

**Das Protein URIM bildet in der M-Phase des
Zellzyklus einen Komplex mit
HIRA und den Histonen H2B, H3 und H4**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Björn Friedrichs aus Stendal
Köln, Februar 2009

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Langer
Prof. Dr. Hinrich Abken
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Ansgar Büschges
Tag der Disputation: 27. April 2009

Abstract

Initially Urim (Up regulated in metastasis) was developed as a differentially expressed protein in metastasizing and non metastasizing tumors. Further analysis displayed its homology to the protein NLVCF (Nuclear localization signal containing protein deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome). Until now the function and binding partners of Urim were unidentified.

Using Co-immunoprecipitation assays we identified Hira as an Urim interaction partner. Via analysis of the interaction from Hira WD 40-domain mutant proteins to Urim, we identified the binding domain as the N-terminal Hira WD 40-domain. Anymore we could identify core-histones H2B, H3 and H4 as Urim interactors, indicating that the complex is involved in histone metabolism and chromatin assembly.

The Urim-Hira complex assembles in a cell cycle dependent manner. Via Co-immunoprecipitation of the protein Urim we displayed the complex formation of Hira, Urim and the histone proteins H2B, H3 and H4 in M-phase of the cell cycle, but not in the other cell cycle phases. This is consistent with the co-localization of Urim and Hira in M-phase in the cytoplasm and the nucleus as shown here via immunohistochemical double fluorescence staining of both proteins. In all other cell cycle phases cytoplasmatic localized Urim does not interact with nucleus localized Hira. As we could not detect any Hira-Urim interaction in S-phase of the cell cycle, where replication dependent chromatin assembly occurs, we suggest that complexation of Urim and Hira is not necessary for events in this cell cycle phase. The complex formation of Urim, Hira and the histone proteins in M-phase without participation of the Asf1a protein is more likely to show a possible involvement of Urim in the replication independent chromatin assembly.

Possibly Urim and Hira establish an alternative way in replication independent chromatin assembly without binding Asf1a. So we conclude that the function of Urim is important due to an alternative Asf1a independent way of replication independent chromatin assembly.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	i
1 Einleitung	1
1.1 Zahlreiche Proteine sind an der Kondensation der DNA in Chromatin beteiligt	1
1.2 Histon-Chaperone beladen die DNA mit Histonen und führen im Zusammenspiel mit Chromatin-remodelling Komplexen zur Chromatinassemblierung	3
1.2.1 Die Replikationsabhängige Chromatinassemblierung durch die Histon-Chaperone CAF-1 und ASF1	5
1.2.2 Das Histon-Chaperon Hira ist ein Schlüsselprotein in der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung	7
1.3 Urim- ein Protein unbekannter Funktion- hat das Potential mit Hira im selben zellulären Weg zu agieren.....	11
1.4 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.1.1 Stammlösungen und Puffer.....	14
2.1.2 Medien für Bakterienkultur und Medienzusätze	15
2.1.3 Bakterienstämme	15
2.1.4 Zelllinien	16
2.1.5 Medien für die Zellkultur und Medienzusätze.....	16
2.1.6 Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer	16
2.1.7 Synthetische Oligonukleotide	17
2.1.8 Plasmide.....	18
2.1.9 Antikörper	19
2.1.10 Reaktionskits.....	21
2.1.11 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.12 Geräte	22
2.2 Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.-coli</i> Bakterien.....	23
2.2.1.1 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präp).....	23
2.2.1.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA	23
2.2.1.3 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA.....	23
2.2.2 Ethanol-fällung von DNA	24
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	24
2.2.3.1 Photometrische Bestimmung	24
2.2.3.2 Mengenabschätzung im Agarosegel im Vergleich zu Markerbanden	24
2.2.4 Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion ..	24
2.2.5 Mutagenese Polymerasekettenreaktion.....	25
2.2.6 Elektrophorese zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten.....	26
2.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen durch Bindung an Siliciumpartikel.....	26
2.2.8 DNA Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	27
2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten	29
2.2.9.1 Sequenzspezifisches endonukleolytisches Schneiden von DNA.....	29

2.2.9.2	Ligation von DNA-Doppelsträngen mit überlappenden kohäsiven Enden durch T4-DNA-Ligase.....	29
2.2.9.3	Herstellung transformations-kompetenter <i>E.coli</i> DH5 α Bakterien	30
2.2.9.4	Transformation von <i>E.-coli</i> Bakterien	30
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen.....	30
2.3.2	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western blotting)	32
2.3.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembran ...	32
2.3.4	Ko-Immunopräzipitation.....	33
2.4	Immunhistochemische Methoden	36
2.4.1	Immunhistochemische Doppelfärbung von intrazellulären Proteinen.....	36
2.4.2	Immunhistochemische Einzelfärbung von intrazellulären Proteinen	37
2.4.3	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	38
2.5	Zellbiologische Methoden	38
2.5.1	Zellkultur	38
2.5.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen.....	38
2.5.1.2	Passage adhärenter Zellen durch Trypsinierung.....	39
2.5.2	Transiente Calciumphosphat-Transfektion von DNA in Eukaryoten-Zellen	39
2.5.3	Kryokonservierung von Zellen	39
2.5.4	Lyse von 293T Zellen mittels Triton X-100 Lysepuffer	40
2.5.5	Regulierte Expression von Genen durch das Tetrazyklin Expressionsystem.....	40
2.5.6	Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd.....	42
2.5.7	Synchronisation von 293T Zellen.....	42
2.5.7.1	Reversibler Zellzyklusarrest in der frühen S-Phase und in der M-Phase	42
2.5.7.2	Synchronisation von 293T Zellen in der G0/1-Phase des Zellzyklus.	42
2.5.8	Durchflusszytometrie.....	43
2.5.8.1	Propidium-Iodid-Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie..	43
2.5.8.2	Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie	43
2.6	Strukturvorhersagen von Proteinen durch „Homologie Modellierung“	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Urim ist ein Bindepartner von Hira	47
3.1.1	Generierung eines Antiserums gegen Urim und Testung von anti Urim #4134 und anti Hira WC 119 auf Funktionalität	47
3.1.2	Urim interagiert mit der 111 kDa großen Isoform von Hira.....	48
3.2	Urim und Hira kolokalisieren in der M-Phase des Zellzyklus.....	50
3.2.1	Urim ist diffus im Zytoplasma und Zellkern verteilt.....	50
3.2.2	Hira befindet sich in Interphase- und M-Phase-Zellen in unterschiedlichen Zellkompartimenten.....	51
3.2.3	Urim und Hira kolokalisieren in der M-Phase.....	52
3.3	Hira ist im Komplex mit Urim an Threonin 555 phosphoryliert.....	54
3.4	Urim interagiert mit der WD 40-Proteinbindedomäne von Hira	55
3.4.1	Klonierung von pcDNA4-TO-HIRA Δ WD-V5/His (#1000)	55
3.4.2	Klonierung von pcDNA3.1V5/His WD Δ Hira+52AS.....	57
3.4.3	Klonierung von pcDNA4-TO-Urim	58
3.4.4	Optimierung der transienten Calciumphosphat-Transfektion von Plasmiden in 293T Zellen.....	59

3.4.5	<i>HIRA-V5/HIS, HIRAΔWD-V5/HIS</i> und <i>WDΔHIRA+52AS-V5/His</i> werden nach transienter Transfektion in 293T Zellen exprimiert	60
3.4.6	Die Expression von Urim wird durch Tetrazyklin induziert	62
3.4.7	Die Interaktion von Hira-V5/His mit Urim wird durch das C-terminale V5-Epitop und den Histidin-Tag nicht beeinflusst	63
3.4.8	Die Deletion der WD 40-Domäne in Hira führt zum Verlust der Binfähigkeit an Urim	64
3.4.9	Die isolierte WD 40-Domäne aus Hira ist nicht in der Lage Urim zu binden.....	67
3.4.10	Punktmutationen in der WD 40-Domäne von Hira führen zu einer Öffnung der β -Propeller Ringstruktur.....	68
3.4.11	Klonierung der Hira Mutanten mit Punktmutationen in der WD 40-Domäne	71
3.4.12	Der Austausch der Aminosäuren RNHSG durch AAAAI zwischen WD #2 und WD #3 der Hira WD 40-Domäne führt zum Verlust der Urim-Bindung	72
3.4.13	Der Austausch der Aminosäuren RGHSG durch AAAAI zwischen WD #3 und WD #4 in Hira führt ebenfalls zum Verlust der Urim-Bindung.....	74
3.4.14	Die Mutation der Aminosäure Arginin 227 in humanem Hira zerstört die Bindung mit Urim.....	76
3.5	Urim und Hira bilden einen Komplex mit den Histonen H2B und H4	80
3.5.1	Das Histon-Protein H4 ist ein weiteres Protein im Urim-Hira-Komplex...	80
3.5.2	Das Histon-Protein H2B interagiert mit dem Urim-Hira-Komplex	82
3.6	Hira und Urim bilden einen alternativen Komplex zu Hira und Asf1a ausserhalb der S-Phase.....	85
3.6.1	Urim und Hira bilden einen alternativen Komplex zu Hira und Asf1a.....	85
3.6.2	Der Urim-Hira-Komplex assembliert in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase mit den Histonen H2B, H4 und H3.....	86
4	Diskussion	94
	Zusammenfassung	101
6	Anhang	102
6.1	Aminosäure- und Nukleotidsequenz der langen HIRA Isoform	102
6.2	Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Hira-RNHSG-AAAAI V5/His....	106
6.3	Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Hira-RGHSG-AAAAI V5/His.....	110
6.4	Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Hira Δ WD V5/His.....	114
6.5	Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Hira R227K V5/His.....	116
6.6	Aminosäure- und Nukleotidsequenz von WD Δ Hira+52AS V5/His.....	120
6.7	Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Urim	122
	Abkürzungsverzeichnis	124
	Literaturverzeichnis	126
	Danksagung	137
	Erklärung	138
	Lebenslauf.....	139

1 Einleitung

1.1 Zahlreiche Proteine sind an der Kondensation der DNA in Chromatin beteiligt

In jedem Organismus ist die DNA deutlich länger als der Durchmesser der Zelle, in der sie verpackt ist. Beispielsweise ist humane DNA ca. 94 cm lang, was in etwa dem 10^7 fachen des zellulären Durchmessers entspricht. Es ist offensichtlich, dass genomische DNA effizient kompaktiert werden muss (Vaquero *et al.*, 2003), was durch eine komplexe Kernproteinstruktur, die als Chromatin bekannt ist, vermittelt wird (Widom, 1997; Widom, 1998). Histone sind die Hauptstrukturproteine des Chromatin in Eukaryoten, wobei die „Kern“ Histone“ in H2A, H2B, H3 und H4 eingeteilt werden und die „Linker“ Histone zur H1-Familie gehören (Luger *et al.*, 1997; Vaquero *et al.*, 2003). „Kern“ Histone bestehen aus zwei strukturell und funktional unterschiedlichen Domänen. Die globuläre C-terminale Domäne der Histone besteht aus drei α -Helices, die durch zwei loops miteinander verbunden sind. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Bindung der DNA und der Interaktion mit benachbarten Histonen (Luger *et al.*, 1997). Die N-terminale Domäne der Histone besteht aus 15-30 basischen Aminosäuren, welche aus der DNA herausragen (Elgin *et al.*, 1979; Hansen *et al.*, 1998). Dieser Teil der Histone wird durch Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen post-translational modifiziert. (Annunziato und Hansen, 2000; Lennartsson und Ekwall, 2009; Nicholson *et al.*, 2004). Die posttranslationalen Modifikationen des N-terminalen Teils der „Kern“ Histone übernehmen eine wichtige Aufgabe bei der Regulation der Chromatindynamik. Sie fungieren als sogenannter „Histon Code“ (Escargueil *et al.*, 2008; Santos-Rosa und Caldas, 2005), der als ein transientes Signal zur Aktivierung oder Repression von spezifischen Genen in Antwort auf die zellulären Bedürfnisse dient. Ausserdem kann er als stabiles Markierungssystem zur Festlegung bestimmter Chromatin Beschaffenheiten dienen und so als epigenetisches Muster vererbt werden (Vaquero *et al.*, 2003).

Bei der Chromatinassemblierung bilden die Histone H2A und H2B ein Dimer, wohingegen die Histone H3 und H4 zu einem Histon-Tetramer assemblieren. Zwei H2A/H2B Dimere und ein H3/H4 Tetramer lagern sich zu einem Histon-Oktamer zusammen, um das die DNA in ungefähr zwei Windungen herumgewundenen ist und so ein Nukleosom bilden (Arents *et al.*, 1991; Fletcher und Hansen, 1996; Luger *et al.*, 1997; Vaquero *et al.*, 2003). Die Assemblierung von Nukleosomen ist eng an die

Replikation (Sogo *et al.*, 1986), die Transkription (Schwartz und Ahmad, 2005) und die Reparatur von genomischer DNA (Moggs *et al.*, 2000) gekoppelt. Während Nukleosomen *in vitro* sehr stabile Strukturen darstellen, werden *in vivo* die Hälfte der Histon H2B-Proteine und 20% der Histon H3 und H4 Proteine durch transiente Mechanismen ausgetauscht, was in Folge die Nukleosomen in einem dynamischen Zustand hält (Kimura und Cook, 2001).

Eine Reihe von hintereinanderliegenden Nukleosomen bildet eine im Elektronenmikroskop sichtbare Anordnung, die als „beads on a string“, oder 11-nm Faser bekannt geworden ist (Zlatanova und Leuba, 2003). Zwischen den Zentren der Nukleosomen befinden sich immer 180-200 bp der DNA. (Blank und Becker, 1995). Die Kompaktierungsstufe der DNA auf eine höhere Ordnung ist die 30 nm Faser. Sie wird durch die Aufnahme eines H1 „Linker“ Histons gebildet, welches an der Ein- und Austrittsstelle der DNA jedes Nukleosoms bindet (Hansen, 2002; Vaquero *et al.*, 2003). Da die DNA negativ geladen ist, tragen die positiv geladenen N-Termini der Histone zu dem höheren Grad an Kompaktierung bei. (Hansen, 2002). Es werden zwei Modelle für die Ausbildung der 30 nm Faser favorisiert. Im sogenannte „Solenoid Modell“ ist die DNA um sechs Nukleosomen pro Einheit gewunden (Thoma *et al.*, 1979). Das zweite Modell wird als „Zick-Zack-Modell“ bezeichnet. In diesem Modell läuft die DNA zwischen aufeinanderfolgenden Nukleosomen herum (Woodcock *et al.*, 1993). Zusätzliche Proteine bewerkstelligen höhere Ebenen der Chromatinkompaktierung, um den Grad an Kondensation zu erhalten, der die mitotischen Chromosomen ausbildet (Vaquero *et al.*, 2003).

