

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von *RERE*,
einem Gen mit möglicher Relevanz bei der Tumorentstehung**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Thomas Michael Wärner
aus Wertheim am Main

Hauptberichter: Prof. Dr. K. Pfizenmaier
Mitberichter: Priv. Doz. Dr. H. Wajant
Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2001

Universität Stuttgart
Institut für Zellbiologie und Immunologie
2001

"Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens endet nicht mit einem Schlußpunkt, sondern mit einem Fragezeichen. Ein Plus an Wissen bedeutet ein Plus an Fragestellungen, und jede von ihnen wird immer wieder von neuen Fragestellungen abgelöst."

(H. Hesse 1877 - 1962)

Diese Arbeit wurde von mir selbst
mit Hilfe der angegebenen Mittel durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden in der Fachzeitschrift "*Cell Growth and Differentiation*"
(April, 2001) veröffentlicht.

Biberach an der Riss, den 22.03.2001

INHALTSVERZEICHNIS

	INHALTSVERZEICHNIS.....	3
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
1.	ZUSAMMENFASSUNG	7
2.	EINLEITUNG	8
2.1.	Funktionelle Gruppen von tumorrelevanten Proteinen	8
2.2.	Genetische Relevanz bei soliden Tumoren	10
2.3.	Identifizierung eines Bruchpunkt-Gens in der Neuroblastom Zelllinie NGP	11
2.4.	Tumorrelevante Proteine in PODs (PML Oncogenic Domains).....	13
2.5.	POD assoziierte Proteine PML, p53 und pRB als gemeinsame RAS Gegenspieler.....	14
2.6	Ziel der Arbeit	15
3.	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1.	Geräte	16
3.2.	Chemikalien und Enzyme	17
3.3.	Zelllinien	19
3.4.	Peptide, Antikörper und Seren	19
3.5.	Bakterienstämme und Plasmide	20
3.5.1.	Herstellung verwendeter Plasmidkonstrukte	21
3.5.1.1.	Herstellung des pSG5myc RERE Plasmids.....	21
3.5.1.2.	Herstellung der GFP-RERE Plasmide	21
3.5.1.3.	Herstellung des pET-RERE_N70kD Vektorkonstruktes.....	21
3.5.2.	Herstellung des pGFP-RERE/Tet ⁽⁻⁾ Vektorkonstruktes	22
3.6.	Computerprogramme	22
3.7.	Allgemeine Medien, Puffer, Lösungen	23
3.8.	Allgemeine molekularbiologische Methoden	26
3.8.1.	Isolierung von Plasmid DNA	26
3.8.2.	Isolierung von poly (A) ⁺ RNA.....	26
3.8.3.	Isolierung von genomischer DNA.....	27
3.8.4.	Enzymatische Behandlung der DNA (nach Sambrook et al. 1989).....	27
3.8.4.1.	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	27
3.8.4.2.	Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (AP).....	27
3.8.4.3.	5' Auffüllreaktion mit Klenov Enzym.....	28
3.8.4.4.	Behandlung mit T4-DNA-Ligase.....	28
3.8.4.5.	Phenol/Chloroform Extraktion von DNA.....	28
3.8.5.	Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis et al., 1986).....	29
3.8.6.	Sequenzierung von DNA	29
3.8.7.	Transfer von DNA.....	30
3.8.7.1.	Elektrotransformation-Elektroporation (nach Dower et al. 1988).....	30
3.8.7.2.	Einschleusen von DNA in Eukaryontenzellen.....	30
3.8.8.	DNA Gelelektrophorese.....	31
3.8.8.1.	Agarose-Gelelektrophorese.....	31
3.8.8.2.	Extraktion von DNA aus Agarose	31
3.9.	DNAanalytische Methoden.....	32
3.9.1.	Genomischer Southern Blot	32
3.9.1.1.	Probenvorbereitung.....	32
3.9.1.2.	Auftrennung	32
3.9.1.3.	Transfer auf Nylonmembran.....	33
3.9.1.4.	Hybridisierung	33

3.10.	RNAanalytische Methoden	34
3.10.1.	Auftrennung von RNA mit einem denaturierendem Gel	34
3.10.1.1.	Vorbereitung der RNA Proben	34
3.10.1.2.	Auftrennung der RNA.....	34
3.10.1.3.	Transfer von RNA auf Nylonmembran	35
3.10.1.4.	Hybridisierung	35
3.10.1.5.	Radioaktive Markierung der DNA Sonden.....	36
3.10.2.	Quantitative RT-PCR (TaqMan [®]).....	37
3.11.	Proteinanalytische Methoden	37
3.11.1.	Proteinquantifizierung (Bradford 1976).....	37
3.11.2.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
3.11.3.	Ni-Chelat Chromatographie	39
3.11.4.	Affinitätschromatographie	39
3.11.4.1.	Herstellung der Affinitätssäule	39
3.11.4.2.	Affinitätsreinigung der Peptid Immuseren.....	39
3.11.5.	Lagerung der gereinigten Proteine	40
3.11.6.	Western Blot.....	40
3.11.6.1.	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran	40
3.11.6.2.	Antikörperhybridisierung.....	40
3.11.6.3.	Regenerieren von Western Blots.....	41
3.11.7.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	41
3.11.8.	Immunfärbung und Mikroskopie	42
3.11.8.1.	Immunfluoreszenz von Formaldehyd fixierten Zellen.....	42
3.11.8.2.	Immunfärbung von Methanaol-Acteon fixierten Zellen.....	43
3.11.8.3.	Mikroskopie	43
3.12.	Zellkultur Methoden.....	44
3.12.1.	Standardkultivierung	44
3.12.1.1.	Auftauen und Kultivieren.....	44
3.12.1.2.	Passagieren.....	44
3.12.2.	Zellzyklusarrest mit Thymidin oder Nokodazol	45
3.12.3.	FACS Analyse zur Bestimmung des DNA Gehaltes in Zellen.....	45
3.12.4.	FACS Analyse zum Nachweis toter Zellen.....	46
3.12.5.	TUNEL Färbung	46
3.13.	Herstellung eines Immuserums	47
3.13.1.	Herstellung und Reinigung des N-terminalen RERE Fragments.....	47
3.13.1.1.	Expression des N-Terminalen RERE Fragments in <i>E. coli</i> BL 21	47
3.13.1.2.	Zellyse mit Ultraschall und Guanidiniumhydrochloridlösung	48
3.13.1.3.	Reinigen im Acrylamidgel	48
4.	ERGEBNISSE	49
4.1.	Beschreibung der RERE cDNA und der genomischen Struktur.....	49
4.1.1.	Vervollständigen der RERE cDNA Sequenz.....	49
4.1.2.	Beschreibung der RERE cDNA und des kodierten Proteinprodukts	51
4.1.3.	Genomische Struktur des RERE Leserahmens.....	51
4.2.	Beschreibung von alternativen RERE Transkripten	54
4.2.1.	RNA Expressionsuntersuchungen von humanem Gewebe.....	54
4.2.2.	Aminosäuresequenzvergleich der RERE Splicevarianten mit Atrophin-1	56
4.2.3.	Charakterisierung von Splicevarianten mittels Northern Blot Analyse	59
4.3.	Zelluläre Lokalisierung von transient exprimiertem RERE Protein	60
4.3.1.	Nachweise der zellulären Lokalisierung von MYC-RERE Protein	60
4.3.2.	Nachweis der zellulären Lokalisierung von Vollängen-GFP-RERE und von N- und C-terminalen GFP-RERE Fragmenten.....	61

4.3.3.	Getrennte zelluläre Verteilung von RERE im Vergleich zu Golgi Strukturen und SC35-haltigen Splicing Aggregaten.....	64
4.3.4.	Kolokalisierung von RERE und N-terminalen RERE Fragmenten mit PODs	65
4.3.5.	Kolokalisierung von RERE mit dem pro-apoptotischen Protein BAX.....	67
4.3.6.	Kolokalisierung von RERE mit Mitochondrien.....	69
4.4.	Funktionelle Charakterisierung von exogenem RERE	70
4.4.1.	Geringe Kolonienbildung in Selektionsansätzen mit RERE-transfizierten Zellen.....	70
4.4.2.	Nachweis einer erhöhten Zahl toter Zellen nach der Transfektion mit dem C-terminalen RERE Konstrukt durch Färbung mit Propidiumjodid.....	71
4.4.3.	Nachweis apoptotischer Veränderungen in RERE transfizierten Zellen	73
4.4.4.	Nachweis des 85 kD Fragments der Poly(ADPribose)Polymerase (PARP) in RERE transfizierten Zellen	74
4.4.5.	Nachweis von apoptotischen Zellen nach der Transfektion mit RERE mittels der TUNEL Methode	76
4.4.6.	Beschreibung der zeitabhängigen Veränderungen von RERE Aggregaten	77
4.5.	Herstellung und Reinigung von RERE bindenden Antikörpern	79
4.5.1.	Herstellung und Affinitätsreinigung von Peptidantikörpern	79
4.5.2.	Herstellung und Reinigung eines 70 kD His-RERE Fragments	81
4.5.3.	Charakterisierung der Antikörper mittels ELISA und Immunfärbung	82
4.6.	Analyse von Tumor Zelllinien auf mögliche Veränderungen im <i>RERE</i> Gen und den RERE Genprodukten	84
4.6.1.	Southern Blot Analysen von Tumor Zelllinien	84
4.6.2.	Northern Blot Analysen von Tumor Zelllinien.....	86
4.6.3.	Western Blot Analysen von Tumor Zelllinien	87
4.7.	Weitere Analysen zum Expressionsniveau und der subzellulären Lokalisierung von endogenem RERE	89
4.7.1.	Vergleich des zellulären RNA- und Proteinniveaus von RERE und Zyklin A im Zellzyklus.....	89
4.7.2.	Bestimmung der intrazellulären Lokalisierung von endogenem RERE	91
5.	DISKUSSION	93
5.1.	Struktur des RERE Gens und Nachweis verschiedener RNA Transkripte	94
5.2.	Veränderung im Gen für RERE und den RERE Genprodukten bei bestimmten Tumor Zelllinien	95
5.3.	Zelluläre Verteilung von RERE und N-terminalen RERE Fragmenten im Vergleich zu PODs.....	97
5.4.	Zelluläre Verteilung von RERE und N-terminalen RERE Fragmenten im Vergleich zu BAX und Mitochondrien	99
5.5.	Mögliche Funktionen des RERE Proteins.....	100
5.6.	Rolle von RERE in apoptotischen Prozessen.....	101
5.7.	Die Bildung von RERE Aggregaten im Zusammenhang mit zellulären Veränderungen bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen	104
5.8.	Pro-apoptische Therapieansätze zur Behandlung von Krebs.....	105
6.	ANHANG	107
	Dot Blot Gewebeverteilung.....	107
7.	LITERATURVERZEICHNIS	108
	ZUSAMMENFASSUNG IN ENGLISCHER SPRACHE	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	mikro	log	logarithmus
Abb.	Abbildung	M	molar (mol/l)
abs.	absolut	mg	Milligramm
ATP	Adenosin-triphosphat	min	Minute
Amp	Ampicillin	MP	Milchpulver
AS	Aminosäure	msec	Millisekunde
BSA	Bovines Serumalbumin	nm	Nanometer
cM	Centimorgan	nt	Nukleotid
Cu	Kupfer	N-Terminus	Aminoterminus
C-Terminus	COOH-Aminosäureterminus	OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge, x nm
H ₂ O _{mp}	Milliporewasser	PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
His	Histidin	PARP	poly(ADPribose) polymerase
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenylindol	PBS	Phosphat Buffered Saline
DMSO	Dimethylsulfoxid	PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Pi	Probidiumjodid
dNTPs	Desoxynukleotide	PML	Promyelocytische Leukämie
DRPLA	Dentatorubrale Pallidoluyische Atrophie	POD	PML Oncogenic Domain
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RERE	RE Repeat
EDTA	Ethylen-diamin-N,N,N',N',-tetraacetat	RNA	Ribonukleinsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	rpm	Runden pro Minute
EGFR	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors	RT	Raumtemperatur
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	s	Sekunde
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting	SDS	Natrium-dodecylsulfat
FCS	Fötale Kälberserum	SRO	"smallest Region of overlap" kleinste überlagernde Region
g	Gramm, Gravitationskonstante	Tab.	Tabelle
GFP	Green Fluorescent Protein	TAE	Tris/Acetat/EDTA
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid	TBS	Tris Buffered Saline
h	Stunden	TE	Tris/EDTA
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
Kan	Kanamycin	Tet	Tetracyclin
kb	Kilobasen	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
kD	Kilodalton	TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labelling
kJ	Kilojoule	U	Unit
l	Liter	UV	Ultraviolett
LB	Luria-Bertani	w/v	Gewicht pro Volumen (g/ml)

Zusammenfassung

Das *RERE* (RE repeats encoded) Gen liegt in der genomischen Region 1p36, die bei verschiedenen Tumoren und im Besonderen bei Neuroblastom Tumoren häufige Veränderungen aufweist. Aufgrund der Lokalisierung von *RERE* als Bruchpunkt-Gen einer Chromosomen-Translokation in der Neuroblastom Zelllinie NGP wurde in dieser Arbeit *RERE* im Hinblick auf dessen mögliche Relevanz bei der Tumorentstehung strukturell und funktionell charakterisiert.

In dieser Arbeit wurde eine cDNA Sequenz von *RERE* vervollständigt und als neue Splicevariante identifiziert. Der Vergleich von genomischen *RERE*-Gensequenzen und von *RERE*-RNAs verschiedener Tumor Zelllinien deutete zunächst nicht auf große genomische Veränderungen des *RERE* Gens bei Neuroblastom Tumoren hin. In allen untersuchten gesunden Geweben wurden zwei dominante RNA Transkripte nachgewiesen. Die nachgewiesene Menge beider RNA Transkripte oder die Menge des kleineren Transkriptes war in Neuroblastom Zelllinien geringer als in anderen Tumor Zelllinien oder in den meisten gesunden Geweben. Einen Hinweis auf eine veränderte *RERE*-Proteinexpression ergab die Untersuchung der Proteinfractionen von verschiedenen Tumor Zelllinien. In 2 von 18 untersuchten Zelllinien wurde im Western Blot eine zusätzliche Proteinbande mit einem Immunsereum nachgewiesen.

In transfizierten Zellen wurde *RERE* im Zytoplasma und im Zellkern nachgewiesen. Im Zellkern war ein großer Anteil von exogenem *RERE* in Aggregaten konzentriert, die teilweise mit PODs (PML Oncogenic Domains) kolokalisiert nachgewiesen wurden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Färbung von exogenem, zytoplasmatischem *RERE* mit der Färbung von BAX und Mitochondrien kolokalisierte und dass BAX, in einem Teil der transfizierten Zellen, eine ungewöhnliche Lokalisierung in PODs aufwies. Nach der Transfektion mit dem gesamten *RERE* Produkt wurde nach 48 Stunden eine kaspase-abhängige Apoptose mit der TUNEL Methode in verschiedenen untersuchten Zelllinien nachgewiesen. Im Ansatz mit Zellen, die mit dem C-terminalen *RERE* Konstrukt transfiziert wurden, konnte ein schneller Zelltod bereits nach 14 Stunden mittels Propidiumjodid-Färbung nachgewiesen werden.

Mit dem Nachweis von (I) veränderten *RERE*-Proteinbanden in 11 % der untersuchten Zelllinien sowie (II) der Lokalisierung von *RERE* in PODs und (III) der pro-apoptischen Funktion von exogenem *RERE* gibt diese Arbeit einen ersten Hinweis darauf, dass der Verlust der *RERE* Funktion die Entstehung von Tumoren begünstigen kann.

2. EINLEITUNG

2.1. Funktionelle Gruppen von tumorrelevanten Proteinen

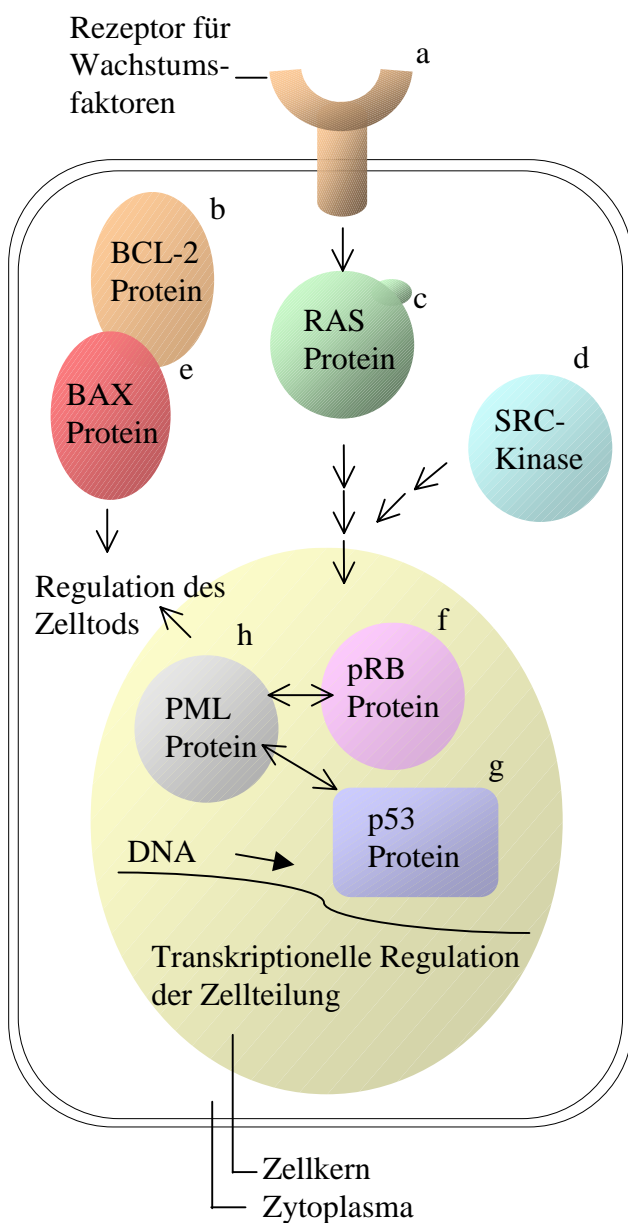
Krebs ist neben Herz-Kreislauf Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Ländern Europas und Nordamerikas (American Cancer Society¹). Bisher sind verschiedene menschliche Gene bekannt, die an der Krebsentstehung beteiligt sind. Sogenannte Proto-Onkogene kodieren für Proteine, welche die Zellteilung stimulieren. In mutierter Form können sie zu Onkogenen ("Krebsgenen") werden, deren Proteine dann hyperaktiv sind und die Zelle veranlassen sich exzessiv zu teilen. Beispiele dafür sind Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren wie beispielsweise C-, L-, und N-MYC, die ihrerseits wieder wachstumsfördernde Gene aktivieren (Schmid, 1996; Wu et al., 1999). Weitere Beispiele für Onkogene sind Gene, die für Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren kodieren (z.B. PDGF, ERB-B; Westermarck et al., 1995; Chausovsky et al., 2000) oder Gene, die für zytoplasmatische Übermittlerproteine innerhalb stimulatorischer Signalwege kodieren (z. B. Ki-RAS, N-RAS; Schlesinger et al., 1999; Marshall, 1996). Die Onkogenprodukte BCL-2, MDM 2 und p73 können eine unkontrollierte Zellvermehrung hervorrufen, indem sie den programmierten Zelltod (Apoptose) verhindern (Yang und Korsmeyer, 1996; Dmitrieva et al., 2000; Pozniak et al., 2000). Die Apoptose spielt bei der Beseitigung von entarteten oder von überflüssigen Zellen, besonders während der Embryonalentwicklung, eine wichtige Rolle (Ameisen, 1996).

Tumorsuppressor-Gene hingegen kodieren für Proteine, welche die Zellteilung unterdrücken. Beispielsweise hemmt das zytoplasmatische Tumorsuppressor-Genprodukt NF-1 das stimulatorische RAS Protein (Downward, 1992; Ohba et al., 2000). Im Zellkern wurden verschiedene Tumorsuppressor-Produkte nachgewiesen, die bei einer ganzen Reihe verschiedener Tumoren inaktiviert sind. Das p16-Protein und das pRB (Retinoblastom Protein) können den Zellzyklus bremsen (Steiner et al., 2000; Passegue et al., 2000). Das p53 Protein ist an einem weiten Spektrum von Tumoren beteiligt, wenn es seine Fähigkeit verliert, die Zellteilung in abnormen Zellen zu stoppen und die Apoptose zu aktivieren (Marin et al., 2000; Ryan et al., 2000). Werden solche Proteine infolge von Gen-Mutationen inaktiviert, verliert die Zelle wichtige Kontrollinstanzen, die ihre Teilungsaktivität normalerweise in Schranken halten.

¹<http://www.cancer.org/statistics/index.html>

Abb. 2-1: Übersicht zu einigen tumorrelevanten Genen und der Zusammenhang mit Krebs beim Menschen.

Bei Krebs können verschiedene Komponenten der Zelle fehlen, zu viel oder zu wenig vorhanden sein oder falsch funktionieren. Wenn diese Proteine ihre Funktion verlieren, steuernd und regulierend in den Ablauf des Zellzyklus einzugreifen oder den Zelltod in überflüssigen oder abnormen Zellen verhindern, können Tumore entstehen. In der linken Grafik sind schematisch 8 tumorrelevante Proteine dargestellt (a-h). Auf mögliche Funktionen oder Interaktionen wird durch Pfeile hingewiesen. In der rechten Spalte sind den Proteinen die Zusammenhänge mit Krebs beim Menschen zugeordnet (in Anlehnung an Old, 1996).



Zusammenhang mit Krebs beim Menschen:

a) Rezeptor für Wachstumsfaktoren: Vermehrt vorhanden bei 20 % der Brustkrebsfälle (beispielsweise ERB-B, EGFR) = Onkogen.

b) BCL-2 Protein: Charakteristische Translokation t(14:18) in 85 % aller follikulären Lymphomen und in 20 % von diffusen B-Zell Lymphomen (Yang et al., 1996) = Onkogen.

c) RAS Protein: Mutationsbedingt bei 20 - 30 % aller malignen Tumore aktiviert = Onkogen.

d) SRC-Kinase: Mutationsbedingt in 2 - 5 % aller malignen Tumore aktiviert = Onkogen.

e) BAX Protein: Mutationen die den Leserahmen des *BAX* Gens verschieben in 64 % von erbten und sporadischen gastrointestinalen Tumoren (Yamamoto et al., 2000) = Tumorsuppressor-Gen.

f) pRB (Retinoblastom Protein): Mutiert oder fehlt in etwa 40 % aller Tumoren = Tumorsuppressor-Gen.

g) p53 Protein: Mutiert oder fehlend in etwa 50 % aller Tumoren = Tumorsuppressor-Gen.

h) PML Protein: Häufig mutiert in verschiedenen Formen von Leukämie, darunter chronische myeloische Leukämie (PML/RAR Fusionsprotein, t(15:17), Goddard et al., 1991) = Tumorsuppressor-Gen.

2.2. Genetische Relevanz bei soliden Tumoren

Bei der Mehrzahl der Tumoren häufen sich Mutationen erst im Laufe des Lebens in der Nachkommenschaft einer Zelle an. Damit eine Zelle bösartig wird - also sich unkontrolliert vermehrt, in fremdes Gewebe einwandert und dort Metastasen bildet - müssen in der Regel eine ganze Anzahl von Genen defekt sein. Das vermehrte Auftreten bestimmter Tumoren innerhalb einer Familie (z.B. Dickdarmkrebs und Brustkrebs) aber auch die frühe Entstehung von malignen (bösartigen) Tumoren bei Säuglingen wie beispielsweise Neuroblastomen deutet auf eine erbliche Komponente bei der Tumorentstehung hin (Malkin et al., 1994; Maris et al., 1999). Da mit Krebs assoziierte Mutationen ererbt sein können, wurden umfangreiche genetische Untersuchungen durchgeführt und dabei verschiedene genomische Regionen nachgewiesen, die häufig bei Tumoren verlorengegangen oder mutiert sind (Knudson, 1996). So wurden beispielsweise in Neuroblastomen, Dickdarmkarzinomen und anderen Tumoren vermehrt strukturelle Veränderungen in der telomeren Region des kurzen Armes von Chromosom 1 (1p) nachgewiesen (Mertens et al., 1997; Schwab et al., 1996). Bei Neuroblastom Tumoren und Neuroblastom Zelllinien wurden umfangreiche genetische Studien in der chromosomalen Region 1p durchgeführt. Dabei wurden in über 70 % der Neuroblastome zytogenetisch erkennbare Veränderungen der 1p Region nachgewiesen (Weith et al., 1989). Diese Veränderungen können entweder durch verlorengegangene Chromosomenstücke (Deletionen) oder durch einen intra- beziehungsweise interchromosomalen Austausch von Chromosomenbruchstücken entstanden sein. Durch den Vergleich von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen konnte die Region mit einer erhöhten Mutationsrate bis auf eine Länge von 20 cM innerhalb der chromosomalen Region (1p36.2,3) eingegrenzt werden. Dieser chromosomale Abschnitt beinhaltet die genomischen Marker D1S47 und D1S244 und wird häufig als SRO (smallest region of overlap) bezeichnet (White et al., 1995; Takeda et al., 1994). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der SRO möglicherweise ein oder mehrere Gene inaktiviert wurden oder verlorengegangen sind, deren veränderte oder nicht mehr vorhandenen Produkte die Entstehung von Tumoren nicht mehr unterdrücken können. Die Hypothese, dass in Chromosom 1 mindestens ein Tumorsuppressor-Gen lokalisiert ist, wird neben den zytogenetischen Daten auch durch zwei Experimente gestützt. Bereits 1991 konnte nachgewiesen werden, dass Neuroblastomzellen ihre tumorigenen Eigenschaften durch das Einschleusen eines nicht veränderten Chromosom 1 verlieren (Bader et al., 1991). Genauere Untersuchungen zeigten, dass bereits das

Einschleusen der chromosomalen Region 1p den tumorigenen Phänotyp von humanen Dickdarmkarzinomzellen aufhebt, während die ebenfalls transfizierte 1q Region keinen anti-tumorigenen Effekt zeigte (Tanaka et al., 1993). Bis heute wurde jedoch kein sicherer Kandidat für ein häufig inaktiviertes Tumorsuppressor-Gen in der SRO identifiziert. Deshalb wurde gezielt nach Zelllinien gesucht, die eine chromosomale Translokation in der SRO aufweisen, jedoch keinen Verlust von Chromosom 1 Material besitzen. Nach einem vereinfachten Modell ist bei einer 1p Translokation in Chromosom 1 nur das jeweilige Gen betroffen, das den Bruchpunkt überlagert.

2.3. Identifizierung eines Bruchpunkt-Gens in der Neuroblastom Zelllinie NGP

Die Neuroblastomzelllinie NGP enthält eine reziproke chromosomale Translokation/Duplikation zwischen Chromosom 1 und Chromosom 15 (1;15)(p36.2;q24), dup(1)(p36.2-p36.3). Diese genomische Veränderung beinhaltet einen Bruchpunkt in der SRO (Amler et al., 1995) und zusätzlich eine duplizierte Region von Chromosom 1 auf Chromosom 15 (Casciano et al., 1996). Die genomische Sequenz im Bereich der 1p36 Bruchpunktregion wurde mittels FISH Analyse (Fluorescence in situ Hybridisierung) charakterisiert und eine genomische Sequenz isoliert, die den Bruchpunkt überspannt (P. Gardellin, Manuskript in Vorbereitung). Mittels Exon Trapping wurden in dieser Sequenz 4 Exons des in dieser Arbeit beschriebenen RERE Gens nachgewiesen (P. Gardellin, Manuskript in Vorbereitung). RERE (RE repeats encoded) wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit erstmals von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben und nach zwei Regionen mit alternierenden Aminosäuren Arginin (R) und Glutaminsäure (E) benannt (Yanagisawa et al., 2000). Das RERE Protein besitzt homologe Abschnitte mit Regionen des DRPLA Proteins (Dentatorubral Pallidoluyasian Atrophy). Das DRPLA Protein ist auf Chromosom 12p lokalisiert und enthält Wiederholungen der Nukleotide „CAG“, die für die Aminosäure Glutamin kodieren (Koide et al., 1994). Vergleichbare CAG-Wiederholungen gibt es jedoch nicht im RERE Gen. Die RNA Transkripte von RERE und DRPLA sind in allen Geweben exprimiert (Kahn et al., 1996; Knight et al., 1997). Die N-terminale Sequenz von RERE enthält eine Sequenzwiederholung von Arginin (R) und Asparaginsäure (D) und mindestens zwei mögliche Kernlokalisierungssequenzen (NLSs, Yanagisawa et al., 2000; Efthymiadis et al., 1997). Während die N-terminale Region von RERE keine Homologie zu

dem DRPLA Protein enthält, ist die C-terminale Aminosäuresequenz des RERE Proteins zu 67 % homolog mit DRPLA. Die Homologie beinhaltet auch beide Proteinregionen mit RE Aminosäurewiederholungen. Mit einer in-vitro Protein-Bindungsstudie konnte eine direkte Interaktion der proximalen RE Region in RERE zwischen zwei RERE Proteinen oder mit der proximalen RE Region von DRPLA Protein nachgewiesen werden (Yanagisawa et al., 2000). In einem Transfektionsexperiment wurde gezeigt, dass RERE bei hohen zellulären Konzentrationen in Kernaggregate aggregieren kann und dort mit DRPLA kolokalisiert (Yanagisawa et al., 2000). Die Funktion von RERE konnte bisher nicht bestimmt werden.

Die im DRPLA Protein enthaltenen Polyglutaminsequenz spielt bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle (Nagafuchi et al., 1994). DRPLA ist eine erbliche Krankheit, die vorwiegend in der asiatischen Bevölkerung auftritt und die pathologisch durch degenerierte Regionen, beispielsweise im Kleinhirn und dem "Globus Pallidus" erkennbar ist (Koide et al., 1994). Insgesamt sieben Krankheiten stehen in direkter Verbindung mit einer krankhaft verlängerten Polyglutaminsequenz, darunter neben DRPLA auch Huntington (Becher et al., 1998; Mangiarini et al., 1996), Spinobulbare muskuläre Atrophie (SBMA; Becker et al., 2000) und verschiedene Formen der Spinocerebellären Ataxie (SCA 1,2,3,6 und 7; Paulson et al., 1997). In betroffenen Regionen von DRPLA Patienten und in DRPLA Tiermodellen wurden auffällige Aggregate im Zellkern nachgewiesen (Ross et al., 1997; Mhyashita et al., 1998). Vergleichbare Aggregate konnten durch die Expression kleiner, künstlicher Proteine mit Glutaminwiederholungen induziert werden, wobei in den Zellen gleichzeitig ein programmierter Zelltod (Apoptose) beobachtet wurde (Ikeda et al., 1996). Das DRPLA Protein ist an einem Signalweg beteiligt, der mit dem Insulin/IGF-1 Signalweg gekoppelt ist und kann dabei zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern wandern (Okamura-Oho et al., 1999). Das DRPLA Protein ist auch ein Substrat für Kaspasen und interagiert somit möglicherweise mit dem Signalweg der Apoptose (Ellerby et al., 1999). Darüber hinaus interagiert das DRPLA Protein mit ETO/MTG8 Protein aus einem nukleären Rezeptor-Korepressor Komplex und besitzt das Potenzial hemmend auf die Transkription zu wirken (Wood et al., 2000).

2.4. Tumorrelevante Proteine in PODs (PML Oncogenic Domains).

Für beide Proteine, DRPLA und RERE, sind neben einer zytoplasmatischen Verteilung auch die Bildung von Aggregaten im Zellkern beschrieben (Wood et al., 2000; Yanagisawa et al., 2000). Während für das DRPLA Protein keine Assoziation zu PODs nachgewiesen ist (Wood et al., 2000), wurde die Verteilung von RERE Protein in Kernaggregaten bisher nicht weiter charakterisiert. Im Zellkern gibt es verschiedene Arten von Proteinkomplexen, die als Kernaggregate erkennbar sind und damit als mögliche Lokalisierung für RERE in Frage kommen. Darunter befinden sich beispielsweise Komplexe, die RNA modifizieren (Splicisomen) oder Proteinkomplexe, die DNA in RNA umschreiben (Transkriptionskomplexe). Diese Proteinkomplexe sind neben anderen Strukturen im Kern notwendig, um eine geordnete Struktur im Zellkern zu gewährleisten (Phair und Misteli, 2000). Diese Ordnung ist für die Zelle von größter Bedeutung bei der Regulation der Genexpression und der korrekten Chromosomenverteilung während der Zellteilung. Eine Art von Kernaggregaten sind die an der Kernmatrix gebundenen „PML Nuclear Bodies“ (PML = Promyelocytische Leukämie). Diese „PML Nuclear Bodies“ werden unterschiedlich benannt. Einige Beispiele für die Bezeichnungen der gleichen Aggregate sind ND10, Kremer bodies oder PODs (PML oncogenic domains). PODs enthalten immer das PML Protein (Ascoli et al., 1991; Roth et al., 1995; Weis et al., 1994). Im Zellkern sind meist 10 - 30 PODs mit einem Durchmesser zwischen 0,2 - 1,0 µm. Die Anzahl und Größe von PODs variiert während des Zellzyklus (Hodges et al. 1994). Die Konzentration von PML Protein in PODs ist unter verschiedenen krankhaften Bedingungen wie beispielsweise nach einer Adenovirusinfektion oder bei verschiedenen Leukämieformen, darunter APL (acute promyelocytic leukemia), aufgelöst und PML zeigt dann eine gleichmäßige Verteilung im Zellkern (Pandolfi et al., 1991; Goddard et al., 1991; de The et al., 1991; Kakizuka et al., 1991; Koken et al., 1995). Bisher wurden etwa 30 verschiedene Proteine nachgewiesen, die zumindest zeitweise in PODs lokalisiert sind. Neben PML wurde das kleine ubiquitinähnliche Protein SUMO-1 (PIC1/Sentrin) in PODs nachgewiesen. SUMO-1 ist für die korrekte Bildung der PODs wichtig, indem es mit drei Lysinresten an PML bindet (Boddy et al., 1996). SUMO-1 modifiziertes PML bildet vermutlich das Gerüst für die POD Struktur während nicht modifiziertes PML in der löslichen Kernplasmafraktion verteilt ist (Muller et al., 1998). Erst die richtige Modifizierung von PML durch gebundenes SUMO-1 ermöglicht die Lokalisierung der oben beschriebenen Proteine zu PODs. Weitere POD assoziierte Proteine

sind beispielsweise die Transkriptionsregulatoren CBP (Creb Binding Protein), SP100, p53 und pRB (Retinoblastom Protein) sowie die pro-apoptotischen Proteine BAX und DAXX (Zhong et al., 2000a; Matera et al., 1999). Neben p53 können also verschiedene Proteine in PODs lokalisieren, die eine wichtige Rolle in den molekularen Mechanismen der Tumorentstehung spielen. Als Beispiele sind hier die Rolle von PML bei der genomischen Stabilität während der Zellteilung (Zhong et al., 1999), die Rolle von PML und Retinoblastomprotein bei der Regulation des Zellzyklus (Labbaye et al., 1999) sowie die Rolle von PML, DAXX und BAX beim programmierten Zelltod genannt (Zhong et al., 2000b). Somit beinhalten PODs eine Reihe von Proteinen, die für die Regulation der Zellteilung sowie für das Überleben der Zelle wichtig sind. Eine funktionelle Verbindung aller Proteine ist bisher nicht bekannt jedoch gibt es erste Hinweise auf eine Beziehung zwischen der Funktion von p53, pRB, CBP und PML bei der Blockade des Zellzyklus.

2.5. POD assoziierte Proteine PML, p53 und pRB als gemeinsame RAS Gegenspieler

Aktiviertes RAS Protein ist ein zytoplasmatischer Übermittler von stimulatorischen Signalwegen, die ohne eine Regulation eine unkontrollierte Zellvermehrung hervorrufen würden. Durch das RAS Onkoprotein wird in verschiedenen Zelllinien aber auch die Expression von PML induziert. PML wirkt dann effektiv der aktivierenden Funktion von RAS entgegen indem sich ein stabiler Komplex aus CBP, p53 und PML in PODs bildet. In diesem Komplex wird p53 durch CBP acetyliert und dadurch die p53 abhängige Szeneszens hervorgerufen (Pearson et al., 2000). Neben p53 wird durch die Expression des RAS Proteins auch der Transkriptionsfaktor pRB Protein in PODs rekrutiert und es wird ein Anstieg des Gehalts an p16, hypophosphoryliertem Rb und Phosphoserin-15 p53 gemessen (Ferbeyre et al., 2000). Darüber hinaus werden dabei durch PML auch eine Reihe von p53 regulierten Genen exprimiert (Ferbeyre et al., 2000). Durch Untersuchungen mit PML^{-/-} Fibroblastenzellen konnte die Notwendigkeit von PML für den Prozess der Szeneszens nach der Expression von onkogenem RAS nachgewiesen werden, da in PML^{-/-} Zellen keine Szeneszens induziert werden kann, CBP und p53 nicht acetyliert sind und auch keinen stabilen Komplex in POD ähnlichen Strukturen bilden (Pearson et al., 2000).

Diese Daten zeigen erstmals ein funktionelles Zusammenspiel verschiedener POD assoziierter Proteine bei der Kontrolle des Zellwachstums und der Apoptose - die entscheidenden Prozesse bei der Vermeidung oder Beseitigung entarteter Zellen.

2.6. Ziel der Arbeit:

Im Rahmen eines Projektes zur Identifizierung von tumorrelevanten Genen in der chromosomalen Region 1p36 wurde am Institut für Molekulare Pathologie (IMP, Wien) das Gen identifiziert, das bei der Neuroblastom Zelllinie NGP in der Chromosomalen Region 1p36 über dem Bruchpunkt liegt (*RERE*-Gen). Zu Beginn dieser Arbeit standen zwei nicht überlappende cDNA Fragmente, die zur Isolierung der gesamten cDNA verwendet werden sollten, zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war die genomische und funktionelle Charakterisierung des Bruchpunkt-Gens und der möglichen Genprodukte. Die ermittelten Daten sollen einen Beitrag zum Verständnis der Funktion des *RERE*-Gens leisten, im Zusammenhang mit einer möglichen Funktion von *RERE* bei der Tumorentstehung.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Geräte:

Agfa	Curix 60 Filmentwicklungsmaschine
Becton Dickinson	FACS SCAN (Becton Dickinson)
BioRad	PAGE Elektrophoresekammer Agarose Elektrophoresekammer Gene Pulser (Elektroporation)
Dynatech	ELISA READER MR 5000
Eppendorf	PCR Maschine Tischzentrifuge Thermomixer Zentrifuge 5810 mit Ausschwingrotor GeneAmp PCR System 9700
Heraeus	Megafuge 1.0, "Biofuge primo" (Tisch-Kühlzentrifuge) Brutschränke "function line"
Leica	Mikroskop DMRA Konfokales Laser Mikroskop DMIRBE
Licor	DNA-Sequenzer LONG READIR4200
Molecular Dynamics	Storm 860 Phosphoimager
MWG Biotech	UV-Schirm, UV-Bildverarbeitungssystem
Perkin Elmer	TaqMan [®] ABI PRISM 7700
Pharmacia Biotech	EPS 600 Spannungsgerät
Sorvall	Zentrifuge RC 5C
Ultrasonics	Sonicator W385 und Microtip
Zeiss	Mikroskop Axiovert 135

3.2. Chemikalien und Enzyme

Agfa	Fotochemikalien
Amersham Pharmacia Biotech	Taq-DNA Polymerase, dNTPs
Clontech	MTE Blot, Human Multiple Tissue Northern Blot I und IV, Human Endocrine Blot, MTA Dot Blot.
Fluka Chemie AG	DMSO, EDTA
Southern Biotechn. Associates	Fluoromount-G
Sigma	Chemikalien p.a., Antibiotika
Molecular Probes	Fluoreszenzfarbstoff REDCMX ROS (Mito Tracker [®])
Qiagen	DNA Extraktions Set, DNA Reinigungs Set, Ni-Chelat Säulenmaterial
Roche	Restriktionsendonukleasen, Alkalische Phosphatase, T4-DNA-Ligase
Roth GmbH	Tris, Ethanol p.a., DNA-Agarose, 30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30)
Serva Feinbiochemica GmbH	SDS, Coomassie Brilliant Blue R250, Ethidiumbromid, TEMED

Alle Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG Biotech AG (Ebersberg, Germany) synthetisiert:

Tab. 3-1: Verwendete Oligonukleotide als Primer für die DNA Amplifikation und Hybridisierungssonden für TaqMan[®] und Northern Blot Analysen.

Bezeichnung	Anwendung	Sequenz (5' ---> 3')
RERE 3' TaqMan Set 1	Bestimmung des Gehalts an RERE 3' RNA	Sense: GATGCTTCGCCACCCAGTT Antisense: CGACTGTAATAATCTTCCTGACTTGG Probe: CTCCATGGCCAGTCTCTGCAGCTC
RERE_Ex_4-5 Set	Amplifizierung der RERE Exons 4 und 5	Sense: AGTAAGAGGGACCATTC Antisense: AAGGGCAGCATGGT
GAPDH AS	Hybridisierungs-sonde für Northern Blot	TTCTACCACTACCCTAAAG

Tab. 3-2: Weitere verwendete Oligonukleotide für die Amplifikation von cDNA Fragmenten und als Primer für die Sequenzierungen.

Bezeichnung	Markierung	Sequenz (5' ---> 3')
22s	-	ACTTCAAACCTGGTCCACAACCTCC
3'818s	-	AGATGAGCTACCCTGACAGACTG
3'920as	-	TCACGTTGAACATCTGCAGTCG
3'26s	-	AGTCACGCCAGCCAGTCAGCTAG
3'114s	-	AGAGGCATGAAGTACAGGTC
1309s3.2	-	ACACTGCATGAAAGCGGTTACGATGC
1390as3.2	-	GTTTCACTTCGTCCTCGGTCCAGC
1426s3.2	-	GGAATCAGGCAGTACGGGAAGAAC
1478as3.2	-	TCAGCTCCCCTGTTTCCTTATTGG
2507s	-	TCTCCATGAATGCCAACCTGC
M13 RP	IRP 700	TAT GTT GTG TGG AAT TGT GAG C
1312s.3.2.	IRD 700	ACTGCATGAAAGCGGTTACGATGC
2507s	IRD 700	TCTCCATGAATGCCAACCTGC
1162s	IRD 700	ACTGCTTCACCACCACCTCC
1810s	IRD 700	ACTCGTCAGCCCAGCAGC
2507s	IRD 700	CTCCATGAATGCCAACCTGC
3'1671	IRD 700	AAATGCTGCCTGTGCTGCTCG
3'587s	IRD 700	GAGATCCGGGAGCGTGAGC
3'1111s	IRD 700	CACGAGATGCTTCGCCACC
3'1726s	IRD 700	AGGCCTGACTTTGATTCTTC
463s	IRD 700	CAAGGAGGCTGAACAGTACC
M13 UP	IRD 800	TTA AGT TGG GTA ACG CCA GG
578as	IRD 800	TCCAGGCATCCAGACCAGTTCC
1304as	IRD 800	ATCCTCTTCCTTGACGGGTTTG
1884as	IRD 800	TGGAGGAGCTGAGGAGGGAGC
108as	IRD 800	GATGCTGTGGTGGCTGTGATGC
3'958as	IRD 800	TGCTGGAGGTGGAGGTG
3'1670as	IRD 800	AGCAGCACAGGCAGCATTTCC
3'1024as	IRD 800	TGACTGGCTGGCGTACTGG
3'344as	IRD 800	GTGGTGGCTCGAAGGATGG
2600as	IRD 800	TGGCTCTGAGGCATGAGTTGC
3'114as	IRD 800	AGAGGCATGAAGTACAGGTC
3'1748as	IRD 800	AGAAGGAATCAAAGTCAGGC
1478as3.2	IRD 800	CAGCTCCCCTGTTTCCTTATTGG

3.3. Zelllinien:

Die humanen Neuroblastom Zelllinien STA-NB-3, STA-NB-1.1 und Vi856 wurden freundlicherweise von P. Ambros, Childrens Cancer Research Institute, Vienna, Austria, zur Verfügung gestellt.

