 - 1989

Asam Gymnasium München (naturwissenschaftlich)

05/1989

Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

06/1989 - 08/1990

Grundwehrdienst bei 3./InstBtl 210 Bruchsal / München

Studium

11/1990 - 11/1995

Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München

11/1995

Diplomhauptprüfung (Wahlfach: Biochemie)

01/1996 - 07/1996

Diplomarbeit im Fach Biochemie am Institut für Immunologie. Thema: „Charakterisierung des MADER-Proteins und der gegen das MADER-Protein gerichteten monoklonalen Antikörper“

08/1996 - 07/2000

Doktorarbeit am Institut für Immunologie. Thema: „MADER: Biochemische Eigenschaften und Regulation eines humanen Transkriptionskorepressors“

Berufstätigkeit

seit 08/1996

Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Immunologie der LMU München