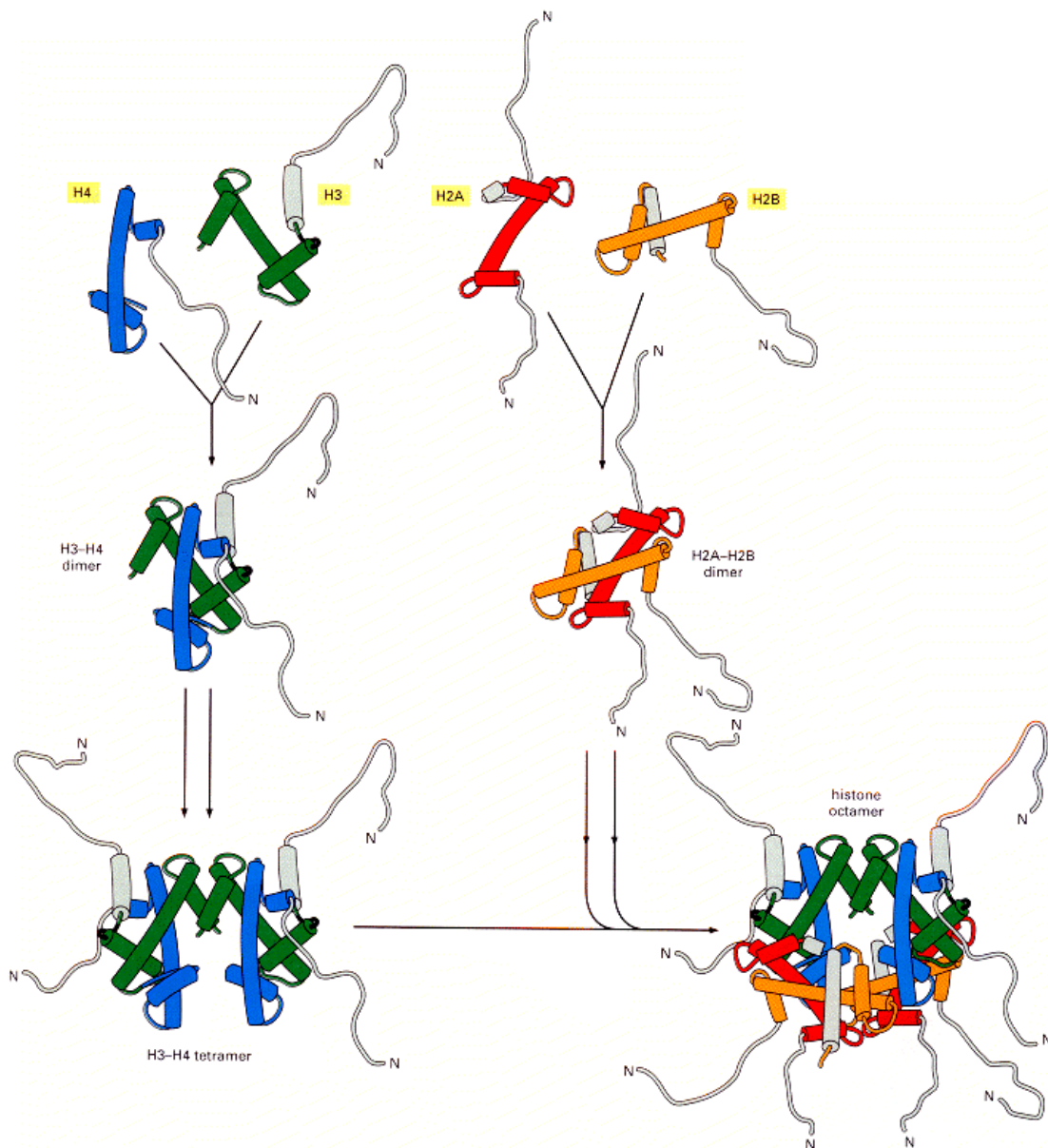


Abb.1: Schematische Darstellung der Assemblierung des Histon-Oktamers der „Kern“ Histone H2A, H2B, H3 und H4 (Darstellung aus „Molecular Biology of the cell“, 4.Auflage, adaptiert nach Abbildungen von J.Waterborg).

1.2 Histon-Chaperone beladen die DNA mit Histonen und führen im Zusammenspiel mit Chromatin-remodelling Komplexen zur Chromatinassemblierung

Das derzeitige Modell für die Nukleosomen Assemblierung schlägt vor, dass Histon-Chaperone während der Chromatinassemblierung die Histone zur DNA geleiten (Nakagawa *et al.*, 2001). Histon-Chaperone assoziieren mit Histonen und fördern deren

spezifische Interaktionen zur Assemblierung von Nukleosomen (Laskey und Earnshaw, 1980; Laskey *et al.*, 1978).

Die stark basische N-terminale Sequenz der Histone dient Karyopherinen als Kernlokalisierungssignal. Im Anschluss an die Bindung von H3/H4 Dimeren oder Tetrameren und H2A/H2B Dimeren schleusen diese „Kerntransportproteine“ die Histone in den Zellkern (Greiner *et al.*, 2004; Mosammaparast *et al.*, 2002a; Mosammaparast *et al.*, 2002b). Beim nukleären Import von Histon H2A/H2B Dimeren ist zusätzlich das Histon-Chaperon Nap1 (nucleosome assembly protein 1) beteiligt (Mosammaparast *et al.*, 2002a; Mosammaparast *et al.*, 2002b).

Im Nukleus dissoziieren die Histone von den Karyopherinen und assoziieren mit Histon-Chaperonen. Die bisher gut untersuchten Chaperone für das H2A/H2B Heterodimer sind Nap1 und der FACT Komplex. Beide Histon-Chaperone sind maßgeblich an der Elongation der DNA durch die DNA- und RNA-Polymerase beteiligt. Einerseits fördern sie die Dissoziation von H2A und H2B Histonen aus den Nukleosomen vor der DNA-Polymerase und andererseits führen sie zu ihrem Wiedereinbau in die DNA nach Passage der Polymerase (Adams *et al.*, 1999; Belotserkovskaya *et al.*, 2003). Die am genauesten charakterisierten Chaperone für die Histone H3 und H4 sind CAF-1, die Hir-Proteine, Spt6 und Asf1 (Krude, 1995; Loppin *et al.*, 2005; Mello *et al.*, 2002; Ray-Gallet *et al.*, 2002; Sanematsu *et al.*, 2006; Tagami *et al.*, 2004).

Histon-Chaperone arbeiten mit Nukleosomen remodelling Komplexen zusammen, um Nukleosomen zu mobilisieren und so den Abstand zwischen ihnen konstant zu halten (Ito *et al.*, 1997; Neves-Costa und Varga-Weisz, 2006). Diese Proteine sind zwischen den Spezies hoch konserviert und wurden erstmals in *Drosophila melanogaster* gezeigt (Tsukiyama und Wu, 1995; Varga-Weisz *et al.*, 1997). Allen ist gemeinsam, dass sie die Energie zur Mobilisierung der Nukleosomen aus der Hydrolyse von ATP mittels der ATPase Untereinheit ISWI gewinnen. (Langst und Becker, 2001; Tsukiyama *et al.*, 1995; Tsukiyama und Wu, 1995; Varga-Weisz *et al.*, 1997). Proteine mit dieser Funktion und Bauweise sind ACF (ATP-utilizing chromatin assembly factor) und CHRAC (chromatin accessibility complex). Sie assemblieren Chromatin *in vitro* in Anwesenheit des Histon-Chaperons Nap1 (Langst und Becker, 2001). Ein weiteres Protein, das für einen ausreichend großen Abstand zwischen den Nukleosomen sorgt, ist RSF (remodeling and spacing factor). Dieses Protein ist ebenfalls in der Lage, Nukleosomen zu assemblieren. Anders als ACF und CHRAC benötigt es dafür kein

zusätzliches Histon-Chaperon, da seine größte Untereinheit selbst Histon-Chaperon-Aktivität besitzt (Loyola *et al.*, 2003; Loyola *et al.*, 2001; Loyola und Reinberg, 2003).

1.2.1 Die Replikationsabhängige Chromatinassemblierung durch die Histon-Chaperone CAF-1 und ASF1

Der Großteil der Chromatinassemblierung findet während der DNA-Replikation in der S-Phase des Zellzyklus statt. Die replikationsabhängige Chromatinassemblierung wird durch das Histon-Chaperon CAF-1 (chromatin assembly factor-1) vermittelt. (Smith und Stillman, 1989). CAF-1 Homologe wurden in *Drosophila melanogaster* (Kamakaka *et al.*, 1996; Tyler *et al.*, 1996; Tyler *et al.*, 2001) und Hefe (Enomoto *et al.*, 1997; Kaufman *et al.*, 1997) identifiziert. Offensichtlich ist die Funktion von CAF-1 evolutionär hoch konserviert. Humanes CAF-1 bindet die Histone H3 und H4. Die mit CAF-1 interagierenden Histone unterscheiden sich vom Großteil der zellulären Histone durch ihre posttranslationalen Modifikationen. Nach der Synthese werden beide Histone acetyliert und Histon H4 weist ein spezifisches Profil von Di-Acetylierungen an den Lysin-Resten 5 und 12 auf, die zwischen unterschiedlichen Spezies konserviert sind (Sobel *et al.*, 1994; Sobel *et al.*, 1995). Im Anschluss an die Aufnahme von acetyliertem Histon H3 und H4 in die DNA werden die Acetylierungsmuster beider Histone durch nukleäre Histon-Deacetylasen entfernt (Parhun *et al.*, 1996; Rundlett *et al.*, 1996; Sobel *et al.*, 1994; Taunton *et al.*, 1996; Verreault *et al.*, 1998). Die replikationsabhängige Nukleosomenassemblierung erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Schritten (Smith und Stillman, 1991). Der erste Schritt ist die CAF-1 vermittelt Ablage von Histon H3-H4 Tetramer auf die sich replizierende DNA. Diese Reaktion ist abhängig von der Replikation der DNA und wurde *in vitro* bei nicht replizierender DNA nicht beobachtet (Smith und Stillman, 1991). In einem zweiten Schritt, der unabhängig von der DNA-Replikation geschieht, werden zwei Histon H2A-H2B Dimere am H3-H4 Tetramer abgesetzt, wodurch ein vollständiger Nukleosomen Kern ausgebildet wird (Smith und Stillman, 1991).

CAF-1 besteht aus drei konservierten Untereinheiten: p150, p60 und p48 (Kaufman *et al.*, 1995). Die Gesamtheit von CAF-1 und den Histonen H3 und H4 wird CAC Komplex genannt (Verreault *et al.*, 1996). Die C-terminale Region der p150 Untereinheit ist an einer Dimerbildung beteiligt und interagiert direkt mit der p60 Untereinheit (Kaufman *et al.*, 1995; Quivy *et al.*, 2001). Darüber hinaus interagiert der

N-terminale Teil von p150 mit der DNA-Polymerase Klammer PCNA (Moggs *et al.*, 2000; Shibahara und Stillman, 1999). Die p60 Untereinheit von CAF-1 besitzt eine ähnliche Aminosäuresequenz wie das Histon-Chaperon Hira (histone regulatory homolog A) (Kaufman *et al.*, 1998; Kirov *et al.*, 1998). Hira bindet in ähnlicher Weise wie CAF-1 an das Histon-Chaperon Asf1 (Krawitz *et al.*, 2002; Mello *et al.*, 2002; Sanematsu *et al.*, 2006; Tyler *et al.*, 1996). Wesentliche Strukturmerkmale in dieser CAF1 Untereinheit sind die WD 40- und die B-Domäne (Kaufman *et al.*, 1995; Kaufman *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2006; Tyler *et al.*, 2001). Die Interaktion von CAF1-p60 und Asf1 ist evolutinär hoch konserviert. Sie wurde in Hefe, *Drosophila melanogaster*, Hühnern und Menschen gezeigt (Krawitz *et al.*, 2002; Mello *et al.*, 2002; Sanematsu *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006; Tyler *et al.*, 2001). Die Histon-Chaperone Asf1 und CAF-1 kooperieren bei der Nukleosomenassemblierung in neu replizierter DNA in der S-Phase. Beide Proteine sind in HeLa-Zellen mit dem replikationsspezifischen Histon H3.1 in einem löslichen Komplex kolokalisiert (Tagami *et al.*, 2004). Asf1 liegt in Vertebraten als Asf1a und Asf1b vor (Mello *et al.*, 2002; Sillje und Nigg, 2001; Umehara und Horikoshi, 2003). Wahrscheinlich fügt der Asf1-CAF-1-Komplex neu synthetisiertes Histon hinter die Replikationsgabel in die DNA ein (Mousson *et al.*, 2007). Die Rekrutierung von CAF-1 an die DNA hinter die Replikationsgabel wird durch seine Interaktion mit der Prozessivitätsklammer der DNA-Polymerase δ , PCNA, erreicht (Shibahara und Stillman, 1999), die durch RFC (replication factor C) (Majka und Burgers, 2004) auf die DNA geladen wird. Ein weiteres Indiz für eine Beteiligung beider Proteine am replikationsabhängigen Nukleosomenaufbau war der Nachweis, dass der Hefe RFC-Komplex an Asf1 bindet (Franco *et al.*, 2005). Somit können Asf1a und CAF-1 mit der fortschreitenden Replikationsgabel assoziieren, um H3-H4 Tetramere auf der DNA abzusetzen.

Zusätzlich zu seiner Beteiligung an der replikationsabhängigen Nukleosomenassemblierung, kann Asf1 in Säugetierzellen zu viel neusynthetisierte H3 und H4 Histone lagern (Groth *et al.*, 2005). Wenn die DNA-Synthese in Zellen durch Hydroxyharnstoff blockiert wird, sinkt die Menge an löslichen mit Asf1 assoziierten Histon H3/H4 Proteinen. Es wird spekuliert, dass dieser Komplex die p48 Untereinheit von CAF-1 und das Histon-Chaperon NASP enthält (Groth *et al.*, 2005). In Hefe wurde gezeigt, dass freie Histone die Chromosomen Segregation stören und das Zellwachstum inhibieren (Gunjan und Verreault, 2003; Meeks-Wagner und Hartwell, 1986). Die

Assoziation von Asf1 und CAF-1 könnte so die Zelle vor den toxischen Effekten freier Histone schützen (Gunjan und Verreault, 2003; Sharp *et al.*, 2005).

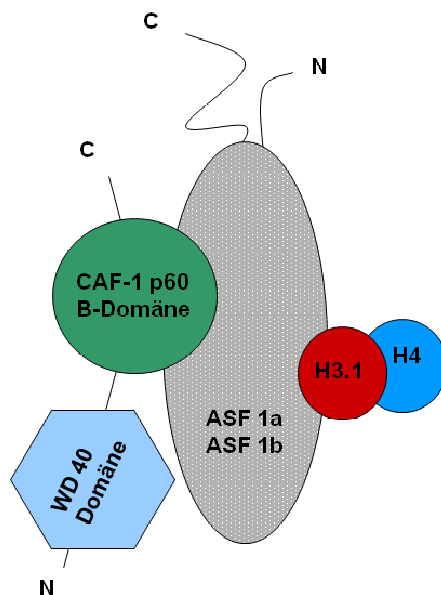


Abb.2: Schema des CAF-1p60-Asf1 Komplex während der replikationsabhängigen Chromatinassemblierung.

1.2.2 Das Histon-Chaperon Hira ist ein Schlüsselprotein in der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung

Das Histon-Chaperon Hira wird durch ein Gen in der „DiGeorge Syndrom kritischen Region“ des humanen Chromosoms 22q11 kodiert (Halford *et al.*, 1993). Das Protein zeigt Sequenzähnlichkeiten mit den Hir1 und Hir2 Proteinen aus der Hefe *S.cerevisiae*, die zur Gruppe der Histongenrepressoren gehören (Osley und Lycan, 1987; Sherwood und Osley, 1991; Sherwood *et al.*, 1993). Die Primärstruktur von Hira ist unterteilt in eine N-terminale Region mit Sequenzähnlichkeiten zu Hir1 und in eine C-terminale Region mit Ähnlichkeiten zu Hir2 (Kirov *et al.*, 1998; Lamour *et al.*, 1995). In Hefe interagiert Hir1 mit Hir2 durch die C-terminale Region von Hir1 (DeSilva *et al.*, 1998; Spector *et al.*, 1997). Beide Proteine assoziieren mit Hir3/Hpc1 und Hpc2 (Xu *et al.*, 1992) und formen den sogenannten HIR-Komplex, der Nukleosomen *in vitro* in ähnlicher Weise wie bei höheren Eukaryoten assembliert (Green *et al.*, 2005; Prochasson *et al.*, 2005). Diese Befunde legen nahe, dass das eukaryotische Hira eine Fusion von Hir1 und Hir2 darstellt. Funktionell ist der Hefe HIR-Komplex mit dem

SWI/SNF „Chromatin remodelling Komplex“ assoziiert. Hir1 und Hir2 reprimieren die Promotoraktivität der Histongene in den Zellzyklusphasen G0 und G1, während die Histongene in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert werden (Hereford *et al.*, 1982; Hereford *et al.*, 1981; Osley und Lycan, 1987; Spector *et al.*, 1997; White *et al.*, 1987). Der ATP-abhängige SWI/SNF „Chromatin remodelling Komplex“ ist notwendig für die Expression von Histogenen und wird durch Interaktion mit Hir1 und Hir2 zu diesem Locus geleitet (Dimova *et al.*, 1999). Der HIR-Komplex inhibiert die Aktivität des SWI/SNF-Komplexes *in vitro* (Prochasson *et al.*, 2005), was zu der Annahme führt, dass die zellzyklusabhängige Histon-Expression durch den HIR-Komplex negativ reguliert wird, während der SWI/SNF-Komplex die Expression positiv beeinflusst.