Die humanen Neuroblastomzelllinien SJ-NB-5, 6, 7, 8, 10, 12 wurden dankenswerterweise von V. Kidd, St. Jude's Hospital, Philadelphia, PA zur Verfügung gestellt.

H4 Neuroglioma, transfiziert mit einem modifiziertem pTet⁽⁻⁾ Konstrukt (auf der Basis von GENE BANK Accession Nr. U89929) wurde freundlicherweise von Dr. Fechteler (BI Pharma KG, Ingelheim), bereitgestellt.

Alle weiteren Zelllinien wurden von ATCC (American Type Culture Collection, Übersicht der Zelllinien unter: "<http://www.atcc.org/pdf/tcl.pdf>") oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Abt. menschliche und tierische Zellkulturen bezogen (Internetadresse: "<http://www.gbf.de/dsmz/dsmzhome.html>").

3.4. Peptide, Antikörper und Seren

INTERACTIVA

Biotechnologie GmbH	Peptide RERE 1, 2 und 3
Calbiochem	anti BAX (Ab-1)
EUROGENTECH	anti N-terminales RERE Serum
Kirkegaard+Perry	anti rabbit IgG HRPeroxidase (H+L) Goat anti mouse IgG HRPeroxidase (H+L) Goat
Molecular Probes	Alexa Fluor 568 goat anti mouse IgG F(ab') ₂ Alexa Fluor 488 anti mouse IgG F(ab') ₂ . Alexa Fluor 488 anti rabbit IgG F(ab') ₂
Promega	anti PARP p85
Roche AG	anti myc
Santa Cruz Biotechnology	anti PML (PG-M3), anti BAX (B-9)
Sigma	anti SC35, anti β Tubulin, anti 58K Golgi Protein, anti Zyklin A, anti Histidin

Anti Pin-1 Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. Schnapp, Boehringer Ingelheim Pharma KG zur Verfügung gestellt.

Die Herstellung der Antikörper wurde dankenswerterweise von Dr. Bamberger, Boehringer Ingelheim Pharma KG durchgeführt.

3.5. Bakterienstämme und Plasmidkonstrukte

Stratagene *E.coli* XL 1 blue

E.coli BL 21

Tab. 3-3: Verwendete Vektoren und hergestellte Plasmide

Expressionsvektor	pro-/eukaryotisch	Eigenschaft	Hersteller	Verwendung	Herstellung
pSG5myc	e	N-terminales myc Epitop	Stratagene	pMyc-RERE	siehe: 3.5.1.1.
pEGPC2	e	N-terminales GFP	Clontech	pGFP-RERE RERE gesamt	siehe: 3.5.1.2.
pEGPC2	e	N-terminales GFP	Clontech	pGFP-C1087 RERE C-Terminus	siehe: 3.5.1.2.
pEGPC2	e	N-terminales GFP	Clontech	pGFP-N581 RERE N-Terminus	siehe: 3.5.1.2.
pEGPC2	e	N-terminales GFP	Clontech	pGFP-N381 RERE N-Terminus	siehe: 3.5.1.2..
pET-28-c(+)	p	N- und C-terminal 6 x His lac Operator	Novagene	pET-RERE_N70kD His-RERE N-Terminus	siehe: 3.5.1.3.
pTRE	e	Tet ⁽⁻⁾ induzierbar	Clontech	pGFP-RERE/Tet ⁽⁻⁾ induzierbare RERE Expression	siehe: 3.5.1.4.

3.5.1. Herstellung verwendeter Plasmidkonstrukte

3.5.1.1. Herstellung des pSG5myc RERE Plasmids

Die cDNA Sequenz des "Expressed Sequence Tags" (EST) mit der Bezeichnung AA721677 wurde nach der Sequenzierung als das fehlende cDNA Fragment für die Vervollständigung der RERE cDNA identifiziert. Die Plasmid DNA dieses EST Klons wurde nach dem Amplifizieren und dem Reinigen der Plasmid DNA mit den Restriktionsenzymen Not I und SgrA I geschnitten. Das entstandene 746 Nukleotid Fragment wurde von den anderen Vektor- und Insertfragmenten mit Agarose-Gel Elektrophorese aufgetrennt und mit dem QIAEX II Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Das gereinigte Fragment wurde in den zuvor über die Schnittstellen Not I and SgrA I geöffneten Vektor pSG5myc/partial RERE, der zwei RERE cDNA Fragmente in der richtigen Orientierung enthielt, eingesetzt. Dieser Vektor wurde von P. Gardellin (Institute für Molekulare Pathologie, Wien, Österreich) bereitgestellt.

3.5.1.2. Herstellung der GFP-RERE Plasmide

Für die Herstellung der GFP-RERE Fusions-DNA wurde die RERE cDNA mit den Restriktionsenzymen Pml I (New England Biolabs, Beverly, MA) and Sac II verdaut. Das gereinigte cDNA Fragment wurde anschließend in den vorher über die Schnittstellen Ecl136 II (New England Biolabs) and Sac II geöffneten Vektor pEGFPC2 (Clontech, Palo Alto, CA) eingesetzt. Für die Herstellung der 5' Fragmente von RERE als GFP-Fusions-cDNA wurde das GFP-RERE Konstrukt mit dem Enzym Pst I geschnitten. Daraus resultierte das GFP-N381 Konstrukt, das für die RERE Aminosäuren 1 - 381 kodiert oder GFP-RERE wurde mit Sal I verdaut, daraus resultierte das GFP-N581 Konstrukt, das für die RERE Aminosäuren 1 - 581 kodiert. Beide Restriktionsansätze wurden nach dem Verdau im Agarose-Gel von den anderen DNA Fragmenten getrennt, mit dem QIAEX II Kit (Qiagen) isoliert und die verbleibenden Konstrukte mit T4-Ligase ligiert. Für die 3' RERE cDNA Sequenz (C1087, kodiert für GFP-RERE Aminosäuren 480 - 1567) wurde das GFP-RERE Konstrukt mit EcoR I und BamH I geschnitten, gereinigt und in einen zuvor mit EcoR I / BamH I geöffneten pEGFPC2 Vektor eingefügt.

3.5.1.3. Herstellung des pET-RERE_N70kD Vektorkonstruktes

Das RERE-cDNA Fragment wurde über die Enzymschnittstellen PML I und Sal I aus dem Vektor pSG5myc-RERE isoliert. Das 1754 bp RERE-cDNA Fragment wurde in einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt und mit dem QIAEX II DNA-Extraktions Kit (Qiagen)

gereinigt. Der prokaryontische Expressionsvektor pET wurde mit BamH I verdaut. Der 5'Überhang wurde mit Klenow Enzym aufgefüllt. Nach einer Phenol/Chloroform Extraktion wurde der Vektor mit Sal I verdaut und anschließend mit 2 U alkaliner Phosphatase behandelt. Für die Ligation des RERE Fragments mit dem pET Vektor wurden 50 ng Vektor mit 170 ng RERE Fragment und 5 U T4-Ligase 14 h bei 14°C inkubiert.

3.5.1.4. Herstellung des pGFP-RERE/Tet⁽⁻⁾ Vektorkonstruktes

Das GFP-RERE Plasmidkonstrukt wurde mit dem Restriktionsenzym Xho I geschnitten. Nach dem Auffüllen der überhängenden Enden mit Klenow Enzym und dNTPs sowie nach dem Abtrennen des Enzyms mit dem Oligonucleotid removal Kit (Qiagen) wurde mit Xba I das GFP-cDNA Fragment aus dem Plasmidkonstrukt herausgeschnitten. Das GFP-RERE DNA Fragment wurde anschließend mittels Gelelektrophorese getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAEXII Kit (Qiagen) aus der Agarose eluiert. Der Vektor pTRE (Clontech) wurde über die Schnittstellen Sac II und Xba I geöffnet, mit dem Oligonucleotid removal Kit (Qiagen) gereinigt und anschließend zusammen mit dem gereinigten GFP-RERE DNA Fragment ligiert.

3.6. Computerprogramme

Die Textverarbeitung erfolgte mit Microsoft Office (Word 97, Excel 97, Fa. Microsoft).

Für alle Sequenzvergleiche sowie die Bestimmung der Exon-Intron Struktur und die Suche nach homologen Proteinen in verschiedenen Datenbanken wurde die Software bioScoutTM der Firma LION Bioscience AG, Heidelberg, Germany, verwendet. Die graphische Darstellung der Sequenzvergleiche erfolgte mit dem GeneDoc Programm, Version 2.5.000. Weitere Informationen zu diesem Programm sind unter www.cris.com/ketchup/genedoc.shtml abrufbar.

Mögliche Promotorsequenzen wurden mit dem öffentlichen Promotor Prediction Programm unter der Internetadresse "http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html" durchgeführt .

Für die Bildüberlagerung, nach der Fluoreszenzmikroskopie, wurde die Software "dhs M.I.S" (Fa. Leica) verwendet. Die Eingrenzung der Bildausschnitte erfolgte mit Adobe Photoshop (Fa. Adobe).

Die Auswertung der DNA Sequenzierdaten erfolgte mit LI-COR AlignIR der Fa. MWG-Biotech AG.

3.7. Allgemeine Medien, Puffer, Lösungen

Medien

LB (Luria et al., 1960)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	NaOH (10 N)	pH 7,5
	H ₂ O _{mp}	ad 1 l
dYT	Trypton	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O _{mp}	ad 1 l

Antibiotika und andere Medienzusätze

	Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration (µg/ml)
Ampicillin	100 (in 59 % EtOH)	100
Kanamycin	50	50
IPTG	50 (in 50 % EtOH)	50

Puffer und Lösungen

Coomassie-Färbelösung für PAGE	Coomassie Brilliant Blue R250	0,2 %
	Methanol	30 %
	Eisessig	10 %
		in H ₂ O _{mp}
Entfärbelösung für PAGE	Ethanol	45 %
	Eisessig	10 %
	H ₂ O _{mp}	45 %

DNA-Auftragspuffer (5 x)	Fikoll (20 %)	874 μ l
	Bromphenolblau (0,5 %)	87,4 μ l
	EDTA (0,5 M, pH 7,5)	38 μ l
SDS-PAGE Laufpuffer (10 x)	Tris	30,2 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	H ₂ O _{mp}	ad 1 l
SDS-PAGE Probenpuffer (5 x)	Tris/HCl pH 6,8	312,5 mM
	Glycerin	50 %
	SDS	10 %
	β -Mercaptoethanol	25 %
	Bromphenolblau	0,1 %
TAE (50 x)	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	EDTA (0,5 M, pH 8)	100 ml
	H ₂ O _{mp}	ad 1 l
PBS (10 x)	Na ₂ HPO ₄ (0,4 M, pH 8)	402 ml
	NaH ₂ PO ₄ (0,4 M, pH 4)	98 ml
	NaCl	70 g
	H ₂ O _{mp}	ad 1 l, pH 7,5

TBS (10 x)	Tris	24,2 g
	NaCl	70 g
	H ₂ O _{mp}	ad 1 l, pH 7,5
20 x SSC	NaCl	175,3 g
	Natriumcitrat x 2 H ₂ O	88,2 g
		ad 1 l, pH 7,0
10 x MOPS:	MOPS	200 mM
	NA Acetat	50 mM
	EDTA	10 mM, pH 6,6

Zellkulturmedien: MEM, 1 g/l Glukose, 25 mM HEPES, 12-108F (BIO WHITTAKER) mit 10 % FCS (Biological Industries, Israel) oder DMEM 4,5 g/l Glukose, Natriumpyruvat, Glutamax-I, (Gibco BRL) mit 10 % FCS (Biological Industries, Israel)

Teilweise zugesetzt:

Mediensupplimente: MEM, nicht essentielle Aminosäuren (Nr. 11140-035 Gibco BRL)
4 mM L-Glutamin (BIO WHITTAKER)

Selektionsreagenz: 0,3 µg/ ml Hygromycin B (Gibco BRL)

Antibiotika: 50 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin (Gibco BRL)

Fungizide: CIPROFLOXACIN (BIOTRADE, Pontex)

3.8. Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.8.1. Isolierung von Plasmid DNA

Von einer 16 h Bakterienkultur wurden 2 ml für 5 min bei 2000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert. Für die Reinigung des Plasmids mit dem "Plasmid purification Kit" (Qiagen) wurde der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 0,3 ml P1 Puffer resuspendiert und mit 0,3 ml P2 Puffer durch leichtes Schwenken vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 0,3 ml P3 Puffer versetzt, vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis präzipitiert. Nach einer Zentrifugation von 15 000 rpm bei 23°C für 5 min wurde der klare Überstand in die mitgelieferten Säulen überführt und zweimal mit 1 ml Puffer Pb gewaschen. Danach wurden die Säulen für 1 min bei 14 000 rpm zentrifugiert und die DNA mit 50 µl PE Puffer in 1,5 ml Eppendorfgläser eluiert.

Für die Präparation im mittleren Maßstab wurde der "DNA midiprep Kit" (Qiagen) verwendet, der nach dem gleichen Muster wie oben beschrieben durchgeführt wurde. Die Zentrifugation wurde in der Sorvall Zentrifuge durchgeführt. Die Sedimentation der Bakterien erfolgte bei 5000 rpm mit dem Zentrifugationseinsatz SLA 3000. Alle weiteren Zentrifugationsschritte wurden bei 10 000 rpm mit dem Zentrifugationseinsatz SLA 1500 durchgeführt.

3.8.2. Isolierung von poly (A)⁺ RNA

Für die Aufreinigung von poly (A)⁺ RNA wurde der "Direkt mRNA isolation Kit" (Qiagen) verwendet. Dazu wurden 1×10^6 Zellen einmal mit PBS gewaschen, trypsiniert und bei 1000 rpm (Eppendorf, swing out Rotor) für 5 Minuten zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden mit 2 ml OL1 Puffer und 30 µl/ml β-Merkaptoethanol lysiert und im Qiaschredder (Qiagen) homogenisiert. Das Zelllysat wurde mit 4 ml Verdünnungs-Puffer versetzt, gut gemischt und auf 3 x 2 ml Eppendorfgläser verteilt. Die Proben wurden 4 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert und der klare Überstand in ein 15 ml Röhrchen dekantiert. Die Probe wurde anschließend mit 60 µl Oligotex-Suspension versetzt, und für 10 min bei 23°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 0,5 ml Waschpuffer OW1 durch Pipettieren

vollständig resuspendiert und in der QIA-Säule für 1 min bei 10.000 g in das Eppendorfgefäß zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 500 ml Puffer OW2 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer (75°C) oder DEPC Wasser.

3.8.3. Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA mit DNAzol (Gibco) wurden 1×10^6 Zellen zweimal in PBS gewaschen und bei 1000 rpm für 2 min zentrifugiert (Eppendorf swing out Rotor). Nach der Zugabe von 10 ml DNAzol wurden die Zellen mit einer speziell präparierten Pipettenspitze, deren Öffnung mindestens 3 mm betrug, durch Rühren und vorsichtiges Pipettieren gemischt. Dieser Suspension wurde dann 10 - 15 ml Ethanol abs. zugegeben bis die genomische DNA als weißes Aggregat ausgefallen war. Diese DNA Präzipitate wurden mit einem autoklavierten Zahnstocher aus Holz in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zweimal mit 1 ml Ethanol p.a. gewaschen. Anschließend wurde das Präzipitat in sterilem dest. Wasser gelöst und die Qualität und Quantität fotometrisch durch das Verhältnis der Extinktionswerte bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

3.8.4. Enzymatische Behandlung der DNA (nach Sambrook et al. 1989)

3.8.4.1. Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA wurden 0,2 bis 0,5 µg DNA in 10 oder 20 µl Gesamtvolumen mit dem für das Enzym vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffer und 2 U Enzym, 2 h bei der optimalen Temperatur (Angabe der Herstellerfirma) verdaut. Für präparative Ansätze wurden 1 bis 5 µg DNA in 100 µl Gesamtvolumen mit 5 bis 10 U Enzym verdaut. Die erhaltenen Fragmente wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt.

3.8.4.2. Behandlung mit alkalischer Phosphatase (AP)

0,5 - 1 µg gefällte und getrocknete DNA wurden in 8 µl TE10.01 aufgenommen und mit 1 µl 10 x AP-Puffer und 1 µl alkalischer Phosphatase (25 U) versetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 15 min bzw. durch die Zugabe von 3 µl Auftragspuffer und anschließender Gelelektrophorese bzw. Phenolextraktion wurde die Reaktion gestoppt.

3.8.4.3. 5' Auffüllreaktion mit Klenow Enzym

5 µg DNA wurde in 50 µl dest. Wasser, 6 µl Puffer M (Roche) sowie jeweils 10 mM Nukleotid-Mix (dARP, dCTP, dGTP, dTTP, Fa. Amersham) sowie 4 U Klenow Enzym (Roche Nr. 1008412) 30 min bei 23°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 10 min bei 72°C inaktiviert.

3.8.4.4. Behandlung mit T4-DNA-Ligase

Äquimolare Mengen der DNA-Fragmente (100 - 300 ng) wurden in 8 µl H₂O_{mp} mit 1 µl 10 x Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase vermischt und 10 - 12 h inkubiert. Die Verknüpfung von überstehenden Enden erfolgte bei 4°C, glatte Enden wurden bei RT ligiert.

3.8.4.5. Phenol/Chloroform Extraktion von DNA

Der gelösten DNA wurde ein gleiches Volumen einer Phenol/Chloroform (1:2) Mischung zugegeben, der Ansatz gemischt und anschließend 2 min bei 4°C mit 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und die DNA auf eine Endkonzentration von 0,5 M LiCl eingestellt. Zusammen mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol wurde die Probe für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Bei kleineren Mengen DNA wurde dem Fällungsansatz noch 1 µl Glykogen zugesetzt.

Nach erneutem Mischen wurden die Proben für 20 min bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 700 µl 70 %igem Ethanol bei RT gewaschen und erneut für 10 min bei 10 000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Ethanol vollständig entfernt. Das Pellet wurde für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in dest. Wasser gelöst.

3.8.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis et al., 1986)

Zur Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden standardmäßig Reaktionsansätze von 50 µl mit 1 U *Taq*-DNA-Polymerase (Amersham) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 50 pg DNA, je 50 pmol Primer-Oligonukleotide und je 100 µM dNTPs (Amersham) verwendet. Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert. Zu Beginn jeder PCR wurde die DNA für 2 min bei 96°C denaturiert. Der folgende Temperaturzyklus wurde 30 mal durchgeführt:

15 s 94°C Denaturierung
30 s 56°C¹ Anlagerung der Primer
60 s 72°C² Primerelongation

- ¹⁾ Die Anlagerungstemperatur wurde immer 4 °C unterhalb der errechneten Anlagerungstemperatur (Protokoll MWG Biotech) festgesetzt.
- ²⁾ Bei Amplifikaten mit einer Länge von weniger als 500 Nukleotiden wurde die Elongationsphase auf 30 s verkürzt.

Am Ende jeder PCR wurde der Ansatz für 2 min bei 72°C inkubiert (terminale Elongation) und anschließend auf 4°C abgekühlt.

3.8.6. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der Nukleotide wurde mit einem LONG READIR4200 (Licor, Lincoln, NE) und dem "Thermo Sequenase cycle sequencing kit" (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) mit vektor- oder insertspezifischen Primern (Tab. 3-2) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die Sequenzierung einer GC-haltigen Region der RERE cDNA wurde dem PCR Ansatz zusätzlich 300 mM Betain zugesetzt und der Amplifikationsschritt bei 75°C durchgeführt. Außerdem wurde die Anlagerungstemperatur nicht, wie üblich 4°C unter dem Schmelzpunkt der Primer gesetzt sondern auf den berechneten Schmelzpunkt des eingesetzten Primerpaares erhöht. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der Software LI-COR AlignIR (MWG-Biotech AG).

3.8.7. Transfer von DNA

3.8.7.1. Elektrotransformation-Elektroporation

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 40 μl der Zellen wurden mit 1 - 10 ng DNA, in 2 - 3 μl TE10.01 versetzt und für 1 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde in eine auf -20°C vorgekühlte Elektroporations-Küvette (Elektrodenabstand 0,2 cm, Fa. BioRad) pipettiert. Der Strompuls wurde mit dem *Gene Pulser* und mit folgenden Einstellungen auf die Zellen gegeben:

Feldstärke	12,5 kV/cm
Widerstand	200 Ω
Kondensator	25 μF
Kondensatorspannung	2,5 kV

Die Zeitkonstante bei dieser Einstellung lag zwischen 3,5 und 4,5 msec (optimal 5 msec). Es wurde nach dem *Pulse* sofort 1 ml dYT-Medium zugegeben, gut gemischt und im Kulturröhrchen 1 h bei 37°C inkubiert.

Auf Selektionsplatten wurden jeweils zwei Portionen, zunächst 100 μl und dann der Rest, ausplattiert. Zur Bestimmung der Transformationsrate wurde 1 ng pUC18-DNA transformiert.

3.8.7.2. Einschleusen von DNA in Eukaryontenzellen

Für das Einschleusen von Plasmid DNA in eukaryontische Zellen wurde FUGENE 6 transfection reagent (Roche) verwendet mit einem Verhältnis von 1 - 2 μg Plasmid DNA pro 1 μl FUGENE 6. Für die Transfektion einer 100 mm^2 Platte wurden beispielsweise 300 μl Medium mit 15 μl FUGENE 6 und 15 μg DNA verwendet und die Menge der jeweiligen Größe des Transfektionsansatzes angepasst.

3.8.8. DNA Gelelektrophorese

3.8.8.1. Agarose-Gelelektrophorese

Spezielle Lösungen: Ethidiumbromid Stocklösung: 10 mg/ml

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarose-Gel wurden BioRad-Gelkammern für 30 ml oder 100 ml Agarose verwendet. Agarose-Gele wurden zwischen 0,8 und 1,5 %ig in TAE-Puffer auf einer Heizplatte oder im Mikrowellenofen aufgekocht und anschließend auf ca. 50°C abgekühlt, bevor die Agarose in den Gelträger gegossen und ein Auftragskamm eingesetzt wurde. Die Gele enthielten 0,3 µg/ml Ethidiumbromid. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit 5fach konzentrierten DNA-Auftragspuffer versetzt und konnten so direkt auf das Gel aufgetragen werden. Der Lauf wurde in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von ca. 10 V pro cm Gelbreite durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker diente 1 kb ladder (Fa. Gibco). Nach dem Lauf wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (302 nm) betrachtet. Die Dokumentation erfolgte über eine Videokamera und einen Video-Printer (Mitsubishi).

3.8.8.2. Extraktion von DNA aus Agarose

Für die Extraktion von DNA aus Agarose wurde QIAEX II (Qiagen) verwendet. Die ausgeschnittene DNA-haltige Agarosebande wurde im 3fachen Volumen (w/v) Qx1 Puffer und 2fachen Volumen (w/v) dest. Wasser zusammen mit 5 µl suspendiertem QIAEX II pro µg DNA für 10 min bei 55°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 000 g für 30 sec wurde der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit 500 µl Puffer PE gewaschen und mit 10 000 g für 30 sec zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet für 10 min luftgetrocknet und die DNA durch die Zugabe von 30 µl H₂O und Erwärmen des Ansatzes auf 60°C für 10 min eluiert. Nach zwei Zentrifugationsschritten mit 10 000 g für 30 sec wurde der klare Überstand bei -20°C gelagert.

3.9. DNAanalytische Methoden

3.9.1. Genomischer Southern Blot

Spezielle Puffer:

Depurinierungspuffer: 0,25 M HCl

Denaturierungspuffer: 0,4 M NaOH, 1,5 M NaCl

Hybridisierungspuffer: Church Puffer: 0,5 M Natriumphosphat pH 7, 7 % SDS,
(nach Church und Gilbert) 1 mM EDTA

Prähybridisierungslösung: 0,5 M Natriumphosphat pH 7, 7 % SDS, 1 mM EDTA .

3.9.1.1. Probenvorbereitung

20 µg der DNA wurden in 40 µl 10fach Probenpuffer, 100 U Restriktionsenzym (z.B. EcoR I) in 400 µl sterilem dest. Wasser in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt. Die Ansätze wurden dann bei 37°C im Brutschrank für mindestens 8 Stunden inkubiert. Die Fällung der DNA erfolgte mit 40 µl einer 3 M LiCl-Lösung zusammen mit 1 ml abs. Ethanol für 30 min bei -80°C. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4°C mit 13 000 rpm. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol bei -20°C gewaschen und anschließend für 5 min bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet für 5 - 20 min bei RT vollständig getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 30 µl dest. Wasser resuspendiert und 5 min bei 50 °C inkubiert. Zur Kontrolle des vollständigen Verdauens wurden 3 µl Fraktionen der verdauten DNA in einem 0,6 %igem Agarose-Gel aufgetrennt.

3.9.1.2. Auftrennung

Die Auftrennung der verdauten, genomischen DNA erfolgte über Nacht in einer 500 ml Gelkammer im 0,8 %igem Agarose-Gel (ohne Ethidiumbromid) mit ständiger Umwälzung des Laufpuffers, bei 55 V Stromspannung. Als Laufkontrolle wurde 10 µl des 1 kb Markers (Fa. Gibco) aufgetragen. Die Markerspür wurde nach dem Lauf mit einem Skalpell vom gesamten Gel abgetrennt und die DNA-Banden in 100 ml TAE und 5 µl Ethidiumbromid gefärbt. Dazu wurde die Markerspür in Folie eingeschweißt und die Laufstrecke der Marker-DNA mit einem Lineal auf einem UV-Schirm bestimmt. Die Depurinierung der genomischen DNAs erfolgte in 0,25 M HCl bis sich die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers gelb verfärbte. Anschließend wurde die DNA unter fließendem entionisiertem Wasser für 2 min

gespült. Die anschließende Denaturierung der DNA erfolgt in 0,4 M NaOH und 1,5 M NaCl für 2-mal 20 min mit 1-mal erneuertem Puffer.

3.9.1.3. Transfer auf Nylonmembran

Für die Überführung der DNA auf die Nylonmembran (Genescreen, Dupont) wurde diese zunächst mit dest. Wasser benetzt und anschließend für 30 min im Denaturierungspuffer belassen. Der Transfer erfolgte über Nacht mit Denaturierungspuffer und einer Lage von mindestens 20 cm saugfähigem Papier. Nach dem Transfer wurde die Membran in 2 x SSC Puffer pH 7 für mindestens 10 min inkubiert. Mit einem Kimwipe-Tuch wurde die Membran von anhaftenden Resten des Gels gesäubert, die Pufferlösung erneuert und die Membran darin für 5 min geschwenkt. Anschließend wurde das Filter auf zwei Lagen von 3 MM Whatmanpapier getrocknet, unter UV-Bestrahlung fixiert (1200 kj) und bei Raumtemperatur gelagert.

3.9.1.4. Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurde das Filter für 3 h in 30 ml Prähybridisierungslösung inkubiert. Für die Herstellung der Hybridisierungssonde wurden 25 ng eines 1,1 kb RERE Fragments mittels "Megaprime DNA Labelling System" und 5 μ l 32 P alpha dCTP = 50 μ Cu (Stock: 3700 Bq; 100 μ C / 0,01 ml , Fa. Amersham) markiert. Das 1,1 kb RERE cDNA Fragment wurde durch einen EcoR I Verdau der RERE cDNA "1b3" mit anschließender Auftrennung der DNA im 1 %igen Agarose-Gel und Elution des 1,1 kb Fragments mit QIAEX II hergestellt. Nach der radioaktiven Markierung wurden die Hybridisierungssonden mit dem Nucleotid removal Kit (Qiagen) gereinigt. Die Hybridisierung erfolgte in 15 ml Church Puffer bei 60°C für 14 - 18 h im Rollinkubator. Die Hybridisierungslösung wurde anschließend entfernt und die Nylonmembran mit jeweils 50 ml Waschpuffer (2-mal mit 2 x SSC und 1-mal mit 0,2 x SSC) bei 64 °C gewaschen. Anschließend wurde die Membran kurz von jeder Seite auf Whatmanpapier angetrocknet und in Saranfolie eingewickelt. Die Detektion erfolgte in einer Filmkassette bei - 80°C in einem Zeitraum zwischen 5 und 20 Tagen mit dem Film Kodak X-OMAT-AR.

3.10. RNAanalytische Methoden

3.10.1. Auftrennung von RNA mit einem denaturierenden Gel

Spezielle Puffer:

Hybridisierungspuffer: 0,5 % Na Phosphatpuffer pH 6,8, 1mM EDTA
(nach Church und Gilbert) 7 % SDS, 1 % BSA

Das verwendete dest. Wasser und alle Puffer wurden mit DEPC (1 ml/l) versetzt und nach Inkubation von mindestens 16 h autoklaviert. Zur Entfernung von RNAsen wurde die Gelapparatur mindestens 5 h in 3 %igem H₂O₂ inkubiert und mit DEPC Wasser abgespült.

3.10.1.1. Vorbereitung der RNA Proben:

Um die Auftrennung der RNA nach dem Molekulargewicht zu ermöglichen, wurden intramolekulare Basenpaarungen geschmolzen und die denaturierte RNA-Struktur durch Formaldehyd erhalten. Dazu wurden 100 µl der gereinigten RNA Probe mit 25 µl 3 M Na-Acetat und 600 µl abs. Ethanol für 2 h bei -80°C gefällt. Das RNA Pellet wurde anschließend in 50 µl Probenpuffer mit der Zusammensetzung 11 µl DEPC Wasser, 5 µl 10 x MOPS, 9 µl Formaldehyd (37°C) und 25 µl Formamid gelöst. Die Denaturierung der Probe erfolgte bei 55°C für 15 min. Für ein ausreichendes Signal wurden 4 µg poly (A)⁺ RNA eingesetzt.

3.10.1.2. Auftrennung der RNA

Für die Auftrennung wurde eine 150 ml Gelkammer (Fa. Biorad) verwendet. Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose (Roth) in 125 ml DEPC Wasser gekocht und anschließend auf 60°C abgekühlt. Nach der Zugabe von 13,5 ml Formaldehyd und 15 ml 10 x MOPS Puffer wurde das Gel unter dem Abzug gegossen. Die Auftrennung erfolgt für etwa 1,5 h bei 140 mA.

3.10.1.3. Transfer von RNA auf Nylonmembran

Das Formaldehyd-Gel wurde 20 min in DEPC Wasser gewaschen und anschließend für 30 - 45 min in 20 x SSC gewässert, um die Bindung der Nukleinsäure an der Nylonmembran (Du Pont, Boston, MA) zu verbessern. Die Membran wurde vollständig gewässert und

anschließend 5 min in 20 x SSC äquilibriert. Für den Blot wurden ca. 1 l von 20 x SSC benötigt. Zunächst wurden 2 Lagen Whatmanpapier in 20 x SSC befeuchtet und das Gel darauf gelegt. Die Ränder des Gels wurden zur Außenseite hin mit Saranfolie bedeckt damit die Flüssigkeit nur durch das Gel wandern konnte. Darauf wurden weitere 2 Lagen Whatmanpapier und etwa 15 cm saugfähiges Papier geschichtet. Abschließend wurde der Aufbau mit einer Glasplatte, mit einem Gewicht von etwa 200 g, beschwert. Nach dem Entfernen des Whatmanpapiers wurden die Geltaschen auf der Membran mit einem Kugelschreiber markiert, anschließend die Membran in Saranfolie, mit der RNA-Seite nach unten, auf den UV-Tisch gelegt und die Lage der RNA-Markerbanden (Gibco) markiert. Anschließend wurde die Membran mit 2 x SSC abgespült, auf Filterpapier leicht abgetrocknet und die RNA mit UV-Licht (1200 kJ) auf der Membran fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift für 5 min in 2 x SSC wurde das Filter entweder direkt für die Hybridisierung verwendet oder getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.10.1.4. Hybridisierung:

Der Hybridisierungssofen, die Hybridisierungsröhren und der Church Puffer wurden auf 65°C vorgeheizt. Der Blot wurde mindestens 2 Stunden mit dem Hybridisierungspuffer inkubiert. Vor dem Auftragen wurde die Sonde 5 min bei 99 °C erhitzt, auf Eis abgeschreckt und kurz abzentrifugiert. 1 ml Hybridisierungslösung wurde aus der Röhre entnommen und mit der Sonde vermischt bevor diese in die Hybridisierungsröhre pipettiert wurde. Die Hybridisierung erfolgte für mindesten 14 h bei 65°C. Folgende Waschschriffe wurden durchgeführt:

3 x 5 min mit 50 ml 1 x SSC, 0,1% SDS in der Röhre, 65°C

1 x 15 min mit 300 ml 1 x SSC, 0,1% SDS in einer Wanne, 65°C

1 x 30 min mit 300 ml 0,1 x SSC, 0,1% SDS in einer Wanne, 65°C

Anschließend wurde der Blot auf Whatmanpapier abgetupft und in Saranfolie eingewickelt. Die Auswertung erfolgte mit einem Phosphoimager nach einem Tag oder bei - 70 °C für 2 - 10 Tage (je nach Strahlungsintensität) mit dem Film Kodak, AR.

3.10.1.5. Radioaktive Markierung der DNA Sonden

Zur Herstellung der Hybridisierungssonden wurden zwei RERE cDNA-Fragmente verwendet. CDNA-Fragment 1 (= Sonde "RERE 5'") war ein gereinigtes EcoR I Fragment und beinhaltet die cDNA Sequenz von Nukleotid 364 bis Nukleotid 1411. Fragment 2 (= Sonde "RERE 3'") beinhaltet die cDNA Sequenz von Nukleotid 4165 bis 5095. Die RERE cDNA-Fragmente wurden im Agarose-Gel gereinigt und mit dem QIAEX II Kit, (Qiagen) aus dem Gel extrahiert. Für die radioaktive Markierung der Sonden wurden die Fragmente mit dem Megaprime labeling Kit der Fa. Amersham (RPN 1606) umgeschrieben. Dazu wurde die entsprechende DNA Probe auf eine Konzentration von 5 ng/ μ l mit 10 mM TE Puffer eingestellt. 25 ng der cDNA wurden zusammen mit 5 μ l der mitgelieferten Primermischung bei 99°C für 5 min denaturiert. Nach dem Abzentrifugieren der Probe wurden 10 μ l dNTP-Mix, 23 μ l dest. Wasser, 5 μ l [32 P]dNTP (3000 Ci/mmol, Amersham) und 2 μ l Klenow Enzym (Boehringer Mannheim) zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch die Inkubation von 5 min bei 99°C inaktiviert.

Für den Nachweis der RERE RNA Splicevarianten wurde ein mit [32 P]dATP (Amersham) markiertes PCR Product verwendet. Der molare Anteil an [32 P]dATP zu ATP betrug 1 : 3. Mit den Primern RERE_Ex_4-5 und RERE_Ex_4-5rev (Tab. 3-1) wurde die RERE cDNA Sequenz nt 724-877 amplifiziert.

Die bisher beschriebenen radioaktiv markierten Hybridisierungssonden wurden mit dem Nucleotide removal Kit (Qiagen) gereinigt.

Für die Herstellung einer radioaktiv markierten Hybridisierungssonde für GAPDH RNA im Northern Blot, wurde das GAPDH Antisense Oligonukleotid (Tab. 3-1) kinasiert. Dazu wurden 10 pmol Oligo, 50 μ Ci [32 P] gamma ATP (Amersham), 2 μ l 10x Polynukleotidkinase Puffer (Roche), 1 μ l (10 U) T4-Polynukleotidkinase mit dest. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l eingestellt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der Oligonukleotide wurde hier mit Quick Spin Columns (Roche) wie folgt durchgeführt. Die Säule wurde zu Beginn mehrmals invertiert, die Kappen abgenommen und die Flüssigkeit aus der aufrecht stehenden Säule entfernt. Die Säule wurde anschließend in einem "swing out" Rotor bei 1100 x g 2 min zentrifugiert und dann in einer aufrechten Position in der Mitte mit 100 μ l der

Kinasierungsreaktion beladen. Abschließend wurde die Säule für 4 min bei 1100 x g zentrifugiert und der Durchlauf für die Hybridisierung verwendet.

Die Auswertung der Blots erfolgte mit dem BioMax MR Film (Kodak, Rochester, NY) zusammen mit BioMax TranScreen-LE intensifying screen (Kodak) nach 2 Tage bei der GAPDH-Hybridisierung und nach 4 - 6 Tagen bei -70°C bei der RERE-Hybridisierung.

3.10.2. Quantitative RT-PCR

Für die quantitative RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) Methode wurden TaqMan[®] Analysen mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Perkin Elmer, Norwalk, CT) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für alle Auswertungen wurde das jeweilige Messsignal in Relation zu dem entsprechenden parallel gemessenen Gehalt an GAPDH (GAPDH control reagents, Perkin Elmer) gesetzt. Die Ergebnisse wurden als relativer Wert zu GAPDH errechnet. Die verwendeten Primer wurden in Tab. 3-1 aufgelistet.

3.11. Proteinanalytische Methoden

3.11.1. Proteinquantifizierung (Bradford 1976)

In Gesamtzellfraktionen wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt um im Western Blot in jeder Tasche eine vergleichbare Proteinmenge zu laden. Die Proteinmenge in einer Probe wurde über einen BIO-RAD-Assay quantifiziert. Hierzu wurden ca. 1 - 10 µg Protein in 800 µl dest. Wasser verdünnt, mit 200 µl Färbereagenz versetzt und sofort intensiv gemischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 595 nm die optische Dichte der Proben gegen den Blindwert (ohne Protein) bestimmt. Mit Hilfe einer Eichgeraden (1 bis 20 µg BSA) konnte über die gemessene OD₅₉₅ die in der Probe enthaltene Proteinmenge geschätzt werden.

3.11.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihren Molekulargewichten erfolgte in vertikalen Gelelektrophoresekammern (Fa. BioRad). Zur Herstellung der Gele wurden die Lösungen wie in Tabelle 3-4 angegeben gemischt (die Angaben beziehen sich jeweils auf ein Gel).

Tab. 3-4: Volumenangaben zur Herstellung eines Polyacrylamidgels

Stammlösung	Trenngel 10 % [ml]	Trenngel 7 % [ml]	Sammelgel 5 % [ml]
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	5	3,5	0,83
1,88 M Tris/HCl pH 8,8	3,8	3,8	-
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	0,63
10 % SDS	0,15	0,15	0,05
H ₂ O _{mp}	5,9	7,4	3,41
TEMED	0,006	0,009	0,005
10 % APS	0,15	0,15	0,05

Das Trenngelgemisch wurde bis ca. $\frac{3}{4}$ der Gelhöhe zwischen die Gelplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das Isopropanol vollständig abgenommen, mit dest. Wasser ausgewaschen und mit Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Probenauftragskamm eingesetzt. Proteinproben, (5 - 15 μ g/Spur) für SDS-PAGE, wurden mit 5 x SDS-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 94°C im Heizblock denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei RT in 1 x SDS-Laufpuffer bei 20 mA/Gel solange, bis die Bromphenolblaubande am Ende des Gels angelangt war. Zur Abschätzung des Molekulargewichts von Proteinen wurde das Standard-Proteingemisch RPN 800 der Fa. Amersham verwendet.

Die Färbung der Gele zum Abschätzen der geladenen Proteinmenge erfolgte mit Coomassie Blue für 30 min, die Entfärbung mit 45 % Ethanol/10 % Essigsäure. Zur Aufbewahrung wurden die Gele entweder getrocknet (2 h, Geltrockner) oder in 7 %ige Essigsäure in PE-Folie eingeschweißt.

3.11.3. Ni-Chelat Chromatographie

14 ml Ni-Beads (Qiagen) wurden dreimal mit 15 ml GuHCl gewaschen und anschließend für 2 min bei 1000 rpm in der Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Zu dem Pellet wurden 12 ml gereinigtes Bakterienlysat gegeben und zusammen 5 h auf einem Drehrad bei 23°C inkubiert. Anschließend wurden die Ni-Beads, die jetzt das N-terminale RERE Proteinfragment gebunden hatten, in einer 15 ml Säule (Fa. Biorad) sedimentiert und anschließend von der Flüssigkeit getrennt. Die Ni-Beads wurden dann in der Säule mit dem 20fachen Säulenvolumen mit 7 M GuHCl und 20 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte mit 500 mM Imidazol in GuHCl. Anschließend wurden die Eluate in einem 32 ml Filtronröhrchen mit 30 kD Ausschlußgröße (Filtron) ankonzentriert und dabei 5 mal 3 ml 7 M Harnstoff zugegeben um das Protein von kleineren Fragmenten zu trennen.

3.11.4. Affinitätschromatographie

3.11.4.1. Herstellung der Affinitätssäule

Für die Immobilisierung der N-terminalen Cysteinreste an das SulfoLink[®] Kopplungsgel (Pierce) wurde eine Säule oben und unten geöffnet und senkrecht befestigt. Nachdem die Konservierungsflüssigkeit herausgelaufen war, wurde die Säule mit 12 ml Kopplungspuffer (Pierce) äquilibriert und 1 mg des entsprechenden in dest. Wasser gelösten Peptides zugegeben. Bevor die Probe durchgelaufen war, wurde die Säule verschlossen, bei RT 15 min im Drehrad gemischt, und anschließend 30 min senkrecht inkubiert. Nach dem Öffnen der Säule und dem Durchlaufen des Puffers wurde die Säule mit 6 ml Kopplungspuffer gewaschen und zusammen mit 2 ml einer 0,05 M Cystein/Kopplungspuffer-Mischung 15 min in der Säule gemischt. Nach einer weiteren Inkubation von 30 min mit senkrecht angebrachter Säule wurde diese 4 x mit 4 ml des mitgelieferten Waschpuffers gespült und anschließend mit 3 x 4 ml 0,05 % Natriumazid/dest. Wasser gewaschen.

3.11.4.2. Affinitätsreinigung der Peptid Immunsereen

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor dem Auftragen des Serums wurde dieses 30 min bei 12 000 g zentrifugiert. Die Säule wurde zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und dann 1 ml des entsprechenden Serums aufgetragen bis dieses vollständig in die Gelmatrix eingesickert war. Anschließend wurde die Säule mit 1 ml PBS überschichtet

und für 1 h inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 20 ml PBS wurden die gebundenen Antikörper mit 100 mM Glycin in PBS, pH 2,6 eluiert und die sauren 1 ml Fraktionen mit 50 µl 1 M Tris pH 9,5 neutralisiert. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml PBS neutralisiert und mit 5 ml 0,05 % Natriumazid/ dest. Wasser konserviert. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm oder durch einen Dot Blot. Für den Dot Blot wurde 1 µl unverdünntes Eluat auf Nitrozellulose Folie transferiert und dort getrocknet. Die weitere Vorgehensweise ist im Abschnitt Western Blot beschrieben (siehe 3.11.6). Die Bestimmung der Antikörperaktivität erfolgte mit einem ELISA-Test (siehe 3.11.7.).

3.11.5. Lagerung der gereinigten Proteine

Die gereinigten Proteine wurden in PBS/1 % BSA bei -20°C in Fraktionen zwischen 50 µl und 500 µl gelagert. Das rekombinante 70 kD RERE Fragment wurde bei -80°C gelagert, ohne die Zugabe von BSA. Die Immunsereen wurden in 5 ml Fraktionen bei -80°C gelagert.

3.11.6. Western Blot

3.11.6.1. Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran

Nach der Auftrennung der Proteinproben durch die SDS-PAGE wurde das Gel auf eine gewässerte Nitrozellulose-Membran (Schleicher und Schuell) gelegt, die sich auf drei Lagen Filterpapier (GB003) befand. Der Aufbau wurde mit weiteren drei Lagen aus Filterpapier (GB003, Schleicher und Schuell) abgedeckt. Das Filterpapier wurden vor dem Aufbau mit Transferpuffer (Glycin 38 mM, Tris-HCl pH 8,3 70 mM, SDS 1,3 mM, 20 % Methanol (v/v)) getränkt. Der Elektrotransfer erfolgte bei 0,65 mA pro cm² für 85 min mit der Semi-trocken Apparatur der Fa. BioRad.