Sowohl Hira, als auch Hir1 besitzen eine WD 40-Domäne und eine B-Domäne (Kirov *et al.*, 1998; Lamour *et al.*, 1995; Sherwood *et al.*, 1993), die Ähnlichkeiten zu Domänen in der CAF-1 Untereinheit p60 zeigen (Kaufman *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2006). WD 40-Domänen stellen eine hoch konservierte, sich wiederholende Sequenz dar und sind in ca. 30 Proteinen identifiziert, die als „WD-repeat Proteine“ bezeichnet werden (Li und Roberts, 2001; Neer *et al.*, 1994). Ein WD 40-repeat besteht aus 40-60 Aminosäuren, und ist durch ein Glycin-Histidin Dipepid (GH) 11-24 Reste vom N-Terminus und ein Tryptophan-Aspartat Dipeptid (WD) am C-Terminus gekennzeichnet. Zwischen den GH und WD Dipeptiden liegt ein konservierter Kern aus ca. 40 Aminosäuren (Smith *et al.*, 1999). Die meisten WD 40-Domänen bestehen aus einer Gruppe von 7-16 WD 40-repeats (Neer *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999), die eine sogenannte β -Propellerstruktur ausbilden (Smith *et al.*, 1999). Diese Struktur ist an der Assemblierung von Multiproteinkomplexen beteiligt (Smith *et al.*, 1999) und bindet bevorzugt Proteine mit vier antiparallelen α -Helices (Wall *et al.*, 1995). Zur Gruppe der „WD-repeat Proteine“ zählen unter anderem die G-Protein β -Untereinheit, Zellzyklusregulatoren wie Coronin und Mad2, das Apoptoseprotein Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) und RNA-Synthese Proteine wie TBP (TATA box-binding protein) und TAFs (TATA box-binding protein associated factors) (Li und Roberts, 2001).

Hira ist ein Phosphoprotein, welches in der S-Phase von Cyclin abhängigen Kinasen an T555 und S687 phosphoryliert wird (Hall *et al.*, 2001). Desweiteren wird Hira in der M-Phase des Zellzyklus hyperphosphoryliert. Unphosphoryliertes Hira ist mit Chromatin assoziiert, nach Hyperphosphorylierung dissoziiert es vom Chromatin (De Lucia *et al.*, 2001). Die Interaktion von Hira mit Transkriptionsfaktoren wie Pax3 und Pax7

(Magnaghi *et al.*, 1998), sowie mit Transkriptionselongationsfaktoren wie Spt4, 5, 6 und 16 (DeSilva *et al.*, 1998; Formosa *et al.*, 2002) legen nahe, dass Hira an der Transkription verschiedener Klassen von Genen beteiligt ist. Außerdem interagiert Hira ähnlich wie CAF-1 mit dem Histonchaperon Asf1 (Daganzo *et al.*, 2003; Gaillard *et al.*, 1996; Sharp *et al.*, 2001; Sutton *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005), vorzugsweise mit Asf1a (Tagami *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005). Strukturelle und funktionale Analysen der Hira-Asf1 Interaktion (Daganzo *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005) haben den Interaktionsbereich zwischen Hira und Asf1, sowie Asf1 und Histon H3-H4 Dimeren identifiziert. Da die Interaktion von Asf1 mit den Proteinen an unterschiedlichen Stellen stattfindet wird davon ausgegangen, dass Hira und Asf1 simultan mit dem Histon H3.3 interagieren (English *et al.*, 2006; Mousson *et al.*, 2005; Munakata *et al.*, 2000; Natsume *et al.*, 2007).

In Vertebraten-Zellen werden zwei Funktionen für Hira spekuliert. Es kann in Analogie zu den Hir1 und Hir2 Proteinen an der Repression von Histongenen in der frühen S-Phase des Zellzyklus beteiligt sein (DeSilva *et al.*, 1998; Spector *et al.*, 1997). Eine weitere Funktion stellt der Einbau von Histon H3-H4 Dimeren in Nukleosomen während der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung ausserhalb der S-Phase dar (Ray-Gallet *et al.*, 2002). Diese Art der Chromatinassemblierung findet in aktiv transkribierten Genomregionen statt (McKittrick *et al.*, 2004). *In vitro* wird durch die Interaktion von Hira mit Asf1a die replikationsunabhängige Chromatinassemblierung ermöglicht (Green *et al.*, 2005; Tagami *et al.*, 2004). Die Chromatinassemblierung an Promotoren und transkribiertem Chromatin könnte dabei eine Funktion des Hira-Asf1 Komplexes sein. Darauf deutet hin, dass durch das Hefeprotein Hir1 und Asf1 Nukleosomen am *PHO5* Promotor zuvor aktivierter Gene reassembliert werden (Schermer *et al.*, 2005). Desweiteren bindet Hira selektiv die für die replikationsunabhängige Chromatinassemblierung typische Histon Variante H3.3 während der Spermiedekondensation in befruchteten Eiern von *Drosophila melanogaster* (Loppin *et al.*, 2005) und Mauszygoten (van der Heijden *et al.*, 2005). Die Inversion von Arginin gegen Lysin an Position 227 von *Drosophila*-Hira führt zur Unfruchtbarkeit weiblicher Individuen, da im männlichen Pronukleus der Austausch der die Spermien verpackenden Protamine gegen Histone nicht mehr stattfindet. Diese Mutation betrifft die WD 40-Domäne von Hira (Loppin *et al.*, 2005).

Zusammengenommen sprechen diese Beobachtungen dafür, dass Hira und Asf1a auch *in vivo* für die replikationsunabhängige Chromatinassemblierung verantwortlich sind.

Als ein möglicher Mechanismus wird angenommen, dass das Asf1a-H3-H4 Heterotrimer zusammen mit anderen Chaperonen einen frühen Komplex bildet. Um ein H3-H4 Tetramer zu bilden, muss Asf1a vom H3-H4 Dimer dissoziieren (Eitoku *et al.*, 2008). Das Histon-Chaperon Hira, welches Nucleosomen in Zusammenarbeit mit Asf1a assembliert, (Green *et al.*, 2005; Tagami *et al.*, 2004) könnte den Asf1a-H3-H4 Komplex binden, Asf1a ablösen und die Formierung von mit DNA komplexierten H3-H4 Tetrameren fördern. Faktoren wie FACT, NAP1 und Nucleoplasmin, die bevorzugt H2A-H2B Dimere binden, stellen im Anschluss daran zwei H2A-H2B Dimere bereit, die dann mit dem H3-H4 Tetramer interagieren, um ein neues Histon-Oktamer zu bilden (Eitoku *et al.*, 2008).

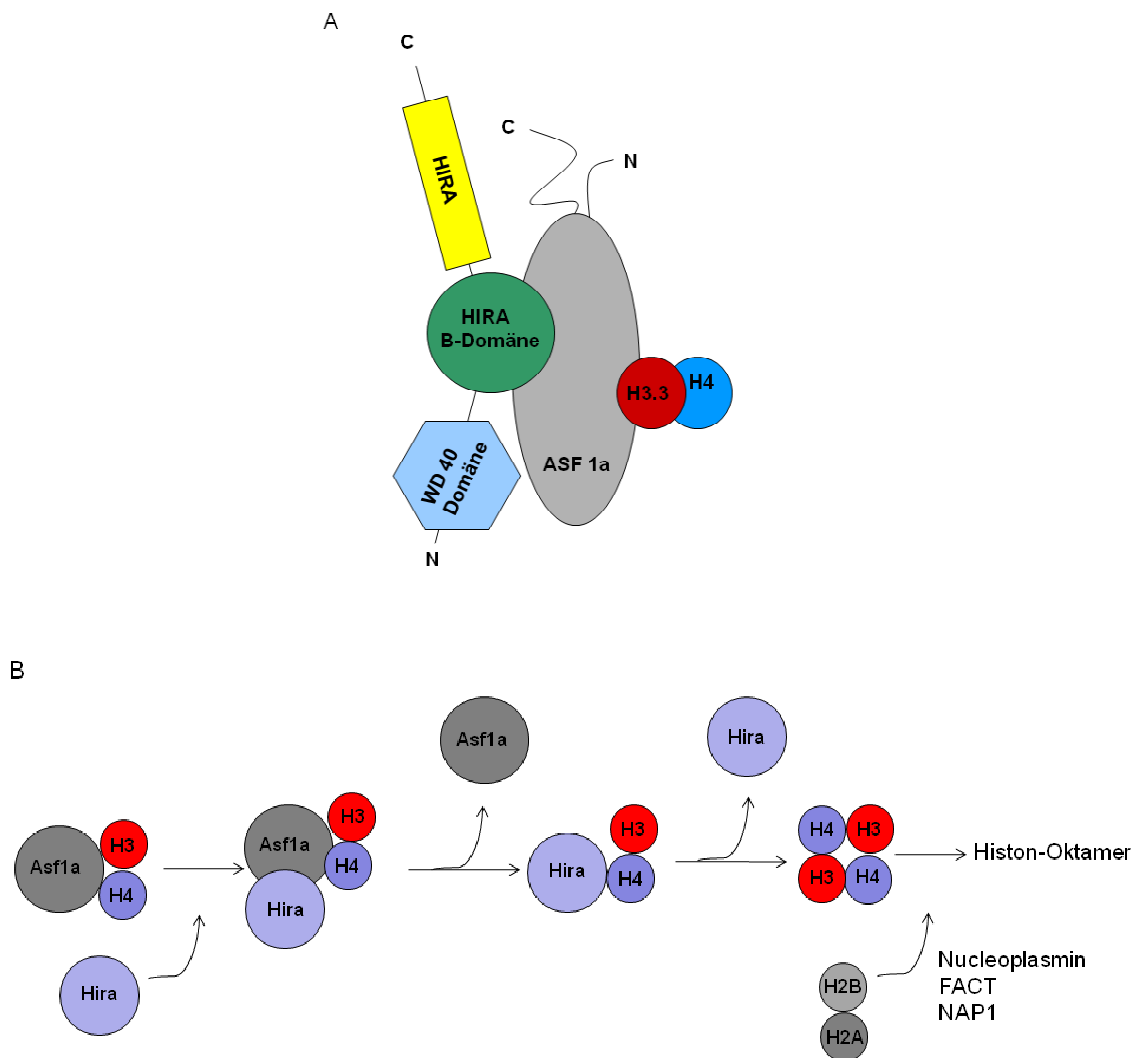


Abb.3: Schematische Darstellung des Hira-Asf1a-Komplexes (A). Flussdiagramm der Interaktion von Hira und Asf1a im replikationsunabhängigen Chromatinassemblierungsweg (B).

1.3 Urim- ein Protein unbekannter Funktion- hat das Potential mit Hira im selben zellulären Weg zu agieren

Das Protein Urim (Up regulated in metastasis) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein unbekannter Funktion. Sein kodierendes Gen liegt wie das von Hira auf dem Chromosom 22q11 in der sogenannten „DiGeorge Syndrom kritischen Region“. Es hat eine Größe von ca. 3,5 kb und besteht aus vier Exons. In dieser Genomregion liegen die Startcodons der Gene *URIM* und *HIRA* nur 1100 Bp voneinander entfernt. Beide Gene werden in unterschiedlichen Richtungen transkribiert (Collins *et al.*, 2004). *URIM* wird in fast allen Geweben exprimiert, wobei seine Expressionsstärke von Gewebe zu Gewebe variiert. In einer Northern-Blot Analyse wurde seine starke Überexpression in der metastasierenden humanen Melanoma-Zelllinie NMCL-1 gegenüber der nicht metastasierenden humanen Melanoma-Zelllinie 530 nachgewiesen (Hildebrandt *et al.*, 1999). Die Korrelation der *URIM* Expression zum Metastasierungspotential wurde ebenfalls an verschiedenen Mammakarzinomzelllinien durch Northern Blot Analysen gezeigt. In normalen epithelialen Zellen der Milchdrüse (HMEC) und den Primärtumorzelllinien WA und AR wurde Urim schwach exprimiert. In drei Zelllinien von Knochenmarkmikrometastasen (KM22, HG15, 1590) und in einer metastasierenden Zelllinie aus Ascites (KS) wurde hingegen eine 17 fach erhöhte Expression von *URIM* gefunden (Hildebrandt *et al.*, 1999).

Das DiGeorge-Syndrom (DGS) und das Velo-Cardio-Facial-Syndrom (VCFS) sind kongenitale Erkrankungen, deren phänotypische Spektren überlappen. Beide Syndrome sind durch schwere Herzfehler, geistige Retardiertheit, T-Zell Immunsuffizienz und faziale Dysmorphien gekennzeichnet. Die Häufigkeit der Syndrome beträgt 1/4000 lebend Geborenen (Burn und Goodship, 1996). Das DGS und VCFS sind mit ähnlichen 22q11 Deletionen assoziiert. Deletionen in diesem Bereich kommen bei 83% aller Patienten vor (Scambler *et al.*, 1992). Ein Großteil der betroffenen Gewebe und Strukturen stammen während der Embryonalentwicklung von den Kiemenbögen ab. Symptome mit Ähnlichkeit zu DGS und VCFS wurden an Hühnerembryonen gefunden, denen Zellen entfernt wurden, die von der Neuralleiste in die Kiemenbögen wandern (Kirby und Waldo, 1990). Etwa zeitgleich mit dem Erscheinen der Veröffentlichung von *URIM* wurde von Funke *et al.*, 1998 eine Sequenz (NLVCF) veröffentlicht, die auf Nukleinsäureebene eine 99,4%ige Homologie zu *URIM* hat. Mit *in situ* Hybridisierungen wurde das Expressionsmuster von *URIM/NLVCF* in 9,5- und 10,5-Tage Maus-Embryonen untersucht. Der Vergleich der Expressionsmuster von *HIRA*

(Wilming *et al.*, 1997) und *URIM/NLVCF* in 9,5- und 10,5- Tage Maus-Embryonen zeigte ein fast identisches Expressionsmuster beider Gene (Funke *et al.*, 1998). Wegen der identischen Expressionsmuster, der Nähe der beiden Transkriptionsstartpunkte und ihrer bidirektionalen Transkription wird angenommen, dass *HIRA* und *URIM* koordiniert reguliert werden. (Gavalas und Zalkin, 1995; Hentschel und Birnstiel, 1981).

1.4 Zielsetzung

Urim ist in Zellen von unterschiedlichen malignen Tumoren differentiell exprimiert. (Hildebrandt *et al.*, 1999). Die Funktion und Bindepartner von Urim sind bisher unbekannt. In direkter Nachbarschaft von *URIM* ist das Gen *HIRA* lokalisiert. Beide Gene werden im Mausembryo ko exprimiert (Funke *et al.*, 1998). Eine Deletion von *URIM* und *HIRA* auf Chromosom 22q11 führt zur Ausbildung der Krankheitsbilder des DiGeorge Syndroms und des Velo-Cardio-Facial-Syndroms. Ein Großteil der betroffenen Gewebe dieser Krankheitsbilder stammen von Zellen ab, die während der Embryogenese von der Neuralleiste in die Kiemenbögen wandern (Kirby und Waldo, 1990). *HIRA* kodiert für ein Histon-Chaperon, welches während der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung für die Translokation von Histon H3-H4 Dimeren an die DNA verantwortlich ist (Ray-Gallet *et al.*, 2002). Weiterhin ist Hira im Komplex mit dem Histon-Chaperon Asf1a für die Nukleosomenassemblierung an transkribierten Chromatinbereichen und Promotoren aktivierter Gene beteiligt und führt zur transkriptionellen Repression von Genen (Schermer *et al.*, 2005). Ein wichtiges Strukturmerkmal von Hira ist seine N-terminale WD 40-Domäne, die bevorzugt Proteine mit vier antiparallelen α -Helices bindet (Wall *et al.*, 1995). Eine Faltungsvorhersage gruppiert Urim zu den Proteinen mit vier antiparallelen α -Helices (unveröffentlichte Daten von Prof. Dr. Timo Schinköthe). Aufgrund der Faltung von Urim, seiner Ko-Expression mit *HIRA* im Mausembryo und der räumlichen Nähe der chromosomalen Loci von *URIM* und *HIRA*, stellten wir die Frage, ob Urim einen Bindepartner von Hira darstellt.

Durch die Ko-Immunopräzipitation steht uns ein Verfahren zur Verfügung, mit dessen Hilfe diese Frage untersucht werden kann. Eine Charakterisierung der Interaktion ist mit Hilfe von Hira-Proteinmutanten durch Ko-Immunopräzipitationen ebenfalls möglich.

Darüber hinaus möchten wir weitere Interaktionspartner des Proteins Urim identifizieren, um Hinweise auf den zellulären Weg zu bekommen, in den das Protein involviert ist. Insbesondere soll eine mögliche Komplexassemblierung in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase untersucht werden.

Die Untersuchung von Urim ist von Bedeutung, da nicht verstanden ist, in welchem Zusammenhang die Überexpression dieses Proteins mit dem Metastasierungspotential von Tumorzellen steht. Hinweise auf eine Assoziation mit dem Histon-Chaperon Hira, würden Urim der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung zuordnen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Stammlösungen und Puffer

PBS

8,0 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na₂HPO₄; 0,2 g/l KH₂PO₄; pH 7,4

PBS/T

PBS mit 0,1% (v/v) Tween[®]-20 (Merck, Darmstadt)

RNase-Stammlösung

100 U/ml Rnase A und 8000 U/ml Rnase T1 werden für 15 min bei 100°C in 15 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 inkubiert

Tris-HCl

10 mM Tris-Base, eingestellt mit 37 %-igen HCl-Säure auf pH 8,4

TBS

50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl

2 x HEBS-Puffer

50 mM HEPES; 28 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; ad 1l ddH₂O, eingestellt mit 1N NaOH auf pH 7,05

50 x TAE-Puffer

2M Tris-HCl; 57,1 ml/l Eisessig; 50 mM EDTA, pH 8,5

Ethidiumbromid

Ethidiumbromid wird in *aqua bidest* in einer Stammlösung 10 mg/ml in H₂O angesetzt.

6 x Gel-Beladungspuffer für native Agarosegele

0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 40 % (w/v) Saccharose

4 x SDS-Ladepuffer

50 mM Tris/HCL pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 0,01% (w/v) Bromphenolblau; 10% (v/v) Glycerin, 50 mM DTT

2.1.2 Medien für Bakterienkultur und Medienzusätze

Alle Nährmedien wurden vor Gebrauch 20 min autoklaviert. Hitzelabile Zusätze (z.B. Antibiotika) wurden steril filtriert und dem Medium erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

LB-Medium

10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10 g/l NaCl

2 x YT-Medium

16 g/l Trypton; 10 g/l Hefe-Extrakt; 5 g/l NaCl

LB-Agar

1l LB-Medium; 15 g Bacto-Agar

Ampicillin- Stocklösung

100 mg/ml Ampicillin (Merck, Darmstadt) in H₂O, steilfiltriert. Die eingesetzte Ampicillin-Konzentration zur Selektion Ampicillin-resistenter Bakterienstämme in LB-Medium betrug 0,1 mg/ml.

2.1.3 Bakterienstämme

***E.coli* DH5 α**

F⁻, end A1, hsd R17 (r_K⁻, m_K⁻) sup E44, thi-1, lambda⁻, recA1, gyrA96, Φ 80 d lacZ δ M15 (Woodcock *et al.*, 1989)

***E.coli* Top10[®] (Invitrogen)**

F⁻, mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 ga/U ga/K rpsL (Str^R) endA1 nupG

2.1.4 Zelllinien

293T

(Pear, 1993) Derivat von 293-Zellen, die das SV40 *large* T-Antigen exprimieren. Die Zellen werden in DMEM Medium (GibcoBRL, Eggenheim), 10 % (v/v) FCS kultiviert.

2.1.5 Medien für die Zellkultur und Medienzusätze.

RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™

(Product Code 61870-010, GibcoBRL, Eggenheim).

DMEM Medium, GlutaMAX™, ohne L-Glutamat

(Product Code 31966-021, GibcoBRL, Eggenheim).

Fetales Kälberserum (FCS)

(Biochrom KG, Berlin)

Penicillin-Streptomycin

(GibcoBRL, Eggenheim)

Eingesetzte Konzentration: 50 IE/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin

2.1.6 Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer

Name des Enzyms (Roche Diagnostics)	Schnittsequenz	Inkubationspuffer
BamHI	5'-G↓GATCC-3'	A oder M
EcoRI	5'-G↓AATTC-3'	A, B oder H
HindIII	5'-A↓AGCTT-3'	M
XbaI	5'-T↓CTAGA-3'	A oder H

Puffer A : 33 mM Tris-Acetat ; 10 mM Mg-Acetat ; 66 mM K-Acetat ; 0,5 mM DTT ; pH 7,9

Puffer B : 10 mM Tris HCl, 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1mM β-Mercaptoethanol, pH 8,0

Puffer H : 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl ; 1 mM DTE ; pH 7,5

Puffer M : 10 mM Tris-HCL ; 10 mM MgCl₂ ; 100 mM NaCl ; 1 mM DTE ; pH 7,5

Das Temperaturoptimum für die Restriktionsreaktion liegt bei diesen Enzymen bei 37°.

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Tab.1: Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide:

Die Restriktionsschnittstellen zur Klonierung sind fett gedruckt. Insetierte Mutationen sind kursiv gedruckt.

Nr.	Name	Sequenz
#407	URIM forw.	5'-CAA ATC GAA TTC ATG ACG GCC TCC GTG CTG-3'
#408	URIM rev.	5'-CAA ATC TCT AGA CTA TCT CTT AAA CTC CAC TTG TGT GTA C-3'
#312	DeltaWDV5HisF	5'-GCC AAG CTT ATG TTC TCC CAG GAT GAG CTT G-3'
#313	DeltaWDV5HisR	5'-GGC GAA TTC TCA ATG GTG ATG GTG ATG ATG-3'
#401	MutDel forw.	5'-PHO-GAC AAG AAG GGC AAT TCT GCA-3'
#461	MutDel rev. 52AS	5'-PHO-CGC AGC ACT CTT CTG GTC CAG-3'
#464	RGHSG-AAAAI forw.	5'-CCA GAA ATT CTA GCT ACT CTG <i>GCG GCA GCC GCT ATA</i> TTG GTC AAA GGG TTG ACA TGG-3'
#465	RGHSG-AAAAI rev.	5'-CCA TGT CAA CCC TTT GAC CAA <i>TAT AGC GGC TGC CGC</i> CAG AGT AGC TAG AAT TTC TGG-3'
#462	RNHSG-AAAAI forw.	5'-TGG CGG TGT GTC TCT ATC <i>CTC GCG GCA GCC GCT ATA</i> GAT GTG ATG GAT GTA GCA TGG-3'
#463	RNHSG-AAAAI rev.	5'-CCA TGC TAC ATC CAT CAC ATC <i>TAT AGC GGC TGC CGC</i> GAG GAT AGA GAC ACA CCG CCA-3'

Tab.2: Oligonukleotide zur Sequenzierung

#300	S1 HIRA forw.	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
#301	S2 HIRA rev.	5'-GGC ATG GGC AGA CAC CAG G-3'
#302	S3 HIRA forw.	5'-GTT GGA GAC CAG CAT CAC CAA G-3'
#303	S4 HIRA rev.	5'-CTC CCT GGT CGC AGC AAC-3'
#304	S5 HIRA forw.	5'-CCG TCA TTG AGA ACC CTG AG-3'
#305	S6 HIRA rev.	5'-AGG TCT CGG GGC CTC AGC-3'
#306	S7 HIRA forw.	5'-AGG TGC TCC TGC CCT GAC C-3'
#307	S8 HIRA rev.	5'-GAG AGT GTG GCT GCA GCG G-3'
#308	S9 HIRA forw.	5'-ATC CTC CTG CCA TCC CCG-3'
#309	S10 HIRA rev.	5'-CGA GAC CGA GGA GAG GGT TAG-3'
#466	S11WD+24As	5'-GTT CTT TCC GCC TCA GAA G-3'
#522	S12 HIRA forw.	5'-CCC ACG ATG CCT GGC TAG CC-3'
#310	S1 URIM forw.	5'-CCT GGA GAC GCC ATC CAC G-3'
#311	S2 URIM rev.	5'-CCG TTA ACA TCA CCA TCT AAA G-3'

2.1.8 Plasmide

Tab.3: Verwendete Plasmide

Nr.	Name	Charakteristika	Herkunft
#556	pCR2.1-URIM	TOPO cloning Vektor mit Urim-Gen	Prof. Weidle, Fa. Roche
#559	pcDNA6-TR	Tetrazyklinrepressor kodierender Vektor	T-Rex System Originalvektor
#601	pQBI25-URIM	Expression von Urim-GFP	laboreigene Plasmidbank

#557	pQBI-25	GFP Expressionsvektor	QBIOgene, Heidelberg
#734	pcDNA3.1V5/His-HIRA	Klonierungsvektor, enthält Expressionskassette für Hira V5/His	laboreigene Plasmidbank
#852	pEGFP-N1	GFP Expressionsvektor	BD Clontech, Heidelberg

2.1.9 Antikörper

Primärantikörper

Charakteristika

anti Urim #4134	affinitätsgereinigter polyklonaler Kanninchen Antikörper gegen humanes Urim (im Auftrag: Biogenes GmbH, Berlin)
anti Hira #4667	affinitätsgereinigter polyklonaler Kanninchen Antikörper gegen humanes Hira
anti Hira WC 119	muriner monoklonaler Antikörper gegen humans Hira (AG Peter Adams, Dana Faber cancer research institute, Philadelphia, USA)
anti Hira WC 15	muriner monoklonaler Antikörper gegen humans Hira (AG Peter Adams, Dana Faber cancer research institute, Philadelphia, USA)
anti Histon H2B (FL 126)	polyklonaler Kanninchen Antikörper gegen humans Histon H2B (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA)
anti Histon H4	polyklonaler Kanninchen Antikörper gegen humans Histon H4 (Abcam, Cambridge, USA)
anti Histon H3	polyklonaler Kanninchen Antikörper gegen das humane Histon H3 (Millipore, Billerica, USA)
anti V5	muriner monoklonaler Antikörper gegen das V5-Epitop (Invitrogen, Karlsruhe)
anti Aktin	muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes α Aktin (Chemicon international, Temecula, USA)

anti Asf1a	polyklonaler Kanninchen Antikörper gegen humans Asf1a Protein (Proteintech Europe, Manchester, UK)
anti Phospho-Threonin-Prolin	muriner monoklonaler Antikörper gegen Phospho-Threonin gefolgt von Prolin (Cell signaling, Danvers, USA)
Urim #4134 Präimmunsrum	Kanninchen Serum entnommen vor Immunisierung mit Peptid 4134 (im Auftrag: Biogenes GmbH, Berlin)
Hira #4667 Präimmunsrum	Kanninchen Serum entnommen vor der Immunisierung mit Peptid 4667 (im Auftrag: Biogenes GmbH, Berlin)
Maus IgG1 κ Isotypkontrolle	muriner monoklonaler IgG1 Antikörper (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, USA)

Konjugierte Sekundärantikörper **Charakteristika**
HRP-konjugiert

Goat anti rabbit HRP	HRP-gekoppelter Zweitantikörper aus der Ziege mit Spezifität gegen Kanninchen IgG (Dako, Glostrup, Dänemark)
Goat anti mouse HRP	HRP-gekoppelter Zweitantikörper aus der Ziege mit Spezifität gegen murines IgG (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, USA)
Swine anti rabbit HRP	HRP-gekoppelter Zweitantikörper aus dem Schwein mit Spezifität gegen Kanninchen IgG (Dako, Glostrup, Dänemark)

Cy-konjugiert

Cy2- polyclonal goat anti rabbit	Cy2-gekoppelter Ziegen Antikörper mit Spezifität gegen Hasen IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)
----------------------------------	--

Cy5- polyclonal goat anti rabbit Cy5-gekoppelter Ziegen Antikörper mit Spezifität gegen Hasen IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)

2.1.10 Reaktionskits

DNA-Sequenzierung BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems, Warrington, UK

Plasmid-Präparation PlasmidMiniprep Kit I, Peqlab, Erlangen, Deutschland
 Qiagen Midiprep Kit, Qiagen Maxiprep Kit, Qiagen, Hilden

Geleextraktion Qiaex II Gel Extraction Kit (150), Qiagen, Hilden

2.1.11 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agfa, München: Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme

GE Healthcare, Buckinghamshire: Amersham[™] Hyperfilm[™] ECL, Amersham[™] ECL[™] Western Blotting Detection Reagents

Heirler, Radolfzell Magermilchpulver

Invitrogen, Carlsbad, CA: NuPAGE[™] 4%-12% Bis-Tris-Gel, NuPAGE[™] Tris-Acetat-Gel, Nitrozellulosemembran Sandwich, NuPAGE[™] MES-SDS-Laufpuffer, Novex[™] Tris-Acetat SDS Laufpuffer, NuPAGE[™] Transfer Puffer, NuPAGE[™] Antioxidant, Reducing Agent, SeeBlue Plus 2 prestained Protein standard[™]

Merck, Hohenbrunn: Tween[®] 20

Nunc, Langenselbold Ein-Kammer Objektträger

Qiagen, Hilden: Geleextraktionssystem, PCR Reinigungssystem, Plasmid Präparationssystem

Roth, Karlsruhe Roti[®] Block, Triton X 100, FCS, Entellan, Sterilfilter, Ethanol, Methanol, Tris

Roche, Basel, Schweiz Ethidiumbromid

Serva, Heidelberg Ponceau S

Sigma-Aldrich, Steinheim: L-Mimosin, Aphidicolin

2.1.12 Geräte

Agfa, München:	Curix 60-System für die Entwicklung von Röntgensystemen
Amersham Pharmacia, Freiburg:	UV/ Visible Spectrophotometer Ultrospec 1000, GeneQuant RNA/DNA Calculator
Barloworld Scientific, USA:	Vortex-Mixer „Stuard-Vortex SA8“
BD Bioscience, Heidelberg:	FACSCalibur™, FACSCanto™
Beckman Coulter, München:	Zentrifuge Avanti™ J-20XP, J-6B
Biometra, Göttingen:	programmierbarer Thermostat für PCR Reaktionen „Tpersonal T3000“
Biorad, München:	Power Pac 300 Powersupply
Carl Zeiss GmbH, Jena:	Fluoreszenzmikroskop “Axiovert 25C”, konfokales Laser Scan Mikroskop “CLSM 410”
Eppendorf, Hamburg:	programmierter Thermostat für PCR “Mastercycler Gradient”, Zentrifugen “Hermle Z252MK”, “Hermle Z320K”, Kühlzentrifuge 5810R
Heraeus, Hanau:	Tischzentrifuge „Biofuge Pico“, Zentrifuge „Megafuge 1.0R“, Brutschränke, CO ₂ Inkubatoren, Sterilwerkbänke: „HERAsafe® HS12“, „LaminAir® LB-48C“
Invitrogen:	Xcell SureLock™ Novex Mini-Cell, XcellIII™ Blot Module
Leitz GmbH, Wetzlar:	Mikroskop “Diavert”
Millipore, Bedford, USA:	MilliQ-Reinstwasseranlage
Mitenyi:	µMACS-System
New Brunswick Scientific, USA:	Schüttelinkubator „Innova 4300“
Sigma, Osterode:	Zentrifugen: SIGMA 113, 1-14, 1-15K
WTW, Weilheim:	inoLab® pH 720

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.-coli* Bakterien

2.2.1.1 Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präp)

Zur Präparation von Plasmid-DNA in kleinerem Maßstab wurde das peqGold Plasmid Miniprep Kit I[®] der Firma Peqlab verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Eine 30 ml Bakterien-Übernachtskultur wurde 15 Minuten bei 1100 x g sedimentiert und in 8 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml Rnase A) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 8 ml Puffer P2 (200 mM NaOH; 1 % SDS). Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung mit 8 ml eiskaltem Puffer P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15 % (v/v) EtOH; 0,15 % (v/v) Triton -X-100) wurde die Anionenaustauschersäule (*Qiagen-tip 500*) äquilibriert. Das Zelllysate wurde durch Filtration unter Verwendung *Qiafilter* von Bakterentrümmern, Proteinen und genomischer DNA befreit und anschließend auf die Anionenaustauschersäule gegeben. Die beladene Säule wurde zweimal mit je 30 ml Puffer QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15 % (v/v) Isopropanol) gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 15 % (v/v) Isopropanol). Danach wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation für 30 Min bei 15.000 x g, 4 °C präzipitiert, mit 2,5 ml 70%-igem (v/v) EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde bei RT getrocknet und in 200 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert. Aufbewahrt wurde die DNA entweder kurzfristig bei 4°C oder längerfristig bei -20°C.