3.11.6.2. Antikörperhybridisierung

Die Nitrozellulosefolie wurde nach dem Proteintransfer 2 h in 5 % Milch / TBS inkubiert und anschließend für eine Stunde in einer 1 : 800 bis 1 : 2000 Verdünnung des primären Antikörpers (proteinspezifischer Antikörper) in Milch / 0,05 % Tween TBS inkubiert. Anschließend wurde 3 mal 5 min mit Milch / 0,05% Tween TBS gewaschen und mit einem

1 : 1000 mit Milch / 0,05% Tween TBS verdünnten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Amersham) für 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Blot 3 x 10 mit 0,05 % Tween TBS gewaschen mit TBS gespült. Nachdem das TBS über den Rand abgelaufen war, wurde der Blot mit 20 ml einer 1 : 1 Mischung der Lösung 1 und 2 des ECL detection reagents (Amersham) 1 min inkubiert, kurz mit beiden Seiten auf Whatmanpapier angetrocknet und mit einer Schicht Saranfolie umwickelt.

3.11.6.3. Regenerieren von Western Blots

Gebundene Antikörper wurden durch 5 min schwenken bei 30°C 0,5 M NaCl, 0,2 M Glycin, pH 2,6 entfernt und die Nitrozellulosefolie dann für 10 min in PBS geschwenkt.

3.11.7. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Spezielle Puffer und Lösungen:

Beschichtungspuffer:	1x PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺) pH 7,4
Blockingpuffer:	5 % BSA in PBS-Waschpuffer
Waschpuffer:	1x PBS mit 0,1 % Tween 20
	TBS pH 7,4 (50 mM TRIS, 150 mM NaCl)
	TBS pH 9,5 (50 mM TRIS, 150 mM NaCl)
AttoPhos Test Kit:	Fa. JBL,Scientific, INC. (Californien, USA)
	Katalog Nummer RP 2200 A

Zunächst wurde die 96-well Platte (Fa. NUNC, # 442404 Immuno Platten Maxi Sorp F 96) mit 50 ng Protein oder Peptid in 50 µl TBS pro Loch für 16 h bei 4°C beschichtet. Für die Bestimmung der RERE Aktivität wurden 50 ng des gereinigten N-terminalen RERE Fragments oder 50 ng der Peptide immobilisiert. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden 50 ng einer Proteinmischung von Myosin, beta-Galaktosidase, Phosphorylase b, Serumalbumin und Ovalbumin (Amersham) verwendet. Nach dem Immobilisieren wurde die Flüssigkeit entfernt und die Platte dreimal mit 300 µl Waschpuffer (PBS/ 0,1 % Tween) pro Loch gewaschen. Vor jedem Waschschrift wurde der Waschpuffer vollständig entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch die Zugabe von 300 µl Blockingpuffer pro Loch und anschließende Inkubation für 1 h bei 23°C geblockt. Nach dem Entfernen des Blockingpuffers wurden jeweils 100 µl der entsprechen Verdünnung des

gereinigten Antikörpers oder des Immunserrums mit 5 % MP in PBS/ 0,1 % Tween zugegeben und 1 h bei 23°C inkubiert. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit wurde jedes Loch 4x mit 300 µl TBS / 0,1% Tween pH 7,4 mit einer Multipette (Eppendorf) gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des peroxidase markierten Antikörpers zugegeben, der 1 : 1000 in 5 %igem Milchpulver in TBS / 0,1 % Tween, pH 7,4 verdünnt war und die Platte für 30 min bei 23°C auf einem Taumelschüttler (Eppendorf) inkubiert. Dann wurde jedes Loch 4 x mit TBS/ 0,1 % Tween, pH 7,4 und nochmals mit TBS pH 9,5 gewaschen. Für die Substrat-Reaktion wurden 100 µl Attophosphat pro Loch zugegeben und bei 37°C inkubiert bis eine Gelbfärbung erkennbar war. Die Messung der Färbung erfolgte im ELISA-READER bei der Extinktionswellenlänge 485 nm und einer detektierten Emission von 590 nm.

3.11.8. Immunfärbung und Mikroskopie

3.11.8.1. Immunfluoreszenz von Formaldehyd fixierten Zellen

Spezielle Lösungen:

Formaldehyd Fixierlösung: 5 g Paraformaldehyd in 250 ml kochendem PBS gelöst

Nach dem Entfernen der Plastikunterteilung (Kulturkammern) wurden die Objektträger mit den adhären Zellen 2 x 5 min in 37°C vorgewärmtem PBS/ 1 mM MgCl₂ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur in 3 % Formaldehyd-Fixierlösung inkubiert, 5 min in PBS/ 50 mM Ammoniumchlorid gewaschen und für 5 min in PBS/ 0.5 % Triton X100 perforiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen für 5 min in PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit einer 5 %igen BSA/PBS Lösung geblockt. Nach dem Entfernen der Blocksubstanz wurde der Erstantikörper zugegeben. Gereinigte Immunsereen wurden in einer Verdünnung von 1 : 300 mit einer 5 %igen BSA/PBS Lösung zugegeben. Das Immunserrum wurde mit einer Verdünnung von 1 : 2000 mit einer 5 %igen BSA/PBS Lösung zugegeben. Anschließend wurde der Objektträger für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösung wurde der Objektträger zweimal mit PBS gewaschen und der zweite Antikörper (fluoreszenzmarkiert, siehe 3.4.) in einer Verdünnung von 1 : 400 in 3 %iger BSA/PBS Lösung, 20 - 30 min bei RT in einer feuchten Kammer dunkel aufbewahrt. Anschließend wurde der Objektträger zweimal für 3 min in PBS gewaschen und nach einer Entwässerungsreihe von: je 5 min in 70 %-, 95 %-

und abs. Ethanol die Zellen in Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates)/ 0.05 – 0.1 µg/ml DAPI (Roche) eingedeckelt.

3.11.8.2. Immunfärbung von Methanol - Aceton fixierten Zellen

Die Zellen wurden wie bei der Formaldehydfixierung behandelt. Anstelle der Zugabe von 3 % Paraformaldehyd wurden die Zellen für 10 min mit einer 1 : 1 Mischung aus Methanol und Aceton (Sigma) bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal für 3 min in PBS gewaschen. Die weiteren Schritte sind identisch zur Immunfärbung mit Paraformaldehyd.

3.11.8.3. Mikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Elektronen eines Fluoreszenzfarbstoffes durch Licht einer definierten Wellenlänge angeregt. Bei der Rückkehr der Elektronen in den energetischen Grundzustand wird Licht einer definierten Wellenlänge emittiert. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Absorptions und Emissionsspektren können in einer Immunfärbung (siehe 3.11.8.1) verschiedene Proteine nachgewiesen werden. Bei der konfokalen Lasermikroskopie wird der Fluoreszenzfarbstoff durch einen Laser angeregt und das emittierte Licht einer fokalen Ebene gemessen. Dabei wird jedes Licht, das außerhalb des Focus liegt, ausgeschlossen. Mittels konfokaler Lasermikroskopie wurde in dieser Arbeit die räumliche Überlagerung verschiedener Proteine nachgewiesen.

Für die Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie wurde das Mikroskop Leica DMA mit folgendem Zubehör verwendet: Okular: HC PLAN 10 x /20; Objektive: HC PL Fluotar 10x/0,3 PH1, HC PL Fluotar 20x/0,5 PH2, PL APO 40x/0,75 PH2, PL APO 63x1,32 OIL PH3, PL FLUOTAR 100x/1,3 OIL PH3; Beleuchtung für Durchlichtmikroskopie: Halogen Glühlampe 12 V, 100 W; Beleuchtung für Auflichtmikroskopie (Fluoreszenzmikroskopie): HG Höchstdrucklampe 100 W; Filter und Reflektorsysteme:

Filter-Kurzbeschreibung	Anregungsfilter [nm]	Teilerspiegel [nm]	Sperrfilter [nm]	detektierter Fluoreszenzfarbstoff
A	340-380	400	425	DAPI
N2.1	515-560	580	590	Texas-Red, CY3.5
GFP	470	500	525	GFP

Die Auswertung erfolgte über Fernsehmikroskopie (c-mount-Objektiv Adapter 1 x HC, Leica) mit der Software von Leica. Für die Untersuchung der Bildüberlagerung wurde die Software "dhs M.I.S" (Leica) verwendet.

Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das Mikroskop Leica DM IRBE verwendet, mit dem Objektiv PL APO 40x/1,25, dem Okular HC PLAN 10x/20, einem Argon-Laser (Anregungswellenlänge = 488 nm) zum Nachweis von GFP und einem Krypton-Laser (Anregungswellenlänge = 568 nm) zum Nachweis von Texas-Red. Als Bilderstellungsprogramm wurde TCS NT der Firma Leica verwendet. Die Untersuchungen mit dem konfokalen Lasermikroskop wurden unter der freundlichen Anleitung von Frau Elfriede Müller durchgeführt.

3.12. Zellkultur Methoden

3.12.1. Standardkultivierung

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre bei 5 % CO₂. Die Zellen wurden in Kulturflaschen, 100 mm² Platten oder in Objektträgern mit Kammern (Nalgene Nunc International, Naperville, IL) kultiviert. Bei allen Zellen für die RNA- und Proteinanalyse wurde dem Medium MEM nicht-essentielle Aminosäuren (11140-035 Gibco BRL) zugegeben. Für die Selektion der stabilen Zelllinien wurde dem Kulturmedium 0,3 µg/ml Hygromycin B (Gibco, BRL) zugegeben.

3.12.1.1. Auftauen und Kultivieren

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein 15 ml Gefäß überführt. Langsam wurden 5 ml Wachstumsmedium zugegeben (ca. 1 min), anschließend das Gefäß mit Kulturmedium aufgefüllt, mit der Pipette gemischt und die Zellen bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert (Eppendorf, swing out Rotor). Das Zellpellet wurde in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in Kulturgefäße mit 25 cm² Wachstumsfläche ausgesät.

3.12.1.2. Passagieren

30 ml des Kulturüberstandes einer 150 cm² Zellkulturflasche wurden in ein 50 ml Gefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml kaltem Trypsin/PBS (Gibco) 3 - 5 min inkubiert bis die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst

werden konnten. Die Zellsuspension wurde in das 50 ml Gefäß, das bereits die 30 ml Kulturmedium enthielt, überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zelllinien wurden dann 1 : 4 bis 1 : 10 gesplittet und etwa 25 % konfluent ausgesät.

3.12.2. Zellzyklusarrest mit Thymidin oder Nocodazol

Für die Synchronisierung der Zellen wurde das Wachstum der Zellen in der gleichen Zellzyklusphase gestoppt. Mit ddThymidin (Sigma) wurden die Zellen in der S-Phase und mit Nocodazol beim Eintritt in die Metaphase arretiert. Nach der Wegnahme des Zellzyklusinhibitors beginnen alle Zellen gerichtet den Zellzyklus.

Am ersten Tag wurden die Zellen etwa 30 % konfluent ausgesät und über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag wurde Thymidin in einer Endkonzentration von 2 mM oder Nocodazol in einer Endkonzentration von 200 ng/ml zugegeben. Nach einer Inkubation von 20 h wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und in Medium ohne Thymidin bzw. ohne Nocodazol für 8 h inkubiert. Nach weiteren 7 h Inkubation wurden die Zellen erneut mit Thymidin oder Nocodazol mit den gleichen Endkonzentrationen für 16 h arretiert.

3.12.3. FACS Analyse zur Bestimmung des DNA Gehaltes in Zellen

Durch den Einbau von Propidiumjodid in perforierte Zellen konnte der DNA-Gehalt in Zellen und somit das Zellzyklusstadium mit einer FACS Analyse bestimmt werden.

Spezielle Lösungen:

Perforationspuffer: PBS, 0,25 % Triton X-100 in PBS

Färbelösung: 0,1 % RNase in PBS, 10 µg/ml Propidiumjodid

Adhärente Zellen wurden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und der Überstand sowie das PBS in einem 50 ml Gefäß gesammelt. Pro 175 cm² Flasche wurden die noch adherierten Zellen mit 2 ml Trypsin (Gibco) abgelöst und zu dem restlichen Kulturmedium gegeben. Anschließend wurde für 5 min mit 1000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach wiederholtem Waschen mit 30 ml PBS wurde nach einem erneuten Zentrifugationsschritt, von 5 min mit 1000 rpm, das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden dann tropfenweise in 5 ml 80 %igem Ethanol überführt und bis zu 4 Tage aufbewahrt.

Für die DNA Färbung wurden die Zellen unmittelbar vor der Messung einmal mit 10 ml PBS gewaschen und für 5 min mit 1000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Perforationspuffer resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und mit 5 ml PBS aufgefüllt. Nach der Zentrifugation für 5 min mit 1000 rpm bei 4°C wurde auf jedes Pellet Färbelösung gegeben, gemischt und die Zellen mit einer Endkonzentration an Propidiumjodid von 20 µg/ml für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Analyse erfolgte im FACS SCAN (siehe 3.12.4., Becton Dickinson).

3.12.4. FACS Analyse zum Nachweis toter Zellen

Die Zellen wurden wie oben beschrieben trypsiniert. Anschließend wurden die Zellen mit HBSS, Hanks Puffer ohne Phenolrot (Gibco) auf eine Endkonzentration von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Genau 2 min vor der Messung wurden die Zellen auf eine Propidiumjodid Konzentration von 2 µg/ml eingestellt. Die Analyse erfolgte im FACS SCAN ("Epics Altra", Becton Dickinson). Der Probendurchlauf erfolgte bei einem Druck von 6 psi und einer Messrate von 400 Ereignissen/sec. Die Anregungswellenlänge betrug 488 nm und die Absorption wurde bei 525 nm (GFP) oder 610 nm (Propidiumjodid) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Expo 32-Software (Becton Dickinson). Die Messungen wurden freundlicherweise von Frau Simone Heinrich, Boehringer Ingelheim Pharma KG, Abt. Biotechnologische Produktion / Verfahrensentwicklung durchgeführt.

3.12.5. TUNEL Färbung

Ein typisches Merkmal apoptischer Zellen ist die Fragmentierung der genomischen DNA. An die dabei entstehenden DNA-Enden werden bei der TUNEL Methode, durch eine Enzymreaktion, markierte Nukleotide hinzugefügt und anschließend nachgewiesen.

Spezielle Lösungen:

Terminale Transferase Kit: Fa. Roche

Reaktionsansatz : 40 µl 5 x Reaktion Puffer, 20 µl CaCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP
Rhodamin¹, 2 µl (2 U) Terminale Transferase, 137 µl dest.
Wasser

¹) Tetramethylrhodamin-5'-desoxy-uridin-6'-triphosphat, (Roche)

Die Zellen wurden nach der Transfektion entweder sofort auf apoptotische Zellen getestet (Kontrolle) oder für 48 bis 72 h in 8-Loch Zellkulturplatten mit 2×10^3 U/ml IFN γ (Sigma) inkubiert. Im Ansatz mit dem Kaspaseinhibitor wurde dem Medium 100 μ M des Kaspase-3 Inhibitors III eine Stunde vor der Transfektion zugegeben (entspricht DEVD, Calbiochem, La Jolla, CA). Die Zellen wurden 5 min in PBS + 1 mM MgCl gewaschen, anschließend in 3 % Paraformaldehyd in PBS für 10 min fixiert und zweimal für 5 min in PBS / 50 mM Ammoniumchlorid inkubiert. Anschließend wurde die Zellmembran bei 25°C in PBS / 0,5 % Triton X 100 für 5 min perforiert und danach die Flüssigkeit auf dem Objektträger entfernt. Es folgten zwei Waschschrte von je 5 min in PBS bevor erneut die gesamte Flüssigkeit entfernt wurde und die Probe mit 1 x Transferasepuffer für etwa 10 sec äquilibriert wurde. Nach dem Entfernen des Puffers werden zu jedem Loch auf der Platte 20 μ l Reaktionsansatz 1 gegeben und mit einer Lage Parafilm überdeckt. Die Probe wurde dann für eine Stunde dunkel in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 mM EDTA / EGTA gestoppt, 2 min in PBS geschwenkt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Trocknen wurde die Probe mit Glycerin konserviert.

3.13. Herstellung eines Immuserums

3.13.1. Herstellung und Reinigung des N-terminalen RERE Fragments

3.13.1.1. Expression des N-terminalen RERE Fragments in *E. coli* BL 21

Das Konstrukt pET-RERE_N70kD wurde nach der DNA-Sequenzierung (Primer: M13 und M13 rev) in *E.coli* BL 21 geschleust und die amplifizierten Einzelklone durch Minipräanalysen auf das komplette Insert getestet. Für die Expression der Proteinfragmente wurde die DNA in *E.coli* BL 21 geschleust und Einzelklone vermehrt. Für die Produktion des RERE Fragments wurde eine Bakterienkultur 1:200 in 6 x 500 ml LB-Kanamycin-Medium bis zu einer Optischen Dichte von $OD_{600} = 0.6$ inkubiert. Die anschließende Induktion der Proteinexpression erfolgte mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG. Nach einer Expressionszeit von 2 h wurden die Bakterien bei 5000 g für 12 min sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und bei 5000 g in der Zentrifuge sedimentiert.

3.13.1.2. Zellyse mit Ultraschall und Guanidiniumhydrochloridlösung

Für die Zellyse wurden die Bakterien in 2 x 6 ml 7 M Guanidiniumhydrochloridlösung für 20 min auf einem Drehrad gemischt. Nach dem Aufschließen der Zellen mit Ultraschall, 3 x 1 min bei 80 % Zeitintensität und maximaler Leistung wurden die Zellen bei 22°C mit 14 000 rpm (Fa. Beckmann, Rotor: SL 600) für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 15 000 rpm erneut für 30 min zentrifugiert (Rotor: SL 600) und mittels Ni-Chelat Chromatographie (3.11) gereinigt.

3.13.1.3. Reinigen im Acrylamidgel

In einem weiteren Reinigungsschritt wurden die Proteinproben in einem 8 % Acrylamidgel aufgetrennt und mit 0,005% Brillant Blau R 250 in dest. Wasser gefärbt. Die Entfärbung erfolgte für etwa 30 min in dest. Wasser. Die entsprechende Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Proben bis zum Versand bei -80°C eingefroren. Die Immunisierung von 2 Kaninchen erfolgt nach der 80 Tage dauernden Standardmethode bei der Fa. EUROGENTECH.

4. ERGEBNISSE

4.1. Beschreibung der RERE cDNA und der genomischen Struktur

Ausgehend von Sequenzbruchstücken wurde in dieser Arbeit der Leserahmen für das in der Neuroblastomzelllinie NGP identifizierte Bruchpunktgen *RERE* vervollständigt und dessen genomische Exon-Intron Struktur beschrieben. Dazu wurde eine Datenbankrecherche durchgeführt. Diese Methode ist im Vergleich zur Herstellung und dem Screening von genomischen- oder cDNA-Banken meist deutlich schneller.

4.1.1. Vervollständigen der RERE cDNA Sequenz

Ausgehend von zwei Fragmenten der humanen RERE cDNA Sequenz (siehe Material und Methoden) wurde mittels Datenbankrecherche eine homologe cDNA Sequenz der Ratte identifiziert (Abb. 4-1). Mit dieser Sequenz wurden in einer zweiten Datenbanksuche homologe, humane cDNA Fragmente, sogenannte Expressed Sequence Tags (ESTs) identifiziert und anschließend sequenziert, um die RERE cDNA zu ergänzen und den Leserahmen zu vervollständigen (Abb. 4-1). ESTs sind cDNA Sequenzen mit einer Länge von etwa 400 bis 1500 Nukleotiden, die in einen bakteriellen Vektor eingesetzt wurden. In EST Datenbanken sind meist nur 100 - 250 randständig sequenzierte Nukleotide gespeichert.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde durch den Sequenzvergleich mit zwei nicht überlappenden RERE cDNA Teilsequenzen, von 1855 Nukleotiden und 1275 Nukleotiden, homologe cDNA Sequenzen in öffentlichen Datenbanken identifiziert (siehe Material und Methoden). Dabei wurden neben einer homologen Sequenz der Ratte, "Rattus norvegicus Atrophin-1 related" (rARP, Accession Nummer U44091, Abb. 4-1) zwei weitere cDNA Sequenzen mit der Bezeichnung Atrophin-1 identifiziert (Accession Nummer U23851 = humanes Atrophin-1; X89453 = Atrophin-1 Homologon der Ratte). Die Sequenzen von Atrophin-1 enthalten homologe Sequenzabschnitte, die durch Sequenzabschnitte mit geringer Homologie unterbrochen sind. Zu der Sequenz der rARP cDNA, die eine Nukleinsäurehomologie von 72 % zu den humanen RERE Teilsequenzen aufweist, wurden in einer weiteren Datenbanksuche 51 homologe humane EST Sequenzen identifiziert (Abb. 4-1). Von 12 EST Klonen wurde die gesamte Nukleotidsequenz bestimmt. Die sequenzierten cDNA Inserts hatten eine Länge von jeweils 475 bis 1218 Nukleotide. Durch die endständige Sequenzüberlagerung dieser cDNA Sequenzen konnte die gesamte humane RERE cDNA Sequenz bestimmt werden (Abb. 4-2).

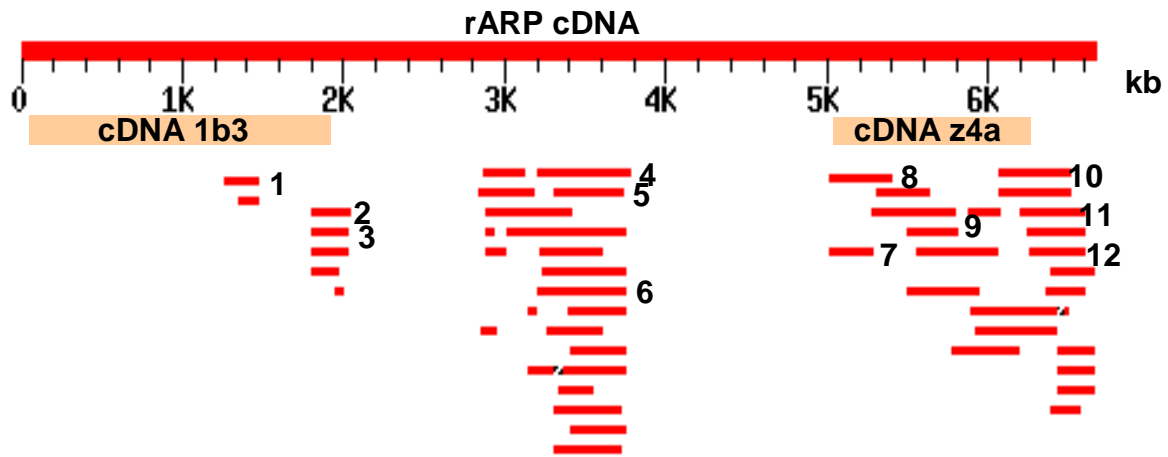


Abb. 4-1: Grafische Darstellung der Ergebnisse zur Vervollständigung der RERE cDNA Sequenz mittels computergestütztem Sequenzvergleich.

Die cDNA Sequenzen von Atrophin Related Protein der Ratte (rARP, U44091, oberer Balken mit Nummerierung der Nukleotide in kb) wurde als homologe Sequenz zu humanem RERE identifiziert, aufgrund seiner Sequenzhomologie zu zwei bekannten humanen RERE cDNA Fragmenten. Die beiden humanen RERE cDNA Fragmente (benannt "1b3" und "z4a") sind entsprechend ihrer homologen Sequenz zu rARP als braune Balken angeordnet. Mit der kompletten cDNA von rARP wurde ein Sequenzvergleich mit humanen EST-Sequenzen durchgeführt. Die identifizierten EST-Sequenzen mit Homologie zu rARP sind dargestellt, entsprechend der Lage ihrer homologen Sequenz zu der rARP-cDNA. Die in dieser Arbeit sequenzierten Sequenzen sind nummeriert. Die Nummerierung entspricht der folgenden Datenbankbezeichnung: 1, H83958; 2, AA021286; 3, H29903; 4, AA452332; 5, AA721677; 6, H305991; 7, AA484986; 8, H27325; 9, T70470; 10, AA621764; 11, H12676; 12, AA021286.



Abb. 4-2: Schematische Darstellung der isolierten cDNA von humanem RERE, des längsten offenen Leserahmens und möglicher Translationsstart- und Translationsstopsequenzen (Translationsstart nur in Leseraster eins markiert).

Schematische Darstellung der drei möglichen Leseraster im „sense“ Strang (Balken 1-3) sowie im „antisense“ Strang (Balken 4-6). Die kodierende Region ist im ersten Leseraster (farblich unterlegt) durch ein gestricheltes Quadrat markiert und kodiert für 1566 Aminosäuren. Mögliche Start Kodons sind durch eine vertikale weiße Linie hervorgehoben und Stop Kodons in allen Leserastern sind durch vertikale, rosa Linie markiert.

4.1.2. Beschreibung der RERE cDNA und des kodierten Proteinprodukts

Aus den RERE cDNA Fragmenten und den neu sequenzierten, überlappenden EST-Sequenzen wurde eine cDNA von 5519 Nukleotiden zusammengesetzt. Der längste offene Leserahmen beinhaltete 4701 Nukleotide und kodierte für 1566 Aminosäuren. Für das RERE Protein wurde keine offensichtliche funktionelle Domäne nachgewiesen. In Abb. 4-3 (nächste Seite) wurde die gesamte Aminosäuresequenz des in dieser Arbeit hergestellten RERE Proteins dargestellt. Mögliche Interaktionsdomänen wie RD und RE Sequenzwiederholungen, die abwechselnd saure und basische Seitenketten enthalten sowie saure und basische Aminosäureregionen wurden markiert und mögliche Kernlokalisierungssignale hervorgehoben.

4.1.3. Genomische Struktur des RERE Leserahmens

Für die Charakterisierung der Exon-Intron Struktur wurden in genomischen Datenbanken Sequenzen mit identischen Exon Sequenzen zu der RERE cDNA Sequenz bestimmt. Durch die Identifizierung der Exon-Intron Übergänge konnte die genomische Region des RERE Gens charakterisiert werden, wie sie in nicht rearrangierten Zellen vorliegt. Diese Ergebnisse dienten zur Identifizierung von RERE RNA Splicevarianten und wurden für die Synthese von Exon überlappenden Primerpaaren zur quantitativen RNA Bestimmung verwendet. Durch weitere Datenbankeinträge über die genomische Lokalisierung der identifizierten Sequenzen konnte das RERE Gen auf Chromosom 1 in der Region 1p36.2-3 lokalisiert werden. Diese Region entspricht der Bruchpunktregion in NGP (Casciano et al., 1996). Für den Bereich des Leserahmens der beschriebenen humanen RERE cDNA wurden 22 Exons nachgewiesen (Tab. 4-1, Abb. 4-4). In drei genomischen Sequenzen mit den Datenbankbezeichnungen "Accession Nummer": AC021953, AL096855 und AC024508 wurde die Sequenz des gesamten offenen Leserahmens von RERE nachgewiesen. Im Exon mit dem ATG Startkodon (Exon 1) wurden weitere 174 Nukleotide der 5' nicht translatierten Region nachgewiesen. Die weitere Nummerierung der Exons erfolgte in der Reihenfolge der identischen Sequenzabschnitte der RERE cDNA mit den genomischen Sequenzen in der 5'-3'Richtung. Auf Exon 22 wurden zusätzlich 572 bp der 3' nicht translatierten Region nachgewiesen, die mit der RERE cDNA identisch waren.

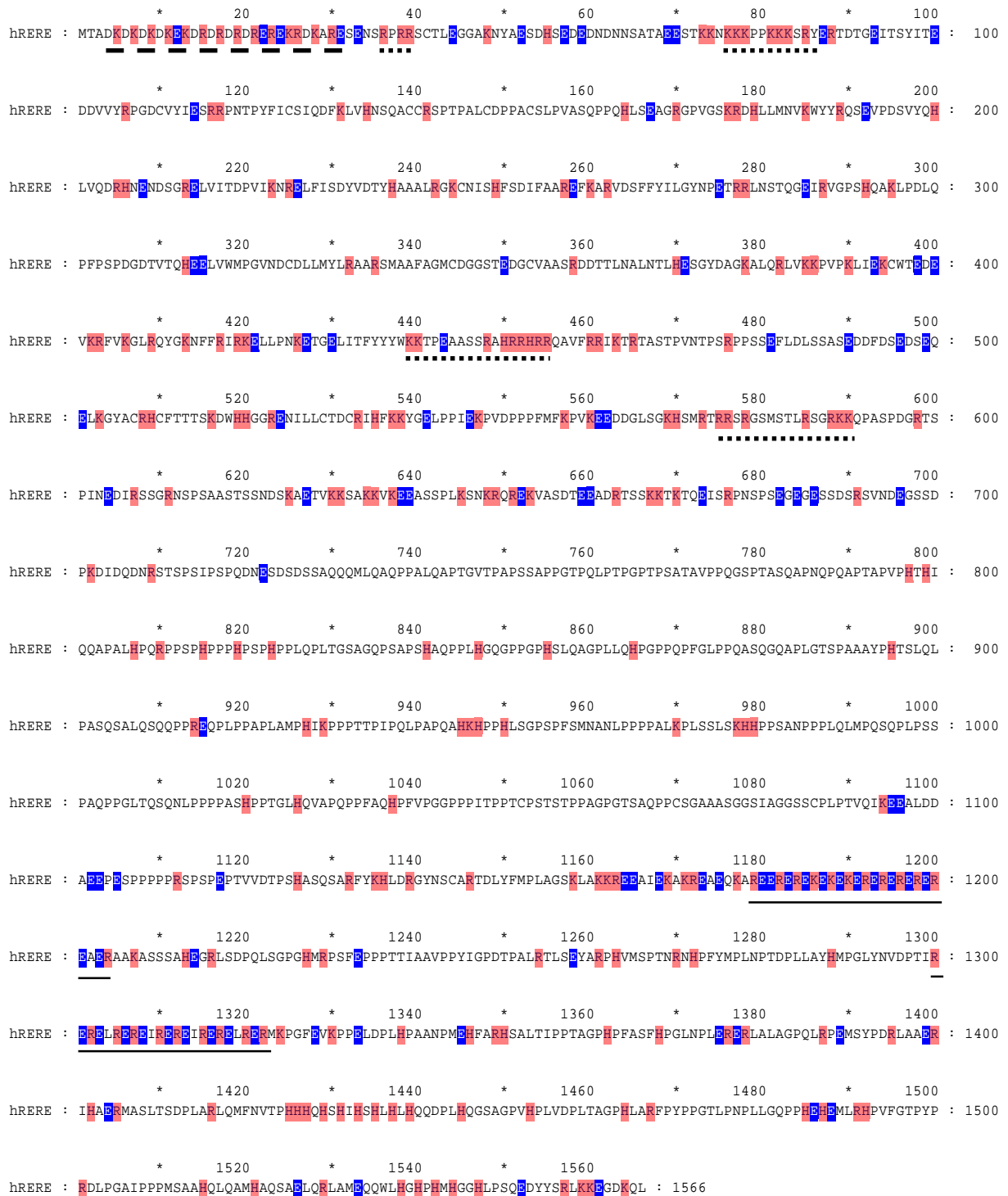


Abb. 4-3: Darstellung der RERE Aminosäuresequenz mit einer Länge von 1566 Aminosäuren.

Die negativ geladene Aminosäure E (Glutaminsäure) ist blau markiert. Die positiv geladenen Aminosäuren R (Arginin), K (Lysin) und H (Histidin) sind rot markiert. Folgenden Proteinregionen sind grafisch hervorgehoben: KD-RD Sequenzwiederholungen (gestrichelte Linie), RE Sequenzwiederholungen (durchgehende Linie) sowie mögliche Kernlokalisierungssequenzen (gepunktete Linie).

Anhand der in den Datenbanken genannten Länge der genomischen Sequenzen (Bestimmung durch Gelelektrophorese) wurde aus den beiden nicht überlappenden genomischen Sequenzen (AC021953 und AC024508) eine Länge von 350 kb berechnet. Beide Sequenzen beinhalten aber nicht den gesamten Leserahmen von *RERE*. Die Lage von weiteren Exons auf verschiedenen genomischen Klonen deutet auf eine größere genomische Ausdehnung des *RERE* Gens hin. Eine genauere Bestimmung der Länge des *RERE* Gens war mit den unvollständigen Sequenzdaten in den öffentlichen Datenbanken noch nicht möglich.

Tab. 4-1: Genomische Exon-Intron Übergänge im *RERE* Gen

Exon [Nr.] ⁽¹⁾	Exon [bp] ⁽²⁾	cDNA [nt] ⁽³⁾	genomische Bezeichnung ⁽⁴⁾	Exon [Nr.] ⁽¹⁾	Exon [bp] ⁽²⁾	cDNA [nt] ⁽³⁾	genomische Bezeichnung ⁽⁴⁾
1	470	1-323	AC021953, AQ088549	12	162	1287-1448	AC024508, AC016049
2	72	324-395	AC021953, AC008272	13	91	1449-1539	AC024508
3	123	396-518	AC021953, AC008272	14	201	1540-1740	AC024508, AF041096
4	110	519-628	AL096855, AC021953	15	163	1741-1903	AC024508, AF041097
5	99	629-727	AL096855, AC021953	16	113	1904-2017	AC024508, AF041098
6	104	728-831	AL096855, AC021953	17	1380	2018-3397	AC024508, AF041009
7	49	832-880	AL096855, AL096858	18	221	3398-3619	AC024508, AF041100
8	125	881-1005	AL096855, AL096859	19	721	3620-4340	AC024508, AF041102
9	100	1006-1105	AL096855, AL096860	20	147	4341-4488	AC024508
10	98	1106-1203	AL096855, AL096861	21	180	4489-4668	AC024508, AF041103
11	83	1204-1286	AL096855, AC024508	22	2717	4669-4698	AC024508, AF041104

⁽¹⁾ Nummerierung der Exons beginnend mit ATG Exon in 5'-3' Richtung;

⁽²⁾ Exonlänge in Basenpaare.

⁽³⁾ Identische Sequenz zu der *RERE* cDNA.

⁽⁴⁾ Repräsentative Beispiele genomischer Sequenzen, die für *RERE* Exon Sequenzen kodieren. Jede genannte Sequenz hatte eine Homologie des Exons von mindestens 99 % der Nukleotide.

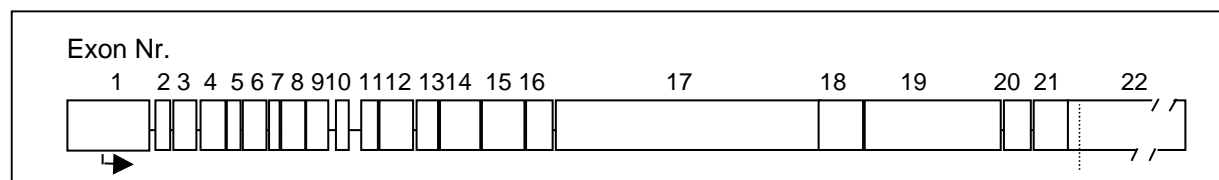


Abb. 4-4: Darstellung der Exon-Intron Übergänge im Leserahmen des *RERE* Gens.

Die Position des Startkodons ist durch einen Pfeil in der Leserichtung für den Leserahmen skizziert; das Stopkodon ist durch eine gepunktete vertikale Linie im Exon Nr. 22 angedeutet.

4.2. Beschreibung von alternativen RERE Transkripten

Für die Charakterisierung der RERE Transkripte wurde mittels Northern Blot RNA Analyse die Länge, Anzahl und die Gewebeverteilung nachgewiesen. Durch Northern Blot RNA Analyse und durch Datenbank-recherchen konnten zwei cDNA-Sequenzeinträge, aus öffentlichen Datenbanken, als Splicevarianten von RERE identifiziert werden.

4.2.1. RNA Expressionsuntersuchungen von humanem Gewebe

Northern Blots mit poly (A)⁺ RNA sowie auf Nylonmembran gepunktete RNA von verschiedenen Geweben und Tumor Zelllinien wurden mit einer radioaktiv markierten 5'RERE cDNA Sonde (siehe Material und Methoden) hybridisiert. Dabei wurden zwei Transkripte von 7,4 und 9,4 kb in allen untersuchten humanen Geweben nachgewiesen (Fig.4-5A). Diese Transkripte hatten die gleiche Länge wie das zu RERE homologe Atrophin Related Protein der Ratte (Kahn et al., 1996). Vergleichbare Transkripte wurden mit einer cDNA Sonde aus der RERE 3'Region nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Mit der 5'Hybridisierungssonde wurde bei einigen untersuchten Geweben noch weitere Transkripte nachgewiesen. In Hodengewebe wurde ein Transkript mit einer Länge von 6,8 kb sowie zwei weitere, schwächere Signale bei 5,2 kb und 3 kb nachgewiesen. Das 5,2 kb Transkript wurde ebenfalls in der Schilddrüse, Pankreas, Skelettmuskulatur und Herz als schwaches Signal nachgewiesen. Da das Hybridisierungsprofil der 5'Sonde im Northern Blot spezifisch war, wurde unter den gleichen Bedingungen die Expression von RERE in weiteren Geweben und Tumor Zelllinien mit einer Dot Blot Hybridisierung untersucht. Dabei wurden RERE Transkripte in allen untersuchten Proben nachgewiesen. Im Vergleich mit anderen Gewebeproben wurde ein stärkeres Signal in Großhirn, Hoden, Uterus sowie in Proben von erwachsener und embryonaler Prostata und Niere nachgewiesen (Abb. 4-5B).

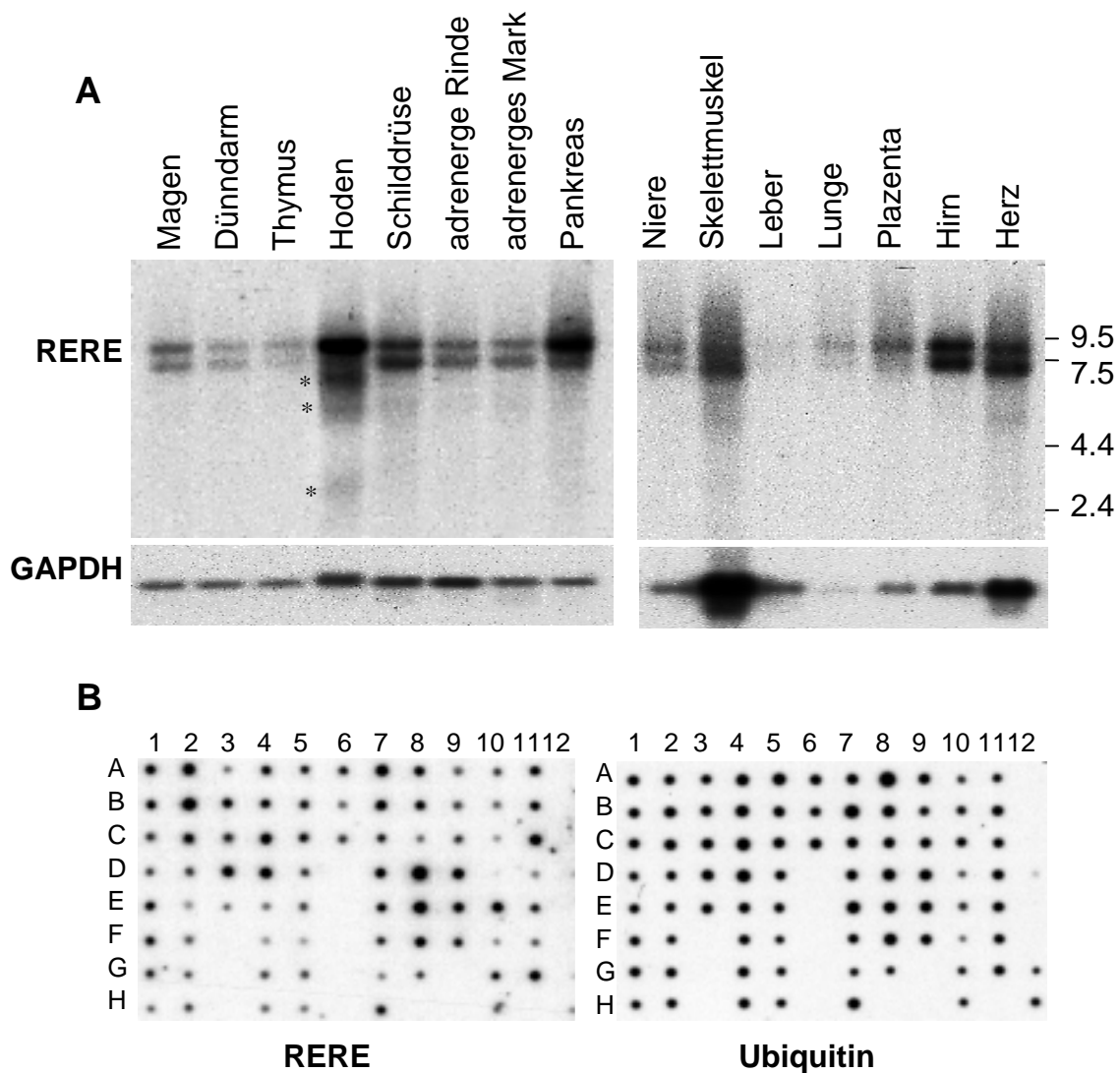


Abb. 4-5: Nachweis von RERE RNA in verschiedenen humanen Geweben mittels Northern Blot.

Mit einer RERE cDNA Sonde wurden RNA Agarose Gel Blots und auf Nylonmembran gepunktete RNA, sogenannte Dot Blots (Clontech, Palo Alto, CA) hybridisiert. Das Molekulargewicht ist in Kilobasen (kb) auf der rechten Seite angegeben.

(A) In allen untersuchten Geweben wurden zwei RNA Transkripte mit einer Länge von 7,4 kb und 9,4 kb nachgewiesen. In RNA aus Hodengewebe wurden zusätzlich drei Banden mit einem Molekulargewicht von 6,8 kb, 5,2 kb und 3 kb nachgewiesen (markiert mit *). Das 5,2 kb Transkript ist ebenfalls in RNA aus der Schilddrüse, adrenergen Rinde, adrenergen Mark, Pankreas, Skelettmuskel und Herz sichtbar. Die Expression der GAPDH RNA (unterer Bildabschnitt) dient zur Kontrolle der RNA Menge und Qualität.

(B) Nachweis von RERE RNA mittels Northern-Dot Blot in allen Geweben mit den stärksten Hybridisierungssignalen in Uterus (D8), Prostata (E8) und Hoden (F8), Großhirn (A2 + B2) sowie Niere (A7, C11). Als Kontrolle für gleichmäßige RNA Beladung wurde der Blot mit einer cDNA Probe von Ubiquitin hybridisiert. Die Beschreibung der auf dem Dot Blot aufgetragenen RNAs befindet sich im Anhang auf Seite 105.

4.2.2. Aminosäuresequenzvergleich der RERE Splicevarianten mit Atrophin-1

Der Nachweis von mRNA Transkripten mit unterschiedlicher Länge von 3 kb, 5,2 kb, 6,8 kb, 7,4 kb und 9,4 kb mit der 5' RERE Sonde kann auf verschiedene RNA Spliceformen zurückzuführen sein. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die RERE cDNA Sequenz mit cDNA aus den öffentlichen Datenbanken verglichen und mögliche alternative Spliceprodukte durch abschnittsweise identische Sequenzen ermittelt. Die hier aufgeführten Ergebnisse beruhen auf Datenbankeinträgen vom Stand Oktober 2000.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden drei identische Teilsequenzen von RERE in der cDNA Datenbank veröffentlicht, die exakt mit dem Transkriptionsstartpunkt eines Exons beginnen und somit mögliche alternative Spliceprodukte sind. Die Sequenz mit der Bezeichnung (Accession Nummer) AB036737 (Exon 1 - 22) wurde im September 2000 erstmals beschrieben (Yanagisawa et al., 2000) und ist bis auf 10 Aminosäuren identisch mit der hier beschriebenen Sequenz (Tab. 4-2). Diese Sequenz (AB036737) enthält eine 5' Region, die nicht in der hier beschriebenen RERE cDNA Sequenz enthalten war und auf der genomischen Sequenz AC25240 als 2 Exons (Nukleotid 3 bis 306 und Nukleotid 307 - 492) kodiert ist. Die Sequenz mit der Bezeichnung AB007927 (Exon 7 - 22) enthält ebenfalls eine veränderte 5' Region, die auf einem Sequenzabschnitt von 183 Nukleotiden auf dem genomischen Klon AL096855 lokalisiert ist. Die cDNA Sequenz AF016005 (Exon 11 - 22) enthält eine alternative 5' Region von 107 Nukleotiden, die als ein Exon auf der genomischen Sequenz AL096855 lokalisiert ist (Tab. 4-3).

Der Sequenzvergleich der RERE Splicevarianten zeigte eine geringe Abweichung der Sequenzen innerhalb des Leserahmens. Eine Ausnahme ist die Splicevariante AF016005. Diese zeigt abschnittsweise keine Homologie mit der RERE Sequenz. Die RERE Aminosäuren 624 - 631 sind nicht mit AF016005 identisch und die RERE Aminosäuren 699 - 723 fehlen in AF016005. In Abb. 4-6 sind die Ergebnisse des Aminosäuresequenzvergleichs der beschriebenen Sequenzen mit dem Stand vom 25.10.2000 zusammengefasst. Darüber hinaus wurde die bereits beschriebene abschnittsweise Homologie mit dem Gen für Atrophin-1 grafisch dargestellt.


```

*          20          *          40          *          60          *          80          *          100
hRERE_S1 : MTADKDKDKKDKDRDRDRDREREKRDKARESENSRPRRSCTLEGGAKNYAESDHSSEEDNDNNSATAEESTKKNKKKPPKKKSRVETDITGEITSYITE : 100
hRERE_S2 : MTADKDKDKKDKDRDRDRDREREKRDKARESENSRPRRSCTLEGGAKNYAESDHSSEEDNDNNGATTEESTKKNKKKPPKKKSRVETDITGEITSYITE : 100
hRERE_S3 : ----- : -
hRERE_S4 : ----- : -
hAtrop_1 : ----- : -

*          120         *          140         *          160         *          180         *          200
hRERE_S1 : DDVVYRPGDCVYIESRRNPTPYFICSIQDFKLVHNSQACCRSPTFALCDPPACSLPVASQPPQHLSEAGRGPVGSKRDLHLMNVKYYRQSEVPDSVYQH : 200
hRERE_S2 : DDVVYRPGDCVYIVCRNPTPYFICSIQDFKLVHNSQACCRSPTFALCDPPACSLPVASQPPQHLSEAGRGPVGSKRDLHLMNVKYYRQSEVPDSVYQH : 200
hRERE_S3 : ----- : -
hRERE_S4 : ----- : -
hAtrop_1 : ----- : -

*          220         *          240         *          260         *          280         *          300
hRERE_S1 : LVQDRHNENDSGRELVIITDPVIKNRELFISDYVDTYHAAALRGKCNISHSDFIFAAREFKARVDSFFYILGYNPETERLNSTQGEIRVGPESHQAKLF--D : 298
hRERE_S2 : LVQDRHNENDSGRELVIITDPVIKNRELFISDYVDTYHAAALRGKCNISHSDFIFAAREFKARVDSFFYILGYNPETERLNSTQGEIRVGPESHQAKLF--D : 298
hRERE_S3 : -----MDDPFSPCRRLNSTQGEIRVGPESHQAKLF--D : 30
hRERE_S4 : ----- : -
hAtrop_1 : -----MKTROKNDKSMRSGRKKKEAPGPREE : 26

*          320         *          340         *          360         *          380         *          400
hRERE_S1 : LQPPF--SPDGDIVTQHEELVWMPGVNDCDLLMYLRAARSMAAFAGMCDGGSTEDGCVAAASRD DTTLNALNTLHESGYDAGKALQRLVKKVPVKLIEKWCW : 396
hRERE_S2 : LQPPF--SPDGDIVTQHEELVWMPGVNDCDLLMYLRAARSMAAFAGMCDGGSTEDGCVAAASRD DTTLNALNTLHESGYDAGKALQRLVKKVPVKLIEKWCW : 396
hRERE_S3 : LQPPF--SPDGDIVTQHEELVWMPGVNDCDLLMYLRAARSMAAFAGMCDGGSTEDGCVAAASRD DTTLNALNTLHESGYDAGKALQRLVKKVPVKLIEKWCW : 128
hRERE_S4 : ----- : -
hAtrop_1 : LRSRGRASPGG--VSTSSD---GKAEKSRQAKKARVEEA--STPKVKNQGRSEE---ISE-S---ES---EE-TNAPKKTKEQELRPPQSPSDDL : 106

*          420         *          440         *          460         *          480         *          500
hRERE_S1 : TEDEVKRFVGLRQYGNFRRIRKELLPNKETGELITFYIYWKKTPEAASSRAHRRHRRCQAVFRRIKTRTASTPVNTPSRPPSSEFLDLSASEDDFDSE : 496
hRERE_S2 : TEDEVKRFVGLRQYGNFRRIRKELLPNKETGELITFYIYWKKTPEAASSRAHRRHRRCQAVFRRIKTRTASTPVNTPSRPPSSEFLDLSASEDDFDSE : 496
hRERE_S3 : TEDEVKRFVGLRQYGNFRRIRKELLPNKETGELITFYIYWKKTPEAASSRAHRRHRRCQAVFRRIKTRTASTPVNTPSRPPSSEFLDLSASEDDFDSE : 228
hRERE_S4 : ----- : -
hAtrop_1 : SLDG----RSLNDDGS--SDPRDIDQDNRS--TSPSIYSPGVSNDSDSSGLSQGFARPYHPPPLFP--SPQPPDSTP--RQPEASEPHPSVTPTGYHAP : 197

*          520         *          540         *          560         *          580         *          600
hRERE_S1 : DSEQELKGYACRHCFTTTSKDWHHGGRENILLCTDCRIHFYKYGELPPIEKVPDPP--PFMFKVKEEDDGLSGKHSMTRRRSRGMSTLRSGRKKQPAS : 594
hRERE_S2 : DSEQELKGYACRHCFTTTSKDWHHGGRENILLCTDCRIHFYKYGELPPIEKVPDPP--PFMFKVKEEDDGLSGKHSMTRRRSRGMSTLRSGRKKQPAS : 594
hRERE_S3 : DSEQELKGYACRHCFTTTSKDWHHGGRENILLCTDCRIHFYKYGELPPIEKVPDPP--PFMFKVKEEDDGLSGKHSMTRRRSRGMSTLRSGRKKQPAS : 326
hRERE_S4 : -----MFKVKEEDDGLSGKHSMTRRRSRGMSTLRSGRSSQPA : 40
hAtrop_1 : MEPPTSRMFQAPPAPPPHPQLYFGGTGGVLSGP--FMGPKGGGAASSVGGPNGKQHPPTTTEISVSSSGASGAPPTKPTTTPVGGNLSAP--PPAN : 293

*          620         *          640         *          660         *          680         *          700
hRERE_S1 : PDGRASPINEDIRSSGRNSPSSAASTSSNDSKAETVKKSAKKVKEEASSPKSNKRQREKVASDTEEADRTSSKKTQTEISRNSPSEGEGBSSDSRSVN : 694
hRERE_S2 : PDGRASPINEDIRSSGRNSPSSAASTSSNDSKAETVKKSAKKVKEEASSPKSNKRQREKVASDTEEADRTSSKKTQTEISRNSPSEGEGBSSDSRSVN : 694
hRERE_S3 : PDGRASPINEDIRSSGRNSPSSAASTSSNDSKAETVKKSAKKVKEEASSPKSNKRQREKVASDTEEADRTSSKKTQTEISRNSPSEGEGBSSDSRSVN : 426
hRERE_S4 : LDGRASPINEDIRSSGRNSPSSAASTSSNDSKAETVKKSAKKVKEEASSPKSNKRQREKVASDTEEADRTSSKKTQTEISRNSPSEGEGBSSDSRSVN : 140
hAtrop_1 : FPHVTPNLPPLPPALRPLNAGASPPG-LGAQPLPGLHPSFYAMGQMGGLPPGPEKPTLPPSPHSLPPASAS-APAPPMRFYVSSSSSSAAASSSSSS : 391

*          720         *          740         *          760         *          780         *          800
hRERE_S1 : DEGSSEPKDIDQDNRS--TSPSIPSDNESDSSAQOQMLCAQPPALCAETGVTAPASSAPPFGPQLPPTFGPTPSATAVFPQGSPTASQAPNQPQAFAP : 794
hRERE_S2 : DEGSSEPKDIDQDNRS--TSPSIPSDNESDSSAQOQMLCAQPPALCAETGVTAPASSAPPFGPQLPPTFGPTPSATAVFPQGSPTASQAPNQPQAFAP : 794
hRERE_S3 : DEGSSEPKDIDQDNRS--TSPSIPSDNESDSSAQOQMLCAQPPALCAETGVTAPASSAPPFGPQLPPTFGPTPSATAVFPQGSPTASQAPNQPQAFAP : 526
hRERE_S4 : DEGSSEPKDIDQDNRS--TSPSIPSDNESDSSAQOQMLCAQPPALCAETGVTAPASSAPPFGPQLPPTFGPTPSATAVFPQGSPTASQAPNQPQAFAP : 240
hAtrop_1 : SSSASLFFPASCALPSYPHSPPE--TSLVSN-----QPKYTCPS--LPSQAVSQGPPPPPPYGRLLANSNAPGFFPPSTGAQSTAHFVST : 478

*          820         *          840         *          860         *          880         *          900
hRERE_S1 : VPHHITQCAPALHFQRPSPPE--PPHPSPEPLQPLTCSAGQPSAPSEAOPELGGQFPFGPHSLQAGFLLQHPGPPQPFGLPPEASQCGQAPLGSPPAA : 891
hRERE_S2 : VPHHITQCAPALHFQRPSPPE--PPHPSPEPLQPLTCSAGQPSAPSEAOPELGGQFPFGPHSLQAGFLLQHPGPPQPFGLPPEASQCGQAPLGSPPAA : 891
hRERE_S3 : VPHHITQCAPALHFQRPSPPE--PPHPSPEPLQPLTCSAGQPSAPSEAOPELGGQFPFGPHSLQAGFLLQHPGPPQPFGLPPEASQCGQAPLGSPPAA : 623
hRERE_S4 : VPHHITQCAPALHFQRPSPPE--PPHPSPEPLQPLTCSAGQPSAPSEAOPELGGQFPFGPHSLQAGFLLQHPGPPQPFGLPPEASQCGQAPLGSPPAA : 337
hAtrop_1 : HHHITQCCQQQQQQQQQHQHNSGPPPEGAPF--HPLEGSSSHHAF--VAMPSILCSLRVYPP---GF--ALLPPEHSQVSYSGQFNGPPVSSSNS : 569

*          920         *          940         *          960         *          980         *          1000
hRERE_S1 : AYPHTSLQLFASQSALCSQCP--RECPIPPAFLAMPHIKPPPTTPIQPLPAQCAKHPPHLSGSPFSMNLNLPPEALKPLSSLKHHPPSANPPPLQL : 990
hRERE_S2 : AYPHTSLQLFASQSALCSQCP--RECPIPPCFLAMPHIKPPPTTPIQPLAEPQCAKHPPHLSGSPFSMNLNLPPEALKPLSSLSTHPPSAHPPPLQL : 990
hRERE_S3 : AYPHTSLQLFASQSALCSQCP--RECPIPPAFLAMPHIKPPPTTPIQPLPAQCAKHPPHLSGSPFSMNLNLPPEALKPLSSLRSDF----- : 712
hRERE_S4 : AYPHTSLQLFASQSALCSQCP--RECPIPPAFLAMPHIKPPPTTPIQPLPAQCAKHPPHLSGSPFSMNLNLPPEALKPLSSLSTHPPSAHPPPLQL : 436
hAtrop_1 : SSSTSQGSYPCSHSP--SQGQAGAPYPPVETVTTSSATLSHVIATVASSPAGYKASPP--GPPYVYKRA---ESPAYKATATPGYK----- : 654

```


Tab. 4-2: Austausch von 10 Aminosäuren zwischen der in dieser Arbeit beschriebenen Sequenz der humanen RERE Splicevariante_1 ⁽¹⁾ und der humanen RERE-Splicevariante_2 von Yanagisawa et al. ⁽²⁾.

Aminosäure (AS) Austausch [Nr.]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AS-position	65	68	114	115	921	940	977	984	1489	1490
AS in hRERE_S1 ⁽¹⁾	S	A	E	S	A	P	K	N	M	L
AS in hRERE_S2 ⁽²⁾	G	T	V	C	G	A	T	H	I	V

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Datenbankeinträge zur Bestimmung möglicher RERE Splicevarianten.

CDNA Bezeichnung	Protein- bezeichnung	identische Exons [Exon bis Exon]	nicht homologe 5' Sequenz [Nukleotide]	zusätzliche Exons ⁽³⁾	genomische Sequenz- bezeichnung ⁽⁴⁾
AB036737	hu RERE ⁽¹⁾	1-22	492	2	AC25240
AB007927	hu ARP ⁽²⁾	7-29	183	1	AL096855
AF016005	-	11-22	107	1	AL096855

⁽¹⁾ humanes RE-Repeats Encoded Protein

⁽²⁾ humanes Atrophin Related Protein

⁽³⁾ Anzahl alternativer Exons die nicht für die in dieser Arbeit beschriebene RERE cDNA kodieren.

⁽⁴⁾ Bezeichnung der genomischen Sequenz die mindestens ein alternatives Exon enthält.

4.2.3. Charakterisierung von Splicevarianten mittels Northern Blot Analyse

Die Ergebnisse dieser Datenbanksuche wurden genutzt, um anschließend im Northern Blot mit einer exonspezifischen Sonde RERE Splicevarianten nachzuweisen. Dazu wurde ein humaner RNA Gewebesblot (Fa. Clontech) mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Diese Sonde wurde so ausgewählt, dass sie Exons enthält die in 2 der 4 RERE Transkripte nicht enthalten sind. Mit dieser Sonde, die exakt die cDNA Sequenz von Exon 4 und Exon 5 enthält, wurde in keinem Gewebe das 7,4 kb Transkript nachgewiesen. Das 9,4 kb Transkript wurde in allen untersuchten Geweben nachgewiesen und das 6,8 kb Transkript in Hodengewebe detektiert (Abb. 4-7). Dies bedeutet, dass zumindest Exon 4 und 5 nicht im 7,4 kb Transkript enthalten sind. Obwohl keines der kleineren RERE Transkripte mit dieser Sonde nachgewiesen wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die 5,6 und 3,0 kb

Transkripte diese Sequenz enthalten und aufgrund der geringeren Nachweisempfindlichkeit, bedingt durch die exonspezifischen Sonde, nicht detektiert wurden.

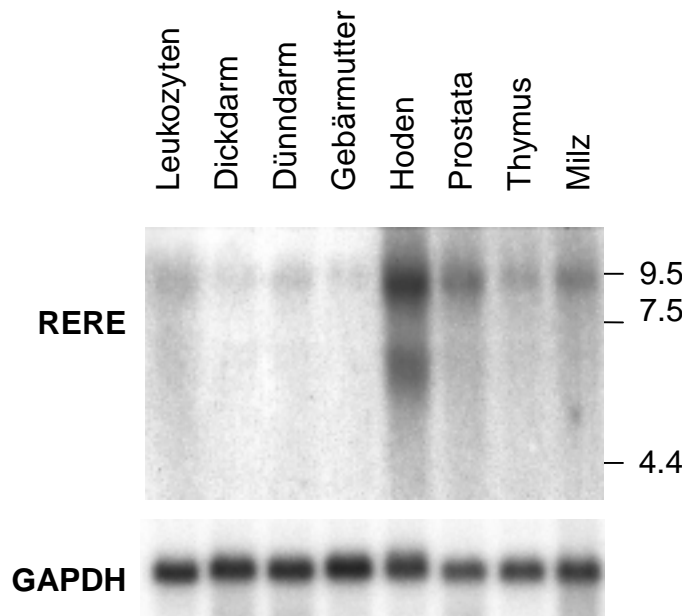


Abb. 4-7: Northern Blot Analyse zur Charakterisierung von alternativen RERE RNA Transkripten.

Mit einem radioaktiv markierten PCR Fragment, das die RERE cDNA von Exon 4 und 5 enthält, wurde ein RNA Agarose Gel Blot (Clontech) hybridisiert. Das Molekulargewicht ist auf der rechten Seite in Kilobasen (kb) angegeben. Ein Transkript von 9,4 kb wurde in allen untersuchten humanen Geweben nachgewiesen (stärkste Expression im Hodengewebe). Im Hodengewebe wurde ebenfalls ein Transkript von 6,8 kb nachgewiesen. In keinem Gewebe wurde das 7,4 kb Transkript nachgewiesen. Als Kontrolle für gleichmäßige RNA Beladung wurde eine cDNA Probe von GAPDH hybridisiert (unterer Bildabschnitt).

4.3. Zelluläre Lokalisierung von transient exprimiertem RERE Protein

Zur Bestimmung der intrazellulären RERE Verteilung wurde RERE als MYC markiertes Fusionsprotein (MYC-RERE) in COS-7 Zellen exprimiert und der Gehalt von MYC-RERE in verschiedenen Zellfraktionen bestimmt. In einem zweiten Ansatz wurde ein GFP-RERE Fusionsprotein in verschiedene Zelllinien transfiziert und die zelluläre Verteilung im Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

4.3.1. Nachweise der zellulären Lokalisierung von MYC-RERE Protein

Nach der Expression von MYC-RERE in COS-7 Zellen für 48 Stunden wurde die Proteinfraction von Zellkern und Zytoplasma getrennt. Mittels einem MYC-spezifischen Antikörper wurde im Western Blot in der zytoplasmatischen Fraktion sowie in der löslichen Kernfraktion und der mit dem Chromatin-assoziierten Zellkernfraktion MYC-RERE nachgewiesen. Im Zellkulturüberstand transfizierter Zellen wurde dagegen kein sezerniertes RERE Protein nachgewiesen (Abb. 4-8).

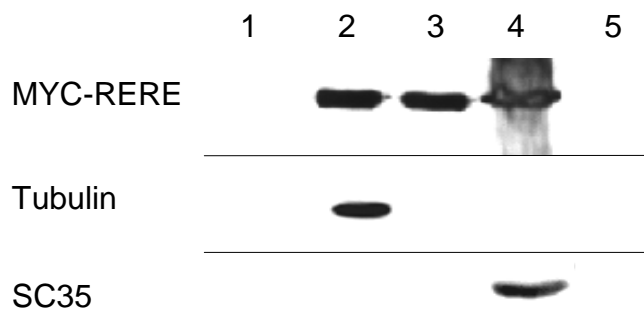


Abb. 4-8: Western Blot Analyse zum Nachweis von RERE in isolierten Zellfraktionen.

Die zytoplasmatische Proteinfraction sowie freie und chromatingebundene Proteinfractionen aus dem Zellkern von MYC-RERE transfizierten COS-7 Zellen wurden nach 48 h aufgetrennt (siehe Material und Me-

thoden) und der Proteingehalt von MYC-RERE im Western Blot mittels eines MYC-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Spalte 1: Kein MYC-RERE wurde in 70 µl Kulturüberstand nachgewiesen. Spalte 2: Nachweis von Myc-RERE in der zytoplasmatischen Zellfraktion. Spalte 3: Nachweis von MYC-RERE in der löslichen Kernfraktion. Spalte 4: Nachweis von MYC-RERE in der Chromatin assoziierten Kernfraktion. Spalte 5: Kein Signal in nicht transfizierten Zellen nach der Hybridisierung mit dem anti MYC Antikörper. Als Kontrolle für die Reinheit der fraktionierten Proteine wurde als ein Beispiel für ein zytoplasmatisches Protein, alpha Tubulin (Reihe 2, Spalte 2) und als Beispiel für ein chromatingebundenes Protein das Splicing Protein SC 35 (Reihe 3, Spalte 4) immunologisch auf den wiederverwendeten Blots nachgewiesen.

4.3.2. Nachweis der zellulären Lokalisierung von Vollängen-GFP-RERE und von N- und C-terminalen GFP-RERE Fragmenten

Für eine direkte Analyse der intrazellulären Verteilung von RERE wurde das GFP-RERE Fusionsprotein in voller Länge, als C- oder als N-terminales Fragment in verschiedenen Zelllinien exprimiert. Durch die Transfektion von RERE Fragmenten, denen entweder die N-terminale oder die C-terminale Region fehlte, konnten die Proteinregionen, die eine Bildung von RERE-Aggregaten begünstigen, bestimmt werden. Für die Beschreibung der intrazellulären Lokalisierung von RERE wurden neben dem direkten Nachweis des GFP-RERE Proteins die Proteine PML, BAX, SC35 und ein Golgi Apparat spezifisches Protein (p58 K) immunhistochemisch detektiert sowie intakte Mitochondrien mit einem Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte im Lichtmikroskop oder mittels konfokaler Lasermikroskopie.

Das vollständige RERE Protein enthält mindestens 3 mögliche Kernlokalisierungssignale. Alle untersuchten RERE Fragmente enthalten ebenfalls mindestens eine mögliche Kernlokalisierungssequenz. Eine schematische Übersicht der hergestellten RERE Fragmente und ihre möglichen Domänen ist in Abb. 4.9. zusammengefasst. Nach der Transfektion der humanen Tumor Zelllinien NGP, SK-N-AS oder HeLa mit GFP-RERE wurde nach 18

Stunden im Zellkern oder in beiden Kompartimenten, dem Zellkern und dem Zytoplasma, GFP-RERE nachgewiesen. Die RERE Fraktion im Zellkern war bei 82 % der transfizierten Zellen in diskreten Aggregaten mit einer Größe von 0,1 - 3 µm lokalisiert. Vergleichbare Kernstrukturen sind in der Literatur als "nuclear bodies" beschrieben (Hodges et. al, 1998). Die verbleibenden 18 % der transfizierten Zellen zeigten eine schwache, gleichmäßige Färbung im Zellkern. Insgesamt zeigten 49 % der GFP-RERE transfizierten Zellen ausschließlich eine Färbung im Zellkern während 51 % eine Färbung im Zellkern und im Zytoplasma zeigten (Abb. 4-9B-C). Alle exprimierten GFP-RERE Fragmente zeigten eine Verteilung sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma (Tab. 4-4).

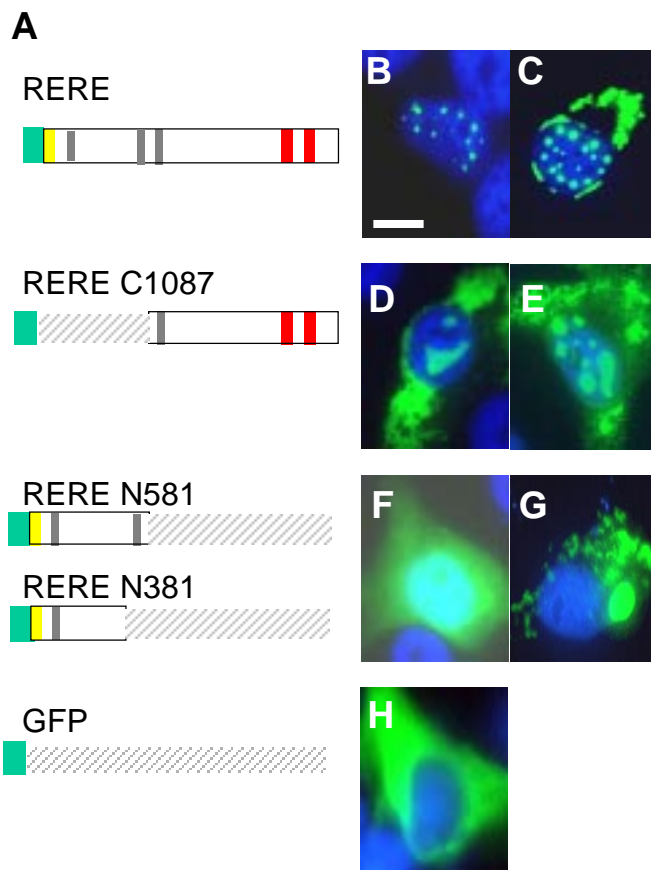


Abb. 4-9: Zelluläre Verteilung von GFP-RERE Fusionsprotein in transfizierten SK-N-AS Zellen.

(A) Schematische Darstellung der DNA-Konstrukte zur Expression von GFP-RERE und GFP-RERE Fragmenten. Dargestellt sind: der GFP-Anteil (grün), RD Aminosäuresequenzen (gelb), mögliche Kernlokalisierungssignale (grau), RERE Aminosäurewiederholungen (rot). Deletierte RERE Sequenzen sind grau schraffiert. Die Abbildungen zeigen das unterschiedliche Verteilungsmuster von GFP-RERE und GFP-RERE Fragmenten (grün) und DAPI gegengefärbter DNA (blau).

(B) Verteilung von GFP-RERE in Kernaggregaten sowie (C) in Kernaggregaten und zusätzlich im Zytoplasma. (D-E) Repräsentative Verteilung des C-terminalen RERE Fragments GFP-C1087 mit auffallenden Kernaggregaten sowie Aggregaten im Zytoplasma. (F) Beispiel für gleichmäßige Verteilung des

N-terminalen RERE Fragments GFP-N381. (G) Beispiel für Aggregate des N381 Fragments. Eine vergleichbare zelluläre Verteilung, wie in (F) und (G) dargestellt ist, war mit dem RERE Fragment N581 erkennbar (Daten nicht gezeigt). (H) Beispiel für gleichmäßige Verteilung von GFP im Zytoplasma (Balken in (B) = 5 µm).

Die Verteilung von N- und C-terminalen RERE Fragmenten zeigte Unterschiede im Vergleich mit dem gesamten RERE Protein. Das C-terminale Fragment GFP-C1087 (AS 480-1567) zeigte neben einer gleichmäßigen Verteilung im Zellkern auch großvolumige Aggregate in 32 % der GFP positiven Zellen. Die Fragmente N581 (AS 1-581) und N381 (AS 1-381) enthalten unterschiedliche Längen der N-terminalen Proteinregion und zeigten neben einer gleichmäßigen Zellkernfärbung zusätzlich kleine Aggregate in 14 % (N581) oder 21 % (N381) der GFP positiven Zellen. Die zytoplasmatische Verteilung von GFP-N381 und -N581 war vornehmlich gleichmäßig, während die meisten mit GFP-C1087 transfizierten Zellen große Aggregate im Zytoplasma aufwiesen. Die weitere Charakterisierung der Lokalisierung von RERE ist in Tabelle 4-4 zusammengefasst. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Bildung von Kernaggregaten, wie bei dem gesamten GFP-RERE, beide Proteinenden, also sowohl die N-terminale Region als auch die C-terminale Region, benötigt werden.

Tab. 4-4: Intrazelluläre Verteilung von verschiedenen RERE Konstrukten

Für die Auswertung wurden in 3 Transfektionsansätzen jeweils 100 Zellen ausgezählt (\pm entspricht der Standardabweichung).

Expressionskonstrukt ⁽¹⁾	Kern [%] ⁽²⁾	Kern und Zytoplasma [%] ⁽³⁾	Kernaggregate [%] ⁽⁴⁾	Aggregatgröße [μm] ⁽⁵⁾
GFP-RERE gesamt	49 \pm 11	51	82 \pm 7	0,1 - 3
GFP-C1087	39 \pm 16	61	32 \pm 7	0,5 - 7
GFP-N581	71 \pm 15	29	14 \pm 5	0,1 - 2
GFP-N381	48 \pm 12	52	21 \pm 6	0,1 - 2
GFP	1 \pm 1	99	0	keine

⁽¹⁾Transfiziertes RERE- Expressionskonstrukt.

⁽²⁾Prozentualer Anteil transfizierter Zellen mit ausschließlicher Färbung des Zellkerns.

⁽³⁾Prozentualer Anteil transfizierter Zellen mit zellulärer und zytoplasmatischer Zellfärbung.

⁽⁴⁾Prozentualer Anteil transfizierter Zellen mit Konzentration von RERE in Kernaggregaten.

⁽⁵⁾Größenvarianz der RERE Aggregate.

4.3.3. Getrennte zelluläre Verteilung von RERE im Vergleich zu Golgi Strukturen und SC35-haltigen Splicing Aggregaten.

Die zytoplasmatische Fraktion von überexprimiertem RERE war in vielen Zellen um den Zellkern konzentriert oder in Aggregate unterschiedlicher Größe verteilt. Diese Verteilung ähnelt der Golgi Struktur. Durch den Vergleich der zytoplasmatischen Lokalisierung von RERE mit dem Golgi spezifischen Protein p58 K wurde keine überlappende Färbung von RERE mit dem gefärbten Golgi Apparat festgestellt (Abb. 4-10A-D). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass RERE nicht im Golgi Apparat prozessiert oder durch Golgivesikel sezerniert wird. Die RERE Aggregate im Zellkern zeigten eine ähnliche Struktur wie Kernaggregate, die an der Prozessierung von RNA beteiligt sind und als Marker das SC35 Protein enthalten. Durch den Vergleich der Lokalisierung von immungefärbten SC35 mit RERE Aggregaten wurde ebenfalls keine überlagernde Verteilung beider Proteine nachgewiesen (Abb. 4-10E-H).

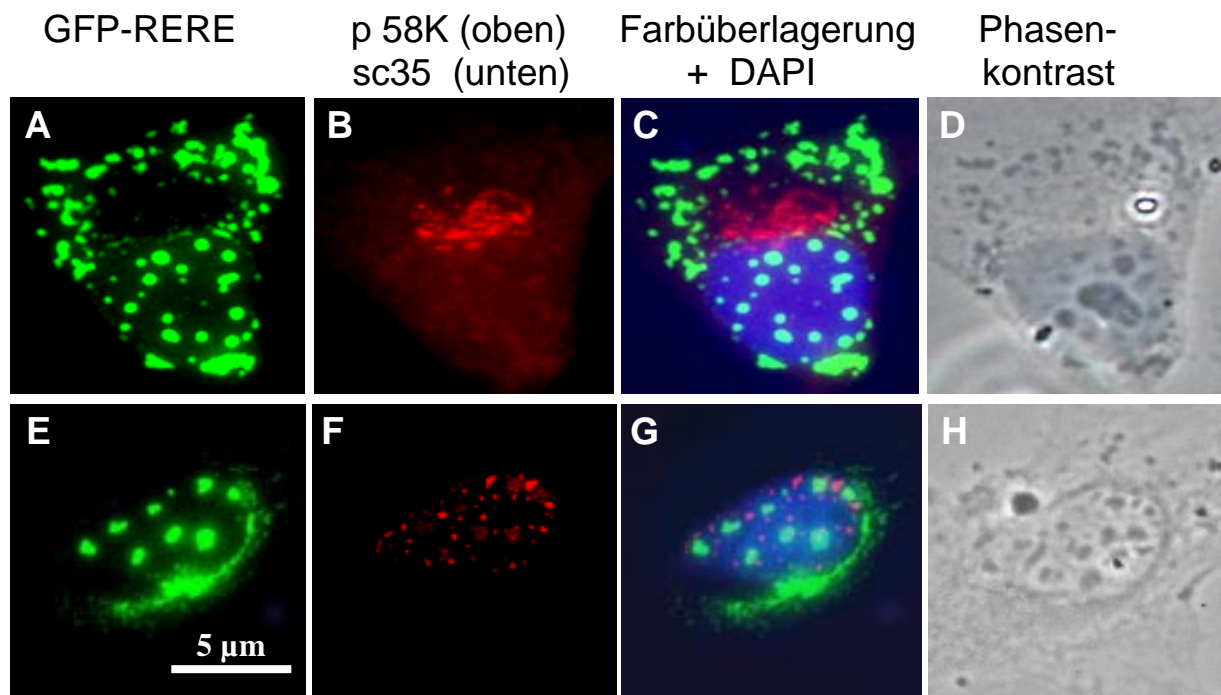


Abb. 4-10: Darstellung der nicht überlagernden Verteilung von RERE mit dem Golgi spezifischen Protein p58 K und dem SC35 Protein.

18 h nach der Transfektion von SK-N-AS Zellen wurde die Verteilung von GFP-RERE mit immunhistochemisch markiertem p58 K, Markerprotein für den Golgi Apparat, sowie dem SC35 Protein, das als Marker für Splicingaggregate verwendet wurde, verglichen. RERE zeigte weder mit p58 K im Zytoplasma (A-D) noch mit SC35 im Zellkern (E-H) eine überlagernde Färbung.

4.3.4. Kolokalisierung von RERE und N-terminalen RERE Fragmenten mit PODs

Die RERE-enhaltenden Kernaggregate zeigten eine auffällige Ähnlichkeit in Größe, Anzahl und dem Verteilungsmuster mit PML Oncogenic Domains (PODs). Um die Kolokalisierung von RERE mit PODs zu untersuchen, wurde PML, das namensgebende Protein für PODs, immunologisch detektiert und mit der zellulären Verteilung von RERE mittels Lichtmikroskop und konfokaler Lasermikroskopie verglichen. Dabei wurde für RERE-Aggregate ab einer Größe von etwa 0,5 μm eine auffällige Kolokalisierung mit PML in etwa 95 - 98 % der Aggregate beobachtet (Abb. 4-11A-C). Mit abnehmender Größe der RERE-Aggregate wurde der Prozentsatz an Kolokalisierung mit PML geringer. Kleine RERE Aggregate mit einem Durchmesser von weniger als 0,3 μm zeigten geringe oder keine Kolokalisierung mit PML jedoch wurden beide Proteine dann häufig nebeneinander nachgewiesen (Abb. 4.11D-F). Der Anteil an Zellen mit GFP-RERE Aggregaten im Zellkern, die mit PODs kolokalisierten, betrug insgesamt 79 % (Tab. 4.5). Die Lokalisierung von RERE und PML wurde zusätzlich mittels konfokaler Lasermikroskopie bestimmt. Hierbei wurde die Intensität der mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proteine in einzelnen Objektebenen gemessen und als Bild oder graphisch als Intensitätsdiagramm dargestellt. Damit konnte die getrennte Verteilung von PML und RERE in kleinen RERE Aggregaten und die Kolokalisierung beider Proteine in größeren Aggregaten bestätigt werden (Abb. 4-11M-R).

In Zellen mit Aggregaten von N-terminalen RERE Fragmenten wurde eine Kolokalisierung von RERE-Aggregaten und PODs bei N581 in 54 % und bei N381 in 52 % aller Fälle detektiert (Abb. 4-11G-I). Die C1087-Aggregate waren in 71 % der transfizierten Zellen nicht mit PODs kolokalisiert (Abb. 4-11J-L). Aufgrund des geringen Anteils an Zellen mit C- und N-terminalen RERE-Aggregaten betrug die Anzahl der Zellen, die sowohl Aggregate im Zellkern als auch Kolokalisierung der RERE Aggregate mit PML aufwiesen 8 % (N581), 11 % (N381) und 10 % (C1087) (Tab.4-5).

RERE/DAPI RERE/PML PML/DAPI

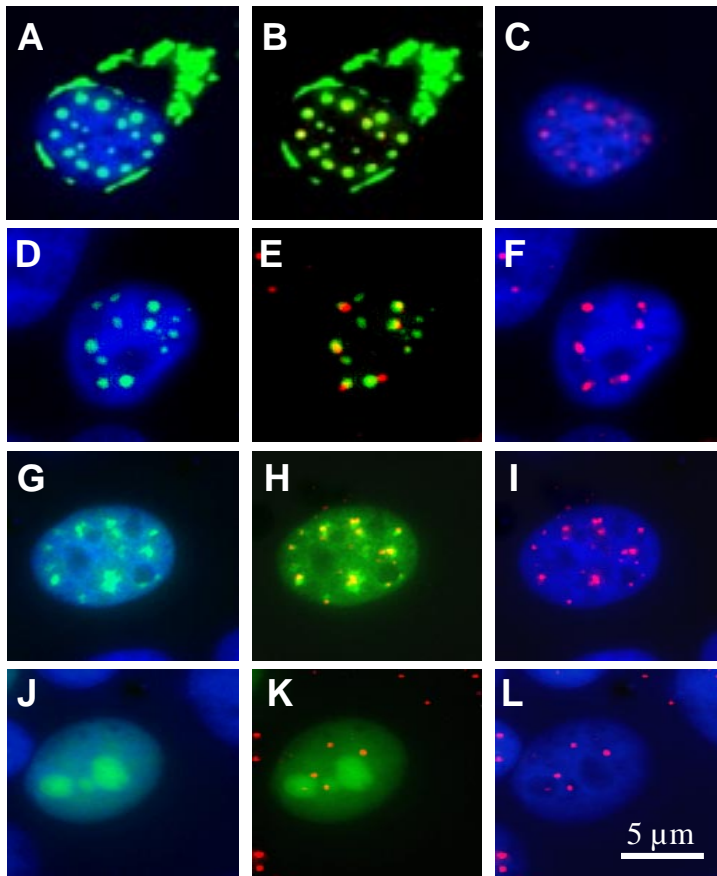
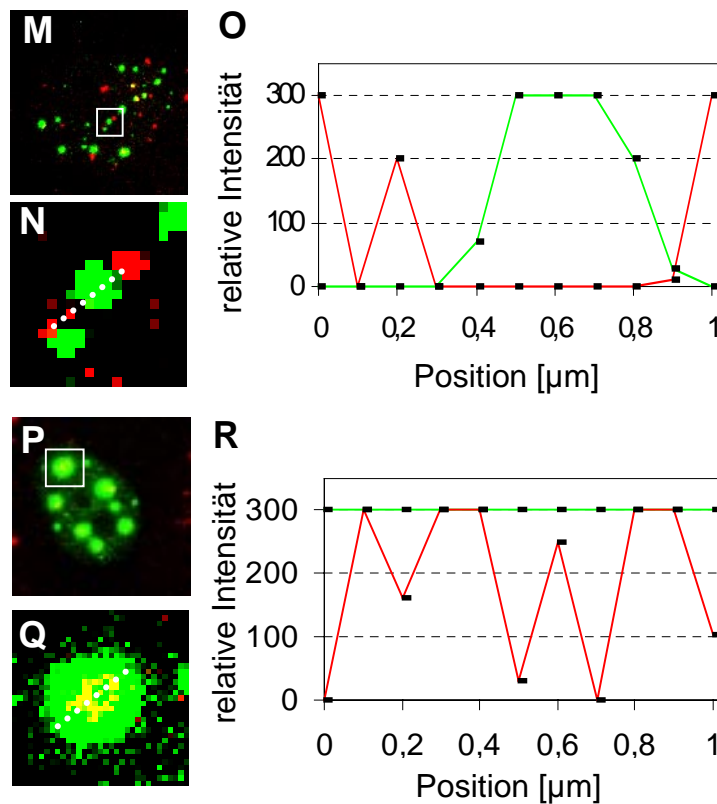


Abb. 4-11: Nachweis der teilweisen Kolo-kalisierung von RERE und PML in PODs mittels Lichtmikroskopie und konfokaler Lasermikroskopie.

SK-N-AS Zellen wurden mit GFP-RERE oder GFP-RERE Fragmenten transfiziert (grün). 18 h nach der Transfektion wurde PML-Protein als Markerprotein für PODs (PML Oncogenic Domains) immunhistochemisch nachgewiesen (rot) und die DNA mit DAPI gefärbt (blau). (A-C) RERE sowie das RERE Fragment N-581 (G-I) waren teilweise mit PML gemeinsam in PODs lokalisiert. (D-F) Kleine RERE Aggregate sowie (J-L) das C-terminale RERE Fragment C-1087 waren nicht mit PML kolo-kalisiert.

(M-R) Repräsentative Beispiele für die Lokalisierung von RERE und PML Kernaggregaten. (M, P) Übersicht von RERE und PML im Zellkern mittels konfokaler Lasermikroskopie. Das weiße Quadrat markiert den Ausschnitt, der jeweils in (N) oder (Q) vergrößert dargestellt ist. (N) Keine überlagerte Färbung von PML und RERE in kleinen RERE Aggregaten. (Q) Kolo-kalisierung von PML und RERE Aggregaten ab etwa 0,5 µm Durchmesser. Die gepunkteten Linien in (N) und (Q) zeigen die Strecke (1 µm), entlang der die Signalstärke von GFP-RERE (grüne Linie) und PML (rote Linie) mit dem konfokalen Lasermikroskop quantifiziert wurde (von links nach rechts). Die Ergebnisse sind in (O) und (R) als relative Intensität der gemessenen Emission (Y-Achse) in horizontaler Schnittebene des Objekts dargestellt. Die detektierte Strecke (Position des Lasers) betrug 1,0 µm.



Tab. 4-5: Zusammenfassung der Kolokalisierung von RERE sowie von RERE Fragmenten mit PODs.

Für die Auswertung wurden in 3 Transfektionsansätzen jeweils 100 Zellen ausgezählt (\pm entspricht der Standardabweichung).

Expressions-konstrukt ⁽¹⁾	Abb. in 4-11 ⁽²⁾	PML/RERE Kolokalisierung [% transfizierter Zellen] ⁽³⁾	PML/RERE Kolokalisierung [% transfizierter Zellen mit RERE Aggregaten] ⁽⁴⁾	Aggregat-größe [μm] ⁽⁵⁾
GFP-RERE	A-F	79 \pm 4	93 \pm 2	0,1 - 3
GFP-RERE-C1087	J-L	10 \pm 6	29 \pm 5	0,5 - 7
GFP-RERE-N581	G-I	8 \pm 5	54 \pm 6	0,1 - 2
GFP-RERE-N381	-	11 \pm 5	52 \pm 6	0,1 - 2
GFP	-	0	0	keine

⁽¹⁾ RERE-Expressionskonstrukt.

⁽²⁾ Entsprechendes repräsentatives Beispiel in Abb. 4-11.

⁽³⁾ Anteil aller transfizierten Zellen mit Kolokalisierung von RERE-Aggregaten und PODs als prozentualer Wert bezogen auf alle transfizierte Zellen. Zellen wurden als positiv gewertet, wenn mehr als 95% der PODs mit RERE Aggregaten kolokalisiert waren.

⁽⁴⁾ Anteil der Zellen mit RERE Aggregaten und Kolokalisierung von RERE-Aggregaten mit PODs als prozentualer Wert bezogen auf alle transfizierten Zellen in denen RERE Aggregate nachgewiesen wurden.

⁽⁵⁾ Größenvarianz der RERE Aggregate.

4.3.5. Kolokalisierung von RERE mit dem pro-apoptotischen Protein BAX

Bei der Überexpression von PML, dem Markerprotein für PODs, starben die transfizierten Zellen und es wurde eine teilweise Lokalisierung von BAX, einem pro-apoptotischen Protein, in POD Strukturen nachgewiesen (Quignon et. al., 1998). Für die Expression von RERE wurde ebenfalls eine zelltoxische Wirkung festgestellt. Aufgrund der teilweise gemeinsamen Lokalisierung der beiden für die Zellen toxischen Proteine RERE und PML in PODs wurde untersucht, ob die Expression von RERE ebenfalls die Lokalisierung von BAX in PODs bewirken kann.

Dazu wurde die zelluläre Verteilung von BAX Protein in transfizierten Zellen mit der Verteilung in nicht transfizierten Zellen verglichen. In etwa 95 % der transfizierten Zellen mit RERE Aggregaten im Zytoplasma waren nach 20 Stunden BAX und RERE in gemeinsamen Aggregaten angereichert (Abb. 4-12A-D) oder zeigten eine Anreicherung von BAX in der Umgebung der Zellkernmembran (Abb. 4-12E-H). In etwa 60 % der transfizierten Zellen mit erkennbaren RERE Kernaggregaten war BAX nicht im Zellkern lokalisiert (Abb. 4-12A-D und I-L). In etwa 40 % der transfizierten Zellen waren RERE und BAX gemeinsam in Kernaggregaten kolokalisiert (Abb. 4-12M-P). Möglicherweise induziert die Expression von

exogenem RERE die Lokalisierung von BAX in den Zellkern, da BAX in untransfizierten Zellen nicht im Zellkern nachgewiesen wurde. Eine gemeinsame Lokalisierung von RERE und BAX im Zytoplasma wurde auch mit den N-terminalen Konstrukten N-381 (etwa 60 %) und N581 (etwa 67 %) beobachtet. Die Kolokalisierung von C-terminalen RERE C1087 Aggregaten (Aminosäuren 1087-1566) mit BAX betrug etwa 5 % (Daten nicht gezeigt). Eine Lokalisierung von BAX in PODs wurde in Zellen, die einen C-, oder N-terminalen Teil des RERE Proteins exprimierten nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls keine Kolokalisierung wurde zwischen BAX und GFP alleine, beobachtet (Daten nicht gezeigt).