2.2.1.3 Präparation großer Mengen Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi Präp) wurde das Pure Link[™] HiPure Plasmid Filter Maxi Prep Kit der Firma Invitrogen verwendet. Die

Bakterien wurden in 50 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Isolierung der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2 Ethanolfällung von DNA

Um DNA aus einer Lösung zu fällen, wurde der Ansatz mit 0,1 Vol. 3M Na⁺-Acetat, pH 5,2 und 2,5 Vol. Ethanol_{abs} versetzt, gründlich gemischt und 30 min bei -80 °C gefällt. Die DNA wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 x g sedimentiert, mit 70 % (v/v) EtOH gewaschen und 15 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Anschließend wurde das DNA Sediment bei RT getrocknet und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 resuspendiert.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Photometrische Bestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion der DNA Suspension in H₂O mit einer Verdünnung von 1:100 bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Extinktion der DNA bei 260 nm (E_{260}) ist proportional zur DNA Konzentration der DNA. Eine $E_{260} = 1,0$ entspricht etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Der Quotient E_{260}/E_{280} ist ein Maß für die Reinheit der Präparation. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.3.2 Mengenabschätzung im Agarosegel im Vergleich zu Markerbanden

Bei dieser Methode ist nur eine ungefähre Mengenabschätzung möglich. Die zirkuläre DNA wurde durch Restriktionsendonukleasen linearisiert und auf ein 1%-iges (w/v) Agarosegel in Gegenwart von Ethidiumbromid aufgetragen. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung. Unter UV-Licht (245 nm) wurden die DNA Banden mit Marker-DNA Banden gleicher Größe und bekannter Konzentration verglichen.

2.2.4 Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine enzymatische *in vitro*-Methode zur Vermehrung von DNA-Fragmenten. Die Methode basiert auf der wiederholten Abfolge

von Doppelstrangaufschmelzungen, Anlagerung spezifischer Oligonukleotide (Primer) an die entsprechenden Einzelstränge und Synthese der zum Matrizenstrang komplementären DNA-Sequenz am 3'-OH-Ende der Primer. Die Reaktion wird durch eine Hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase katalysiert (Saiki *et al.*, 1988).

Ein Standardreaktionsansatz von 60 µl bestand aus 2,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate, ca. 50 ng DNA-Molekülen des Matrizenstranges, 60 pM Primer, 2U DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder *HF*-Polymerase) und 5 µl zur verwendeten Polymerase spezifischen Reaktionspuffers.

Der PCR-Reaktionsansatz wurde nach folgendem Zyklusprogramm amplifiziert:

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer	
Initiale Denaturierung	96	4	
Denaturierung	96	1	} 35 Zyklen
Primeranlagerung	52-60	1	
<u>Kettenverlängerung</u>	72	1	
Fiale Verlängerung	72	4	

Die individuelle Hybridisierungstemperatur (T_p) der Primer wurde entweder experimentell ermittelt oder mit der folgenden empirischen in Annäherung berechnet (Wu *et al.*, 1991):

$$T_p = \text{Primer(bp)} + 1,46 \cdot [2 \cdot (G + C) + A + T]$$

Die Größe und Menge der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.5 Mutagenese Polymerasekettenreaktion

Um eine Plasmid-DNA zu mutieren, wurde eine Mutagenese-PCR nach dem „QuickChange® XL Site-directed mutagenesis“-Protokoll durchgeführt. Bei dieser Methode kamen Oligonukleotid-Primer zum Einsatz, welche die gewünschte Mutation enthielten. Durch Synthese der zum Matrizenstrang komplementären DNA-Sequenz am 3'-OH-Ende der Oligonukleotide entstand ein Produkt, welches die gewünschte

Mutation enthielt. Um methylierte, nicht mutierte DNA zu eliminieren, wurde anschließend ein Verdau mit 10 U *DpnI* vorgenommen.

Ein Standardreaktionsansatz von 50 µl bestand aus 10 ng doppelsträngiger Matrizen-DNA, 125 ng Primer, 1 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate, 2,5 U DNA-Polymerase (*PfuTurbo* DNA- Polymerase) und 5 µl 10 x *PfuTurbo* DNA- Polymerase Puffer. Eine Erhöhung der Matrizen-DNA-Konzentration auf 50 ng bei gleichbleibender Oligonukleotid-Primer Konzentration war möglich, um mehr PCR-Produkt zu erhalten. Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem programmierbaren Thermostat durchgeführt.

Das Programm begann mit einer Inkubation des PCR-Ansatzes bei 95°C für 1 min, um den Matrizenstrang zu denaturieren. Es folgten 18 Zyklen aus Doppelstrangdenaturierung (95°C, 50 s), Anlagerung der Oligonukleotide (60°C, 50 s) und Synthese des Gegenstranges (68°C, 2 min pro 1 kb Plasmid-DNA). Die Größe und Menge der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Die gewünschte Mutation wurde durch Sequenzierung verifiziert.

2.2.6 Elektrophorese zur Größenauffrennung von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von 1%-igen (w/v) Agarosegelen (m/v) wurden 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen der gelösten Agarose auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid ad 0,5 µg/ml zugegeben. Nach dem Erstarren wurde das Agarosegel in ein mit TAE-Puffer gefülltes Gelkammer gelegt. Die Proben wurden in DNA-Probenpuffer aufgenommen und die Probentaschen damit befüllt. Die Elektrophorese wurde standardgemäß bei 15 V/cm durchgeführt.

2.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen durch Bindung an Siliciumpartikel

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch die Agarose-Gelelektrophorese wurde die gewünschte DNA Bande unter UV-Licht (245 nm) ausgeschnitten und das Gewicht des Gelstücks bestimmt. Abhängig von der Größe des im Agarosegel gefangenen DNA-Fragments wurde entsprechendes Volumen des Lösungspuffers QX1 (Qiagen) hinzugegeben:

Größe des DNA-Fragmentes	Zugabe von QX1, x-faches Volumen des Gel-Gewichts	Zugabe von H ₂ O, x-faches Volumen des Gel-Gewichts
< 100 bp	6-faches Volumen	-
100 bp – 4 kb	3-faches Volumen	-
> 4 kb	3-faches Volumen	2-faches Volumen

QIAEX II-Lösung (Qiagen) wurde abhängig von der eingesetzten DNA Menge hinzugefügt:

DNA-Menge	Zugabe an QIAEX II
≤ 2µg DNA	10 [µl]
2-10 µg DNA	30 [µl]

Unter mehrmaligem Mischen wurde das gelöste Agarosestück mit der DNA-Bande 10 min bei 50 °C inkubiert. Dabei wurde kontrolliert, dass der pH-Wert der Lösung im optimalen pH-Bereich ($\text{pH} \leq 7,5$) liegt, angezeigt durch einen pH-Indikator, um eine maximale Adsorption der DNA durch die Säulenpartikel zu erreichen. Bei einem unerwünschten Farbumschlag wurden nach Bedarf 1-10 µl einer 3 M Na-Acetat-Lösung, pH 5,0 hinzugegeben, um den optimalen pH-Bereich zu erhalten. Danach wurde das Eppendorf-Gefäß mit der geschmolzenen Gelmatrix für 30 s mit 10.000 x g, RT zentrifugiert und das Sediment in 500 µl Puffer QX1 (Qiagen) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 s; 10.000 x g; RT) wurde das Sediment zweimal mit Puffer PE (Qiagen) gewaschen und 30-60 Min bei RT getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,4 gelöst und, um die Elutions-Effizienz zu steigern, unter folgenden Bedingungen inkubiert:

Größe des DNA-Fragments	Inkubation
≤ 4 kb	RT, 5 min
4 kb – 10 kb	50 °C, 5 minuten

Anschließend wurde die Lösung für 30 s bei 10.000 x g zentrifugiert.

2.2.8 DNA Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode

Die DNA Sequenzierung wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch Methode durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Das Prinzip dieses enzymatischen Verfahrens beruht auf dem Einbau von fluoreszenzmarkierten 2', 3' Dideoxy-Nukleotiden (ddNTPs) in

einen durch die DNA-Polymerase I neu synthetisierten DNA-Strang. Dies führt zum Abbruch der Synthese, da die für die Kettenverlängerung benötigte 3'-Hydroxylgruppe im Didesoxy-Nukleotid fehlt. Auf diese Weise wird die Polymerisierung selektiv bei A, C, G oder T terminiert. Es entsteht eine Vielzahl von unterschiedlich langen DNA Fragmenten, die sich durch ein fixes 5'-Ende und ein variables, basenspezifisches 3'-Ende auszeichnen. Durch den Einsatz von vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (A: di-chloro [R6G]; C [ROX]; G di-chloro [R100]; T di-chloro [TAMRA]) können alle vier enzymatischen Sequenzier-Reaktionen gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Durch Gel-Elektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel werden die DNA Fragmente getrennt.

Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion:

Komponente	Endkonzentration/Volumen
Matrizen-DNA	150-300 ng
Oligonukleotid zur Sequenzierung	5 pmol
BigDye Terminator Mix v3.1	0,5 µl
BigDye Puffer	1x
H ₂ O _{dest}	ad 10 µl

Es wurden 30 Zyklen mit einem spezifischen Temperaturprofil in einem programmierbaren Heizblock (*UNO II*, Biometra®) durchgeführt:

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer
Denaturierung	96	30 s
Primeranlagerung	50	15 s
Kettenverlängerung	60	4 min

Die Auftrennung der synthetisierten Sequenzierprodukte wurde vom ZMMK-ServiceLabor, Institut für Biochemie der Medizinischen Einrichtungen der Universität zu Köln, mit einem ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer/ Applied Biosystems) oder (ab 2005) mit einem ABI Prism™ 3730 DNA Sequencer (Perkin Elmer/ Applied Biosystems) im Institut für Genetik an der Universität zu Köln durchgeführt.

2.2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.9.1 Sequenzspezifisches endonukleolytisches Schneiden von DNA

Die verwendeten Enzyme (Roche Diagnostics, Mannheim) spalten die DNA an definierten Schnittstellen, bei denen die DNA-Erkennungssequenz der Spaltstelle entspricht. Pro μg DNA wurden 1-3 Units Restriktionsenzym eingesetzt. Eine Enzymeinheit (Unit) entspricht dabei der definierten Menge an Enzym, die in einer Stunde 1 μg DNA, bei der spezifischen optimalen Temperatur, in einem Gesamtvolumen von 10 μl spaltet. Um optimale Reaktionsbedingungen für die verschiedenen Restriktionsenzyme zu schaffen, wurden die vom Hersteller mitgelieferten 10 x Puffer verwendet. Die DNA wurde nur dann mit zwei verschiedenen Restriktions-Endonukleasen gleichzeitig geschnitten, wenn die geforderten optimalen Pufferbedingungen erfüllt waren. Ansonsten wurde nacheinander geschnitten, wobei nach jedem Restriktionsverdau eine EtOH-Fällung durchgeführt wurde.

2.2.9.2 Ligation von DNA-Doppelsträngen mit überlappenden kohäsiven Enden durch T4-DNA-Ligase

Isolierte DNA-Fragmente wurden in einem 4-fach molaren Überschuss mit linearisierter Vektor DNA gemischt. Nach der Zugabe von 1 U T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) und 1/10 Vol. 10 x Inkubationspuffer (660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,5) wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 6 °C inkubiert und anschließend zur Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt.

Ligationsansatz:

Komponenten	verwendetes Volumen
DNA-Gesamtmenge 100 ng (ein 4:1 molares Verhältnis der Vektor-DNA zur Insertions-DNA)	2-4 μl
10 x Ligationspuffer	1 μl
T4 DNA Ligase (1 U/ μl)	1 μl
H ₂ O	4-6 μl
Gesamtvolumen	Σ 10 μl
Inkubation	ü.N., bei 6°C

2.2.9.3 Herstellung transformations-kompetenter *E.coli* DH5 α Bakterien

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Eine stationäre *E.coli*-Kultur des Stammes DH5 α (500 μ l) wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit vorgewärmten 2 x YT-Medium verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} \approx 0,50$) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienkultur wurde sofort unter gelegentlichem Schwenken für 10 Minuten auf Eis abgekühlt und 5 Minuten bei 4.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in eiskaltem TFB I Puffer (30 mM Kaliumacetat; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,8) resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert (5 Minuten, 4.000 x g; 4 °C) und in 2 ml eiskaltem TFB II Puffer (10 mM MOPS, pH 7,5; 75 mM CaCl₂; 10 mM NaCl; 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert. In jedes Eppendorf-Gefäß wurden 200 μ l der Lösung mit den kompetenten Bakterien gegeben und sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Bakterien bei -80 °C gelagert.

2.2.9.4 Transformation von *E.-coli* Bakterien

Transformations-kompetente *E.-coli*-Bakterien (50 μ l) wurden vorsichtig mit dem Ligationsansatz (oder dem PCR-Ansatz von der Mutagenese-Polymerasekettenreaktion) vermischt und 30 min bei 4°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde 90 s bei 42°C und anschließend 3 min auf Eis inkubiert. Darauf folgend wurden 900 μ l LB-Medium mit dem Transformationsansatz angeimpft und 1 h bei 37°C unter Schütteln (750 Upm) inkubiert. Die Bakterien wurden in der Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert (10 s, 13.000 Upm, RT). Der Überstand wurde bis auf 100 μ l verworfen, das Sediment resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit 100 μ g/ml Ampicillin ausgestrichen. Die transformierten Bakterien wurden über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Proteine wurden elektrophoretisch in denaturierenden Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS aufgetrennt (SDS-PAGE) (Laemmli *et al.*, 1970). Es wurde für die diskontinuierliche Elektrophorese 12%-14% Bis-Tris-Gele (Invitrogen) verwendet. Die

Polyacrylamidgelelektrophorese wurde mit MES-SDS-Puffer im Xcell *SureLock*TM Mini-Cell System von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Auftrennung von Proteinen im höhermolekularen Bereich wurden Tris-Acetat-Gele benutzt. In diesem Fall diente Tris-Acetat Puffer als Laufpuffer. Als Standardproteinmarker wurde „SeeBlue Plus 2 Prestained Protein StandardTM“ (Invitrogen) eingesetzt. Der Standard enthält rekombinante, gefärbte Proteine mit Molekulargewichten zwischen 4 kDa und 250 kDa. Die Elektrophorese wurde etwa 1 h bei 200 V durchgeführt.

Probenzusammensetzung : 20 µl Zelllysat (Proteinäquivalent aus 2×10^5 Zellen)
 5 µl NuPAGE[®] LDSSample Buffer (4x)
 2 µl NuPAGE[®] reducing agent (10x)

Apparente Molekulargewichte der Markerproteine des „SeeBlue Plus 2 Prestained Protein StandardTM“ (Invitrogen) in Abhängigkeit des verwendeten Laufpuffers:

Standardprotein	Mes-Puffer (kDa)
Myosin	188
Phosphorylase	98
BSA	62
Glutamat Dehydrogenase	49
Alkohol Dehydrogenase	38
Carbonat Anhydrase	28
Myoglobin	17
Lysozym	14
Aprotinin	6
Insulin, B-Kette	3

Standardprotein	Tris-Acetat-Puffer (kDa)
Myosin	210
Phosphorylase	111
BSA	71
Glutamat Dehydrogenase	55
Alkohol Dehydrogenase	41

2.3.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western blotting)

Durch das Western-Blot-Verfahren wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Burnette, 1981). Dabei wurden die Nitrocellulosemembran und das Polyacrylamidgel zwischen zwei Blatt Whatman-3MM-Filterpapier gelegt, mit Transferpuffer (25 ml NuPAGE® Transfer Puffer, 50 ml Methanol, ad 500 ml ddH₂O) durchtränkt und zwischen zwei Graphitelektroden des Xcell *SureLock*TM Mini-Cell Systems (Invitrogen) laut Herstellerprotokoll angeordnet. Der elektrophoretische Transfer erfolgte eine Stunde bei 30 V. Die Transfer-Effizienz wurde durch Anfärbung der Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) Trichloressigsäure) überprüft.

2.3.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran zwei Stunden in Blocklösung 1 [5% Magermilchpulver (w/v), 5 ml Roti Block®, ad 50 ml ddH₂O] geschwenkt, um Proteinbindungsstellen der Nitrozellulose abzusättigen. Die Membran wurde zwei Stunden bei RT unter Schwenken mit dem in Blocklösung 1 verdünnten primären Antikörper inkubiert. Eine Liste der verwendeten Primärantikörper mit den entsprechenden Spendertieren und verwendeten Verdünnungen zeigt Tab.4.

Nach der Bindung des primären Antikörpers wurde die Nitrozellulosemembran dreimal fünf min in PBST gewaschen. Zum Nachweis des primären Antikörpers wurde die Membran 45 min unter Schwenken mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (siehe Tab.5) in Blocklösung 2 [5% (w/v) Magermilchpulver, 50 ml TBS, 1% (v/v) FCS, 1% (w/v) BSA] inkubiert. Darauf folgte ein erneutes Waschen der Nitrozellulosemembran für dreimal 5 min mit PBST. Die Membran wurde anschließend mit einer 1:1 Mischung der Lösungen ECL1 und ECL 2 (Amersham) für 1 min inkubiert, um eine Lumineszenzreaktion hervorzurufen. Diese erlaubte eine Lokalisierung der an die Zielproteine gebundenen Antikörper auf der Nitrozellulosemembran (Immunoblotting). Die Chemilumineszenz wurde durch Exposition eines Röntgenfilms dokumentiert.

Tab.4: verwendete Primärantikörper

Name	Spezifität	Verdünnung
anti HIRA (WC119)	monoklonal mouse anti human	1:50
anti URIM #4134	polyklonal rabbit anti human	1:1000
anti Histon H2B (FL126)	polyklonal rabbit anti human	1:200
anti Histon H4	polyklonal rabbit anti human	1:1000
anti Histon H3	polyklonal rabbit anti human	1:25000
anti V5	monoklonal mouse anti human	1:5000
anti Actin	monoklonal mouse anti human	1:1000
anti Asf1a	polyklonal rabbit anti human	1:1000
anti P-Thr-Pro	monoklonal mouse anti human	1:5000

Tab.5: verwendete Sekundärantikörper

Name	Verdünnung
Goat anti rabbit HRP	1:1000
Goat anti mouse HRP	1:1500
Swine anti rabbit HRP	1:1000

2.3.4 Ko-Immunopräzipitation

Das Prinzip der Fällung von Proteinen und deren Interaktionspartnern aus einem Zelllysate besteht in der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das Zielprotein und der anschließenden Bindung des Antikörper-Protein-Komplexes an eine Feststoffmatrix. Nach Elution der gebundenen Proteinkomplexe können diese durch SDS-PAGE und Western Blot identifiziert werden.

Im ersten Schritt wurden 1×10^7 Zellen mit 1 ml Triton X-100-Lysepuffer unter nicht-reduzierenden Bedingungen 30 min unter Schütteln bei 4°C lysiert (siehe 2.4.4). Um die Aktivität der Proteasen zu inhibieren, wurden dem Lysepuffer 1/10 Volumen Complete[®] Proteasehemmer (Roche Diagnostics) zugesetzt. Diese hemmen ein breites Spektrum an Serin-, Cystein- und Metalloproteasen, sowie Calpaine. Anschließend wurde der Ansatz bei 12000 Upm, 30 min, 4°C zentrifugiert und der Überstand in der Ko-Immunopräzipitation eingesetzt. Nach Zugabe des Antikörpers (siehe Tab.6) inkubierte der Ansatz drei Stunden, bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Darauf folgte die Inkubation mit 50 µl µMACS[®] ProteinG-beads für 30 min. Nachdem die Präzipitationssäulen in das Magnetfeld des µMACS[®]-Separators (Miltenyi) platziert wurden, erfolgte deren Equilibrierung mit 200 µl Triton X-100-Lysepuffer [150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% (v/v) Triton X 100]. Nach dem Laden der Säule mit dem Lysat wurden die Zielproteine an der magnetischen Matrix der Säulen gebunden, da die magnetischen ProteinG beads an den Fc-Teil des spezifischen Antikörpers binden (Abb. 1). Ungebundene Proteine wurden durch viermaliges Waschen der Säulen mit je 200 µl Triton-X-100-Lysepuffer und einmaligem Waschen mit 100 µl Niedrig-Salz-Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5) von der Säule entfernt. Die Elution der Proteine von der Säulenmatrix erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden 20 µl reduzierender SDS-Ladepuffer auf die Säule gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 50 µl SDS-Ladepuffer wurden die Proteine vollständig von der Säule eluiert und konnten für die weitere Analyse mittels SDS-PAGE benutzt werden.

Tab.6: Verwendete Präzipitations-Antikörper

Name	Spezifität	Menge
anti HIRA (WC15)	monoklonal mouse anti human	3 µg
anti URIM #4134	polyklonal rabbit anti human	3 µg
anti V5	monoklonal mouse anti human	2 µg

Tab.7: Verwendete Isotypkontrollen

Name	Einsatz bei Ko-Immunopräzipitation mit
Urim #4134 Präimmunsereum	anti Urim #4134
Mouse IgG1 κ Isotypkontrolle	WC15, anti V5

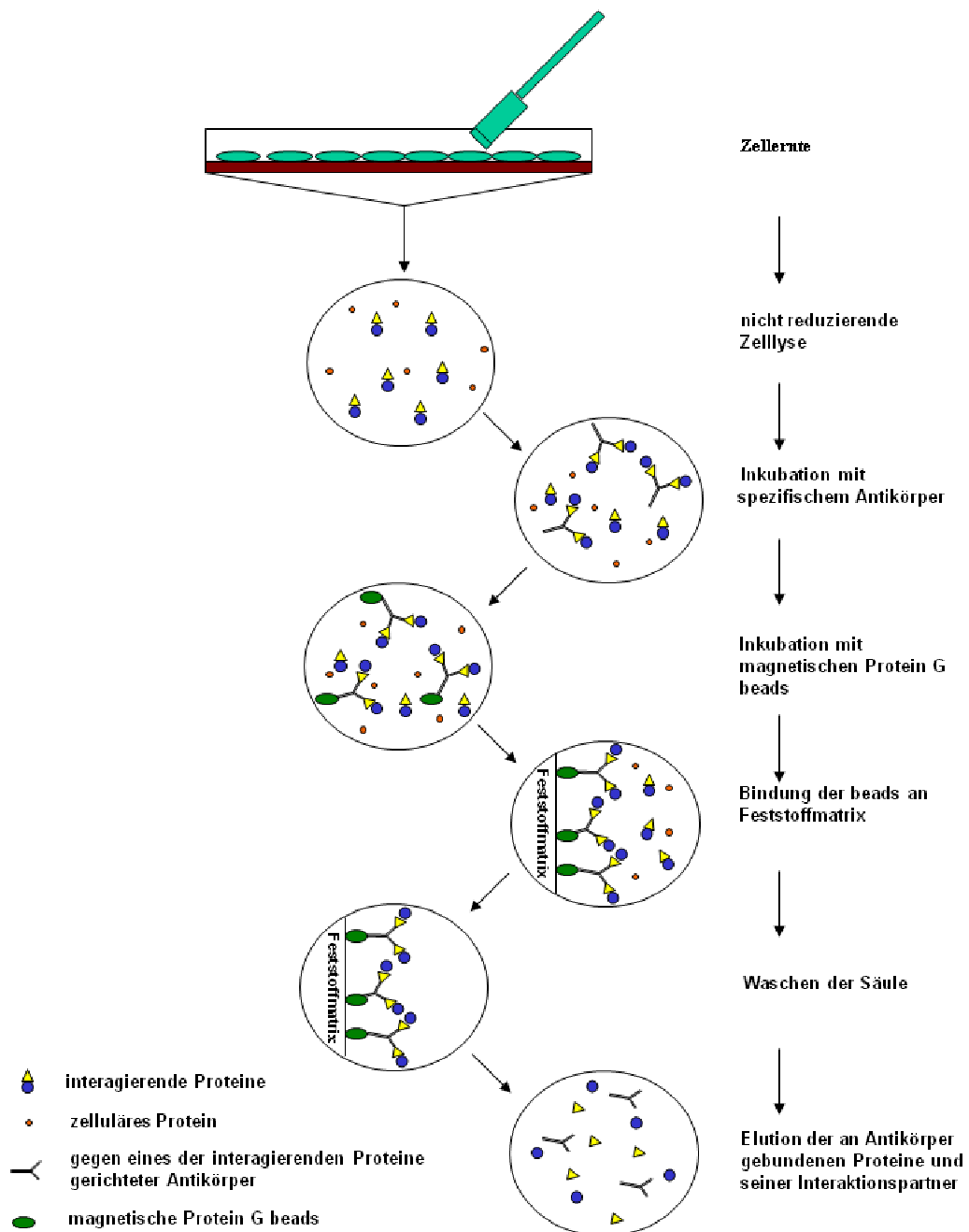


Abb.4: Prinzip der Ko- Immunoräzipitation von Proteinen. Schematische Darstellung des Ablaufs der durchgeführten Ko-Immunopräzipitationen.

2.4 Immunhistochemische Methoden

2.4.1 Immunhistochemische Doppelfärbung von intrazellulären Proteinen

Eine Möglichkeit zum Nachweis der Lokalisation von Proteinen und der Identifikation von Interaktionspartnern innerhalb der Zelle bietet die immunhistochemische Färbung zellulärer Proteine. Das Prinzip besteht in der Makierung der zu untersuchenden Proteine durch spezifische Primärantikörper und die Bindung von Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörpern an den Fc-Teil des Primärantikörpers. 293T Zellen wurden auf Einkammer-Objektträgern in RPMI-Medium, 10% (v/v) FCS bei 37°C und 5% CO₂ bis zu 30% Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden nach der Fixierung mit Paraformaldehyd (siehe 2.4.6) 3 x 10 min mit TBS gewaschen. Zum Aufschluss der Zellmembran wurde anschließend 10 min mit 0,5 M Ammoniumchlorid und 0,25% (v/v) Triton X 100 in TBS gewaschen. Nach zweimaligem Waschen der fixierten Zellen für 10 min in TBS, wurden unspezifische Antikörperbindestellen mit 5% (w/v) BSA in TBS für 2 Stunden blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen Urim in einer Verdünnung von 1:750 in 0,8% (w/v) BSA in TBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem URIM Präimmunserum inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde von den Zellen durch viermaliges Waschen für 10 min mit TBS entfernt. Darauf folgte die Inkubation mit dem Antikörper Cy2 polyclonal gaoat anti rabbit in 1:200 Verdünnung. Nach 3-maligem Waschen der Zellen mit TBS wurden nochmals für 1h mit 5% (w/v) BSA in TBS blockiert. Darauf folgte eine 2 stündige Inkubation mit einem Antikörper gegen Hira. Als Kontrolle diente HIRA-Präimmunserum. Durch 4 x 10 min waschen der Zellen mit TBS wurde nicht gebundener Antikörper entfernt. Es folgte eine Inkubation mit dem Fluorochrom gekoppelten Antikörper Cy5 polyclonal goat anti rabbit für 60 Minuten in 1:800 Verdünnung. Abschließend wurden die Zellen 4 x 10 min mit TBS gewaschen. Um die Präparate zu entwässern, wurden sie für je 2 min aufsteigend in einer Alkoholreihe von 70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol bis Xylol inkubiert. Das Eindecken der Zellen wurde mit Entellan (Roth, Karlsruhe) vorgenommen. Nach dem mehrstündigen, lichtgeschützten Trocknen des Eindeckmediums wurden die Färbungen fluorezenzmikroskopisch ausgewertet.

2.4.2 Immunhistochemische Einzelfärbung von intrazellulären Proteinen

293T Zellen wurden auf Einkammer-Objektträgern in RPMI-Medium, 10% (v/v) FCS bei 37°C und 5% CO₂ bis zu 30% Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden nach der Fixierung mit Paraformaldehyd (siehe 2.5.6) 3 x 10 min mit TBS gewaschen. Zum Aufschluss der Zellmembran wurde anschließend 10 min mit 0,5 M Ammoniumchlorid und 0,25% (v/v) Triton X 100 in TBS gewaschen. Nach zweimaligem Waschen der fixierten Zellen für 10 min in TBS wurden unspezifische Antikörperbindestellen mit 5% (w/v) BSA in TBS für 2 Stunden blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primärantikörper in 0,8% (w/v) BSA in TBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation der Zellen mit den Präimmunsereen der entsprechenden Primärantikörper. Durch 4 x 10 min waschen der Zellen mit TBS wurde nicht gebundener Antikörper entfernt. Es folgte eine Inkubation mit dem Fluorochrom gekoppelten Antikörper Cy2 polyclonal goat anti rabbit für 60 min in 1:200 Verdünnung. Im Anschluss wurden die Zellen 4 x 10 min mit TBS gewaschen und die DNA in den Zellkernen durch eine fünfminütige Inkubation mit 7-AAD nachgewiesen. Um die Präparate zu entwässern, wurden sie für je 2 min aufsteigend in einer Alkoholreihe von 70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol bis Xylol inkubiert. Das Eindecken der Zellen wurde mit Entellan (Roth, Karlsruhe) vorgenommen. Nach dem mehrstündigen, lichtgeschützten Trocknen des Eindeckmediums wurden die Färbungen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Tab.8: Verwendete Primärantikörper für Immunhistochemische Färbungen und fluorochromgekoppelte Sekundärantikörper

Primärantikörper (Verdünnung)	Fluorochromgekoppelter Sekundärantikörper (Verdünnung)	Anwendung
anti Hira #4667 (1:2000)	Cy2 polyclonal goat anti rabbit (1:200)	Einfachfärbung
anti Hira #4667 (1:2000)	Cy5 polyclonal goat anti rabbit (1:800)	Doppelfärbung
anti Urim #4134 (1:750)	Cy2 polyclonal goat anti rabbit (1:200)	Einfachfärbung Doppelfärbung

2.4.3 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Konfokale Aufnahmen fluoreszierender Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Annette Schmidt (Abteilung molekulare und zelluläre Sportmedizin, Sporthochschule Köln) am CLSM 410 (Carl Zeiss AG, Jena) durchgeführt. Beim CLSM wird im Gegensatz zu einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop ein Schnittbild über sequentielle punktförmige Abtastung mit konfokaler Filterung erzeugt. Dies erlaubt die Betrachtung optischer Schnitte des Präparates und somit eine exakte Kollokalisierung unterschiedlich gefärbter Strukturen. Dabei wird jeweils ein Schwarz/Weiß-Bild erzeugt, dem nachträglich ein Farbkanal zugewiesen wird. Verschiedene Fluoreszenzen können auf diese Weise in drei unterschiedliche Farbkanäle eingelesen werden, die anschließend digital zu einem Farbbild kombiniert werden können (Paddock, 2000). Durch die Bearbeitung des Bildes in einem Grafikbearbeitungsprogramm (adobe Photoshop 5.0, Adobe Systems, 1998) kann ein mehrfarbiges Bild wieder in seine drei Kanäle aufgetrennt werden, was bei der Untersuchung von Kollokalisierungen von Interesse ist. Zur Mikroskopie wurden Zellen auf Einkammer-Objektträgern (Nunc, Langensselbold) kultiviert. Mit Hilfe eines 63 x 1,4 NA Ölimmersionsobjektivs und der systemeigenen Software „Carl Zeiss LSM“ wurden Bilder mit einer Größe von 514 x 514 Bildpunkten aufgenommen. Bei Einzelfärbungen von Urim und Hira wurden adhärend wachsende 293T Zellen im grünen Kanal in Bildstapeln durch alle Zellebenen aufgenommen (Anregung: 488 nm, Erfassung mit Bandpass-Filter 505-530 nm). Die durch APC nachgewiesene DNA wurde im roten Kanal detektiert (Anregung 543 nm, Erfassung mit LP 560 nm). Bei der Doppelfärbung von Hira und Urim wurde Hira im roten Kanal (Anregung 543 nm, Erfassung mit LP 560 nm) und Urim im grünen Kanal (Anregung: 488 nm, Erfassung mit Bandpass-Filter 505-530 nm) aufgenommen.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Zellkultur

2.5.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Laboren der Sicherheitsstufe S1 oder S2 unter einer Sterilbank der Sicherheitsklasse II (Heraeus Biotech, Hanau) durchgeführt. Die Zellen

wurden in Inkubatoren (Heraeus) unter 10% CO₂-Versorgung bei 37 °C und 95 bis 100 %-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Medien, Zusätze und Lösungen wurden nach dem Autoklavieren oder Sterilfiltrieren unter sterilen Bedingungen gehandhabt.