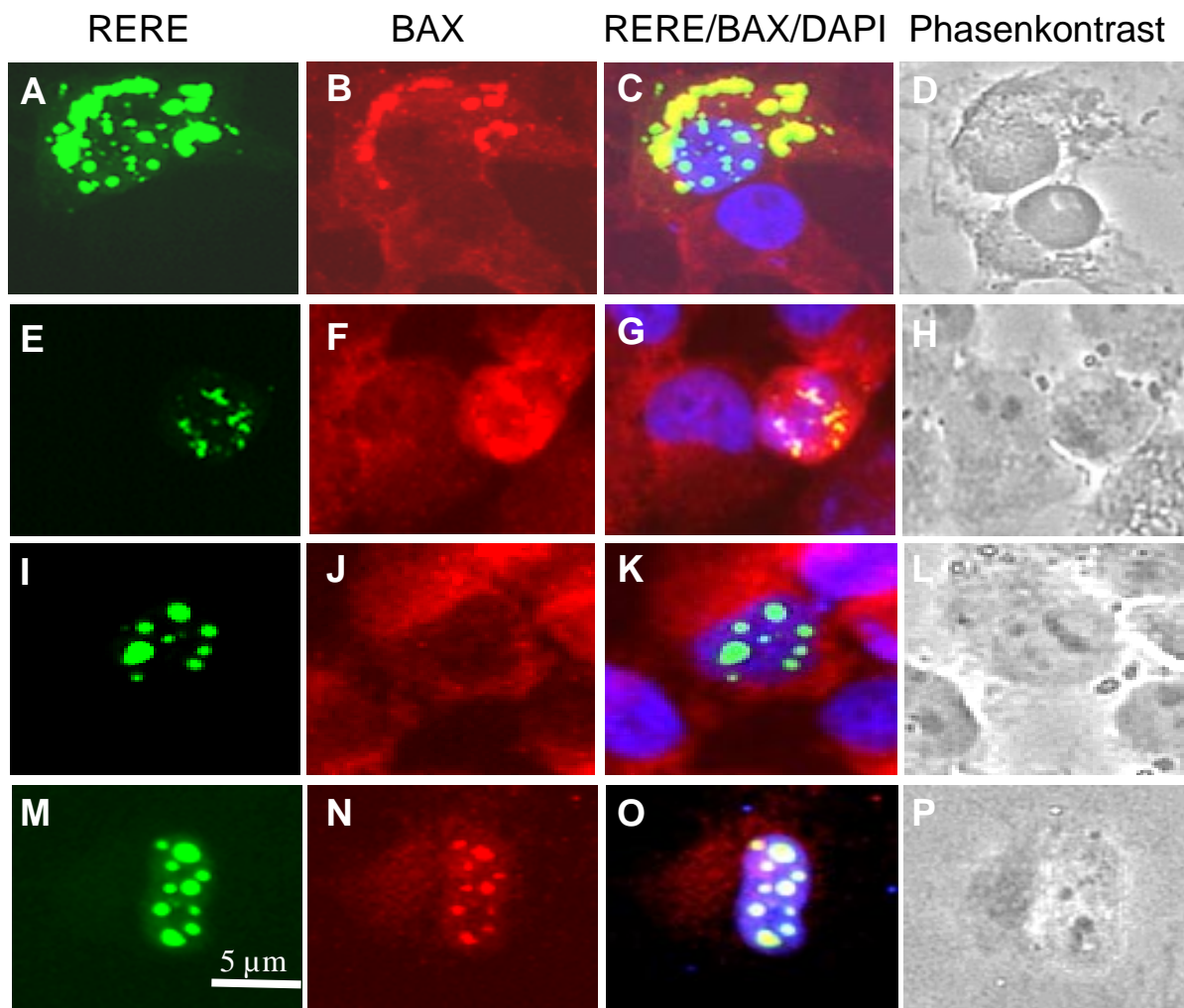


Abb. 4-12: Nachweis der Kolokalisierung von RERE mit BAX Protein mittels Immunfärbung.

SK-N-AS Zellen wurden mit GFP-RERE transfiziert (grün). 18 h nach der Transfektion wurde BAX Protein immunhistochemisch nachgewiesen (rot) und die DNA mit DAPI gegengefärbt (blau). (A-D) Beispiel für zytoplasmatische Kolokalisierung von GFP-RERE mit BAX. (E-H) Beispiel für die Konzentration von BAX um den Zellkern in RERE transfizierten Zellen. (I-L) Beispiel für RERE-Aggregate im Zellkern, die nicht mit BAX kolokalisieren. (M-P) Beispiel für die Kolokalisierung von RERE und BAX in RERE Kernaggregaten.

4.3.6. Kolokalisierung von RERE mit Mitochondrien

Das pro-apoptotische Protein BAX kann zusammen mit weiteren Proteinen Membranporen in den Mitochondrien bilden und die Funktion der Mitochondrien zerstören. Gleichzeitig werden zelltoxische Faktoren aus den Mitochondrien freigesetzt. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff REDCMX ROS (Mito Tracker[®], Fa. Molecular Probes) wurden intakte Mitochondrien markiert. Eine überlagerte Färbung von RERE Aggregaten mit Mitochondrien wurde 18 Stunden nach der Transfektion in etwa 81 % der Zellen mit zytoplasmatischen RERE Aggregaten (Abb. 4-13A-D) sowie in Zellen mit N-terminalen RERE Aggregaten des N381 Fragments (73 %, Abb. 4-13F-J) und des N581 Fragments (68 %, Daten nicht gezeigt) nachgewiesen. Wenige transfizierte Zellen (etwa 3 %) zeigten keine Färbung der Mitochondrien durch REDCMX ROS (Daten nicht gezeigt). In etwa 92 % der mit dem C-terminalen RERE Fragment transfizierten Zellen wurde keine Kolokalisierung von RERE Aggregaten mit Mitochondrien nachgewiesen (Abb. 4-13K-O).

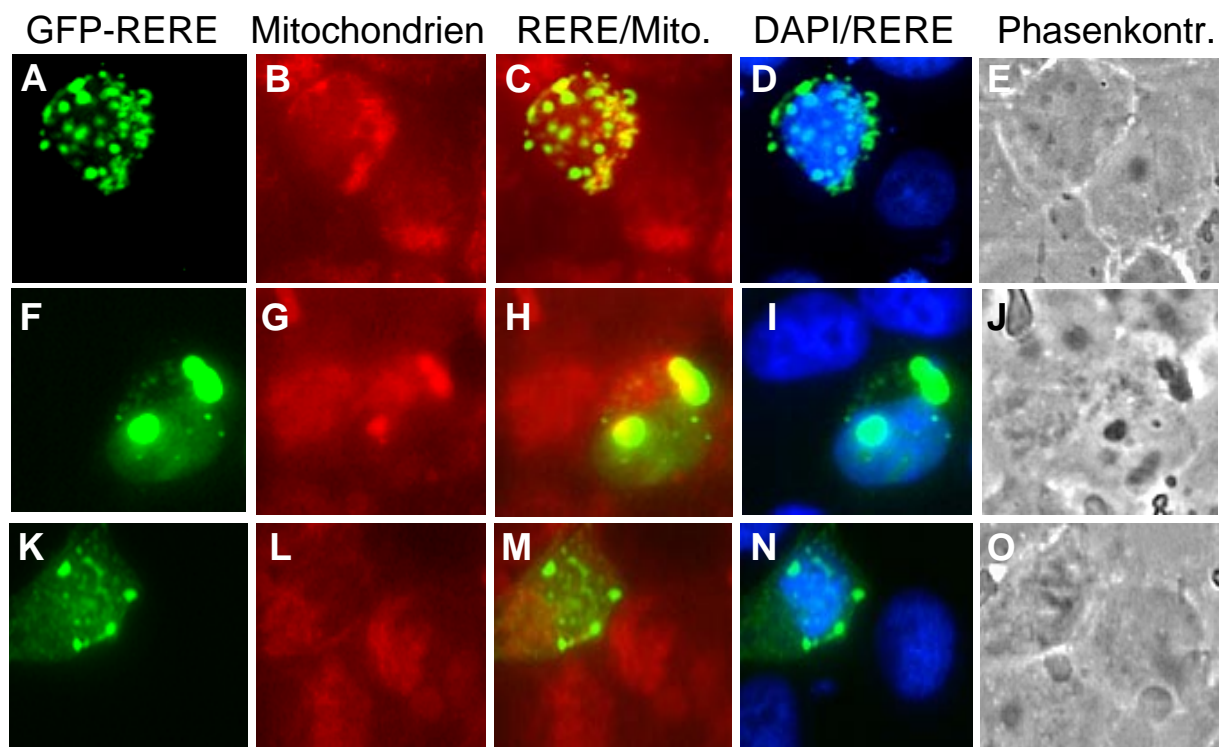


Abb. 4-13: Nachweis der Kolokalisierung von RERE und N-terminalen RERE Fragmenten mit Mitochondrien.

SK-N-AS Zellen wurden mit GFP-RERE transfiziert (grün). 18 h nach der Transfektion wurden intakte Mitochondrien mit REDCMX ROS (Mito Tracker[®], Fa. Molecular Probes) nachgewiesen (rot) und die DNA mit DAPI gegengefärbt (blau). (A-E) Beispiel für die Kolokalisierung von RERE-Aggregaten mit Mitochondrien im Zytoplasma. (F-J) Beispiel für die Kolokalisierung von N-terminalen RERE-Aggregaten (N381) mit Mitochondrien im Zytoplasma. (K-O) Beispiel für die getrennte Lokalisierung von C-terminalen RERE Aggregaten (C1087) und Mitochondrien.

4.4. Funktionelle Charakterisierung von exogenem RERE

Die Kolo-kalisierung von RERE mit PODs, BAX und Mitochondrien sowie die veränderte Verteilung des pro-apoptotischen BAX Proteins in RERE transfizierten Zellen deutet auf eine mögliche Rolle von RERE bei der Regulation von Zelltodprozessen hin. Im Folgenden werden die Hinweise auf eine toxische Wirkung von überexprimiertem RERE beschrieben und der Mechanismus des Zelltods charakterisiert.

4.4.1. Geringe Kolonienbildung in Selektionsansätzen mit RERE-transfizierten Zellen

Für die Selektion stabiler RERE-exprimierender Zellen wurden zwei verschiedene Vektorsysteme verwendet. Um eine stabile Expression von GFP-RERE zu erzielen, wurde ein pEGFP Vektorsystem (siehe Material und Methoden) in SK-N-AS Zellen transfiziert. Als ein induzierbares Expressionssystem wurde ein Tetracyclin (Tet) regulierbares Konstrukt (Tet-off Konstrukt, Tet⁽⁻⁾) verwendet. Das Tet⁽⁻⁾ Konstrukt sollte es ermöglichen, die Expression von GFP-RERE in H4 Neurogliomzellen während der Selektion zu unterdrücken, um die toxische Wirkung von RERE zu verringern. Nach einer Selektionsdauer von 18 Tagen wurden die antibiotika-resistenten Kolonien gezählt. Im Ansatz mit permanenter GFP-RERE Expression betrug der prozentuale Anteil der Kolonien durchschnittlich 9 % des Kontrollansatzes (Expression von GFP, Abb. 4-14). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Tet regulierbarem Tet⁽⁻⁾-GFP-RERE Konstrukt und Tet⁽⁻⁾-GFP Konstrukt erhalten. Obwohl die Expression in beiden Transfektionsansätzen durch die Anwesenheit von Tetracyclin inhibiert war, wurden im GFP-RERE Ansatz etwa 4 - 8 % der Kolonien gezählt, verglichen mit einem Kontrollansatz (Expression von GFP, Abb. 4-14). Im Ansatz mit GFP-RERE war nach der Selektion (siehe Material und Methoden) intrazellulär kein GFP-RERE nachweisbar, unabhängig von Tetrazyklin im Medium. Zur Überprüfung des GFP-RERE Gehaltes in den Zellen wurde ein GFP spezifischer Antikörper im Western Blot oder in einer Immunfärbungen eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Die geringe Kolonienzahl in RERE-transfizierten Zellen verglichen mit GFP-transfizierten Zellen war ein erster Hinweis auf eine cytotoxische Funktion von exogenem RERE Protein, möglicherweise bereits in sehr geringen Mengen.

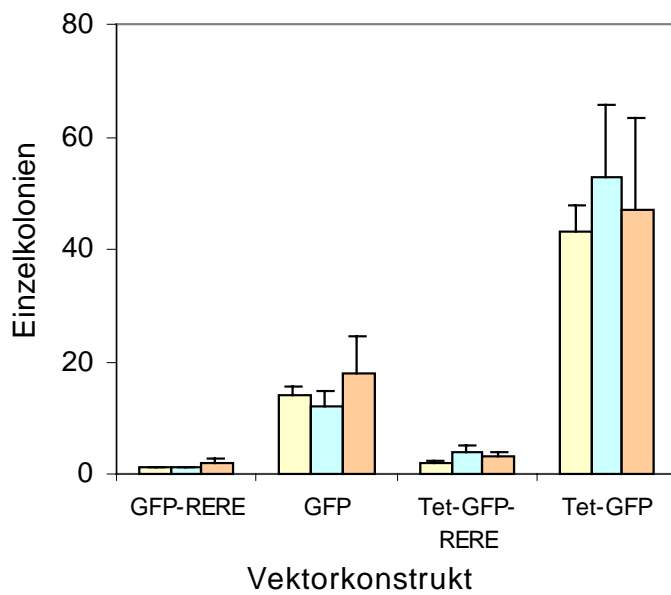


Abb. 4-14: Anzahl an Einzelkolonien nach Selektion stabil transfizierter Zelllinien.

SK-N-AS Zellen wurden mit einem konstitutiv exprimiertem GFP-RERE Konstrukt (pEGFP) transfiziert oder H4 Neurogliomzellen wurden mit einem Tetracyclin regulierten GFP-RERE Konstrukt (Tet⁽⁻⁾-Konstrukt) transfiziert. 18 Tage nach Selektionsstart wurden die überlebenden Kolonien ausgezählt. Jeder Balken zeigt die Mittelwerte der Kolonienzahl von jeweils 3 Selektionsansätzen mit insgesamt 2×10^6 Zellen. Für jedes Konstrukt wurden die Transfektionen dreimal wiederholt. Der Fehlerbalken stellt die Standardabweichung der Meßwerte dar.

Säulengruppe 1, 2: Mit dem konstitutiv exprimiertem GFP-RERE Konstrukt wurde maximal eine Kolonie pro Versuchsansatz nach der Selektion nachgewiesen. Das entspricht durchschnittlich 9 % der Kolonienzahl in der Kontrolle (Expression von GFP, 12-18 Kolonien). Säulengruppe 3, 4: Im Ansatz mit Tet-GFP-RERE transfizierten Zellen wurden nach der Selektion 2 - 4 Kolonien gezählt, das entspricht 4 - 8 % der Kontrolle (Tet-GFP Transfektion, 43-53 Kolonien).

4.4.2. Nachweis einer erhöhten Zahl toter Zellen nach der Transfektion mit dem C-terminalen RERE Konstrukt durch Färbung mit Propidiumjodid

Für die Expression von PML wurde ein schneller Zelltod beschrieben, der schon nach wenigen Stunden nachweisbar ist (Quignon et al., 1998). Im folgenden Versuchsansatz wurde untersucht, ob durch die Expression von RERE der Zelltod ebenfalls schon nach 14 Stunden nachgewiesen werden kann. Dazu wurden SK-N-AS Neuroblastom Zellen mit RERE oder den RERE Fragmenten transient transfiziert, der Anteil toter Zellen mit Propidiumjodid (Pi) gefärbt und mittels FACS Analyse bestimmt. Der Anteil Pi-positiver Zellen in vergleichbaren Transfektionsansätzen betrug nach 14 Stunden im Ansatz mit GFP 5,9 % und im Ansatz mit GFP-RERE 5,5 %. Der Anteil an Pi-positiven Zellen in Ansätzen mit N-terminalen RERE Konstrukten betrug bei N381 5,0 % und bei N581 6,2 %. Ein vergleichsweise hoher Anteil von 17 % an Pi positiven Zellen wurde im Ansatz mit dem C-terminalen RERE Konstrukt gemessen (Abb. 4-15). Somit wurden für das Volllängen-RERE Produkt, das nach 14 Stunden in etwa 81 % der transfizierten Zellen in Aggregaten im Zellkern zu finden war sowie für die N-terminalen RERE Fragmente, die in etwa 80 % der transfizierten Zellen in keinen Aggregate zu finden waren, kein Zelltod nachgewiesen, der mit dem schnellen PML-induzierten Zelltod vergleichbar war. Im Gegensatz dazu wurde in Zellen, die mit dem C-terminalen RERE Fragment transfiziert wurden, das nach 14 Stunden in etwa 61 % der

transfizierten Zellen in Form von auffälligen zytoplasmatischen Aggregaten vorlag, ein schneller Zelltod nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden in einem weiteren, vergleichbaren Transfektionsansatz durch die Färbung toter Zellen mit Methyleneblau und Auszählen von jeweils 300 Zellen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

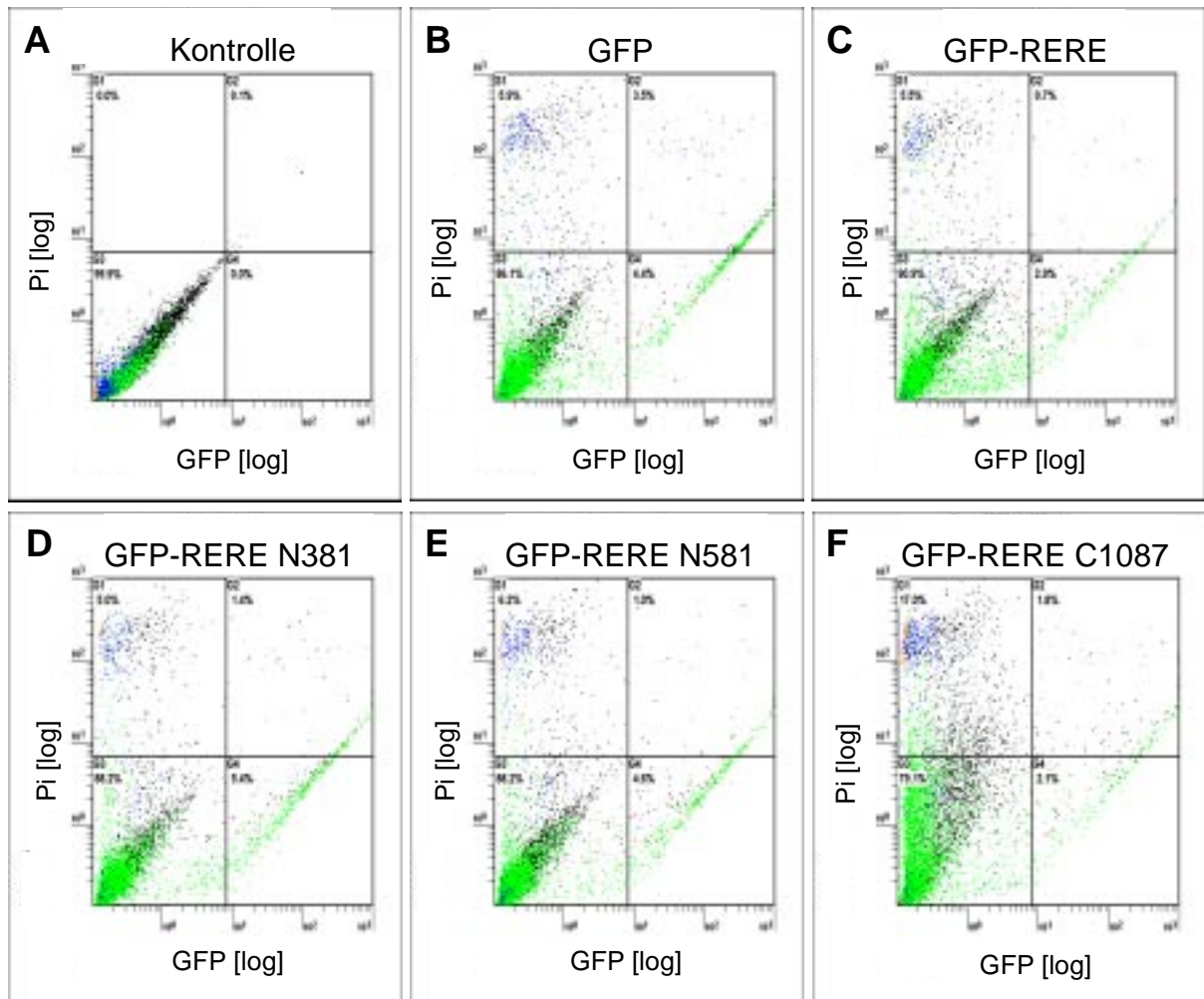


Abb. 4-15: Nachweis einer erhöhten Anzahl toter Zellen mittels Propidiumjodidfärbung und FACS Auswertung, nach der Transfektion mit einem C-terminalen RERE-Konstrukt.

SK-N-AS Zellen wurden mit GFP oder N- bzw. C-terminalen GFP-RERE Konstrukten transfiziert. 14 h nach der Transfektion wurde die Intensität der mit Propidiumjodid (Pi) gefärbten Zellen mittels FACS bestimmt (log Y-Achse). Auf der X-Achse ist die Intensität des GFP Signals logarithmisch aufgetragen. Das Auswertefenster wurde in 4 Bereiche unterteilt. Linke Seite unten: Eigenfluoreszenz der Zellen. Linke Seite oben: Pi positives Signal. Rechte Seite unten: GFP positives Signal. Rechte Seite oben GFP und Pi positives Signal sowie stark GFP positive Signale. (A) Eigenfluoreszenz von nicht transfizierten und nicht Pi gefärbten Zellen. (B - E) Anteil Pi positiv bestimmter Zellen bei GFP (5,9 %, B), GFP-RERE (5,5 %, C) und bei den N-terminalen RERE Konstrukten N381 (5,0 %, D) und N581 (6,2 %, E).

(F) Auffälliger Anteil an Pi positiven Zellen von 17 % im Ansatz mit Zellen, welche mit dem C-terminalen RERE-Konstrukt (C1087) transfiziert wurden. Gezählt wurden 2×10^5 Zellen pro Versuchsansatz.

4.4.3. Nachweis apoptotischer Veränderungen in RERE transfizierten Zellen

Für die weitere Untersuchung von RERE-transfizierten Zellen wurden GFP-RERE positive Zellen über einen Zeitraum von 6 Tagen mikroskopisch auf morphologische Veränderungen, die auf einen apoptotischen Effekt von RERE hindeuten, untersucht. 5 Tage nach der transienten Transfektion zeigten etwa 80 % der GFP positiven Zellen eine zusammengeschrumpfte Oberfläche und waren nur noch schwach adhärent oder teilweise vollständig vom Untergrund abgelöst. In diesen Zellen wurde mittels DNA-Färbung (DAPI), die für die Apoptose typischen Veränderungen im Zellkern wie die Kondensation und Fragmentierung der DNA nachgewiesen (Abb. 4-16).

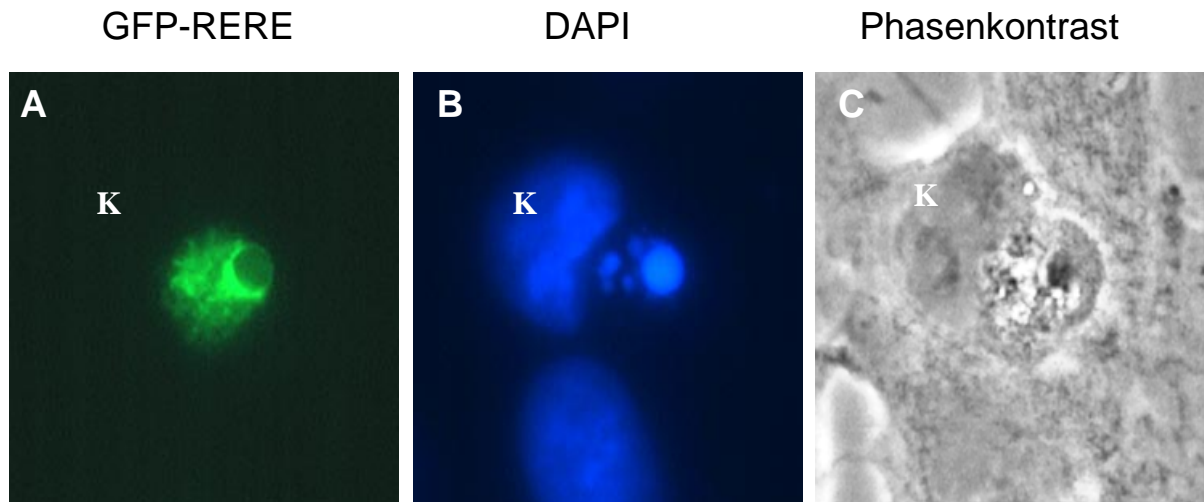


Abb. 4-16: Apoptotische Merkmale nach der Transfektion mit RERE.

Ansätze von SK-N-AS Neuroblastom Zellen wurden 1-6 Tage kultiviert und alle 24 Stunden in jeweils einem Ansatz die DNA mit DAPI gegengefärbt. (A-C) Vergleich einer nicht transfizierten Zelle (K) mit einer GFP-RERE exprimierenden Zelle mit fragmentiertem Zellkern sowie zusammengeschrumpftem Zytoplasma, vier Tage nach der Transfektion.

4.4.4. Nachweis des 85 kD Fragments der Poly(ADPribose)Polymerase (PARP) in RERE transfizierten Zellen

PARP ist eine DNA-bindende Proteinkinase, die an der Markierung und der Reparatur von DNA-Strangbrüchen beteiligt ist. Die Aktivierung von Kaspase-3 im Verlauf der Apoptose führt zur Spaltung und Inaktivierung von PARP. Dabei entstehen zwei charakteristische PARP Fragmente mit Molekulargewichten von 85 kD und 25 kD.

Mit einem Antikörper, der spezifisch das 85 kD Fragment von PARP erkennt, wurde die Spaltung von PARP, 30 Stunden nach der transienten Transfektion mit RERE, immunhistochemisch nachgewiesen. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen der Größe und der Verteilung der RERE-Aggregate mit dem Auftreten des 85 kD Spaltproduktes von PARP beobachtet. In Zellen, die RERE ausschließlich im Zellkern enthielten, wurde kein gespaltenes PARP nachgewiesen (Abb. 4-17A-E). In etwa 30 % der Zellen mit einem geringen zytoplasmatischen Anteil von RERE wurde das 85 kD PARP-Spaltprodukt nachgewiesen (Abb. 4-17F-J). RERE und PARP waren in diesem Stadium nicht kolokalisiert (Abb. 4-17H, Ausschnitt). In etwa 95 % der Zellen mit großen RERE Aggregaten im Zellkern oder im Zytoplasma, wurde ein hoher Level an gespaltenem PARP immunologisch nachgewiesen. Das 85 kD PARP-Spaltprodukt war in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt. Zellen mit einem starken Signal für das 85 kD PARP-Fragment zeigten auch die typischen apoptotischen Merkmale wie beispielsweise das Zusammenschrumpfen der Zytoplasmafraktion und die Fragmentierung des Zellkerns (Abb. 4-17K-O). Die räumliche Nähe von zytoplasmatischem RERE und dem PARP-Spaltprodukt könnte auf ein Zusammenspiel beider Proteine im Signalweg der Apoptose hinweisen.

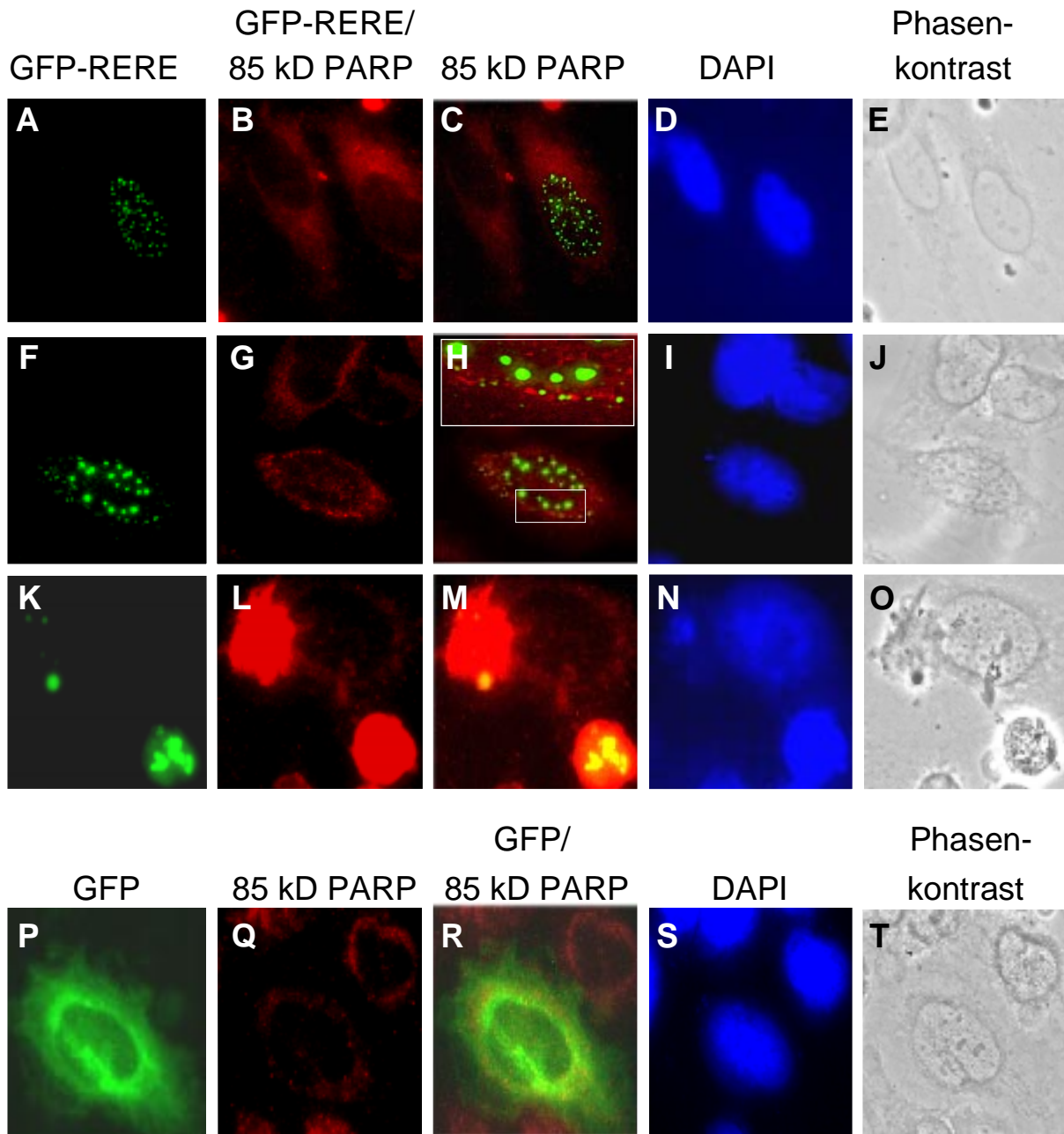


Abb. 4-17: Nachweis von enzymatisch gespaltenem PARP nach der Expression von RERE mittels Immunfärbung.

30 Stunden nach der Transfektion von HeLa Zellen wurde das 85 kD PARP-Spaltprodukt mittels Immunfärbung nachgewiesen. (A-E) Zellen mit kleinen RERE Aggregaten im Kern zeigten eine schwache Hintergrundfärbung von PARP. (F-J) Nachweis von gespaltenem PARP im Zytoplasma, in Zellen mit größeren RERE Aggregaten im Zellkern und im Zytoplasma. Der vergrößerte Bildausschnitt in Abb. H zeigt die nicht überlappende zytoplasmatische Verteilung von RERE und dem 85 kD PARP-Fragment. (K-O) Starkes Signal von gespaltenem PARP in Zellen mit großen RERE Aggregaten und apoptotischen Merkmalen wie kondensierter DNA oder fragmentierten Zellkern (N) und geschrumpfter Zytoplasmafraktion (O). (P-T) Typisches Beispiel für GFP transfizierte Zellen mit starker GFP-Expression aber keiner erkennbaren Spaltung von PARP.

4.4.5. Nachweis von apoptotischen Zellen nach der Transfektion mit RERE mittels der TUNEL Methode

Ein typisches Merkmal für Apoptose ist die Fragmentierung der genomischen DNA. An die dabei entstehenden überlappenden DNA-Enden werden bei der TUNEL Methode, durch eine Enzymreaktion, markierte Nukleotide hinzugefügt und nachgewiesen.

In RERE transfizierten Zellen waren die oben beschriebenen apoptotischen Merkmale bereits nach zwei Tagen erkennbar, wenn dem Kulturmedium IFN γ zugefügt wurde. Nur durch IFN γ alleine wurde keine Apoptose induziert. In dieser Arbeit wurde nicht weiter untersucht wie IFN eine Beschleunigung des Verlaufs der Apoptose bewirkt. Bisher bekannt ist, dass IFN γ bei der Apoptose in verschiedenen Neuroblastom Zelllinien beteiligt ist (Lutz et al., 1998) und die Transkription von PML induziert (Stadler et al. 1995). In diesem Ansatz wurde IFN γ als Zusatz im Medium verwendet, da aufgrund der schnelleren Induktion der Apoptose die Zellen in einer höheren Dichte transfiziert werden konnten, ohne dass die Zellen zum Messzeitpunkt konfluent gewachsen waren. Der prozentuale Anteil an transfizierten Zellen, die auch TUNEL positiv waren, betrug in allen Versuchsansätzen direkt nach der Transfektion etwa 5 - 6 % und 16 h nach der Transfektion etwa 7 - 10 %. 48 Stunden nach der Transfektion war die Anzahl TUNEL positiver Zellen im Ansatz mit GFP-RERE um das 3,5fache erhöht (42 % der transfizierten Zellen), verglichen mit GFP transfizierten Zellen (12 % der transfizierten Zellen, Abb. 4-18).

Die Aktivierung von PARP sowie die Fragmentierung des Zellkerns deuteten auf einen apoptotischen Signalweg hin. Deshalb wurde untersucht, ob die aktivierte Kaspase-3, ein Protein das im Signalweg der Apoptose eine wichtige Rolle spielt, für den RERE abhängigen Zelltod notwendig ist. Dazu wurden GFP-RERE transfizierte Zellen mit einem nicht reversiblen Kaspase-3 Inhibitor inkubiert (DEVD, Schranz et al., 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Kaspase-3 Inhibitor die RERE-induzierte Apoptose vollständig verhinderte (TUNEL positiv etwa 9 % der transfizierten Zellen, Abb. 4-18). Die Anzahl transfizierter Zellen mit sichtbarem Anteil an GFP wurde nach 24 Stunden durch das Auszählen von jeweils 300 Zellen bestimmt und betrug in den verschiedenen Ansätzen zwischen 15 % und 25 % (Daten nicht gezeigt).

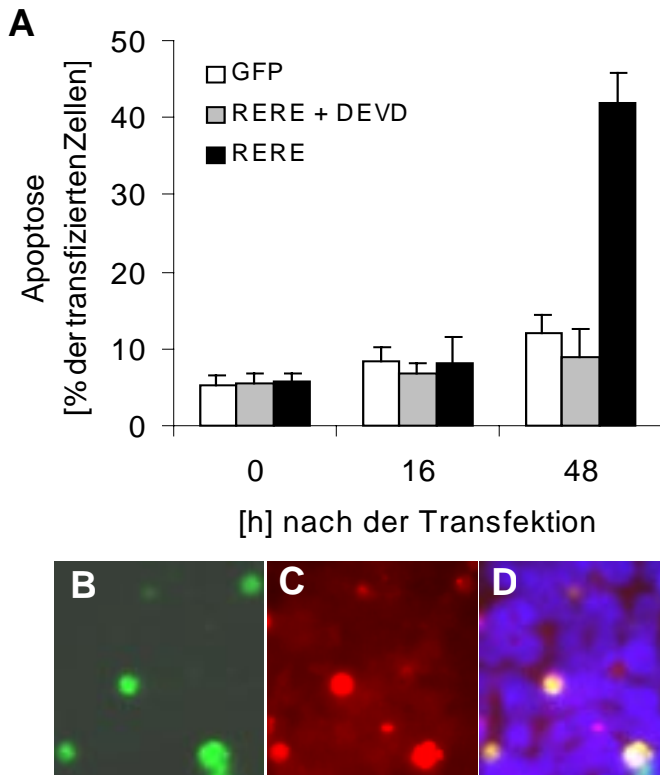


Abb. 4-18: Erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nach der Transfektion mit RERE.

SK-N-AS Zellen wurden transient mit GFP oder GFP-RERE transfiziert. In einem Ansatz mit GFP-RERE wurde dem Kulturmedium der Kaspaseinhibitor (DEVD) zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Anzahl von apoptotischen Zellen mit fragmentierter DNA mittels TUNEL Methode bestimmt. (A) 0 Stunden: Für eine Fraktion transfizierter Zellen wurde sofort nach der Transfektion der Anteil apoptotischer Zellen im Ansatz mit GFP, GFP-RERE und GFP-RERE + DEVD bestimmt. 16 h: Kein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen in den untersuchten Ansätzen. 48 h: Erhöhte Anzahl TUNEL positiver Zellen im Ansatz mit GFP - RERE (42 %)

verglichen mit dem Kontrollansatz (GFP, 12 %). Die Inhibition der Apoptose durch den Kaspase-3 Inhibitor DEVD ist durch die graue Säule dargestellt. Die Ergebnisse eines von drei vergleichbaren Experimenten wurden grafisch dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung bei zehnmal 1000 gezählten Zellen.

(B-D) Bildausschnitt von GFP-RERE transfizierten Zellen, 4 Tage nach der Transfektion (B). Etwa 80% der GFP positiven Zellen waren ebenfalls TUNEL positiv (C). Die DNA wurde mit DAPI gegengefärbt und ist als Bildüberlagerung mit dem GFP- und dem TUNEL Signal in (D) dargestellt. Durchschnittlich zeigten 20-30 % der TUNEL positiven Zellen keine GFP-Färbung und wurden deshalb von der Auswertung (A) ausgeschlossen.

4.4.6. Beschreibung der zeitabhängigen Veränderungen von RERE Aggregaten

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde eine auffällige Veränderung der Anzahl und Größe von RERE Aggregaten über einen Zeitverlauf von 4 Tagen beobachtet. Für eine genaue Beschreibung dieser Veränderungen wurde die Anzahl und Größe der RERE Aggregate in transfizierten SK-N-AS Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion (18 h, 48 h, 72 h, und 96 h) mit und ohne Kaspaseinhibitor verglichen. 18 Stunden nach der Transfektion wurden durchschnittlich 18 Aggregate mit einem Durchmesser von etwa 0,3 μm pro transfizierte Zelle nachgewiesen. Nach 96 Stunden sank die Anzahl der RERE Aggregate auf 1-2 Aggregate mit einer Größe von durchschnittlich 7 μm . Etwa 80 % der Zellen mit 1 - 2 RERE Aggregaten waren TUNEL positiv, während Zellen mit kleinen RERE Aggregaten keine morphologischen Anzeichen von Apoptose aufwiesen. Die

Behandlung der Zellen mit dem Kaspaseinhibitor DEVD verhinderte zwar die Fragmentierung der DNA aber nicht die RERE Aggregation. Die durchschnittliche Anzahl an RERE Aggregaten 18 Stunden nach der Transfektion betrug 20, mit einer durchschnittlichen Größe von 0,3 μm . Nach 96 Stunden war die durchschnittliche Anzahl der Aggregate auf 4 gesunken, mit einer Größe von durchschnittlich 4,5 μm (Abb. 4-19). Die Bildung von RERE-Aggregaten im Ansatz mit Kaspaseinhibitor war im zeitlichen Ablauf leicht verzögert, verglichen mit einem Ansatz ohne Kaspaseinhibitor (Abb. 4-19). Die Bildung von RERE Aggregaten im Ansatz mit Kaspaseinhibitor deutet darauf hin, dass die Bildung von RERE Aggregaten vermutlich unabhängig von apoptotischen Prozessen, wie beispielsweise der Aktivierung von Kaspasen, ist.

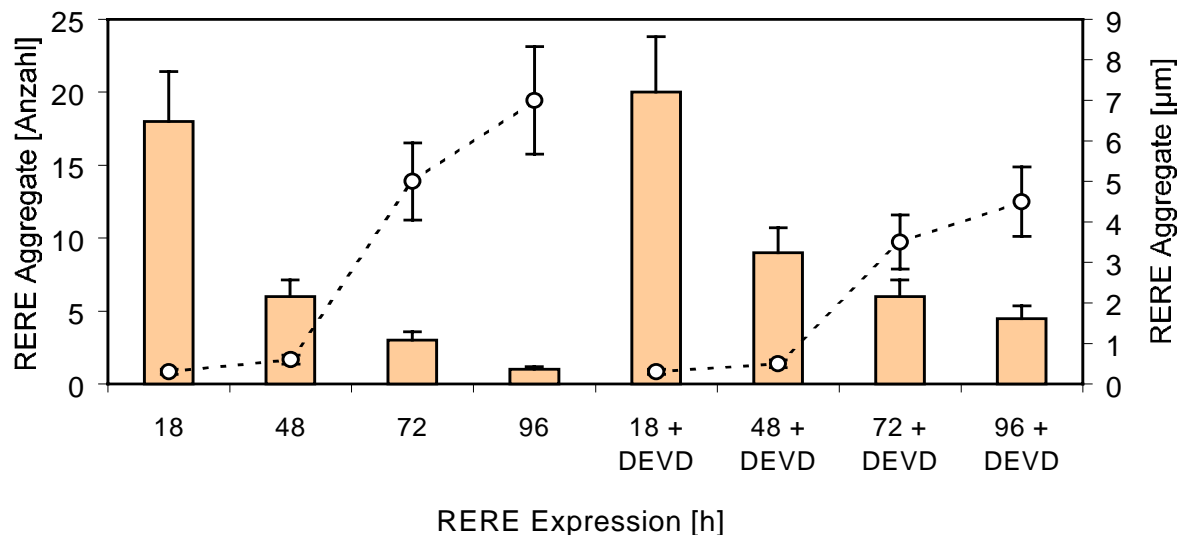


Abb. 4-19: Grafische Darstellung von Anzahl und Größe der RERE Aggregate im Zellkern über einen Zeitraum von 96 Stunden ohne und mit Kaspaseinhibitor.

Zu den angegebenen Zeitpunkten 18, 48, 72 und 96 Stunden wurde die Anzahl der RERE Aggregate gezählt (linke Achse, Darstellungsform: Säulen) und die Größe der RERE Aggregate bestimmt (rechte Achse, Punkte und Linien). Säule 1 - 4 (ohne Kaspaseinhibitor): Abnahme der Anzahl an RERE Aggregaten von durchschnittlich 18 (18 h) auf durchschnittlich 2 Aggregate (96 h). Die Größe der Aggregate stieg von durchschnittlich 0,3 μm (18 h) auf durchschnittlich 7 μm (96 h). Säule 5 - 8 (Inkubation mit dem Kaspaseinhibitor DEVD): Abnahme der Anzahl an RERE Aggregaten von durchschnittlich 20 (18 h) auf durchschnittlich 4 Aggregate (96 h). Die Größe der Aggregate stieg von durchschnittlich 0,3 μm (18 h) auf durchschnittlich 4,7 μm (96 h). Ausgewertet wurden jeweils 100 Zellen pro Zeitpunkt.