2.5.1.2 Passage adhärenter Zellen durch Trypsinierung

Nach Abnahme des Zellkulturüberstandes wurden die Zellen einmal mit Ca²⁺-freiem PBS gewaschen, mit 1 ml einer Trypsin-Lösung (10 x-fach Trypsin (Sigma, Deisenhofen) pro 10 ml PBS für 3-5 Minuten bei 37° C inkubiert und von der Kulturschalenoberfläche abgelöst. Anschließend wurden die gelösten Zellen in geeignetem Medium (DMEM, 10% (v/v) FCS oder RPMI, 10% (v/v) FCS) resuspendiert, wodurch die Trypsin-Aktivität blockiert wurde, und einmal mit Medium gewaschen. Nach Bedarf wurden eine definierte Anzahl Zellen in die Zellkulturflasche zurückgegeben und in frischem Medium aufgenommen. Um eine homogen proliferierende Zellpopulation zu erhalten, wurden die Zellen bei 70% Konfluenz aufgeteilt.

2.5.2 Transiente Calciumphosphat-Transfektion von DNA in Eukaryoten-Zellen

Bei einer Transfektion von 293T Zellen auf 15 cm Zellkulturschalen wiesen die zu transfizierenden Zellen eine Konfluenz von 60 – 80% auf. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das DMEM-Medium durch 30 ml frisches Medium ersetzt und die Zellen anschließend bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Die Transfektion erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt, wurden ca. 30 µg DNA mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 900 µl aufgefüllt und diese mit 100 µl 2,5M CaCl₂ versetzt. Im zweiten Schritt wurde zu diesem Ansatz 1 ml 2 x HEBS pH7,2 pipettiert und die gesamte Lösung 3 s mit Hilfe des Vortex-Mixer „Stuard-Vortex SA8“ gemischt. Im Anschluß an eine Inkubation von 2 min bei RT wurde der gesamte Transfektionsansatz tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 17-24 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert.

2.5.3 Kryokonservierung von Zellen

Etwa 5 x 10⁶ Zellen wurden trypsinisiert, in Medium überführt und durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min bei RT sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 900 µl

Einfríermedium mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert. Diese Zellsuspensionen wurden zügig in Gefrier-Ampullen überföhrt und sofort auf Eis gelagert. Zunächst wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren und nach 48 h zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überföhrt.

2.5.4 Lyse von 293T Zellen mittels Triton X-100 Lysepuffer

Die Extraktion von Gesamtproteinen aus 293T Zellen erfolgte durch Lyse der Zellen mit Triton X-100 Lysepuffer [150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% (v/v) Triton X 100]. Dazu wurden 1×10^7 293T Zellen mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS geerntet und für 4 min bei 5000 Upm sedimentiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl verworfen und das Sediment resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für die nicht reduzierende Lyse mit 1 ml Triton X-100 Lysepuffer und 100 µl 10 x Complete Protease Inhibitor (Roche Diagnostics) gemischt. Zur Lyse unter reduzierenden Bedingungen wurde zusätzlich 1 µl 1M DTT zugesetzt. Die Protease-Inhibitoren hemmen ein breites Spektrum an Serin-, Cystein- und Metalloproteasen, sowie Calpaine. Bei der Untersuchung von phosphorylierten Proteinen wurde dem Lysepuffer 10 µl Phosphataseinhibitor (Sigma Aldrich, 1:100 Verdünnung) zugesetzt. Die Lyse erfolgte durch Inkubation für 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler. Nach erfolgter Lyse wurde der Ansatz für 10 min bei 6000 Upm und 4°C zentrifugiert und anschließend der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überföhrt. Die nicht reduzierten Lysate wurden in der Ko-Immunopräzipitation, die reduzierten Lyse für Western Blot Analysen eingesetzt.

2.5.5 Regulierte Expression von Genen durch das Tetrazyklin Expressionssystem

Zur Überexpression eines für die Zelle potentiell toxischen Proteins, wurde sich des T-Rex™ Expressionssystems (Invitrogen) bedient. Das Prinzip des Systems beruht auf der durch Tetrazyklin induzierbaren Expression eines Gens. Dazu wird die cDNA des zu induzierenden Gens in den Tetracyclin-induzierbaren Vektor pcDNA 4-TO kloniert. Dieser enthält eine Bindestelle für einen tetrameren Tetracyclin-Repressor, welcher den Promotor des Gens abschließt und somit eine Expression des zugehörigen Inserts verhindert. Die Bildung des Tetracyclin-Repressors erfolgt durch die Expression eines Repressor kodierenden Gens auf dem Plasmid pcDNA 6-TR (Invitrogen).

Dafür wurden 293T Zellen bis zu 60% Konfluenz in DMEM mit 0,1% (v/v) FCS kultiviert und die Plasmide pcDNA 4-TO (mit Insert) und pcDNA 6-TR durch Calcium-Phosphat-Transfektion (siehe 2.5.2) in die Zellen kotransfiziert. Um eine wirkungsvolle Repression des Zielgens zu erreichen, wurden pcDNA 6-TR und pcDNA 4-TO bei der Transfektion im Verhältnis 6:1 eingesetzt. So wurde ein Überschuss an Tetracyclin Repressor und eine wirkungsvolle Promotorrepression gewährleistet.

Nach Inkubation der ko-transfizierten 293T Zellen für 24 h bei 37°C und 10% CO₂ im Zellkulturinkubator wurde für 6 h mit 1 µg/ml Tetrazylin inkubiert. Durch die Bindung von Tetrazyklin an den tetrameren Repressor verändert dieser seine Konformation in der Weise, dass eine weitere Bindung an den Operatorbereich des Gens nicht mehr möglich ist. Der Repressor verläßt die DNA und der Promotor kann als Startpunkt für die Transkription des Gens dienen.

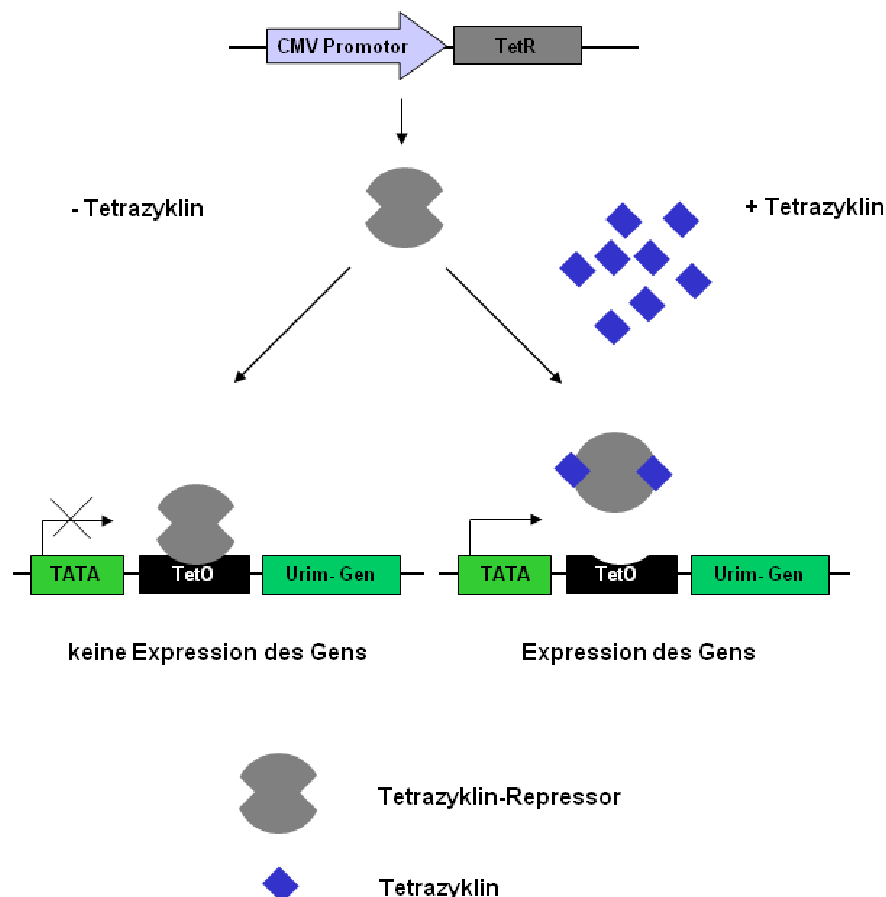


Abb.5: Prinzip der Tetracyclininduktion eines Proteins. Abkürzungen: CMV, Cytomegalovirus; TetR, Tetracyclin Repressor Gen; TetO, Tetracyclin Operator; TATA, TATA-Box

2.5.6 Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd

Zellen auf Objektträgern wurden mit 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Dazu wurden 293T Zellen in Einkammer-Objektträgern mit RPMI Medium mit 10% (v/v) FCS bis zu einer Konfluenz von ca. 30% bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach dem Waschen der Zellen mit 0,2 M PBS, wurden die Zellen in 37°C vorgewärmten 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS, pH 7,6 für 10 min inkubiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen in PBS bei 4°C bis zur Färbung gelagert.

2.5.7 Synchronisation von 293T Zellen

2.5.7.1 Reversibler Zellzyklusarrest in der frühen S-Phase und in der M-Phase

Die reversible Arretierung von 293T Zellen in der frühen S-Phase des Zellzyklus erfolgte durch die Inkubation der Zellen mit dem Antibiotikum Aphidicolin. Aphidicolin ist ein tetracyclisches Diterpen aus dem Pilz *Nigrospora sphaerica*. Es hemmt in eukaryotischen Zellen die Zellteilung, indem es die DNA-Polymerase α und δ reversibel inhibiert. Infolge dessen arretiert die Zelle in der frühen S-Phase.

293T Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase einem Aphidicolin-Doppelblock unterzogen. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Aphidicolin (Stocklösung: 10 mM Aphidicolin in DMSO gelöst) in DMEM für 18 h bei 10% CO₂ und 37°C inkubiert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen zweimal mit 10 ml DMEM-Medium gewaschen und 7 h in DMEM Medium, 10% (v/v) FCS inkubiert. Im Anschluss daran wurde der zweite Block durch Aphidicolin-Inkubation in der gleichen Weise wie der erste Block durchgeführt. Um Zellen synchronisiert in M-Phase zu erhalten, wurden die Zellen im Anschluss in DMEM-Medium, 0,1% (v/v) FCS 6 h inkubiert. Die Effizienz der Zellsynchronisation wurde durch die durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehalts der Zellen kontrolliert (siehe 2.5.8.2)

2.5.7.2 Synchronisation von 293T Zellen in der G0/1-Phase des Zellzyklus

Eine Möglichkeit 293T Zellen reversibel in der G 0/1-Phase des Zellzyklus zu arretieren besteht in der Inkubation der Zellen mit der Pflanzenaminosäure L-Mimosin (β -[N-(3-hydroxy-4-pyridon)]- α -aminopropionsäure) aus den Blättern der Leguminosen *Mimosa* und *Leucaena*. Es blockiert die DNA-Synthese, indem es die Hydroxylierung von

Deoxyhypusin verhindert und somit den Initiationsfaktor eIF5-A inhibiert. Zur G 0/1-Arretierung wurden 293T Zellen bis zu 60% Konfluenz kultiviert und anschließend mit 0,5 mM L-Mimosin (Stocklösung: 10 mM L-Mimosin in DMEM, 10% (v/v) FCS gelöst) in DMEM-Medium, 10% (v/v) FCS für 18 h bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 10 ml DMEM-Medium gewaschen und 7 h in DMEM-Medium, 10% (v/v) FCS inkubiert. Für den zweiten Mimosin-Block wurde die Zellen anschließend nochmals mit DMEM mit 0,5 mM L-Mimosin für 18 h inkubiert. Der Arrest der Zellen in G0/1-Phase wurde durchflusszytometrisch kontrolliert (siehe 2.5.8.2).

2.5.8 Durchflusszytometrie

2.5.8.1 Propidium-Iodid-Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie

Der Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid (PI) kann die perforierte Zellmembran von toten Zellen, doch nicht die intakte Zellmembran von lebenden Zellen durchdringen. Diese Eigenschaft wird in der Durchflusszytometrie zur Lebend-Tod-Diskriminierung von Zellen verwendet. Um tote Zellen bei einer durchflusszytometrischen Analyse zu diskriminieren, wurden rund 5×10^5 Zellen mit 1 µg/ml PI versetzt und 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Eine weitere durchflusszytometrische Anwendung von PI stellt die Messung des DNA-Gehalts von Zellen im Rahmen einer Zellzyklusanalyse dar (siehe 2.4.8.2).

2.5.8.2 Zellzyklusmessung mittels Durchflusszytometrie

Die Bestimmung von Zellzyklusphasen erfolgt durch die Analyse des DNA-Gehalts der Zellen nach PI-Inkubation. PI markierte DNA emittiert Fluoreszenzlicht bei einer Wellenlänge von 580 nm bis 650 nm. Da PI stöchiometrisch an die DNA bindet, ist mit dieser Ein-Parameter-Messung eine Einteilung der Zellen in G0/G1-, S- und G2/M-Phase-Zellen möglich (Abb. 6). Vor der Messung wurden 5×10^5 293T Zellen geerntet und Medium- und Serumrückstände durch zweimaliges Waschen mit 1 ml PBS entfernt. Zwischen den Waschschritten wurde der Ansatz jeweils 3 min bei 1300 Upm zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und unter Durchmischen auf einem Vortex-Gerät langsam mit 3 ml

-20°C kaltem, absolutem Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde im Anschluss daran 45 min bei 4°C inkubiert. Um das Ethanol von den Zellen zu entfernen, wurden sie 3 min bei 1300 Upm abzentrifugiert und darauf folgend nochmals zweimal wie oben beschrieben mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Die Zellen konnten bis zu ihrer weiteren Verwendung bei einer Temperatur von 4°C für eine Woche gelagert werden. Im Anschluss an die Ethanol-Fixierung der 293T Zellen wurde die RNA der fixierten Zellen durch Zugabe von 50 µg/ml Rnase verdaut und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 µg/ml PI versetzt und 5 min im Dunkeln inkubiert.