4.5. Herstellung und Reinigung von RERE bindenden Antikörpern

Für die Untersuchung von endogenem RERE Protein wurden zunächst 3 RERE-Peptide ausgewählt, synthetisiert (Fa. INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm) und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Nach der Affinitätsreinigung der Seren wurde die Qualität der Antikörper anhand der Aktivität in einem ELISA-System und mittels Immunfärbung von exprimiertem RERE Protein bestimmt. Da die gereinigten Antikörper im Western Blot ein schwaches RERE spezifisches Signal ergaben, wurde in einem zweiten Ansatz eine 70 kD N-terminale RERE Region als His-Fusionsprotein bakteriell hergestellt. Das gereinigte His-RERE Fragment wurde für die Immunisierung von Kaninchen (Fa. Eurogentec, Holland) verwendet.

4.5.1. Herstellung und Affinitätsreinigung von Peptidantikörpern

Für die Auswahl der Peptide zur Herstellung von Antikörpern wurden hydrophile Sequenzregionen von RERE anhand eines Hydrophobizitätsblots bestimmt. Auf der Oberfläche von wasserlöslichen Proteinen liegen meist Aminosäuren mit hydrophilen Seitenketten. Im nativen Zustand sind diese hydrophilen Sequenzen mögliche Epitope für Antikörper.

Zur Identifizierung hydrophiler Proteinregionen wurde ein Hydrophobizitätsblot nach der Methode von Kyte und Doolittle durchgeführt (Abb. 4-20). Für die Immunisierung wurden Peptidsequenzen mittels Datenbankvergleich ausgewählt, die keine Homologie mit bekannten Proteinsequenzen aufwiesen, um eine möglichst hohe Spezifität der Antikörper für RERE zu erhalten (Tab. 4-6).

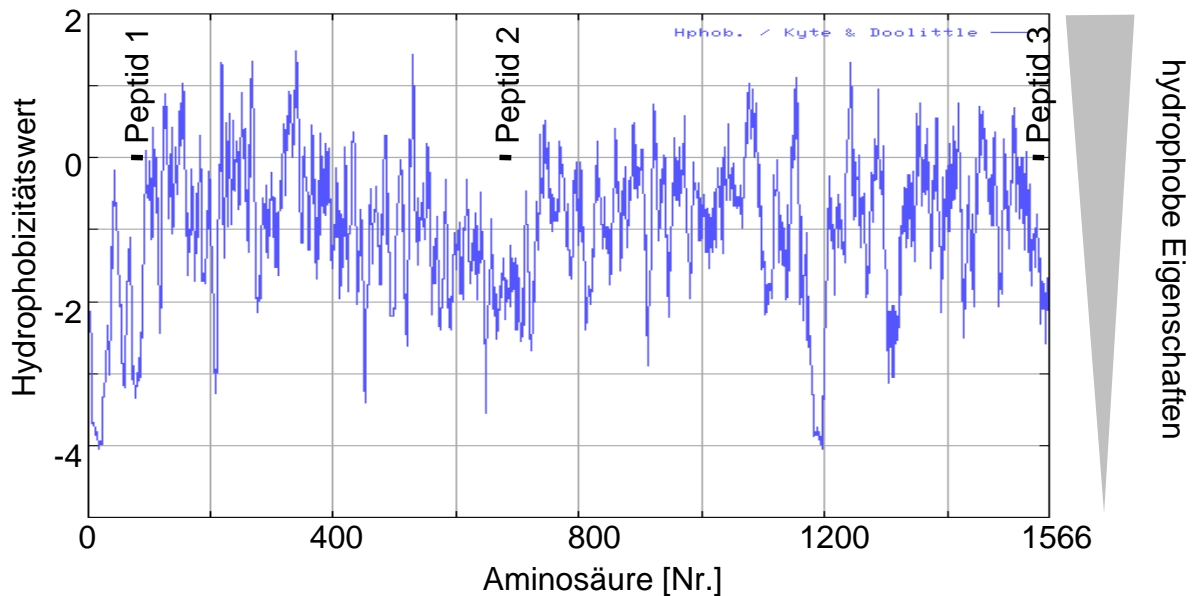


Abb. 4-20: Grafische Darstellung der Hydrophobizitätsverteilung nach Kyle und Doolittle für das gesamte RERE Protein.

In der grafischen Darstellung ist die Hydrophobizität der Proteinregion als Mittelwert aus den umgebenden 9 Aminosäurewerten errechnet. Die hydrophilen Proteinregionen von RERE sind die Regionen der RD und RE Aminosäurenwiederholungen und haben einen berechneten Wert von maximal - 4,05. Die Lage der synthetisierten Peptidsequenzen im gesamten RERE Protein ist durch einen Balken markiert. Einzelwerte für die Beschreibung der Hydrophobizität errechnet nach der Kyte und Doolittle Methode:

Ala: 1,8	Arg: -4,5	Asn: -3,5	Asp: -3,5	Met: 1,9	Phe: 2,8	Pro: -1,6	Ser: -0,8
Cys: 2,5	Gln: -3,5	Glu: -3,5	Gly: -0,4	Thr: -0,7	Trp: -0,9	Tyr: -1,3	Val: 4,2
His: -3,2	Ile: 4,5	Leu: 3,8	Lys: -3,9	Asx: -3,5	Glx: -3,5	Xaa: -0,5	

Tab. 4-6: Beschreibung der für die Immunisierung ausgewählten Peptide.

Peptid [Nr.]	Anzahl der Aminosäuren	Aminosäuresequenz	Aminosäure in RERE [Nr.]
1	18	NH ₂ -CESTKKNKKKPPKKKSRY-COOH	70 - 86
2	17	NH ₂ -CSRPNPSEGESESSDS-COOH	675 - 690
3	17	NH ₂ -CAMEQQWLHGHPMHGG-COOH	1531 - 1546

Für die Reinigung von RERE-bindenden Antikörpern wurden die Seren der immunisierten Kaninchen mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurde das entsprechende Peptid chemisch an eine Säulenmatrix gekoppelt (Pierce). Die nach dem Waschen an der Säule gebundenen Antikörper wurden durch Veränderung des pH-Wertes eluiert. Der Proteingehalt der Eluate wurde photometrisch bestimmt. Etwa 60 – 80 % der gebundenen Antikörper waren in den Fraktionen 4, 5 und 6 konzentriert (Abb. 4-21A). Die Fraktionen 4 und 5 zeigten im ELISA die höchste Aktivität zu gebundenem Peptid (Abb. 4-21B).

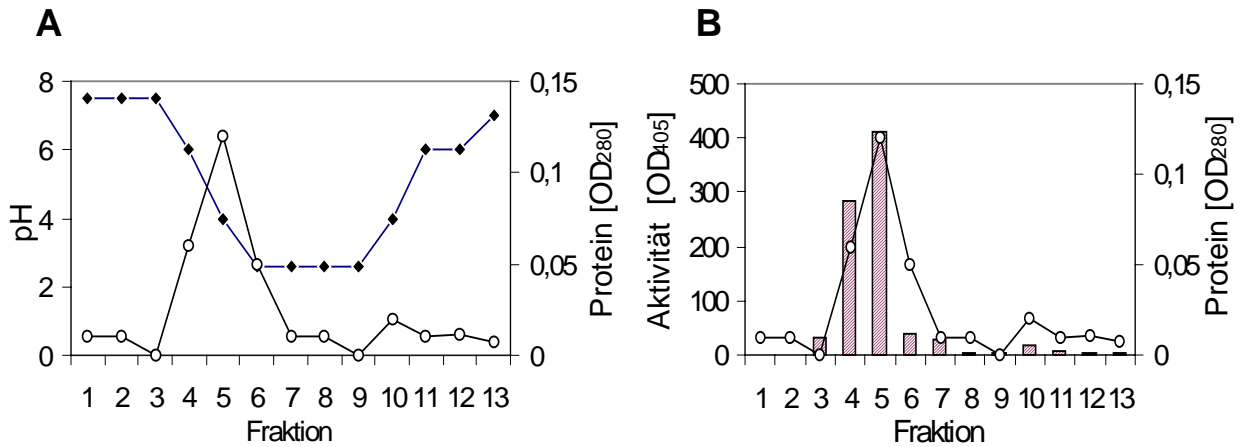


Abb. 4-21: Analyse von pH Wert, Proteingehalt und Antigenbindungsaktivität in Fraktionen der gereinigten Peptidantikörper.

Repräsentatives Beispiel der Aufreinigung des Immunerums am Beispiel von immunisiertem Peptid 1.

(A) Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt und der pH Wert (Quadrate und Linie) sowie der Proteingehalt (Kreise und Linie) bestimmt. Die Proteinmenge im Eluat (photometrisch bei 280 nm bestimmt) stieg in Fraktion 4 (pH 6) an. Die maximale Proteinkonzentration im Eluat lag in Fraktion 5 ($OD_{280} = 0,12$) und nahm in Fraktion 6 auf $OD_{280} = 0,05$ ab. Alle weiteren Eluate enthielten gemessene Extinktionswerte von weniger als $OD_{280} = 0,02$.

(B) Korrelation von Antigenbindungsaktivität und Proteingehalt in den eluierten Fraktionen. Für jede Fraktion wurde im ELISA eine 1 : 200 Verdünnung mit immobilisiertem Peptid 1 überprüft (Säulen). Die maximalen Werte lagen in der Fraktion 4 ($OD_{280} = 284$) und Fraktion 5 ($OD_{280} = 412$). Dies korrelierte mit dem photometrisch bestimmten Proteingehalt der entsprechenden Fraktionen (Kreise). Alle weiteren untersuchten Fraktion zeigen eine geringere Antigenbindungsaktivität.

4.5.2. Herstellung und Reinigung eines 70 kD His-RERE Fragments

Die N-terminale 70 kD Region von RERE wurde aufgrund ihrer geringen Homologie zu anderen bekannten Proteinen für die Immunisierung ausgewählt. Die Herstellung des RERE Fragments erfolgte mit dem IPTG induzierbaren, bakteriellen Expressionsvektor pET. Die Aufreinigung des His-RERE Fragments erfolgte über die Histidinsequenz mittels Ni-Chelat Säule. Die Konzentration des angereicherten Proteins betrug 400 µg/ml. Die gesamte Menge an rekombinantem 70 kD RERE Fragment aus einem Ansatz von 2 Liter betrug etwa 1,6 mg. Bei der Analyse des rekombinanten Proteins im Coomassie Gel waren Abbauprodukte erkennbar (Abb. 4-22A). Das 70 kD Fragment wurde im Western Blot über die Histidinsequenz sowie mittels affinitätsgereinigtem RERE Peptidantikörper nachgewiesen (Abb. 4-22A-C).

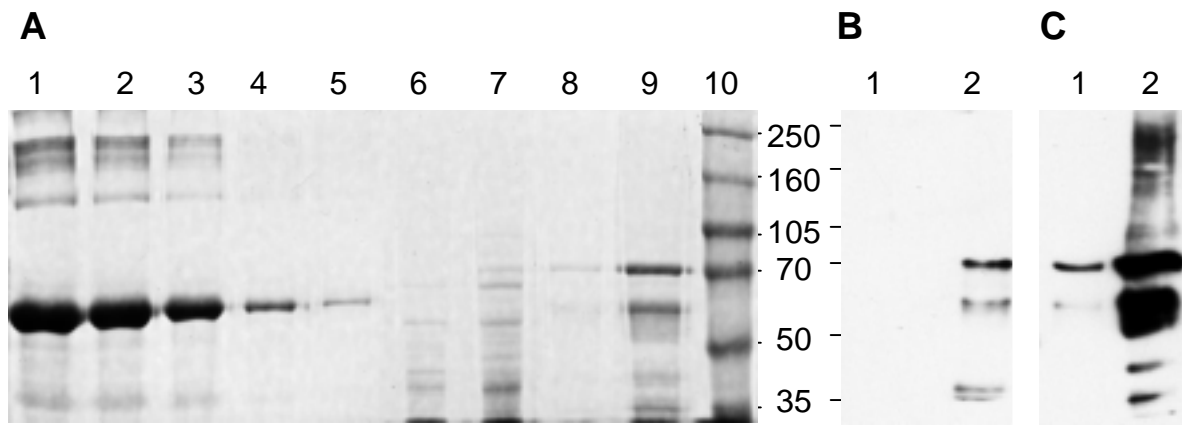


Abb. 4-22: Coomassie gefärbtes Proteingel und Western Blot Analysen mit Proben des Cu-Chelat gereinigten 70 kD RERE Fragments.

(A) Coomassie gefärbtes Proteingel: Spur 1 - 5 enthalten 8, 4, 2, 1 oder 0,5 mg BSA. Spur 6: Gesamt-Proteinfraktion aus 20 μ l Bakterienkultur ohne IPTG Induktion. Spur 7: Gesamt-Proteinfraktion von 20 μ l Bakterienkultur nach 1,5 Stunden Induktion mit IPTG. Spur 8: 20 μ l aus dem Eluat der Cu-Chelat Reinigung. Spur 9: 5 μ l des auf 10 % des ursprünglichen Volumens mittels Filtron Röhrchen eingegangenen Eluats. Die Konzentration des RERE Fragments wurde anhand der BSA Verdünnungsreihe auf 400 μ g/ml bestimmt. Spur 10: Molekulargewichtsmarker (Amersham) mit Angabe des Molekulargewichtes in [kD].

(B) Nachweis der Expression von His-RERE Protein im Western Blot aus jeweils 5 μ l Bakterienkultur ohne IPTG (Spur1) und mit IPTG. (Spur2) mit einem Histidin spezifischen Antikörper.

(C) Nachweis von His-RERE im Cu-Chelat Eluat mittels Peptidantikörper (anti RERE Epitop 1). Spur 1: 5 μ l des gereinigten Eluats. Spur 2: 5 μ l des konzentrierten Eluats.

4.5.3. Charakterisierung der Antikörper mittels ELISA und Immunfärbung

Die Antigenbindungsaktivität der affinitätsgereinigten Peptidantikörper sowie des Immunserums (Immunisierung mit der N-terminale RERE Proteinregion) wurde durch einen ELISA mit immobilisiertem Antigen sowie durch den Vergleich der Immunfärbung von GFP-RERE transfizierten Zellen und nicht transfizierten Zellen nachgewiesen. Für alle affinitätsgereinigten Peptidantikörper sowie für das Immunserum wurde im ELISA eine Bindung an das entsprechend immunisierte RERE-Antigen nachgewiesen. Nach einer Verdünnung von 1:1000 zeigten die gereinigten Antikörper gegen Peptid Nr. 3 im ELISA die höchste Aktivität, verglichen mit den gereinigten Antikörpern gegen Peptid 2 und Peptid 1 (Abb. 4-23A). Für das Immunserum (Immunisierung mit dem 70 kD RERE Fragment) wurde bei einer Verdünnung von 1:1000 ein etwa 14fach höheres Signal im ELISA gemessen, verglichen mit den affinitätsgereinigten Antikörpern gegen RERE Peptid 1-3 (siehe Tab. 4-6). Die zweite Überprüfung der spezifischen Antigenbindungsaktivität erfolgte durch die Immunfärbung von Zellen mit transienter Expression von GFP-RERE. Dabei zeigten die Immunseren gegen das Peptid Nr. 1 (Abb. 4-23B-D) und gegen das Peptid Nr. 2 eine Bindung an GFP-RERE während das Serum gegen Peptid Nr. 3 nur eine geringe

Antigenbindungsaktivität für RERE zeigte (Daten nicht gezeigt). Mit dem Immenserum gegen die 70 kD N-terminale RERE Region konnte mit einer 1:1000 Verdünnung GFP-RERE sensitiv nachgewiesen werden, das durch die GFP-Intensität nahe an der Nachweisgrenze lag. Für alle folgenden Western Blot Analysen wurde aufgrund dessen hoher Antigenbindungsaktivität das Serum gegen die N-terminale RERE Region verwendet, während für alle im Folgenden gezeigten Immunfärbungen von RERE die gereinigten Peptidantikörper gegen Peptid 1 verwendet wurden.

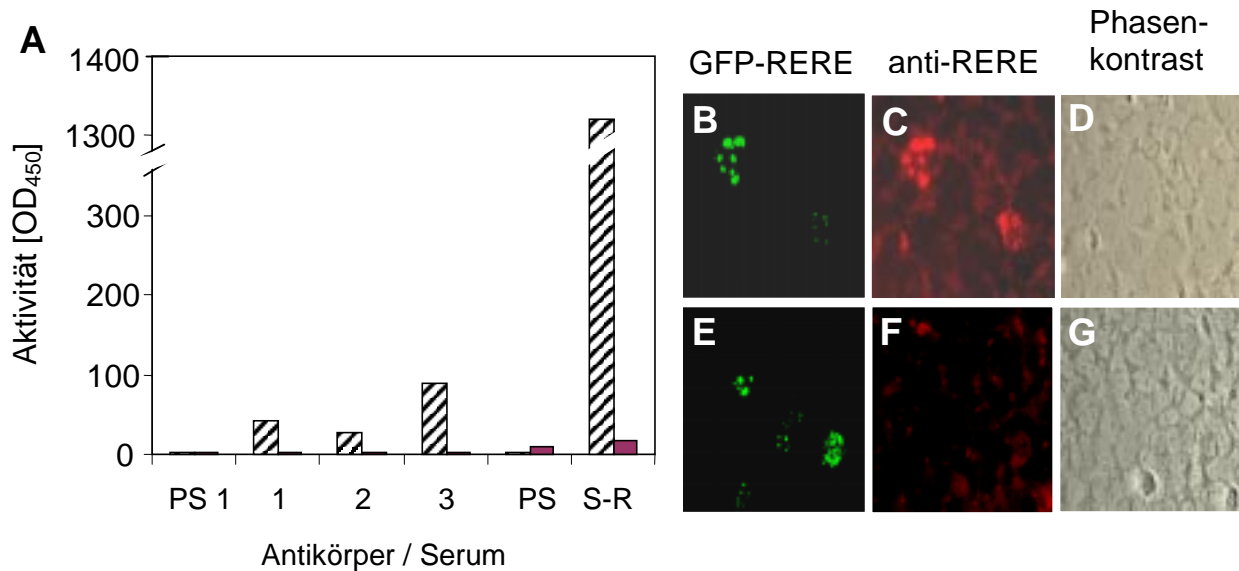


Abb. 4-23: Nachweis der Bindungsaktivität verschiedener Antikörper und einem Immenserum im ELISA und Nachweis der Spezifität eines affinitäts-gereinigten, RERE spezifischen Immenserums in GFP-RERE transfizierten Zellen.

In einer 96 Loch Mikrotiterplatte wurden jeweils 50 ng Peptid 1-3 oder 50 ng des 70 kD N-terminalen RERE Fragments immobilisiert.

(A) In der Grafik ist die Antigenbindungsaktivität von repräsentativen Fraktionen der gereinigten Peptidantikörper nach einer Verdünnung von 10^{-3} dargestellt (jeweils linke, gestreifte Säule). Für die Überprüfung der unspezifischen Antikörperaktivität wurden bei den Peptidantikörpern jeweils 50 ng der beiden Peptide, die nicht zur Immunisierung verwendet wurden, immobilisiert. Bei dem Serum gegen das 70 kD Protein wurden 50 ng einer Proteinmischung (Amersham) immobilisiert (jeweils rechte Säulen). In den Ansätzen mit Peptidserum und gereinigten Peptidantikörpern betrug die unspezifische Bindungsaktivität weniger als 10 OD und ist bei dieser Grafik kaum erkennbar. Linkes Säulenpaar: Repräsentatives Beispiel für die geringe Antigenbindungsaktivität der Immenserum vor der Immunisierung ist durch das Präimmenserum 1 (PS1 = Serum vor der Immunisierung mit Peptid 1) dargestellt. Säulenpaare 2 - 4: spezifische und unspezifische Antigenbindungsaktivität der affinitätsgereinigten Peptidantikörper. Spezifische ELISA-Werte: Peptid 1 ($OD_{405} = 42$), Peptid 2 ($OD_{405} = 28$) und Peptid 3 ($OD_{405} = 89$). Säulenpaar 5: geringes ELISA Signal von Serum vor der Immunisierung mit dem N-terminalen RERE Fragment (PS = Präimmenserum). Säulenpaar 6: hohe spezifische Antigenbindungsaktivität nach der vierten Immunisierung mit dem N-terminalen RERE Fragment (S-R = Serum-RERE, $OD_{405} = 1307$). (B-D) Immunologischer Nachweis von GFP-RERE in SK-N-AS Zellen mittels gereinigten Antikörpern (C, affinitätsgereinigtes Peptidserum 1, 1 : 500 verdünnt). (E-G) Schwaches Hintergrundsignal des Serums vor der Immunisierung mit Peptid 1 (F).

4.6. Analyse von Tumor Zelllinien auf mögliche Veränderungen im *RERE* Gen und den *RERE* Genprodukten

Aufgrund der Identifizierung des *RERE* Gens als Bruchpunktgen in der Neuroblastom Zelllinie NGP (P. Gardellin, Manuskript in Vorbereitung) wurden verschiedene Tumor Zelllinien auf eine veränderte genomische Struktur mittels Southern Blotting, auf veränderte RNA Transkripte mittels Northern Blotting und auf eine veränderte Expression des *RERE* Proteins mittels Western Blot Analysen untersucht.

4.6.1. Southern Blot Analyse von Tumor Zelllinien

Für die Southern Blot Methode wurden 20 µg gereinigte genomische DNA zunächst mit einem Restriktionsenzym, das statistisch alle 5000 - 10 000 Basenpaare schneidet verdaut, im Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit einer cDNA Sonde hybridisiert. Dabei entstand für jedes Enzym ein charakteristisches Bandenmuster, das bei einem chromosomalen Rearrangement oder einer Deletion in der von der Sonde detektierten Region verändert sein kann. Um eine genetische Veränderung in der Bruchpunktregion zu untersuchen, wurde als Sonde die *RERE* cDNA Sequenz Nukleotid (nt) 364 bis nt 1411 verwendet. Diese Sequenz überspannt die Chromosom 1 Bruchpunktregion in der Zelllinie NGP (persönliche Mitteilung von P. Gardellin). Mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I, *Hind* III und *Xba* I war in den 12 untersuchten Neuroblastom Zelllinien (SK-N-AS, NGP, IMR 32, SK-N-SH, GI-ME-N, STA-NB-3, GI-CA-N, LAN-1, SHEP, Kelly, Vi856, NMR) sowie der neuroektodermalen Zelllinie SK-N-MC oder der Leukämie Zelllinien HL 60 kein verändertes Bandenmuster erkennbar, das auf eine chromosomale Veränderung hindeutet (Abb. 4-24). Mit dem Enzym *Pst* I wurde bei der Zelllinie NMR eine zusätzliche Bande im Restriktionsmuster nachgewiesen (Abb. 4-24). Ein verändertes Restriktionsmuster, das nur nach dem Verdau mit einem Enzym auftritt ist häufig erkennbar, wenn der Austausch eines Nukleotids, welches im Genom mit statistischer Häufigkeit auftritt (Polymorphismus), die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym verändert. Damit wurden mit Southern Blot Analyse keine groben Veränderungen im Gen für *RERE* nachgewiesen. Die Sequenzanalyse der noch unvollständigen öffentlichen genomischen Sequenzdaten im *RERE* Gen ergab mögliche Intron Sequenzen von mehreren 100 000 Nukleotiden und nur kurze Exonsequenzen (siehe 4.1.3). Deshalb besteht die Möglichkeit, dass ein Bruchpunkt in einem Intron kein verändertes Bandenmuster im Southern Blot bei der Hybridisierung mit einer

cDNA Sequenz ergibt. Da die Intronregion in der Nähe des chromosomalen Bruchpunkts der Zelllinie NGP hoch repetitive Sequenzen enthält, die im gesamten Genom häufig vorkommen, waren im Southern Blot viele genomische Fragmente markiert und deshalb einzelne Banden nicht mehr auflösbar (Daten nicht gezeigt).

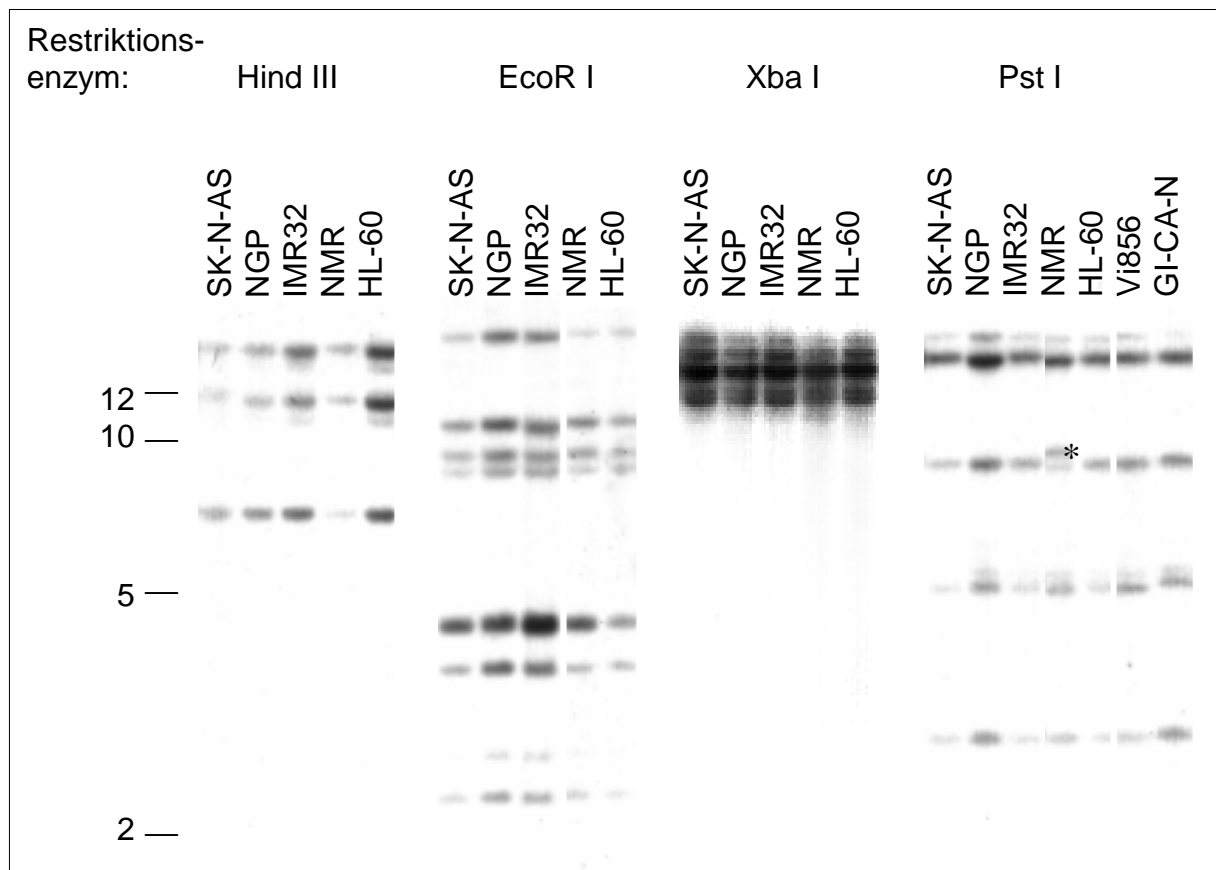


Abb. 4-24: Untersuchung von verschiedenen Tumor Zelllinien auf genomische Veränderungen im *RERE* Gen mittels Southern Blot.

Bandenmuster im Gen für RERE nach Restriktionsverdau mit Hind III, EcoR I, Xba I oder Pst I. In jeder Spur wurden 20 µg gereinigte genomische DNA aufgetragen. Als Hybridisierungssonde wurde radioaktiv markierte RERE cDNA Sequenz von Nukleotid 364 bis Nukleotid 1411 hybridisiert. Das Molekulargewicht ist in Kilobasen (kb) auf der linken Seite angegeben. Repräsentative Beispiele von vier Neuroblastom Zelllinien SK-N-AS, NGP, IMR 32, NMR sowie der Leukämie Zelllinien HL-60 sind gezeigt. Bei dem Verdau mit PST I ist zusätzlich Vi856 und GI-CA-N gezeigt. Das bei der Zelllinie NMR nach dem Verdau mit PST I zusätzlich nachgewiesene DNA Fragment ist mit einem (*) markiert.

4.6.2. Northern Blot Analyse von Tumor Zelllinien

Um die Vollständigkeit der RERE Transkripte in Tumor Zelllinien zu untersuchen, wurden Northern Blot Analysen und quantitative "real-time" RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, Taqman[®] Methode, Perkin Elmer) durchgeführt.

Dazu wurden 18 poly (A)⁺ RNA Proben verschiedener Neuroblastom Zelllinien, einer Leukämie Zelllinie (HL-60) und einer neuroektodermalen Zelllinie (SK-N-MC) untersucht. Zunächst wurde die poly (A)⁺ RNA der verschiedenen Zelllinien im Northern Blot mit der radioaktiv markierten 5'Probe der RERE cDNA hybridisiert. Dabei wurden zwei RNA Transkripte, die in allen normalen Geweben detektiert wurden, mit vergleichbaren Mengen in SK-N-MC und HL-60 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde eine sehr schwache Expression beider Transkripte in NGP, SK-N-AS, Gi-CA-N, GI-ME-N, SHEP, Vi856 und IMR32 detektiert. Diese Signale waren in Northern Blot Analysen schwach oder nicht erkennbar (Abb. 4-25). Verglichen mit RERE-RNA in normalem Gewebe wurde in den anderen 11 untersuchten Neuroblastom Zelllinien eine verringerte Signalstärke des 7,4 kb Transkripts nachgewiesen (Abb. 4-25). In einem quantitativen Taqman[®] Ansatz wurde ein Primersystem aus der RERE 3'Region (siehe Material und Methoden) verwendet, um den RERE RNA Gehalt der verschiedenen Zelllinien zu vergleichen (Abb. 4-25). Die gemessene RERE RNA Menge aus 100 ng poly (A)⁺ RNA stimmte mit den Northern Blot Ergebnissen weitgehend überein. Mit der Taqman[®] Methode konnte noch eine geringe RERE RNA Konzentration in Zelllinien, die im Northern Blot kein Signal ergaben, nachgewiesen werden (Abb. 4-25). Lediglich in der Zelllinie Vi856 wurde keine RERE RNA nachgewiesen sowohl mittels Northern Blot als auch mittels der empfindlicheren Messung mit der Taqman[®] Methode.

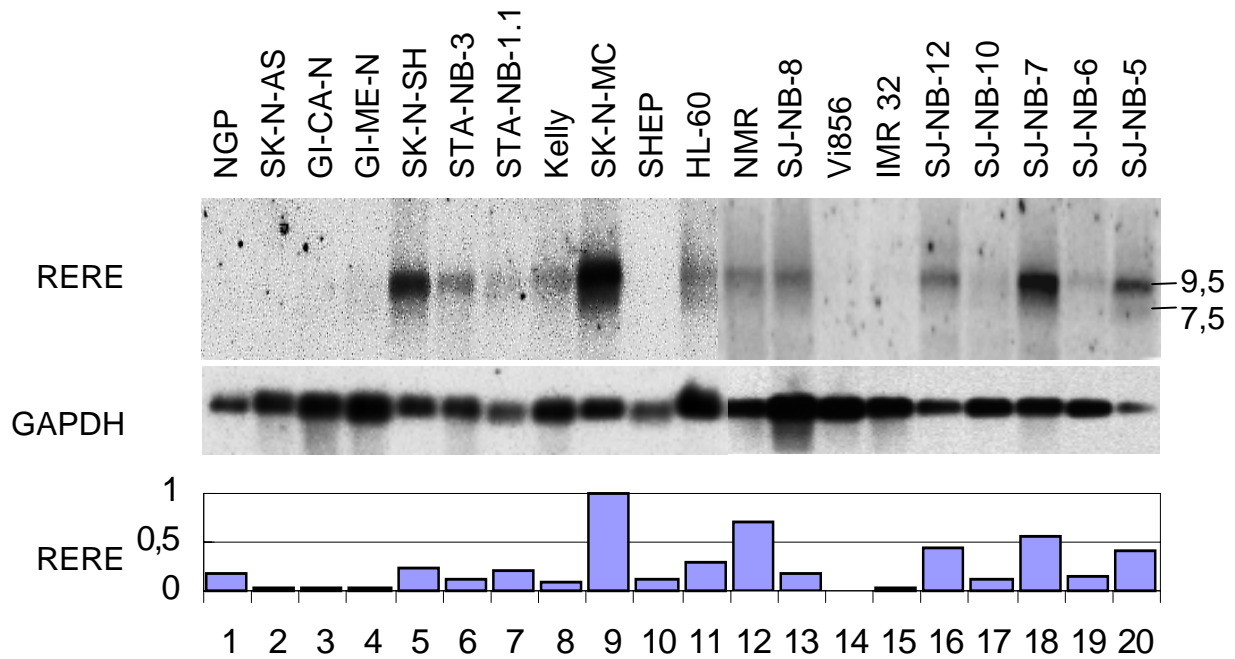


Abb. 4-25: Vergleich der RERE RNA Transkripte in Tumor Zelllinien mittels Northern Blot Analyse und einer quantitativen RT-PCR Methode.

Poly (A)⁺ RNA aus 20 verschiedenen Zelllinien wurde mittels Northern Blotting mit einer radioaktiv markierten Sonde aus der 5' RERE Region hybridisiert. Der RNA-Längenstandard ist in Kilobasen (kb) auf der rechten Seite angegeben

(A) RERE Transkripte waren im Northern Blot in 7 von 18 Proben schwach erkennbar oder nicht nachweisbar. Bei dieser Abbildung ist zu beachten, dass geringe Mengen an RERE-RNA zu schwachen Signalen führen, die teilweise unter der Nachweisgrenze des dargestellten Northern Blots liegen (NGP, SK-N-AS, GI-CA-N, GI-ME-N, SHEP, Vi856, IMR32). Das 7,4 kb RNA Transkript wurde in allen Neuroblastom Zelllinien mit einem schwächeren Signal nachgewiesen als in der neuroektodermalen Zelllinie SK-N-MC und der Leukämie Zelllinie HL-60. Als Kontrolle für gleichmäßige RNA Beladung wurde der Blot mit einer GAPDH cDNA Probe (unterer Bildabschnitt) hybridisiert.

(B) Relative Quantifizierung der RERE RNA mit einer quantitativen Echtzeit PCR-Methode (Taqman[®] Analysegerät, Primersystem aus der RERE 3' Region). Mit dieser Methode wurde die Expression von geringen Mengen RERE-RNA, in Zellen die im Northern Blot kein Signal ergaben, nachgewiesen. Die gemessene Intensität ist im Verhältnis zu der Zelllinie SK-N-MC berechnet, als gemittelter Wert einer 3fach Messung. Das Signal von SK-N-MC wurde als 1 gesetzt.

4.6.3. Western Blot Analysen von Tumor Zelllinien

Die hergestellten Antikörper gegen die N-terminale RERE Region ermöglichten die Untersuchung von Tumor Zelllinien auf veränderte Proteinbanden im Western Blot. In 18 untersuchten Zelllinien (Neuroblastom Zelllinien: STA-NB-3, STA-NB-1.1, NGP, IMR32, Kelly, NMR, GI-ME-N, SHEP, Vi856, SJ-NB-8, SJ-NB-5, SJ-NB-10, SJ-NB-12, SJ-NB-4, GI-CA-N; Leukämie Zelllinie: HL60; neuroektodermale Zelllinie: SK-N-MC; Karzinom Zelllinie: SW480) wurden mindestens zwei dominante Proteinbanden von 175 kD und etwa 250 kD nachgewiesen (Abb. 4-26A,B). Diese Banden waren in Zelllinien mit einer geringen nachgewiesenen Menge an RERE RNA (siehe 4.6.2.) nicht signifikant schwächer als in Zelllinien mit einem hohen Level an RERE RNA. Dies könnte darauf hindeuten, daß das

RERE Protein, zumindest teilweise, auf der Ebene der Translation reguliert ist. Beide Proteinbanden waren nach der Behandlung mit Harnstoff unverändert. Die Intensität beider Banden untereinander ist bei verschiedenen Zelllinien unterschiedlich, wobei keine Korrelation zwischen der Menge des großen RERE RNA Transkriptes und dem Nachweis einer großen Proteinbande mit einem starken Signal nachgewiesen wurde. Bei zwei Zelllinien wurden zusätzliche dominante Proteinbanden nachgewiesen. In der Neuroblastom Zelllinie GI-CA-N wurde ein zusätzliches Protein mit einem Molekulargewicht von 91 kD detektiert. In der Karzinom Zelllinie SW480 wurde eine zusätzliche Proteinbande von 42 kD nachgewiesen (Abb-26B). In keiner weiteren untersuchten Tumor Zelllinie wurden Proteine mit vergleichbarem Molekulargewicht nachgewiesen. Die Häufigkeit von veränderten Banden, die mit dem RERE spezifischen Immunsereum detektiert wurden betrug 11 % (2 von 18) und war nicht auf Neuroblastom Zelllinien beschränkt.

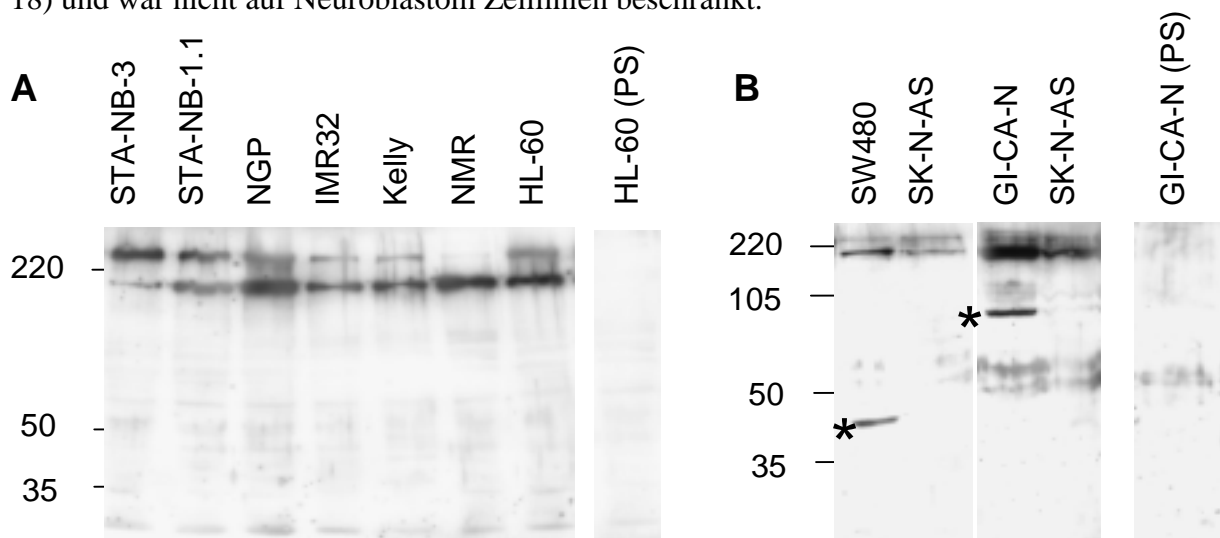


Abb. 4-26: Nachweis von veränderten Proteinbanden in den Tumor Zelllinien SW480 und GI-CA-N.

Gesamtprotein von 16 Zelllinien wurde im Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach dem Transfer auf Nitrozellulose Folie als Western Blot mit einer 1 : 1000 Verdünnung des Immunsereums gegen die N-terminale RERE Region oder dem Serum vor der ersten Immunisierung (PS = Präimmunsereum) hybridisiert. Das Molekulargewicht ist jeweils am linken Rand in Kilodalton (kD) angegeben.

(A) Repräsentative Beispiele anhand der 5 Neuroblastom Zelllinien, STA-NB-3, STA-NB-1.1, NGP, IMR32, Kelly, NMR und der Leukämie Zelllinie HL-60 in einem 7 %igen, nicht reduzierenden Polyacrylamidgel. In jeder Gesamtproteinfraktion wurden zwei dominante Proteinbanden von 175 kD und etwa 250 kD nachgewiesen. Auffällig war die unterschiedliche Intensität beider Banden zueinander bei verschiedenen Zelllinien. Als Nachweis der spezifischen Bindung des Immunsereums wurde eine HL-60 Proteinfraktion mit Präimmunsereum (PS) inkubiert.

(B) Nachweis von zusätzlichen Proteinen mit einem geringem Molekulargewicht bei der Karzinom Zelllinie SW480 (42 kD) sowie der Neuroblastom Zelllinie GI-CA-N (91 kD), markiert mit (*). Die Proteinfraktionen wurden in einem 10 %igen Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen (4 M Harnstoff) zusammen mit der Neuroblastom Zelllinie SK-N-AS als Beispiel für das typische Muster der Proteinbanden aufgetragen. Als Kontrolle für die spezifische Bindung des Immunsereums wurde eine Proteinfraktion von GI-CA-N mit Präimmunsereum hybridisiert. Damit wurde die Färbung im Bereich von 50 bis 60 kD als nicht spezifisch nachgewiesen.

4.7. Weitere Analysen zum Expressionsniveau und der subzellulären Lokalisierung von endogenem RERE

4.7.1. Vergleich des zellulären RNA- und Proteinniveaus von RERE und Zyklin A im Zellzyklus

Die bisherigen Ergebnisse hatten gezeigt, dass RERE transfizierte Zellen sich 24 h nach der Transfektion nicht mehr teilten. Deshalb wurde durch einen Vergleich mit dem im Zellzyklus regulierten Zyklin A untersucht, ob die endogene Konzentration an RERE RNA und RERE Protein in einer bestimmten Zellzyklusphase stark variiert und damit einen Wachstumsstopp auslösen könnte. Dazu wurde der relative Gehalt an RERE RNA in synchronisierten Zellen mittels quantitativer Taqman[®] Methode bestimmt. Bei dieser Auswertung wurde der Gehalt an RERE RNA und Zyklin A RNA auf den RNA Gehalt von GAPDH bezogen. Die Expression von RERE Protein wurde im Western Blot mit einem Immunsersum bestimmt.

Nach dem Auswaschen von Thymidin im Medium traten die G1-Phase arretierten HeLa Zellen wieder in den Zellzyklus ein und durchliefen die Zellzyklusphasen G1, S, G2 und die Mitose, bevor sie nach 13 Stunden wieder in die G1 Phase eintraten. Der relative Gehalt an RERE RNA wurde direkt nach dem Auswaschen des Thymidins bestimmt (0 Stunden) und als 1 festgelegt (relativer Wert). Über den gesamten Messzeitraum von 15 Stunden betragen die relativen Werte des RERE RNA-Gehalts zwischen 0,9 und 1,4. Geringfügig erhöhte Werte für RERE RNA wurden in der S-Phase (relativer Wert = 1,3) sowie 3 Stunden nach der Zellteilung (1,4) gemessen (Abb. 4-27A). Der Level an Zyklin A RNA, als Beispiel für zellzyklusabhängige Transkription, wurde mit einem Anstieg um das 4fache am Ende der G2 Phase bestimmt (relativer Wert = 4, Abb. 4-27A). Im Western Blot wurde eine gleichbleibende RERE Konzentration detektiert. Es wurden in keiner Phase des Zellzyklus RERE Proteinbanden mit einem veränderten Molekulargewicht nachgewiesen. Auch die Signalstärke der beiden dominanten Proteine zueinander war während des gesamten Zellzyklus unverändert mit einer deutlichen Präferenz für die Proteinbande von 175 kD (Abb. 4-27B). Die einzelnen Zellzyklusphasen wurden durch Messung des DNA Gehalts einzelner Zellen mittels FACS Analyse bestimmt (Abb. 4-27C).

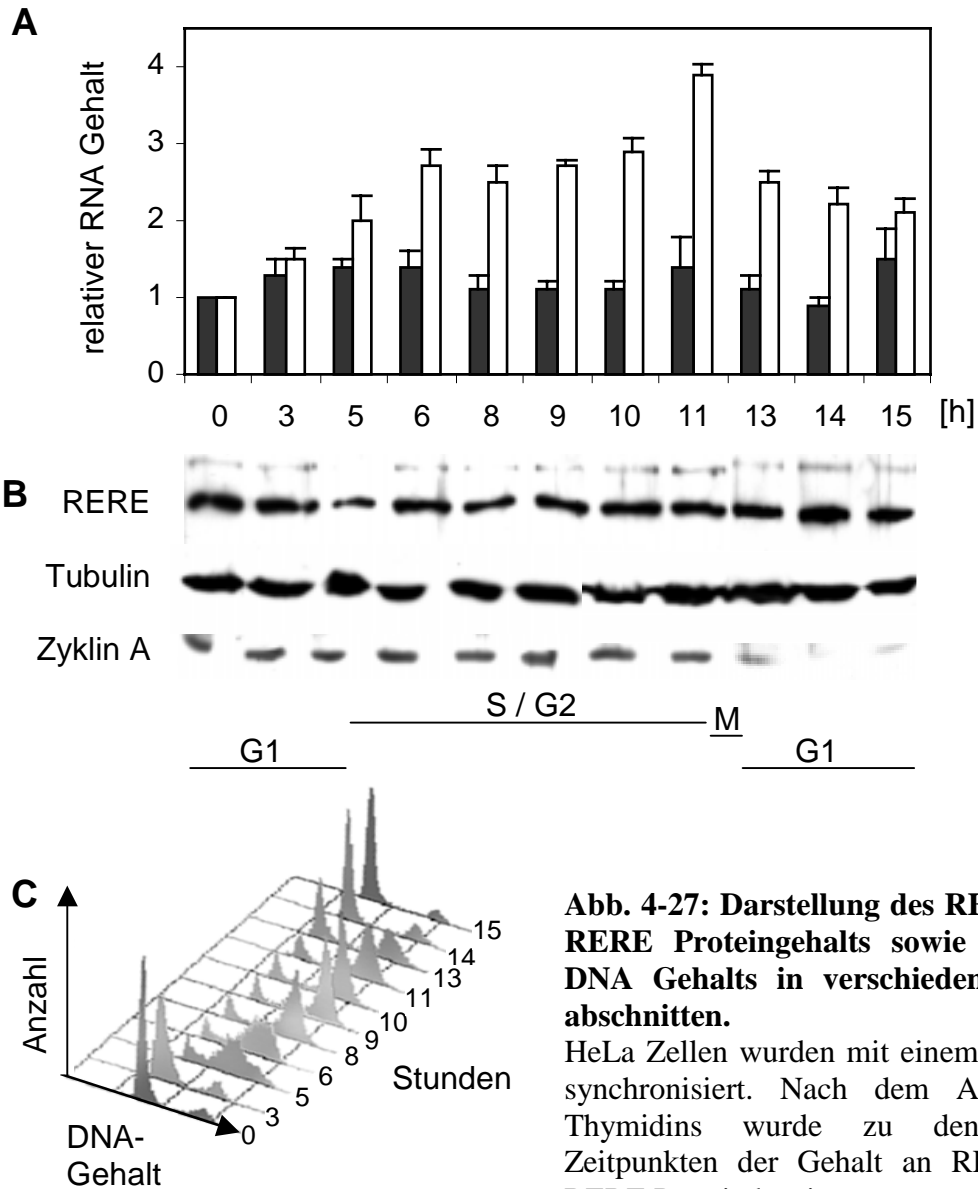


Abb. 4-27: Darstellung des RERE RNA- und RERE Proteingehalts sowie des zellulären DNA Gehalts in verschiedenen Zellzyklusabschnitten.

HeLa Zellen wurden mit einem Thymidinblock synchronisiert. Nach dem Auswaschen des Thymidins wurde zu den angegebenen Zeitpunkten der Gehalt an RERE RNA und RERE Protein bestimmt.

(A) Grafische Darstellung der quantitativen RNA Bestimmung (Taqman[®]) von RERE und Zyclin A in Relation zur GAPDH Konzentration. Alle Werte sind im relativen Verhältnis zu dem ersten Wert nach dem Auswaschen des Thymidins (0 h) dargestellt. Dieser Wert wurde als 1 definiert. RERE RNA (schwarze Säulen) wurde in allen Zellzyklusstadien mit relativen Werten zwischen 0,9 und 1,4 bestimmt. Dagegen stieg die gemessene Menge an Zyclin A (weiße Säulen) während der Synthesephase und der G2 Phase an und erreicht ihr Maximum in der späten G2 Phase (relativer Wert = 4,0).

(B) Western Blot zur Bestimmung des Proteingehalts von RERE, β Tubulin und Zyclin A. Obere Reihe: Nachweis der Expression von RERE Protein in HeLa Zellen während des gesamten Zellzyklus. Mittlere Reihe: Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung durch den Nachweis von Tubulin. Untere Reihe: Anstieg der Zyclin A Konzentration in der G2 Phase und geringer Gehalt an Zyclin A nach der Zellteilung. Die Zellzyklusstadien sind den Zeitpunkten nach dem Zellzyklusarrest zugeordnet.

(C) Ermittlung der Zellzyklusstadien mittels FACS Analyse anhand des DNA Gehalts der Zelle (Propidiumjodid-Färbung). 0 - 3 Stunden G1 -Phase; 4 - 12 Stunden Synthesephase und Verdopplung des DNA Gehaltes (S / G2); nach 13 Stunden Mitosephase (M); ab 14 Stunden erneut G1 Phase.

4.7.2. Bestimmung der intrazellulären Lokalisierung von endogenem RERE

Für die Bestimmung der intrazellulären Verteilung wurde RERE in HeLa Zellen mit affinitätsgereinigtem Peptidserum immunhistochemisch nachgewiesen und die RERE spezifische Färbung mit dem Verteilungsmuster von PML, SC35 und β Tubulin verglichen.

Dabei wurde eine Verteilung von RERE sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen. Für etwa 79 % der Zellen wurde RERE ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen. Die Verteilung war meist um die Zellkernmembran angereichert. Der prozentuale Anteil der Zellen mit RERE Verteilung im Zellkern betrug etwa 9 % und in etwa 12 % der Zellen wurde kein RERE nachgewiesen. Der Anteil an Zellen mit Aggregaten im Zellkern betrug etwa 3 % wobei die durchschnittliche Größe der Aggregate etwa 0,1 - 0,2 μm betrug. Etwa 5 % der Zellen zeigten neben einer diffusen Verteilung von RERE im Zellkern auch RERE Aggregate von etwa 0,1 - 0,4 μm im Zytoplasma. Repräsentative Abbildung der intrazellulären RERE Verteilung sind in Abb. 4-28 dargestellt und in Tab. 4-7 zusammengefasst. Der Vergleich der Verteilung von PML und RERE ergab bei keinem der beschriebenen Verteilungsmuster von RERE eine Kolokalisierung mit PML, dem Markerprotein für PODs oder SC35, dem Markerprotein für RNA Splicing Domänen sowie mit Tubulin (Abb.4-28).

Tab. 4-7. Intrazelluläre Verteilung von endogenem RERE in einer nicht konfluenten HeLa Kultur. Es wurden dreimal 100 Zellen ausgewertet (\pm entspricht der Standardabweichung der Zählungen)

Intrazelluläre Verteilung von endogenem RERE Protein	Anteil [%]	Abb. in 4 - 28
Zytoplasma und nicht im Zellkern	79 ± 6	A - E, F-J
Gleichmäßig im Kern und Aggregate im Zytoplasma	6 ± 2	A - E
Aggregate im Zellkern	3 ± 1	K - T
nicht nachweisbar	12 ± 3	A - E

Für die Untersuchung ob die beobachtete Lokalisierung von RERE im Zellkern spezifisch für eine Zellzyklusphase ist, wurden die Zellen durch eine Behandlung mit Nokodazol am Durchlaufen der Mitose gehindert. Etwa 40 % der arretierten Zellen zeigten die bereits beschriebene Verteilung von RERE im Zellkern und als Aggregate im Zytoplasma (Abb. 4-28A-D). Während der Mitose (Abb. 4-28F-J) war RERE gleichmäßig in der Zelle verteilt aber nicht mit der DNA assoziiert. Wenn sich am Ende der Zellteilung die Schwesterzellen trennen, wurde RERE im Zytoplasma und an den Verbindungen zwischen den Schwesterzellen, den "Mid-Bodies" nachgewiesen (Abb. 4-28V-Z).

RERE (A,F,K) Phase (D,I,N)
 PML (B,G,L) Bildüberlagerung DNA (E,J,O)

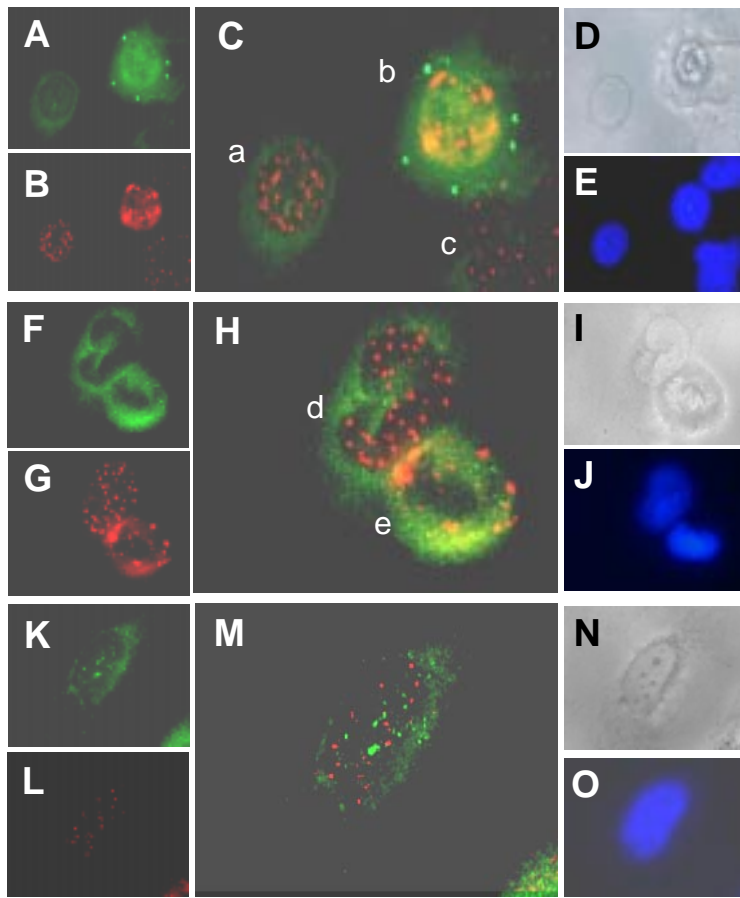


Abb. 4-28: Immunfärbung von endogenem RERE Protein.

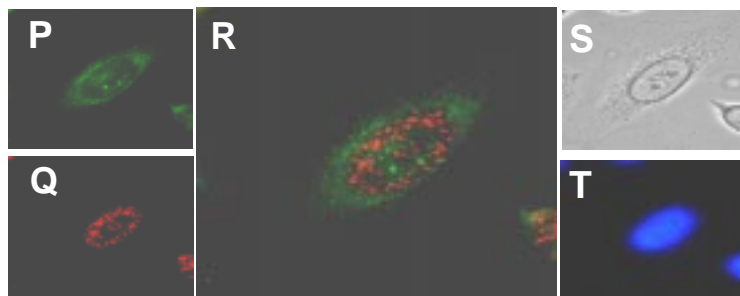
HeLa Zellen wurden immunzytochemisch mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen RERE (grün) und einem der drei Proteine PML, Tubulin oder SC35 (rot) gefärbt. DNA wurde mit DAPI (blau) gegengefärbt (Phasenkontrastabbildung = Phase). Einzelne Zellen in einer Abbildung sind durch einen Kleinbuchstaben markiert.

(A-O) In keiner Zelle wurde eine auffällige Kolokalisierung von RERE mit PML nachgewiesen. (aA-E, dF-J) Beispiele für Zellen mit vorwiegend zytoplasmatischer RERE Färbung, die um den Zellkern konzentriert war. (bA-E) Beispiel für die Verteilung von RERE im Zellkern und als Aggregate im Zytoplasma. (cA-E) Beispiel für Zellen mit kaum nachweisbarem Gehalt an RERE. (eF-J) Zellen mit vorwiegend gleichmäßiger Verteilung von RERE, ohne eine Kolokalisierung von RERE mit der DNA. Zellen mit dieser Verteilung von RERE waren nach der Behandlung mit Nokodazol angereichert.

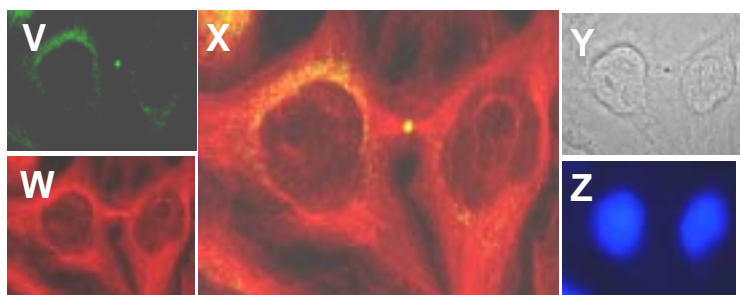
(K-O) Beispiel für die seltene Anreicherung von RERE in Form von nukleären Aggregaten. Diese Aggregate kolokalisierten nicht mit PML Protein (M).

(P-T) RERE Aggregate im Zellkern kolokalisierten ebenfalls nicht mit SC35 Splicing Protein.

RERE (P) Phase (S)
 SC35 (Q) Bildüberlagerung DNA (T)



RERE (V) Phase (Y)
 Tubulin (W) Bildüberlagerung DNA (Z)



(V-Z) Beispiel für Zellen mit Lokalisierung von RERE im Zytoplasma und im "Mid-Body". In der Zelle wurde zusätzlich Tubulin gefärbt.

5. DISKUSSION

In der chromosomalen Region 1p36 wurden bei verschiedenen Tumoren und Tumor Zelllinien genomische Veränderungen nachgewiesen (Schwab et al., 1996). Durch den Vergleich molekulargenetischer Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen konnte eine Region eingegrenzt werden, die häufige genomische Deletionen aufweist (White et al., 1995). Die Hypothese, dass diese Region mindestens ein tumorrelevantes Gen enthält, konnte bisher nicht bestätigt werden. Obwohl verschiedene Kandidatengene publiziert sind, darunter das p53 homologe p73 Protein (Schultheis et al., 1999), konnte noch kein Gen identifiziert werden, das sowohl durch seine Funktion als auch durch Mutationsanalysen als das seit langem gesuchte "Tumor Suppressorgen" in der chromosomalen 1p36 Region in Frage kommt. In der Neuroblastom Zelllinie NGP wurde eine Chromosomentranslokation/-duplikation nachgewiesen, die zu einem chromosomalen Bruchpunkt in der 1p36 2-3 Region führt (Casciano et al., 1996; Amler et al., 1995). In einer genomischen Sequenz, die den Bruchpunkt überlagert, wurden Exonsequenzen identifiziert und cDNA Fragmente des NGP Bruchpunkt-Gens aus cDNA Banken von nicht pathogenem humanem Gewebe isoliert (P. Gardellin, Manuskript in Vorbereitung). In der vorliegenden Arbeit wurde anhand dieser cDNA Fragmente das Bruchpunkt-Gen in der Zelllinie NGP als RERE identifiziert und eine neue Splicevariante isoliert. Mit einem Serum gegen die N-terminale Region von RERE wurden in einem geringen Prozentsatz der untersuchten Zelllinien veränderte Proteinbanden im Western Blot nachgewiesen. Bei der Charakterisierung von überexprimiertem RERE Protein wurde die Lokalisierung von RERE im Zellkern und im Zytoplasma nachgewiesen und eine überlappende Färbung von RERE mit PML, BAX und Mitochondrien gezeigt. Weiterhin wurde die toxische Wirkung hoher RERE Konzentrationen nachgewiesen und als einen kaspaseabhängigen Zelltod charakterisiert. Im Gegensatz zu überexprimiertem RERE war endogenes RERE nicht mit PML, BAX und Mitochondrien kolokalisiert. Dieser Unterschied im Verteilungsmuster von überexprimiertem und endogenem RERE deutet darauf hin, dass RERE in nicht apoptotischen Zellen eine andere Funktion haben könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung von RERE bei der Tumorentstehung diskutiert.

5.1. Struktur des RERE Gens und Nachweis verschiedener RNA Transkripte

Die Vervollständigung der cDNA Sequenz, Identifizierung der Splicevarianten und die Beschreibung der genomischen Exon-Intron Struktur war im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nur mit der Unterstützung durch bioinformatische Methoden für die Auswertung der rasant wachsenden biologischen Sequenzdaten möglich. Zu Beginn dieser Arbeit waren etwa 50 humane cDNA Fragmente (ESTs) mit RERE identischen Sequenzabschnitten in öffentlichen Datenbanken vorhanden. Diese Daten wurden für die Vervollständigung einer neuen RERE cDNA verwendet. Innerhalb von drei Jahren stiegen die humanen EST Sequenzeinträge, die mit RERE identisch sind, um mehr als das 4fache auf über 200 EST Sequenzen an. Auch die Daten über genomische RERE Sequenzen stiegen in diesem Zeitraum sprunghaft an. Während in ersten Datenbankrecherchen, zu Beginn dieser Arbeit, keine RERE homologe genomische Sequenz dem Chromosom 1 zugeordnet war, gab es in der Datenbankrecherche vom 20. Oktober 2000 bereits vier genomische Sequenzen, die unterschiedliche Fragmente des *RERE* Gens enthielten. Eine Sequenz war bereits der genomischen Region 1p36.2 zugeordnet. In dieser genomischen Region wurde RERE als das Bruchpunkt-Gen in der Neuroblastom Zelllinie NGP lokalisiert (P. Gardelin, Manuskript in Vorbereitung). Trotz intensiver Bemühungen von öffentlichen Instituten, die sich zur Human Genomic Organisation (HUGO) zusammengeschlossen haben sowie privaten Organisationen (z.B. Fa. Celera Inc.), sind die genomischen Datenbanken noch nicht vollständig geordnet. Obwohl zur Zeit täglich verbesserte Arbeitsversionen von Genabschnitten in den Datenbanken bereitgestellt werden, konnten die einzelnen Sequenzabschnitte aufgrund von repetitiven Sequenzabschnitten, die sich im gesamten Genom wiederholen, noch nicht zusammengefügt werden. Deshalb war zum Abschluß dieser Arbeit eine genaue Bestimmung der Ausdehnung des *RERE* Gens noch nicht möglich. Die bisherigen Daten zeigen aber eine Ausdehnung des *RERE* Gens, die deutlich über dem Durchschnitt bekannter Gene liegt. Aus den genomischen Daten konnten mit Promotorsuchprogrammen (Reese et al., 1996) auch erste Hinweise auf Promotorregionen sowohl vor der hier beschriebenen RERE cDNA Version als auch vor der von Yanagisawa et al., 2000. beschriebenen RERE Splicevariante identifiziert werden, die auf verschiedenen genomischen Teilsequenzen liegen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf eine unterschiedliche Regulation der Transkription verschiedener *RERE* Genabschnitte hindeuten, die in Abhängigkeit der jeweils im Zellkern aktiven Transkriptionsfaktoren verschiedene Splicevarianten hervorruft. Die Funktion der möglichen Promotorsequenzen könnte in Promotor-Bindungsstudien überprüft werden.

Für die Beschreibung der RERE Splicevarianten wurde die eigene RERE Sequenz mit öffentlichen cDNA Datenbankeinträgen verglichen. Zu Beginn dieser Arbeit war keine humane cDNA Sequenz öffentlich zugänglich, während 3 Jahre später drei teilweise identische RERE cDNA Sequenzen anhand der ermittelten Exon-Intron Übergänge als mögliche Splicevarianten identifiziert werden konnten. Das Vorkommen von zumindest zwei Splicevarianten in allen untersuchten Geweben wurde durch Exon-spezifische Hybridisierungssonden im Northern Blot nachgewiesen.

5.2. Veränderung im Gen für RERE und den RERE Genprodukten bei bestimmten Tumor Zelllinien

Bei der Untersuchung der endogenen RERE Proteinexpression mittels Western Blot wurden in allen Zelllinien zwei Proteinbanden detektiert, von denen die Größe der kleineren Bande dem theoretisch berechneten Molekulargewicht von RERE entspricht (174 kD). Darüber hinaus wurde in der Neuroblastom Zelllinie GI-CA-N sowie in der Karzinom Zelllinien SW 480 jeweils eine dominante, niedermolekulare Proteinbande mit einem Immunsersum nachgewiesen. Dieser Nachweis, jeweils einer veränderten Proteinbande in zwei der untersuchten Zelllinien (entspricht 11 % der untersuchten Zelllinien), war der erste Hinweis auf eine Veränderung von RERE bei verschiedenen Tumor Zelllinien. Mögliche Ursachen für die Entstehung dieser veränderten Proteinbanden könnte beispielsweise eine chromosomale Deletion oder Translokation sein, die zu einem verkürzten, möglicherweise chimären Protein führen könnte. Eine weitere Möglichkeit ist eine Veränderung des Leserahmens durch die Deletion oder den Austausch eines einzelnen Nukleotids, welches zu einem vorzeitigen Kettenabbruch bei der Translation führen kann. Die letztgenannten Möglichkeiten können mit einer Southern Blot Analyse aber fast unmöglich nachgewiesen werden sondern erfordern die Sequenzierung der RERE-Exons.

Die grobe Analyse von genomischen DNAs aus verschiedenen Tumor Zelllinien im Southern Blot deutet nicht auf große genomische Veränderungen, welche die RERE Genstruktur betreffen, hin. Einzig die DNA der Zelllinie NMR zeigte eine veränderte Bande nach dem Verdau mit PST I. Da kein verändertes Bandenmuster nach dem Verdau mit anderen Enzymen auftrat, kann es sich bei der NMR-DNA um einen Polymorphismus (einzelner Austausch von Nukleotiden) handeln. Wie oben beschrieben werden mit der Southern Blot Analyse jedoch kleine Mutationen, wie der Austausch oder die Deletion von einzelnen Nukleotiden, nur selten nachgewiesen. Auch mögliche Veränderungen in den langen Intron

Sequenzen des RERE Gens können mit der verwendeten cDNA Hybridisierungssonde nicht nachgewiesen werden.

Bei der Analyse der RERE RNA im Northern Blot wurden in allen untersuchten Geweben zwei dominante Transkripte von 7,4 kb und 9,4 kb nachgewiesen. In bestimmten Geweben, wie beispielsweise Hodengewebe, wurden zusätzliche Transkripte von 6,8 kb, 5,2 kb oder 3 kb nachgewiesen. In Neuroblastom Zelllinien waren entweder beide dominanten Banden von 9,4 kb und 7,4 kb schwächer exprimiert oder spezifisch die 7,4 kb Bande deutlich reduziert im Vergleich zu den untersuchten Geweben oder anderen Tumor Zelllinien. Darüber hinaus wurden in 5 Zelllinien, darunter NGP, zwei kleine Transkripte von etwa 0,8 und 1,2 kb mit einer 5'Hybridisierungssonde nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis dieser Banden in einzelnen Präparationen der Zelllinie NGP könnte darauf hinweisen, dass diese kleinen Transkripte induzierbare Splicevarianten darstellen (Daten nicht gezeigt). Der nachgewiesene, teilweise verringerte Gehalt einer oder mehrerer Transkripte in Neuroblastom Zelllinien ist noch kein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von RERE bei der Tumorentstehung. Welche Faktoren die möglichen Transkriptionsunterschiede bewirken wurde bisher noch nicht weiter untersucht.

Die bisherigen Untersuchungen über die Veränderungen im *RERE* Gen oder RERE Protein beinhalten somit nur grobe Veränderungen des Gens sowie des Genprodukts. Bei verschiedenen tumorrelevanten Genen, wie beispielsweise p53 oder pRB, kann bereits der Austausch eines Nukleotids entscheidend sein, ob das Protein an der Entstehung von Tumoren beteiligt ist (Marin et al., 2000; Old, 1996). Beispielsweise zeigten umfangreiche Southern Blot Analysen des p53 Tumorsuppressor-Gens keine signifikanten Änderungen in der Bandenstruktur (persönliche Mitteilung von R. A. Weinberg), obwohl ein verändertes p53 Genprodukt in etwa 50 % aller Tumoren eine Rolle spielt (Old, 1996).

Der Nachweis veränderter Proteinbanden mit einem Immunsereum in der Neuroblastom Zelllinie GI-CA-N und der Dickdarmkarzinom Zelllinie SW 480 geben, neben der Identifizierung von RERE als das Bruchpunkt-Gen in der Neuroblastom Zelllinie NGP, Hinweise darauf, dass RERE nicht spezifisch bei Neuroblastom Tumoren verändert ist, sondern möglicherweise auch bei anderen Tumoren wie beispielsweise Dickdarmkrebs. Die Untersuchung weiterer Tumor Zelllinien oder primärer Tumore auf verändertes RERE Protein könnte beispielsweise mit dem in dieser Arbeit hergestellten Antikörper gegen die N-

terminale RERE Region erfolgen. Der Nachweis von verändertem RERE Protein in primären Tumoren wäre ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von RERE bei der frühen Tumorentstehung. Werden veränderte RERE Proteine dagegen nicht in primären Tumoren sondern nur in weiteren Tumor Zelllinien nachgewiesen würde dies auf einen Wachstumsvorteil dieser Zellen bei der Kultivierung der Tumor Zellen hindeuten.

5.3. Zelluläre Verteilung von RERE und N-terminalen RERE Fragmenten im Vergleich zu PODs

In dieser Arbeit wurde die zelluläre Verteilung von verschiedenen RERE Produkten (gesamtes RERE sowie N- oder C-terminale Konstrukte) sowohl im Kern als auch gleichzeitig im Kern und im Zytoplasma nachgewiesen. 18 Stunden nach der Transfektion zeigen 82 % der RERE transfizierten Zellen Aggregate im Zellkern. Im Gegensatz dazu wurde nur in maximal 21 % der Zellen, die ein N- terminales RERE Fragment und 32 % der Zellen, die ein C-terminales RERE Fragment exprimierten, die Bildung von Aggregaten im Zellkern nachgewiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die N-terminalen als auch die C-terminalen Regionen von RERE die Bildung von Aggregaten fördern. Bei der Untersuchung von nukleären RERE Aggregaten wurde keine Kolokalisierung von RERE mit dem RNA Splicing-Protein SC35 (Abb. 4-10) oder mit PIN-1 Aggregaten (Daten nicht gezeigt), die möglicherweise den Zellzyklus regulieren (Rippmann et al., 2000), nachgewiesen.

Neben der Beschreibung der intrazellulären Verteilung vom gesamten RERE Protein und RERE Fragmenten konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Region die Lokalisierung von RERE mit PODs begünstigt, da etwa die Hälfte der Aggregate, die eine N-terminale RERE Proteinregion enthält, mit PODs kolokalisiert war. Im Gegensatz dazu waren die C-terminalen Aggregate im Zellkern nicht signifikant mit PODs kolokalisiert. PODs sind Proteinkomplexe, die aus bisher 30 bekannten Proteinen mit variabler Zusammensetzung bestehen (Zhong et al., 2000). Neben dem in PODs immer vorhandenem PML Protein gibt es eine Reihe von Proteinen, darunter BAX, DAXX und pRB, die nicht dauernd in PODs lokalisiert sind (Labbaye et al., 1999). Die Ursache für diese transiente Lokalisierung verschiedener Proteine in PODs ist noch weitgehend unbekannt. RERE ist somit ein neues Protein, das teilweise in PODs nachgewiesen wurde. Diese Kolokalisierung von RERE Aggregaten und PODs nahm mit der Größe der RERE Aggregate zu. Nur in etwa 8 % der

transfizierten Zellen wurde keine Kollokalisierung von RERE Aggregaten mit PODs nachgewiesen. In diesen Zellen waren kleinere RERE Aggregate häufig in der Nähe von PODs lokalisiert. PODs sind für die Regulation verschiedener Zellfunktionen notwendig, darunter Funktionen wie Zellteilung, Wachstum und Zelltod (Koken et al., 1995; Zhong et al., 1999; Labbaye et al., 1999). Die in PODs lokalisierten Proteine PML, pRB, p53 und BAX sind als Tumorsuppressor-Gene beschrieben (Zhong et al., 2000b, Wang et al., 1998). So wirkt beispielsweise das PML Protein einer Tumorentstehung in verschiedenen Geweben entgegen, indem es das Zellwachstum blockiert und sowohl Szeneszens als auch Apoptose induzieren kann (Wang et al., 1998). Dabei interagiert PML direkt mit p53 und wirkt auch als Transkriptions-Koaktivator (Ferbeyre et al., 2000). Darüber hinaus sind PML^{-/-} Mäuse und Zellen resistent gegen verschiedene apoptotische Signale wie beispielsweise radioaktive Strahlung und TNF alpha. Dies zeigt, dass PML für die Aktivierung verschiedener zentraler Proteine im Signalübertragungsweg der Apoptose, wie beispielsweise Kaspase-1 und Kaspase-3, notwendig ist (Wang et al., 1998).

Somit scheint PML in einen kaspaseabhängigen, durch p53 regulierten, cytotoxischen Prozess involviert zu sein (Guo et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine hohe zelluläre Konzentration von RERE Protein Apoptose hervorrufen kann. Diese Beobachtung korreliert stark mit der Funktion von PML und BAX. Während eine hohe zelluläre PML Konzentration einen kaspaseunabhängigen Zelltod induziert, scheint die Expression von gesamten RERE Protein einen Kaspase-vermittelten Zelltod hervorzurufen. Durch die Aktivierung von Kapsasen ist der durch die Überexpression von RERE induzierte Zelltod eher mit dem durch BAX Protein induzierten Zelltod vergleichbar als mit dem schnellen, kaspase-unabhängigen Zelltod, welcher durch exogenes PML induziert wird. Wie bei allen funktionellen Studien mit überexprimiertem Protein, müssen für die funktionelle Analyse von endogenem RERE noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dies ist notwendig, da eine hohe Proteinkonzentration eine Reaktion in der Zelle hervorrufen kann, die sich von der Funktion des endogenen Proteins unterscheiden kann. Mögliche Ansätze, für die Überprüfung ob endogenes RERE an der Apoptose beteiligt ist, sind Untersuchungen ob die Induktion von Apoptose einen Einfluß auf die Menge oder die zelluläre Verteilung von RERE Protein hat. Für diese Untersuchungen könnte beispielsweise die in dieser Arbeit beschriebene quantitative RT-PCR Methode und die Immunfärbung von Zellen mit den hergestellten Antikörpern, vor und nach der Induktion der Apoptose durch pro-apoptotische Substanzen, durchgeführt werden.

5.4. Zelluläre Verteilung von RERE und N-terminalen RERE Fragmenten im Vergleich zu BAX und Mitochondrien

Ein weiterer Hinweis auf eine Verknüpfung der RERE Funktion mit POD-vermitteltem Zelltod war neben der Kolo-kalisierung von RERE mit PML die Kolo-kalisierung von RERE und BAX. Etwa 95 % der transfizierten Zellen mit zytoplasmatischem RERE Anteil zeigten im Zytoplasma eine Kolo-kalisierung mit immunologisch nachgewiesenem BAX. Darüber hinaus wurden in etwa 40 % der transfizierten Zellen BAX in PODs nachgewiesen. In keiner untransfizierten Zelle wurde die Lokalisierung von BAX in PODs beobachtet. Die Lokalisierung von BAX in PODs ist auch in HeLa Zellen beschrieben, die PML überexprimieren (Quignon et al., 1998). Die beschriebene Kolo-kalisierung von zytoplasmatischem RERE mit BAX aber nicht mit anderen Proteinen, die zumindest zeitweise im Zytoplasma lokalisiert sind, wie beispielsweise BCL-2 (Daten nicht gezeigt) und beta-Aktin sowie dem p58 K Golgi Protein, könnte darauf hinweisen, dass RERE in hohen Konzentrationen direkt oder indirekt die Lokalisierung von BAX in PODs vermitteln kann. Die Aggregation von BAX um den Zellkern sowie die Lokalisierung von BAX in der Mitochondrienmembran ist nach der Behandlung von Dickdarmkarzinomzellen mit EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor)-spezifischen Antikörpern, die eine Aktivierung des EGF Rezeptors verhindern, gezeigt (Mandal et al., 1998). Möglicherweise ist die Lokalisierung des pro-apoptotischen Proteins BAX in PODs und die Aggregation um den Zellkern ein durch die Expression von RERE hervorgerufener Mechanismus, der die Apoptose auslösen kann. Auf eine pro-apoptotische Funktion von RERE deutet auch die gemeinsame Lokalisierung von zytoplasmatischem RERE und BAX mit Mitochondrien hin, die in etwa 81 % der transfizierten Zellen detektiert wurde. Das pro-apoptotische Protein BAX spielt eine direkte Rolle bei der Bildung von Porenkomplexen in der Mitochondrienmembran und der daraus resultierenden Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren wie beispielsweise Cytochrom C. Als Folge dieses Prozesses werden Kaspasen aktiviert, die dann verschiedene Substrate schneiden können. PARP (Poly(ADP-ribose)Polymerase, beteiligt an der Reparatur von DNA Brüchen) beispielsweise wird durch Kaspase 3 in zwei Fragmente gespalten und dadurch inaktiviert. Eines der PARP Fragmente wurde in RERE transfizierten Zellen nachgewiesen. Für BAX ist durch Untersuchungen mit BAX^{-/-} Mäusen eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose in Nervenzellen nachgewiesen worden, da während der Embryonalentwicklung Neuronen in verschiedenen Regionen nicht wie normal durch Apoptose beseitigt wurden, sondern sich abnormal vermehrten (Deckwerth et al., 1996).

Bei der Untersuchung der N- und C-terminalen RERE Fragmente betrug die beobachtete zytoplasmatische Kolokalisierung der N-terminalen RERE Aggregate mit BAX bei N381 etwa 60 % und bei N581 etwa 67 % der transfizierten Zellen, während nur 5 % eine Kolokalisation von C-terminalen RERE Aggregaten mit BAX zeigten. Eine Lokalisierung von BAX in PODs, wie in RERE transfizierten Zellen, wurde nach der Transfektion mit den N- und C-terminalen RERE Konstrukten bisher nicht nachgewiesen. Der prozentuale Anteil an Zellen mit RERE Aggregaten die mit Mitochondrien kolokalisierten betrug für RERE-N381 etwa 73 % und für RERE-N581 etwa 68 %. C-terminale RERE Aggregate waren in etwa 8 % der transfizierten Zellen mit Mitochondrien kolokalisiert.

Das ähnlichen Verteilungsmuster von RERE und von N-terminalen RERE Fragmenten mit PML, BAX und mit Mitochondrien, deuten auf eine wichtige Rolle der N-terminalen Region von RERE bei der Lokalisierung mit PODs im Zellkern sowie mit BAX und Mitochondrien im Zytoplasma hin. Diese, für die Kolokalisierung wichtige Proteinregion, konnte bis auf die N-terminalen 381 Aminosäuren (N381) eingegrenzt werden. Mindestens bei einer der identifizierten RERE Splicevarianten sowie bei dem homologen, Protein, DRPLA fehlt diese Region. Möglicherweise ist das Fehlen dieser Region die Ursache, weshalb DRPLA Protein nicht mit PODs assoziiert, sondern meist gleichmäßig im Zellkern verteilt ist (Miashita et al., 1998).

5.5. Mögliche Funktionen des RERE Proteins

RERE und DRPLA können über die proximale RE-Region, die beide ähnliche alpha-helikale Strukturen bilden, miteinander interagieren (Yanagisawa et al., 2000). Die Bildung von RERE Aggregaten kann verhindert werden, wenn Zellen mit cDNA von RERE und DRPLA ko-transfiziert werden (Yanagisawa et al. 2000). Eine gleichmäßige Verteilung von RERE, hauptsächlich im Zellkern, wurde außerdem bei Zellen mit geringer GFP-RERE Färbung nachgewiesen und ist auch von Yanagisawa et al., 2000 beschrieben worden. Diese Beobachtungen könnten darauf hindeuten, dass RERE nur mit PODs kolokalisiert, wenn es im Überschuß zu DRPLA exprimiert wird. Eine hypothetische Annahme ist, dass die homologen Proteine der Atrophin-1 Familie, die eine RERE Domäne besitzen, darunter auch die RERE Varianten, ihre Aktivität durch gemeinsame Interaktionen regulieren können. Ein vergleichbarer Mechanismus wurde für verschiedene Mitglieder der BCL-2 Familie, darunter BCL-2, BAX und BCL-XL beschrieben, die über gemeinsame BH Domänen interagieren und

dadurch ihre Aktivität regulieren (Yang et al., 1996). Kommen anti-apoptotische Proteine wie beispielsweise BCL-2 im Überschuß vor, ist die Zelle teilweise vor Apoptose geschützt. Tritt jedoch das pro-apoptotische Protein BAX im Überschuß auf, kann die Apoptose in der Zelle induziert werden (Yang et al., 1996). Ob die identifizierten RERE Splicevarianten verschiedene Funktionen in der Zelle haben, die möglicherweise über eine Interaktion mit PML und/oder BAX vermittelt werden, kann erst durch weitere Versuche bestimmt werden. Alternative Genprodukte sowie Proteine, die durch Mutationen funktionslos geworden sind und bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle spielen, sind für das BAX Gen (Mejerink et al., 1998) sowie das PML Gen (Fagioli et al., 1992; de The et al., 1991) beschrieben.

Die Kolokalisierung von RERE mit PODs und mit Mitochondrien könnte auf einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen RERE, PML und BAX sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma hindeuten. Während RERE im Zellkern zusammen mit weiteren Proteinen der PODs die Transkription verschiedener Gene beeinflussen könnte, ist bei der zytoplasmatischen RERE Fraktion eine Beteiligung von RERE bei der durch Mitochondrien induzierten Apoptose möglich. Eine mögliche Beteiligung von RERE bei der Apoptose wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.6. Rolle von RERE in apoptotischen Prozessen

Die Expression von RERE in verschiedenen Zelllinien war toxisch für die Zellen. Dies wurde unabhängig auch von Yanagisawa et al., 2000 beschrieben. Möglicherweise war aufgrund der toxischen Funktion von RERE Protein die Selektion stabiler Klone in dieser Arbeit auch mit einem tetracyclinabhängigen Selektionssystem, das die Expression des Proteins stark verringern aber nicht vollständig unterdrücken kann, nicht möglich. In Zellen, die mit einem C-terminalen GFP-RERE Konstrukt transfiziert wurden, konnte bereits 14 Stunden nach der Transfektion eine Fraktion toter Zellen durch Propidiumjodidfärbung nachgewiesen werden, die etwa 3fach höher war als in einem vergleichbaren Ansatz mit GFP oder GFP-RERE transfizierten Zellen. Der Mechanismus des schnellen Zelltodes, der nicht bei der Transfektion mit dem gesamten RERE oder einem der N-terminalen RERE Fragmente detektiert wurde, ist bisher nicht weiter untersucht worden. Ein ähnlich schnell induzierter Zelltod ist für die Expression von PML beschrieben und als ein kaspase-unabhängiger Zelltod charakterisiert (Quignon et al., 1998). Verschiedene bisherige Untersuchungen lassen einen Zusammenhang zwischen zytoplasmatischen RERE Aggregaten und der Toxizität für die

Zelle vermuten. Nach 14 Stunden zeigten etwa 70 % der RERE transfizierten Zellen die Lokalisierung von RERE ausschließlich im Kern und dort teilweise als Kernaggregate. Nur in etwa 30 % der Zellen wurden zytoplasmatische Aggregate festgestellt. N-terminale RERE Fragmente waren sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma verteilt aber nur in etwa 10 - 20 % in Aggregaten konzentriert. Das C-terminale Konstrukt zeigte bereits nach 14 Stunden zytoplasmatische Aggregate in etwa 60 % der transfizierten Zellen. Im Zusammenhang, dass zytoplasmatisches RERE toxisch für die Zelle ist, steht auch die Beobachtung, dass in RERE transfizierten Zellkulturen der Neuroblastom Zelllinie NGP nach 4 Tagen nur Zellen ohne einen nachweisbaren zytoplasmatischen RERE Anteil keine apoptotischen Merkmale aufwiesen. Der Anteil dieser Zellen betrug etwa 1 - 2 % und die detektierte Verteilung von RERE war ausschließlich nukleär in Form von 6 - 10 RERE Aggregaten (Daten nicht gezeigt).

Bei etwa 90 % der RERE transfizierten Zellen wurde nach etwa 4 Tagen typische apoptotische Merkmale wie die Kondensation des Chromatins, Fragmentierung der Kern DNA und das Zusammenschrumpfen des Zytoplasmas beobachtet. Diese morphologischen Veränderungen im Zellkern entstehen durch das enzymatische Zerschneiden der genomischen DNA und wurden mittels der TUNEL Methode nachgewiesen. Auch die Aktivierung der Poly(ADPribose)Polymerase (PARP) wurde immunologisch detektiert. PARP Aktivierung ist ein proteolytischer Prozess, der von der aktivierten Kaspase-3, einem Mitglied der ICE/CED-3 Familie, durchgeführt wird. Dieser Prozess geht der Zerstörung der DNA Struktur voraus. Durch die Blockierung der Kaspase-3 Aktivität mit einem spezifischen Inhibitor wurde in dieser Arbeit die Apoptose in RERE transfizierten Zellen verhindert. Dies deutet darauf hin, dass RERE einen kaspaseabhängigen Zelltod induzieren kann.

In einem Transfektionsansatz mit dem C-terminalen RERE Fragment wurde bereits nach 14 Stunden ein erhöhter prozentualer Anteil toter Zellen durch Propidiumjodidfärbung nachgewiesen, verglichen mit einem GFP-Kontrollansatz. In den transfizierten Zellen war keine Kolokalisierung des RERE Fragments mit BAX oder mit Mitochondrien nachweisbar. Im Gegensatz dazu, wurde 14 h nach der Transfektion von RERE (full length) oder dem N-terminalen RERE Fragmenten, eine Kolokalisierung von RERE, BAX und Mitochondrien nachgewiesen aber keine erhöhte Anzahl toter Zellen detektiert. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass RERE und das C-terminale RERE Fragment durch verschiedene Signalwege den Zelltod hervorrufen können.

Das ebenfalls in PODs lokalisierte Protein DAXX kann Apoptose induzieren und interagiert mit PML (Torii et al., 1999; Zhong et al., 2000). Die pro-apoptotische Funktion von DAXX und seine Konzentration in Kernaggregaten ist in PML^{-/-} Zellen aufgehoben. Eine interessante Frage ist, ob die zelluläre Verteilung von exprimiertem RERE in PML^{-/-} Zellen ebenfalls verändert ist, und ob diese Zellen vor der Induktion der Apoptose durch RERE geschützt sind. Zur Zeit steht jedoch kein geeignetes Zellsystem zur Verfügung. DAXX kann außerdem als Repressor der Transkription agieren und auch PML ist vermutlich als Kofaktor, der mit CBP (Creb Binding Protein) interagiert, an der Regulation der Transkription wie beispielsweise p53 beteiligt (Zhong et al., 2000; Guo et al., 2000; Pearson et al., 2000; Ferbeyre et al., 2000). Darüber hinaus sind PODs Regionen mit aktiver Transkription (Zhong et al., 2000). Vor diesem Hintergrund scheint es interessant, dass das DRPLA Protein, dessen C-terminale Region homolog zu RERE ist, nicht in PODs lokalisiert ist, sondern im Zellkern mit einem nukleärem Rezeptor-Repressorkomplex (nuclear receptor corepressor complex) interagiert und damit an der Transkriptionsregulation verschiedener Gene beteiligt sein kann (Wood et al., 2000). Weitere Untersuchungen mit einem heterologen Transkriptions-Reporter-System sind notwendig, um die bisher vermutete Funktion von RERE bei der Regulation der Transkription zu untersuchen. RERE könnte dabei, ähnlich wie PML, eine Rolle als Kofaktor spielen, da eine DNA bindende Domäne in RERE nicht enthalten ist. Diese Hypothese könnte durch den Vergleich der Genexpression von RERE transfizierten und nicht transfizierten Zellen geprüft werden (differentielle Genexpression).

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass RERE, möglicherweise ähnlich wie PML, DAXX und andere POD assoziierte Proteine, im Zellkern eine Rolle bei der Transkription von Genen ausüben kann und darüber hinaus im Zytoplasma eine toxische Funktion aufweist. Bisher sind keine Faktoren bekannt die eine Transkription von RERE begünstigen oder eine Kolo-kalisierung von RERE mit PML induzieren, die bei der Untersuchung von endogenem RERE in HeLa Zellen nicht nachgewiesen wurde. Die verschiedenen identifizierten Splicevarianten könnten möglicherweise verschiedene Funktionen haben. Weiter könnte auch spekuliert werden, dass die beiden nachgewiesenen, veränderten Proteinbanden, die zwar die N-terminale Region enthalten aber möglicherweise nicht mehr die C-terminale Region beinhalten, das Überleben entarteter Zellen begünstigen können.

5.7. Die Bildung von RERE Aggregaten im Zusammenhang mit zellulären Veränderungen bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen

Nach einem Zeitraum von etwa 4 Tagen nach der Transfektion zeigte die zelluläre Verteilung von RERE eine Ähnlichkeit mit Strukturen, wie sie bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen auftreten. Es wurde eine Abnahme der Anzahl an RERE Aggregaten im Kern aber teilweise auch im Zytoplasma festgestellt, die möglicherweise durch die Aggregation einzelner RERE Komplexe zu großen Aggregaten hervorgerufen wurde. Die Bildung von auffälligen Aggregaten im Zellkern oder im Zytoplasma ist eine häufig beobachtete Erscheinung aber keine Voraussetzung von sterbenden Zellen bei verschiedenen zelldegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise DRPL und Huntington (Nagafuchi et al., 1994; Koide et al., 1994; Mangiarini et al., 1996). Es scheinen verschiedene Ursachen für diese Aggregatbildung verantwortlich zu sein. Neben der unspezifischen Interaktion von Polyglutamin-wiederholungen mit anderen Proteinen (Miyashita et al., 1998) wird für eine gesteuerte Aggregatbildung die Beteiligung des Glukokortikoid-Rezeptors ebenso beschrieben wie die Aktivierung der Aggregatbildung durch Kaspasen (Diamond et al., 2000; Ellerby et al., 1999).

Die in dieser Arbeit beschriebene Bildung von RERE Aggregaten im Zellkern und Zytoplasma auch in Anwesenheit eines Kaspase-3 Inhibitors, der die Zellen vor der DNA Fragmentierung bei der Apoptose schützte, deutet auf kaspaseunabhängige Aggregatbildung hin. Vergleichbare Ergebnisse sind für die Expression von Huntingtin veröffentlicht, wobei in kultivierten Nervenzellen ein Kaspaseinhibitor zwar die Apoptose blockiert aber nicht die Bildung von huntingtinhaltigen Aggregaten im Zellkern unterbindet (Saudou et al., 1998). Ein Beispiel für die kaspaseabhängige Bildung von Aggregaten ist das Atrophin-1 Protein, das fast identisch mit dem DRPLA Protein ist, aber keine amplifizierte Glutaminsequenzen enthält. Erst nach einem enzymatischen Schnitt, durch Kaspasen, an der Aminosäureposition Asparaginsäure (109) zeigt Atrophin-1 eine zelltoxische Wirkung und bildet erst dann auffällige Aggregate im Zellkern und im Zytoplasma (Ellerby et al., 1999). Der Aminosäure-Sequenzvergleich der Kaspaseschnittstelle von Atrophin-1 (¹⁰⁶DSL¹⁰⁹) zeigt keine Homologie mit der entsprechenden Region der RERE cDNA Sequenz (³⁹⁶WTED³⁹⁹) oder einer anderen Region der RERE Sequenz. Sollte die in RERE veränderte Sequenz nicht durch Kaspasen geschnitten werden, könnte dies erklären, weshalb die Aggregatbildung von RERE eine Aktivierung durch Kaspasen nicht benötigt.

Bei der DRPLA Erkrankung und möglicherweise bei weiteren degenerativen Erkrankungen ist die Inhibition der Apoptose ein Therapieansatz um die Ausbreitung der Krankheit zu verlangsamen. Als therapeutische Zielmoleküle eignen sich dazu beispielsweise die Kaspasen. Im Gegensatz zu der Blockierung von Apoptosesignalwegen in degenerativen Erkrankungen, kommt es bei der Behandlung von Krebs darauf an, gezielt Apoptose in Tumorzellen zu induzieren (Nicholson, 2000).

5.8. Pro-apoptische Therapieansätze zur Behandlung von Krebs

Fasst man die bisherigen Daten über Krebs zusammen, so scheint in den meisten, vielleicht sogar in allen Tumoren, ein blockierter Apoptose-Signalübertragungsweg die Ursache für das unkontrollierte Zellwachstum innerhalb eines Zellverbundes zu sein (Hanahan und Weinberg, 2000). Da in jeder Zelle - also auch in Tumor Zellen - vermutlich alle notwendigen Proteine für verschiedene, parallele Apoptose-Signalübertragungswege zur Verfügung stehen, könnte die spezifische Aktivierung eines intakten aber im Tumor nicht aktivierten Apoptose-Signalwegs eine gezielte Tumorbehandlung ermöglichen. Als Beispiel sind hier zwei relativ neue Therapieansätze erwähnt die bisher deutlich weniger Schädigungen von normalem Gewebe zeigten als die Kombination von Chemo- und Strahlentherapie und somit auch die oft beträchtlichen Nebenwirkungen und akuten gesundheitlichen Risiken für den Patienten während und nach der Behandlung vermindern könnten. Am Beispiel von malignen Melanomen ist in einer klinischen Phase II Studie gezeigt worden, dass die zusätzliche Gabe von BCL-2 Antisense-Molekülen (G-3139, Fa. Genta) den Gehalt an anti-apoptischen BCL-2 senken kann und die Apoptoserate, die durch das Antitumorpräparat Dacarbazin induziert wird, signifikant erhöht (Jansen et al., 2000).

Ein weiterer Ansatz zur Aktivierung der Apoptose in Tumorzellen geht über den pro-apoptischen TRAIL-Rezeptor-Signalübertragungsweg. Etwa 80 % aller Krebszellen, darunter Krebszellen des Dickdarms, der Lunge, der Brust, des Gehirns, der Haut und der Niere sind empfindlicher für pro-apoptische Signale die über den TRAIL-Membran-Rezeptor vermittelt werden als die meisten anderen Gewebe. Die molekularen Ursachen für diese gesteigerte Empfindlichkeit verschiedener Tumorzellen ist nicht bekannt. Jedoch kann die TRAIL-Rezeptor vermittelte Apoptose vermutlich auch in Tumorzellen induziert werden die kein funktionelles pro-apoptisches p53 oder einen hohen Gehalt an anti-apoptischen

BCL-2 enthalten und dadurch teilweise resistent gegenüber bisherigen Chemotherapien sind (Takimoto, 2000). Präklinische Untersuchungen mit humanem Tumorgewebe, welches in immunsupprimierte Mäusen verpflanzt wurde, sind Erfolg versprechend. Bei der Behandlung mit einem aktivierenden TRAIL-Liganden konnte ein vermindertes Tumor-Wachstum oder eine Abnahme der Tumor-Masse bei verschiedenen Tumoren beobachtet werden. Bei Glioblastom Tumorgewebe konnte sogar eine komplette Remission des implantierten Tumorgewebes nachgewiesen werden (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde RERE erstmals als ein POD assoziiertes Protein beschrieben und bei zwei verschiedenen Tumoren in Form von zusätzlichen kurzen Proteinbanden nachgewiesen. Die Kolokalisierung mit PML, BAX und Mitochondrien sowie die Induktion von Apoptose durch die Expression des RERE Proteins ergaben erste Hinweise auf ein funktionelles Zusammenspiel von RERE mit weiteren wichtigen POD-Komponenten, möglicherweise bei der Regulation von Transkriptionsprozessen und / oder der Apoptose.

6. ANHANG

Dot-Blot Gewebeverteilung für Abb. 4-5:

whole brain	cerebellum, left	substantia nigra	heart	esophagus	colon, transverse	kidney	lung	liver	leukemia, HL-60	fetal brain	yeast total RNA
cerebral cortex	cerebellum, right	accumbens nucleus	aorta	stomach	colon, descending	skeletal muscle	placenta	pancreas	HeLa S3	fetal heart	yeast tRNA
frontal lobe	corpus callosum	thalamus	atrium, left	duodenum	rectum	spleen	bladder	adrenal gland	leukemia, K-562	fetal kidney	E.coli rRNA
parietal lobe	amygdala	pituitary gland	atrium, right	jejunum		thymus	uterus	thyroid gland	leukemia, MOLT-4	fetal liver	E.coli DNA
occipital lobe	caudate nucleus	spinal cord	ventricle, left	ileum		PBL	prostate	salivary gland	Burkitt's lymphoma, Raji	fetal spleen	Poly r(A)
temporal lobe	hippocampus		ventricle, right	ileoecum		lymph node	testis	mammary gland	Burkitt's lymphoma Daudi	fetal thymus	human COI-DNA
p.g.* of cerebral cortex	medulla oblongata		inter-entricular septum	appendix		bone marrow	ovary		colorectal adenocarcinoma, SW480	fetal lung	human DNA 100 ng
pons	putamen		apex of the heart	colon, ascending		trachea			lung carcinoma, A549		human DNA 500 ng

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ameisen, J.C. (1996) The origin of programmed cell death. *Science*, 272, 1278-1279.
- Amler, L.C., Corvi, R., Praml, C., Savelyeva, L., Le Paslier, D. und Schwab, M. (1995) A reciprocal translocation (1;15) (36.2;q24) in a neuroblastoma cell line is accompanied by DNA duplication and may signal the site of a putative tumor suppressor-gene. *Oncogene*, 10, 1095-1101.
- Ascoli, C.A. und Maul, G.G. (1991) Identification of a novel nuclear domain. *J. Cell Biol.*, 112, 785-795.
- Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J.; Koeppen, H., Shahrokhi, Z., Schwall, R.H. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J. Clin. Invest.* 104, 155-162.
- Bader, S.A., Fasching, C., Brodeur, G.M. und Stanbridge, E.J. (1991) Dissociation of suppression of tumorigenicity and differentiation in vitro effected by transfer of single human chromosomes into human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ.*, 5, 245-255.
- Becher, M.W., Kotzlik, J.A., Sharp, A.H., Davies, S.W., Bates, G.P., Price, D.L. und Ross, C.A. (1998) Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and pallidolusian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length. *Neurobiol. Dis.*, 4, 387-397.
- Becker, M., Martin, E., Schneikert, J., Krug, H.F. und Cato, A.C. (2000) Cytoplasmic localization and the choice of ligand determine aggregate formation by androgen receptor with amplified polyglutamine stretch. *J. Cell Biol.* 149, 255-262.
- Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E. und Freemont, P.S. (1996) PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene*, 13, 971-982.
- Casciano, I., Marchi, J.V., Muresu, R., Volpi, E.V., Rozzo, C., Opdenakker, G. und Romani, M. (1996) Molecular and genetic studies on the region of translocation and duplication in the neuroblastoma cell line NGP at the 1p36.13-p36.32 chromosomal site. *Oncogene*, 12, 2101-2108.
- Chausovsky, A., Waterman, H., Elbaum, M., Yarden, Y., Geiger, B. und Bershadsky, A.D. (2000) Molecular requirements for the effect of neuregulin on cell spreading, motility and colony organization. *Oncogene*, 19, 878-888.
- de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L. und Dejean, A. (1991) The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell*, 66, 675-684.
- Dmitrieva, N., Kultz, D., Michea, L., Ferraris, J. und Burg, M. (2000) Protection of renal inner medullary epithelial cells from apoptosis by hypertonic stress-induced p53 activation. *J Biol Chem* 275, 18243-18247.

- Downward, J. (1992) Regulatory mechanisms for ras proteins. *BioEssays*, 14, 177-184.
- Dyck, J.A., Maul, G.G., Miller, W.H.Jr., Chen, J.D., Kakizuka, A. und Evans, R.M. (1994) A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell*, 76, 333-343.
- Efthymiadis, A., Shao, H., Hubner, S. und Jans, D.A. (1997) Kinetic characterization of the human retinoblastoma protein bipartite nuclear localization sequence (NLS) in vivo and in vitro. A comparison with the SV40 large T-antigen NLS. *J. Biol. Chem.*, 272, 22134-22139.
- Ellerby, L.M., Andrusiak, R.L., Wellington, C.L., Hackam, A.S., Propp, S.S., Wood, J.D., Sharp, A.H., Margolis, R.L., Ross, C.A., Salvesen, G.S., Hayden, M.R. und Bredesen, D.E. (1999) Cleavage of atrophin-1 at caspase site aspartic acid 109 modulates cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 274, 8730-8736.
- Fagioli, M., Alcalay, M., Pandolfi, P.P., Venturini, L., Mencarelli, A., Simeone, A., Acampora, D., Grignani, F. und Pelicci, P.G. (1992) Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene*, 7, 1083-1091.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C. und Lowe, S.W. (2000) PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.*, 14, 2015-27.
- Goddard, A.D., Borrow, J., Freemont, P.S. und Solomon, E. (1991) Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science*, 254, 1371-1374.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong S., Gu, W. und Pandolfi, P.P. (2000) The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nature Cell Biology*, 2, 730-736.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70
- Hodges, M., Tissot, C., Howe, K., Grimwade, D. und Freemont, P.S. (1998) Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am. J. Hum. Genet.*, 63, 297-304.
- Holmberg, M., Duyckaerts, C., Durr, A., Cancel, G., Gourfinkel-An, I., Damier, P., Faucheux, B., Trottier, Y., Hirsch, E.C., Agid, Y. und Brice, A. (1998) Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 913-918.
- Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S. und Kakizuka, A. (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nature Genet.*, 13, 196-202.

- Jansen, B. et al. (2000) BCL-2 antisense plus dacarbazine therapy for malignant melanoma. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. Conf. Programmed Cell Death Regulation, A59.
- Kakizuka, A., Miller, W.H.Jr., Umesono, K., Warrell, R.P.Jr., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E. und Evans, R.M. (1991) Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. Cell, 66, 663-674.
- Khan, F.A., Margolis, R.L., Loev, S.L., Sharp, A.H., Li, S.H. und Ross C.A. (1996) cDNA cloning and characterization of an atrophin-1 (DRPLA disease gene)-related protein. Neurobiol. Dis., 3, 121-128.
- Knight, S.P., Richardson, M.M., Osmand, A.P., Stakkestad A. und Potter, N.T. (1997) Expression and distribution of the dentatorubral-pallidoluysian atrophy gene product (atrophin-1/drplap) in neuronal and non-neuronal tissues. J Neurol Sci., 146, 19-26.
- Knudson, A.G. (1996) Hereditary cancer: two hits revisited. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 122, 135-140.
- Koide, R., Ikeuchi, T., Onodera, O., Tanaka, H., Igarashi, S., Endo, K., Takahashi, H., Kondo, R., Ishikawa, A. und Hayashi, T. (1994). Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). Nature Genet., 6, 9-13.
- Koken, M.H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thepot, J., Juhlin, L., Degos L., Calvo F. und de The, H. (1995) The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. Oncogene, 10, 1315-1324.
- Koken, M.H., Puvion-Dutilleul, F., Guillemin, M.C., Viron, A., Linares-Cruz, G., Stuurman, N., de Jong, L., Szostecki, C., Calvo, F., Chomienne, C., et al. (1994) The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. EMBO J., 13, 1073-1083.
- Labbaye, C., Valtieri, M., Grignani, F., Puglisi, R., Luchetti, L., Masella, B., Alcalay, M., Testa, U. und Peschle, C. (1999) Expression and role of PML gene in normal adult hematopoiesis: functional interaction between PML and Rb proteins in erythropoiesis. Oncogene, 18, 3529-3540.
- Luria, S.E., Adams, I.N. und Ting, R.C. (1960) Transduction of lactose utilizing ability among strains of E.coli and S.dysenteriae and properties of transducing phage particle. Virology, 12, 348-390.
- Lutz, W., Fulda, S., Jeremias, I., Debatin, K.M. und Schwab, M. (1998) MycN and IFNgamma cooperate in apoptosis of human neuroblastoma cells. Oncogene, 17, 339-346.
- Malkin, D.und Portwine, C. (1994) The genetics of childhood cancer. Eur. J. Cancer, 30, 1942-1946.

- Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J. und Kumar, R. (1998) Nuclear targeting of Bax during apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncogene*, 17, 999-1007, 1998.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W. und Bates G.P. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87, 493-506.
- Marin, M.C., Jost, C.A., Brooks, L.A., Irwin, M.S., O'Nions, J., Tidy, J.A., James, N., McGregor, J.M., Harwood, C.A., Yulug, I.G., Vousden, K.H., Allday, M.J., Gusterson, B., Ikawa, S., Hinds, P.W., Crook, T. und Kaelin, W.G Jr. (2000) A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nature Genet.*, 25, 47-54
- Maris, J.M. und Matthay, K.K. (1999) Molecular biology of neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* 17, 2264-2279.
- Marshall, C.J. (1996) Ras effectors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, 197-204.
- Matera, A.G. (1999) Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.*, 9, 302-309.
- Meijerink, J.P., Mensink, E.J., Wang, K., Sedlak, T.W., Sloetjes, A.W., de Witte, T., Waksman, G. und Korsmeyer, S.J. (1998) Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood*, 91, 2991-2997.
- Mertens, F., Johansson, B., Hoglund, M. und Mitelman, F. (1997) Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res.*, 57, 2765-2780.
- Miyashita, T., Nagao, K., Ohmi, K., Yanagisawa, H., Okamura-Oho, Y. und Yamada, M. (1998) Intracellular aggregate formation of dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein with the extended polyglutamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 96-102.
- Muller, S., Matunis, M.J. und Dejean, A. (1998) Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.*, 17, 61-70.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G.T. und Ehrlich, H.A. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 51, 263-273.

- Nagafuchi, S., Yanagisawa, H., Sato, K., Shirayama, T., Ohsaki, E., Bundo, M., Takeda, T., Tadokoro, K., Kondo, I. und Murayama, N. (1994) Dentatorubral and pallidoluysian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. *Nature Genet.*, 6, 14-18.
- Nicholson, D.W. (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 407, 810-6.
- Ohba, Y., Mochizuki, N., Yamashita, S., Chan, A.M., Schrader, J.W., Hattori, S., Nagashima, K. und Matsuda, M. (2000) Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J. Biol. Chem.*, 275, 20020-20026.
- Okamura-Oho, Y., Miyashita, T., Ohmi, K. und Yamada, M. (1999) Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 947-957.
- Old, L.J. (1996) Immuntherapie gegen Krebs. *Spektrum der Wissenschaft Spezial: Krebsmedizin*.
- Pandolfi, P.P., Grignani, F., Alcalay, M., Mencarelli, A., Biondi, A., LoCoco, F., Grignani, F. und Pelicci, P.G. (1991) Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene*, 6, 1285-1292.
- Passegue, E. und Wagner, E.F. (2000) JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J.*, 19, 2969-2979.
- Paulson, H.L., Perez, M.K., Trottier, Y., Trojanowski, J.Q., Subramony, S.H., Das, S.S., Vig, P., Mandel, J.L., Fischbeck, K.H. und Pittman, R.N. (1997) Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron*, 19, 333-344.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P. und Pelicci, P.G. (2000) PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*, 406, 207-10.
- Phair, R.D. und Misteli, T. (2000) High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 404, 604-609.
- Pozniak, C.D., Radinovic, S., Yang, A., McKeon, F., Kaplan, D.R. und Miller, F.D. (2000) An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 289, 304-306.
- Puvion-Dutilleul, F., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M., Quignon, F., Puvion, E. und de The, H. (1995) Adenovirus infection induces rearrangements in the intranuclear distribution of the nuclear body-associated PML protein. *Exp. Cell. Res.*, 218, 9-16.
- Quignon, F., De Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J.C. und de The, H. (1998) PML induces a novel caspase-independent death process. *Nature Genet.*, 20, 259-265.

- Reese, M.G., Harris, N.L. und Eeckman, F.H. (1996) Large Scale Sequencing Specific Neural Networks for Promoter and Splice Site Recognition. *Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium*, Singapore.
- Rippmann, J.F., Hobbie, S., Daiber, C., Guilliard, B., Bauer M., Birk, J., Nar, H., Garin-Chesa, P., Rettig, W.J. und Schnapp, A. (2000) Phosphorylation-dependent Proline Isomerization Catalyzed by Pin1 Is Essential for Tumor Cell Survival and Entry into Mitosis. *Cell Growth Diff.*, 11, 409-416.
- Ross, C.A. (1997) Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases?. *Neuron*, 19, 1147-1150.
- Roth, M.B. (1995) Spheres, coiled bodies and nuclear bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 325-328.
- Ryan, K.M., Ernst, M.K., Rice, N.R. und Vousden, K.H. (2000) Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*, 404, 892-897.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. und Greenberg, M.E. (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, 95, 55-66.
- Schlesinger, T.K., Demali, K.A., Johnson, G.L. und Kazlauskas, A. (1999) Platelet-derived growth factor-dependent association of the GTPase-activating protein of Ras and Src. *Biochem J.*, 344, 519-526.
- Schmidt, E.V. (1996) MYC family ties *Nature Genet.*, 14, 8-10.
- Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., Dever-Bertrand, J. und Bertrand R. (2000) Characterization of Bax-sigma, a cell death-inducing isoform of Bax. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 868-879.
- Schrantz, N., Blanchard, D.A., Mitene, F., Auffredou, M.T., Vazquez, A. und Leca, G. (1999) Manganese induces apoptosis of human B cells: caspase-dependent cell death blocked by bcl-2. *Cell Death Differ.*, 6, 445-453.
- Schultheis, B., Kramer, A., Willer, A., Hegenbart, U., Goldschmidt, H., Hehlmann, R. (1999) Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma. *Leukemia*, 13, 2099-2103.
- Schwab, M., Praml, C. und Amler, L.C. (1996) Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer*, 16, 211-229.

- Spieker, N., Beitsma, M., van Sluis, P., Roobeek, I., den Dunnen, J.T., Speleman, F., Caron, H., Versteeg, R. (2000) An integrated 5-Mb physical, genetic, and radiation hybrid map of a 1p36.1 region implicated in neuroblastoma pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 143-152.
- Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemain, M.C., Schindler, C., et al. (1995) Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene*, 11, 2565-2573.
- Steiner, M.S., Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, X. und Lu, Y. (2000) p16/MTS1/INK4A suppresses prostate cancer by both pRb dependent and independent pathways. *Oncogene*, 19, 1297-1306.
- Takeda, O., Homma, C., Maseki, N., Sakurai, M., Kanda, N., Schwab, M., Nakamura, Y. und Kaneko, Y. (1994) There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma., *Genes Chromosomes Cancer*, 10, 30-39.
- Takimoto, R., El-Deiry, W.S. (2000) Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene*, 19, 1735-43.
- Tanaka, K., Yanoshita, R., Konishi, M., Oshimura, M., Maeda, Y., Mori, T. und Miyaki, M. (1993) Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 1p36 region. *Oncogene*, 8, 2253-2258.
- Torii, S., Egan, D.A., Evans, R.A. und Reed, J.C. (1999) Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J.*, 18, 6037-6049.
- Walczak, H; Bouchon, A., Stahl, H. Krammer, P.H. (2000) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2- or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells. *Cancer Res.*, 60, 3051-3057.
- Wang, Z.G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F. und Pandolfi, P.P. (1998) Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science*, 279, 1547-1551.
- Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R. und Pandolfi P.P. (1998) PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nature Genet.*, 20, 266-272.
- Warrick, J.M., Paulson, H.L., Gray-Board, G.L., Bui, Q.T., Fischbeck, K.H., Pittman, R.N. und Bonini, N.M. (1998) Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*, 93, 939-949.
- Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvalho, T., Carmo-Fonseca M., Lamond A. und Dejean, A. (1994) Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell*, 76, 345-356.

- Weith, A., Martinsson, T., Cziepluch, C., Bruderlein, S., Amler, L.C., Berthold, F. und Schwab, M. (1989) Neuroblastoma consensus deletion maps to 1p36.1-2. *Genes Chromosomes Cancer*, 1, 159-166.
- Westermarck, B., Heldin, C.H. und Nister, M. (1995) Platelet-derived growth factor in human glioma. *GLIA*, 15, 257-263.
- White, P.S., Maris, J.M. Beltinger, C., Sulman, E., Marshall, H.N., Fujimori, M., Kaufman, B.A., Biegel, J.A., Allen, C. und Hilliard, C. et al. (1995) A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 5520-5524.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G. und Youle, R.J. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell. Biol.* 139, 1281-1292.
- Wood, J.D., Nucifora, F.C. Jr, Duan, K., Zhang, C, Wang, J., Kim, Y., Schilling, G., Sacchi, N., Liu, J.M.und Ross, C.A. (2000) Atrophin-1, the dentato-rubral and pallido-lusian atrophy gene product, interacts with ETO/MTG8 in the nuclear matrix and represses transcription. *J. Cell Biol.*, 150, 939-948.
- Wu, KJ., Polack, A. und Dalla-Favera, R. (1999) Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science*, 283, 676-679.
- Yamamoto, H., Sawai, H. und Perucho, M. (1997) Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res.*, 57, 4420-4426.
- Yanagisawa, H., Bundo, M., Miyashita, T., Okamura-Oho, Y., Tadokoro, K., Tokunaga, K. und Yamada, M. (2000) Protein binding of a DRPLA family through arginine-glutamic acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1433-42.
- Yang, E. und Korsmeyer, S.J. (1996) Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, 88, 386-401.
- Zhong, S., Hu, P., Ye, T.Z., Stan, R., Ellis, N.A. und Pandolfi, P.P. (1999) A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene*, 18, 7941-7947.
- Zhong, S., Salomoni, P. und Pandolfi, P.P. (2000b) The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat. Cell. Biol.*, 2, 85-90.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D. und Pandolfi, P.P. (2000a) Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J. Exp. Med.*, 191, 631-640.

ZUSAMMENFASSUNG IN ENGLISCHER SPRACHE

Summary

RE RE (RE repeats encoded), a novel gene that was recently described by Yanagisawa et al. 2000 is located to the distal region of chromosome 1p. In this genomic region, molecular and cytogenetic studies have unveiled frequent structural rearrangements in several human malignancies (Meterns et al., 1997, Schwab et al., 1996). In neuroblastoma, comparison among extensive studies indicates a 10-cM region between genomic markers *DIS47* and *DIS244* at 1p36.2 that is consistently deleted (White et al., 1995; Takeda et al., 1994). These results, and the observation that introduction of a normal chromosome 1p region into neuroblastoma (Bader et al., 1991) or colorectal carcinoma (Tanaka et al., 1993) abolishes the tumor phenotype, suggest that this region contains one or more tumor suppressor genes. No strong candidate, however, has been identified so far. The neuroblastoma cell line NGP contains a reciprocal chromosomal translocation/duplication t(1;15)(p36.2;q24), dup(1)(p36.2-p36.3) (Casciano et al., 1996) which maps within the minimal deleted region (Amler et al., 1995). The genomic sequence of *RE RE* was recently identified to span this reciprocal translocation/duplication breakpoint in the cell line NGP (P. Gardellin, manuscript in preparation).

RE RE is related to the Dentatorubral and pallidolusian atrophy (*DRPLA*) gene that resides on chromosome 12p. *RE RE* RNA as well as *DRPLA* RNA, in general, are widely expressed (Yanagisawa et al., 2000, Knight et al., 1997). *DRPLA* protein contains an unstable expansion of a "CAG" repeat which, upon extension, leads to a polyglutamine stretch. In contrast, *RE RE* does not contain such a polyglutamine repeat. The C-terminal portion of the *RE RE* protein is homologous to the *DRPLA* protein with 67 % identical residues at corresponding positions, including two *RE RE* repeats. In addition to its homology to the *DRPLA* protein, the N-terminal portion of the *RE RE* protein contains an arginine-aspartic acid (RD) dipeptide repeat

and two putative nuclear localization signal sequences (NLSs) of mono-partite and bi-partite basic amino acid stretches (Yanagisawa et al., 2000; Efthymiadis et al., 1997). The polyglutamine stretch in DRPLA protein appears to be causal for a progressive neurodegenerative disorder through interaction with specific effector molecules including RERE protein (Yanagisawa et al., 2000; Koide et al., 1994). Effected brain areas are predominantly located to the dentate nucleus of the cerebellum and in the globus pallidus (Nagafuchi et al., 1994). The molecular mechanism underlying neuronal death seems to be common among seven different CAG/polyglutamine disorders including Huntington's disease, spinobulbar muscular atrophy (SBMA) and spinocerebellar ataxia (SCA 1,2,3,6 and 7). In affected brains of patients and model organisms (Ross et al., 1997; Mangaiarini et al., 1996), nuclear inclusion bodies are detected. These inclusion bodies seem to be consistent with aggregates formed in cells by overexpression of small proteins carrying an extended polyglutamine tract which induces apoptosis in cultured cells (Ikeda et al., 1996; Miyashita et al., 1998). DRPLA protein is a shuttle plying across the nuclear membrane; it functions in a signal transduction pathway coupled with insulin/IGF-1 (Okamura-Oho et al., 1999) and is a caspase substrate (Ellerby et al., 1999). Association of DRPLA protein with overexpressed RERE correlates with the appearance of nuclear aggregates of different sizes and with the induction of cell death (Yanagisawa et al., 2000).

In the nucleus, different kinds of small aggregates exist that delineate highly organized structural and functional sub-domains. One such type of discrete nuclear matrix-associated structures is variably named as PML (Promyelocytic leukemia) nuclear bodies, ND10, Kremer bodies or PODs (PML oncogenic domains, Ascoli et al., 1991; Roth et al., 1995; Koken et al., 1994; Weiss et al., 1994; Hodges et al., 1998). Cells typically contain 10-30 PODs per nucleus with diameters between 0,2 and 1 μm , although their number and size changes during the cell cycle (Koken et al., 1995).

PODs are rearranged in their intranuclear distribution in several pathogenic conditions including adenovirus infection (Puvion-Dutilleul et al., 1995) and acute promyelocytic leukemia (APL, Pandolfi et al., 1991; Goddard et al., 1991; de The et al;1991) in which PODs are dissociated to a diffuse distribution pattern in the nucleus. To date, several components of PODs have been identified in addition to the tumor suppressor PML, including the transcriptional regulators CBP, SP100, pRB and p53, as well as the pro-apoptotic proteins BAX and DAXX (for review see: Zhong et al., 2000; Matera et al., 1999). Another protein that is localized to PODs is the small ubiquitin-like modifier SUMO-1 (also known as PIC1 or sentrin). SUMO-1 is required for proper formation of PODs by covalent modification of PML through the binding of SUMO-1 at three lysine residues (Boddy et al., 1996). Unmodified PML is associated with the soluble nucleoplasmic fraction, whereas the SUMOylated PML fraction is tightly associated with the nuclear body (Muller et al., 1998). Only the correct formation of PODs allows the transient localization of other proteins, including those described above, to nuclear bodies (Zhong et al., 2000). Several of these proteins that are transiently located to PODs are known to be involved in pathways important for tumorigenesis, such as maintaining genomic stability (Zhong et al., 1999), regulating cell growth (Labbaye et al., 1999) and controlling cell survival (Zhong et al., 2000; Quignon et al., 1998; Wang et al., 1998; Torii et al., 1999). Functional connections and common signalling pathways between the POD components are currently being elucidated. Recent studies suggest a role of PML in p53-dependent apoptosis or senescence, depending on the cell type, that appears to involve PML-mediated acetylation of p53 by the acetyltransferase CBP in PODs (Guo et al., 2000; Pearson et al., 2000; Ferbeyre et al., 2000).

This work provides further information on the human *RERE* gene which is located across the translocation breakpoint in the neuroblastoma cell line NGP and which is homologous to the *DRPLA* gene. However, the breakpoint gene is clearly distinct from the *DRPLA* gene because its product contains additional 1104 amino acids at the N-terminus compared to the *DRPLA* protein. The reading frame of the breakpoint gene was identified as 1566 aminoacids and was

nearly identical to the recently described protein, designated as *RERE* (RE repeats encoded, Yanagisawa et al., 2000). The predicted protein sequence described here revealed the following differences: position 65: transition of G to S, position 68: transition T to A, position 114: V to E, position 115: C to S, position 921: G to A, position 940: A to P, position 977: T to K, position 984: H to N, position 1489: I to M, position 1490: V to L.

The exon-intron boundaries of the gene for *RERE* were determined by alignment of the *RERE* cDNA sequence against genomic sequences. The open reading frame (ORF) of *RERE* was detected as splitted into 22 exons and flanked by multiple stop codons. The exon containing the start codon contains a sequence of additional 147 bp of the 5' "non translated region". In exon 22, a stop codon and additional 572 bp of the 3' "non translated region" that was detected.

During the course of our experiments, Yanagisawa et al. published the observation, that *RERE* protein largely localizes to "nuclear speckles", without any further description of the nature of these domains. Here, the results demonstrate that in cells transiently expressing a high level of *RERE*, a large fraction of this protein is located to PML Oncogenic Domains (PODs). It is known that the formation of PODs is important for proper cell division and for cell growth control (Koken et al., 1995; Zhong et al., 1999; Labbaye et al., 1999). The POD associated proteins PML, pRB, p53 and BAX are characterized as tumor suppressors (Zhong et al., 2000; Quignon et al., 1998; Guo et al., 2000). PML antagonizes the initiation and progression of tumors of various histological origins acting as a cell growth suppressor (Wang et al., 1998). As PML^{-/-} mice and cells are resistant to different apoptotic signals, PML is also required for activation of caspase-1 and caspase-3 (Wang et al., 1998). This thesis provides data that a high cellular concentration of *RERE* induces apoptotic cell death, correlating with pro-apoptotic activity of PML and BAX. However, whilst strong expression of PML also induces caspase-independent cell death (Quignon et al., 1998), the expression of complete *RERE* in contrast appears to preferentially induce activation of caspases and concomitant

apoptosis. Thus the function of RERE may rather be comparable to the overexpression of pro-apoptotic BAX. Interestingly, it was detected that upon transfection of RERE, almost all transfected cells showed cytoplasmic colocalization of RERE and BAX and in addition, a fraction of cells showed recruitment of BAX from the cytosol to nuclear RERE aggregates. As a specific cytoplasmic colocalization of RERE protein with BAX but not with other proteins that are at least partially localized to the cytoplasm (BCL-2, RAR α , β -actin and p58 K golgi protein) was detected it might be possible that RERE plays a direct role in recruiting BAX to the nucleus and particularly to PODs. Thus, recruitment of pro-apoptotic proteins such as BAX to PODs may be the mechanism how RERE promotes apoptosis. Recruitment of cytoplasmic BAX to the nucleus has been described previously in apoptotic processes that are induced by anti-EGFR antibodies in colorectal carcinoma cells (Mandal et al., 1998). Localisation of BAX specifically to nuclear PODs has been described in HeLa cells expressing high levels of PML protein (Quignon et al., 1998), indicating a functional association of the two proteins.

The finding that RERE and N-terminal RERE fragments localize to mitochondria, which is the major organelle for initiating apoptosis, strengthens the hypothesis that RERE is involved in apoptosis. Mitochondria store different apoptotic co factors (such as cytochrome c and Smac/DIABLO) and their release is regulated by members of the BCL-2 family. The BCL-2 homologue BAX assembles in pore-forming multi protein complexes which mediate the release of pro-apoptotic factors that are stored in the mitochondria under most cellular conditions (Nichelson, 2000). Further protein interaction studies (e.g. with co-immunoprecipitation, or FLIM method (fluorescence lifetime imaging) will show if RERE interacts directly with BAX or PML and triggers cell death via a mitochondrial pathway.

RERE overexpressing cells showed typical apoptotic features three days after transfection, including chromatin condensation, nuclear fragmentation and internucleosomal DNA cleavage as detected by TUNEL assay. The cleavage of poly(ADPribose) polymerase (PARP)

which is a prior step to DNA fragmentation in the apoptotic process was also detected. PARP cleavage is caused by activated caspase-3, a member of the ICE/CED-3 family. It was detected that upon blocking caspase-3 activity with a caspase inhibitor, the induction of apoptosis is abolished. This indicates that RERE overexpression induces caspase-dependent apoptotic cell death. Another pro-apoptotic protein, DAXX, is also localized to nuclear PODs and interacts directly with PML (Torii et al., 1999). The pro-apoptotic activity of DAXX is abolished in the PML^{-/-} cells, where it is aberrantly localized in the nucleus. It remains to be seen if RERE localization is similarly altered in PML mutant mice. DAXX can function as a transcriptional repressor and also PML itself appears to be involved in transcriptional regulation of target genes such as p53 (Guo et al., 2000; Pearson et al., 2000; Ferbeyre et al., 2000), possibly as a co-factor via interaction with CBP (Zhong et al., 2000). Furthermore, PODs represent a site of active gene transcription within nuclei (Zhong et al., 2000). In this context, it is interesting to note that DRPLA which shows sequence homology with RERE, but which is apparently not localized to PODs associates with nuclear receptor corepressor complexes and thus may be involved in transcriptional regulation (Wood et al., 2000). Further studies using a heterologous transcriptional reporter system are required to address a potential role of RERE in transcriptional regulation, possibly as a co-factor, since a DNA-binding domain is not evident.

The investigation on the cellular localisation of various RERE protein products (full length RERE and N- or C-terminal deletion mutants of RERE) add further information on which regions of RERE enhance localization to PODs. Furthermore this thesis provides data on the morphology, number and size of RERE containing nuclear aggregates. In addition to the published uniform staining of the N-terminal RERE products, a significant fraction of nuclear aggregates containing N-terminal portions of RERE that colocalized with PODs in neuroblastoma cells was investigated in this thesis. In contrast, the nuclear staining of the C-terminal RERE portion indicated the localization to nuclear aggregates of which only a small percentage coincided with PODs. Thus it could be that the N-terminal part of RERE is mainly

responsible for the localization to small PML containing nuclear aggregates. Strikingly, this N-terminal RERE portion is not present in the homologous DRPLA protein and in two RERE splice variants that were identified in public databases; this suggests a lack of colocalization of these putative translation products with PODs. Indeed, this suggestion is supported by previous findings that overexpressed DRPLA, which interacts with RERE, localizes predominantly in the nucleus with almost uniform distribution (Miyashita et al., 2000). Localization of RERE to nuclear aggregates was also absent in cells with low RERE protein level (Yanagisawa et al., 2000) or in cells overexpressing both, RERE and its interacting partner DRPLA (Yanagisawa et al., 2000).

The results presented here do not only indicate that RERE localizes to PODs when it is highly expressed but also defines the importance of the N-terminal protein portion in this process. Different splice variants and loss of function mutants as well as their involvement in tumorigenesis are described for both, the BAX gene (Meijerink et al., 1998) and the PML gene (Fagioli et al., 1992; de The et al., 1991). It remains to be tested whether the different RERE splice variants have different functional properties such as interaction with PML and/or BAX as well as differences in their capability to induce apoptosis.

Investigation of the genomic organisation of the *RERE* locus did not indicate frequent genomic aberrations in the investigated neuroblastoma tumor cell lines. Southern Blot analysis revealed that only one neuroblastoma cell line, namely NMR, showed an altered restriction pattern with one additional band. As a hybridisation probe the radiolabelled partial cDNA of RERE that bridges the NGP breakpoint region (personal information from P. Gardellin) was used.

Northern blots with poly (A)⁺ RNA from normal tissues, neuroblastoma and other tumour cell lines as well as a dot blot of normal tissue and tumor cell lines were probed with a 5' radiolabelled RERE cDNA probe (see Materials and Methods). Two dominant transcripts of

7,4 kb and 9,4 kb were detected in all investigated human tissues and were identified as splice variants. These transcript sizes were consistent with the transcript sizes of the RERE homologue in rat, the atrophin related protein (Khan et al., 1996). Further Northern blot analyses indicated subtle differences between normal tissues and tumor cells, in which either both major transcripts or specifically the smaller, 7,4 kb transcript were expressed at reduced levels in neuroblastoma tumor cell lines.

In this thesis a RERE-specific polyclonal antibody against the 70 kD N-terminal portion of RERE was developed (EUROGENTEC; Netherlands) for detecting endogenous RERE protein. Western blot analysis revealed protein species of 175 kD and of about 250 kD in whole protein lysates of 18 tumor cell lines. The first evidence that RERE protein expression varies in tumor cell lines was the detection of additional smaller RERE-specific protein species in the neuroblastoma cell line GI-CA-N (about 40 kD) and the colon carcinoma cell line SW 480 (about 90 kD). To further characterize the smaller RERE protein variants, affinity purification followed by microsequencing, in addition to RT-PCR approaches could be employed. This investigations will clarify if the additional detected protein species are alternatively spliced products of RERE or if they are truncated RERE proteins probably as a result of a genomic point mutation or rearrangement.

In summary, it is shown that RERE is localized to PML Oncogenic Domains and colocalizes with the pro-apoptotic proteins PML, BAX and with mitochondria. Overexpression of RERE triggers caspase-3 activation leading to cell death. Furthermore, a smaller RERE Protein, compared to most cell lines was detected in 11% of the investigated cells, namely the neuroblastoma cell line GI-CA-N and the colon carcinoma cell line SW 480. These findings shed considerable light on the function of RERE which may provide an important link between the role of PODs in the control of apoptosis and tumorigenesis.

DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand durch die Mithilfe vieler Menschen, denen ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

Ich danke im Besonderen:

Meinen Eltern und Andrea.

Herrn Prof. Klaus Pfizenmaier für die wissenschaftliche Betreuung, die fachlichen Diskussionen und die freundliche Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Dr. Andreas Weith für die gute Betreuung und besonders für die lehrreichen Diskussionen.

Ganz besonders Dr. Norbert Kraut für seine engagierte und fachkundige Unterstützung rund um diese Arbeit.

Priv. Doz. Dr. Wolfgang Rettig und allen Kolleginnen und Kollegen der Gruppe Onkologische Forschung für die freundliche Zusammenarbeit und vielseitige Unterstützung, besonders während der Aufbauphase der Genomics Gruppe.

Den freundlichen Kolleginnen und Kollegen der Genomics Gruppe, besonders Frau Dagmar Knebel für ihre engagierte Unterstützung bei den TaqMan[®] Analysen und Herrn Werner Rust, der auf fast jede technische Frage eine Antwort wußte.

Frau Reinhilde Heimann und Herrn Detlef Heimann u.a. für das Korrekturlesen.

Dr. Andreas Köhler und dem Bioinformatik-Team für die freundliche Unterstützung.

Dr. Peter Seither für seine Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Herrn Andreas Eberlein für die freundliche Unterstützung bei allen Hürden rund um den Computer.

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name: Thomas Michael Wärner
geboren am: 25.04.1970 in Wertheim am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Brunnengasse 1, 97877 Wertheim

Schulbildung
08/76 - 07/86 Grund- und Realschule in Wertheim am Main
08/86 - 05/89 Wirtschaftsgymnasium in Wertheim am Main

Wehrdienst
06/89 - 08/90 Luftwaffen-Sanitätsstaffel in Lauda

Ausbildung/Studium
08/90 - 06/92 Ausbildung zum biologisch - technischen Assistenten (BTA) in Überlingen am Bodensee
07/92 - 10/92 Tätigkeit als BTA am Robert Bosch Krankenhaus in Stuttgart
10/92 - 10/97 Studium der technischen Biologie in Stuttgart/ Vaihingen
06/94 - 02/95 Studienarbeit "Anreicherung und Beschreibung TNF-spezifischer Antikörperfragmente mit dem Phagenoberflächen-Expressionssystem" bei Prof. Pfizenmaier am Institut für Zellbiologie und Immunologie in Stuttgart.

Diplomarbeit

07/96 - 9/97 Diplomarbeit über die Herstellung eines *single chain* Antikörperfragments (scFv) in Säugerzellen und Charakterisierung des Produktes. Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart / Fa. Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach.

Promotion
11/97 - 2/01 Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart / Abteilung Forschung, Boehringer Ingelheim Pharma KG.