Die Daten-Acquisition erfolgt durch einen PI-A (Peak-Fläche) gegen PI-W (Peak-Breite) Dotplot (Abb. 6). Zur Auswertung definierte man im PI-A gegen PI-W Dotplot eine Region (rote Population). Das Histogramm wird auf diese Region eingegrenzt um G1-Dupletten von der G2 / M-Analyse auszuschließen. Für jede Zellzyklus-Phase wird ein Marker gesetzt. In der Marker-Statistik wird dann die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen in der gemessenen Population angegeben.

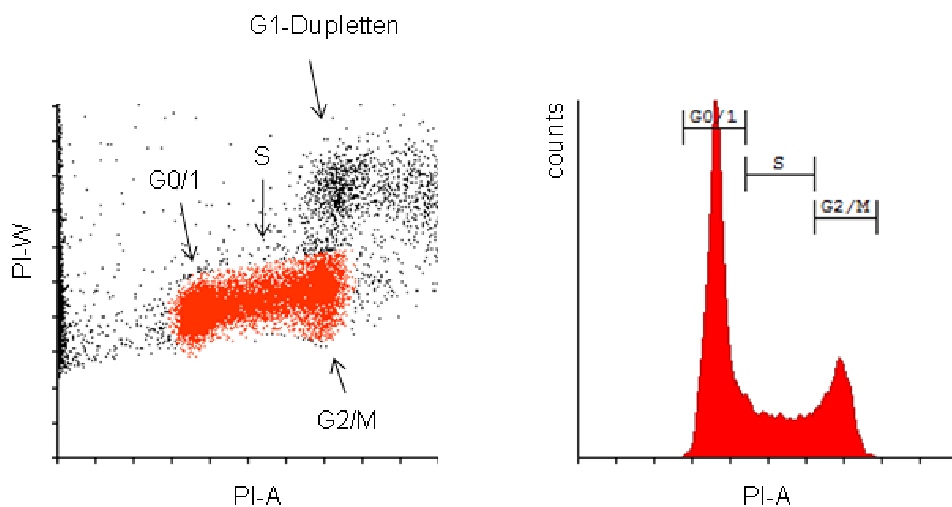


Abb.6: Schematische Darstellung des Dotplots und des dazugehörigen Histogramms einer Zellzyklusanalyse. G0/1, G0/1-Phase Population; S, S-Phase Population; G2/M, G2/M-Phase Population; PI-W, PI-Signal Breite; PI-A, PI-Signal Fläche

2.6 Strukturvorhersagen von Proteinen durch „Homologie Modellierung“

Die Vorhersage von räumlichen Proteinstrukturen wird durch die sogenannte „Homologie Modellierung“ ermöglicht. Diese Technik basiert auf der Identifikation von einem oder mehreren Proteinen mit bekannter Struktur (Template), die Strukturähnlichkeiten mit dem gesuchten Protein (Target) haben. Um die Struktur eines unbekanntes Proteins vorherzusagen werden Target Sequenzen mit Template Sequenzen abgeglichen und auf dieser Grundlage ein Strukturmodell erstellt. Hohe Sequenzähnlichkeiten können signifikante strukturelle Ähnlichkeiten bedeuten. Die Qualität des Homologie Modells hängt von der Qualität des Sequenzalignments und der Templatestruktur ab. Schwierigkeiten entstehen durch Lücken im Sequenzabgleich ohne Entsprechung im Zielprotein. Die einfachste Möglichkeit der Template Identifikation stellt der paarweise Sequenzabgleich durch Datenbank Suchtechniken wie FASTA („**F**ast **a**ll“) und BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) dar. In dieser Arbeit wurde der Sequenzabgleich über die Internet Plattform „Multalign“ (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) durchgeführt (Corpet, 1988). Die Informationen aus der Templatessequenz und dem Alignment wurden im nächsten Schritt dazu verwendet, ein Strukturmodell, basierend auf einer Reihe von karthasischen Koordinaten für jedes Atom des Zielproteins, zu erstellen. Die Erstellung des Strukturmodells erfolgte durch den Protein Modelling Server „Swiss Modell“ (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_overview) {Guex, 1997 #172; Peitsch *et al.*, 1995; Schwede *et al.*, 2003). Durch den Swiss Pdb Viewer „Deep view“ (<http://spdbv.vital-it.ch/>) erfolgte die Bewertung des Modells über statistische Möglichkeiten oder durch physikalischen Energiekalkulationen. Beide Methoden produzieren eine Abschätzung der Energieverhältnisse für die vorhergesagte Proteinstruktur.

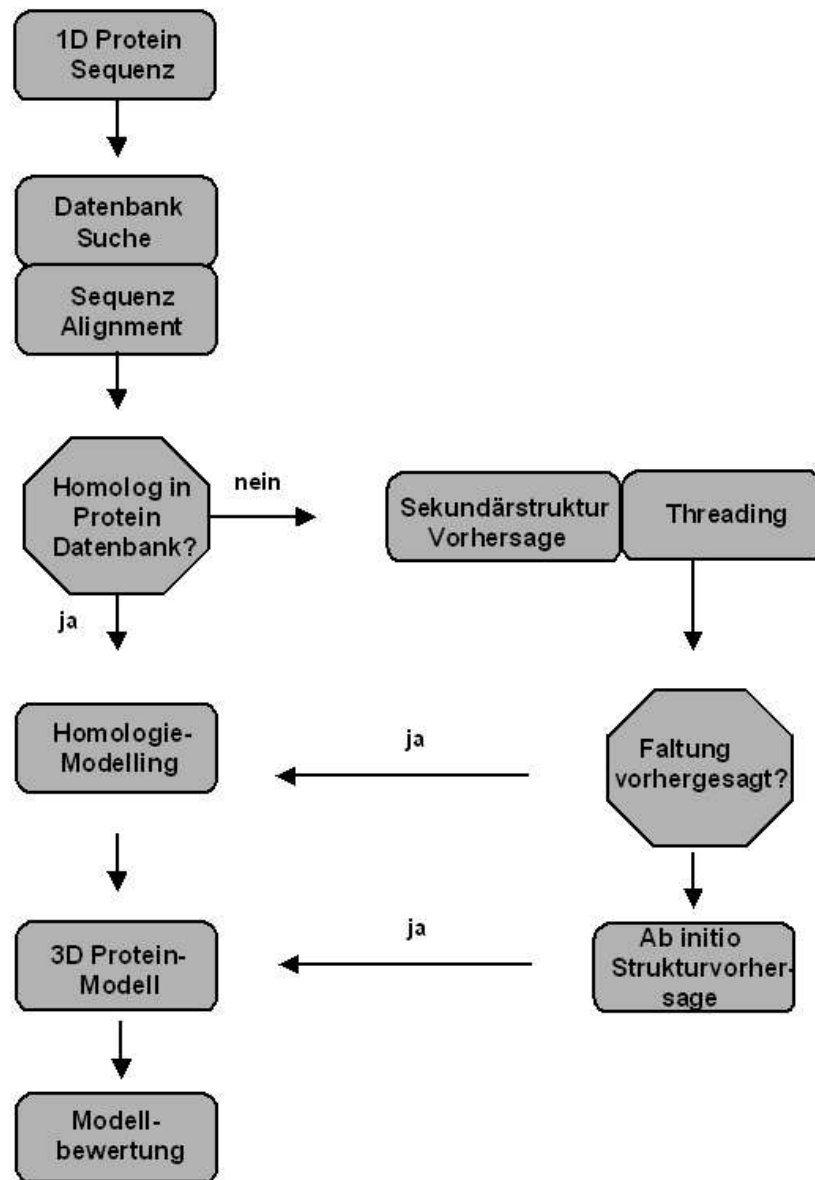


Abb.7: Schematischer Verlauf eines „Homologie Proteinmodellings“.

3 Ergebnisse

3.1 Urim ist ein Bindepartner von Hira

Strukturvorhersagen lassen vermuten, dass Urim einen Quadruplex mit vier antiparallelen α -Helices ausbildet (unveröffentlichte Daten von Prof. Dr. Timo Schinköthe). Proteine mit dieser Struktur binden häufig an die WD 40-Domäne anderer Proteine. Ein Protein mit WD 40-Domäne ist Hira. Die offenen Leseraster von *URIM* und *HIRA* sind nur 1kb voneinander entfernt auf dem Chromosom 22q11 lokalisiert und werden in Mäuseembryonen ko-exprimiert. Diese Argumente führten zu der Arbeitshypothese, dass Urim ein Bindepartner von Hira sein könnte.

3.1.1 Generierung eines Antiserums gegen Urim und Testung von anti Urim #4134 und anti Hira WC 119 auf Funktionalität

Wir generierten ein Kanninchen Antiserum gegen Urim. Die Immunisierung wurde von der Firma Biogenes GmbH, Berlin durchgeführt. Zur Immunisierung wurden die 16-mer Peptide CKKWSLYKQQRKMER (Peptid #4134) und CLRKKKKVDPKKDQEA (Peptid #4135) synthetisiert und über HPLC gereinigt. Nach der Konjugation der Peptide an Proteincarrier wurden weiße Neuseeländer Kanninchen damit immunisiert. Die anti Urim Immunsereen #4135 und #4134 wurden durch Affinitätschromatographie gereinigt und im Western Blot Verfahren getestet. Kanninchen, die mit dem Peptid #4134 immunisiert wurden, produzierten ein Antiserum, das Urim im Western Blot Verfahren detektiert. Das Antiserum anti Urim #4134 wurde von der Firma Biogenes GmbH affinitätsgereinigt.

Die Proteine Urim und Hira wurden im Western Blot Verfahren mit Hilfe der Antikörper anti Hira WC119 und affinitätsgereinigtem anti Urim #4134 dargestellt. Dazu wurde ein Lysat von 293T Zellen unter reduzierenden Bedingungen hergestellt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem affinitätsgereinigten Antiserum anti Urim #4134 und dem Antikörper anti Hira WC 119 detektiert (Abb. 8). Urim zeigt ein Molekulargewicht von 24 kDa, Hira ist bei einem Molekulargewicht von 111 kDa zu detektieren. Beide Antikörper können damit im Western Blot Verfahren für den Nachweis der jeweiligen Proteine verwendet werden. Für Western Blot Nachweise

verwendeten wir im Folgenden ausschließlich das Antiserum #4134 für die Urim-Detektion und WC 119 für die Hira-Detektion.

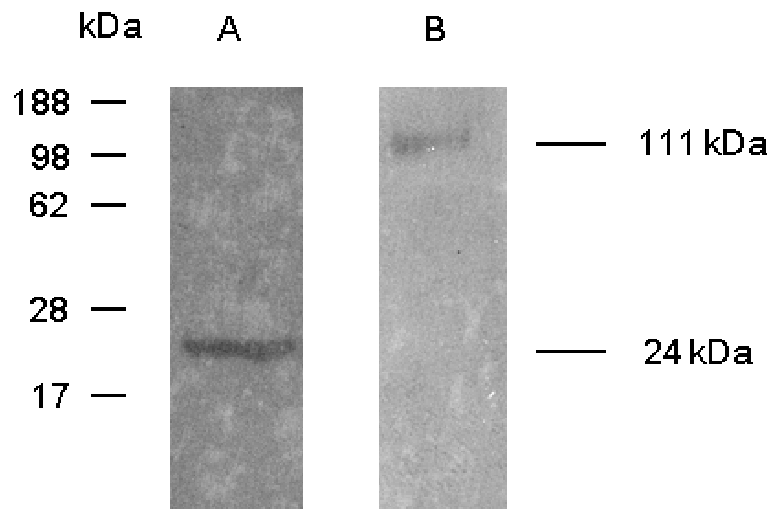


Abb.8: Hira und Urim werden durch die Antikörper WC 119 und anti Urim #4134 im Western Blot nachgewiesen. Zellen der Linie 293T wurden mit Triton X-100 Lysepuffer unter reduzierenden Bedingungen lysiert. Das Proteinäquivalent aus 2×10^5 Zellen wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot zur Detektion von Urim mit affinitätsgereinigtem Antiserum anti Urim #4134 (A) und zur Detektion von Hira mit dem Antikörper anti Hira WC119 inkubiert (B).

3.1.2 Urim interagiert mit der 111 kDa großen Isoform von Hira

Durch Ko-Immunopräzipitation wurde untersucht, ob Urim *in vivo* an Hira gebunden vorliegt. Dazu wurde Urim aus einem nicht reduzierten 293T Zelllysat mit dem affinitätsgereinigten Antikörper anti Urim #4134 gefällt und nach SDS-PAGE und Western Blot durch den Antikörper anti Urim #4134 mit einem Molekulargewicht von 24 kDa nachgewiesen. Im 293T Lysat ist Urim ebenfalls gezeigt. Unter Verwendung eines Urim-Präimmunsersums als Kontrolle wurde Urim nicht nachgewiesen (Abb. 9B). Als weitere Kontrolle wurde das Präzipitat auf der Nitrozellulosemembran mit dem Antikörper anti Aktin inkubiert (Abb. 9C). Es ist kein Aktin in dem Präzipitat nachgewiesen. Ein Aktin-Signal bei einem Molekulargewicht von 43 kDa ist nur im 293T Lysat detektierbar. Wir gehen davon aus, dass das affinitätsgereinigte Antiserum #4134 spezifisch Urim präzipitiert. In diesem Urim-Präzipitat wurde mit dem Antikörper anti Hira WC 119 die 111 kDa Form von Hira nachgewiesen (Abb. 9A). Diese Form ist im Lysat von 293T Zellen ebenfalls zu detektieren. Unter Verwendung

eines Urim-Präimmunserums in der Immunopräzipitation als Kontrolle wurde kein Hira nachgewiesen.

Es wurde gezeigt, dass die spezifische Präzipitation von Urim aus 293T Zelllysate die 111 kDa große Isoform von Hira kopräzipitiert. Offensichtlich bindet Urim an Hira in 293T Zellen.

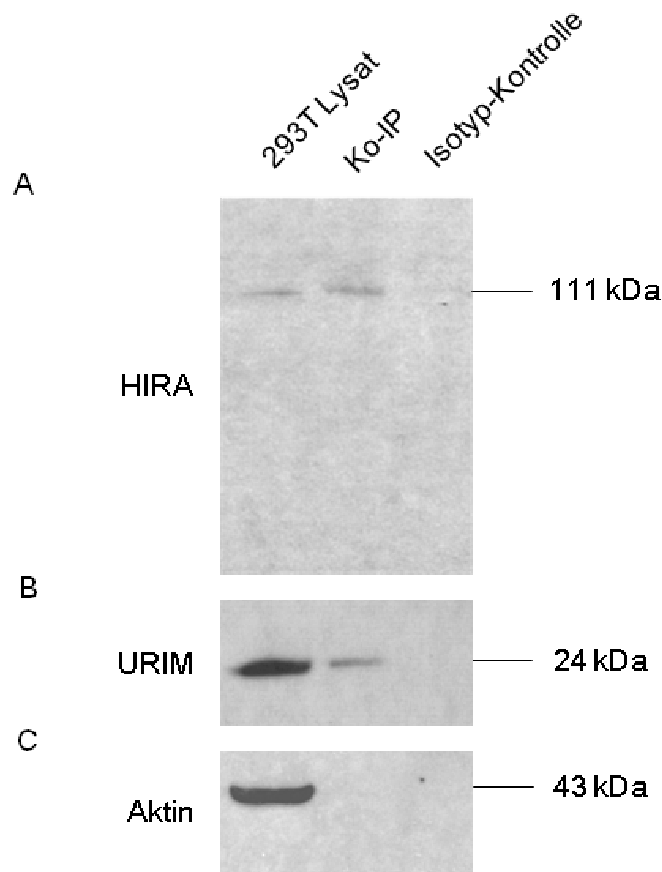


Abb.9: Urim interagiert *in vivo* mit Hira. Zellen der Linie 293T (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert. Die Präzipitation von Urim (Ko-IP) erfolgte durch Inkubation des Lysats mit $3 \mu\text{g}$ des affinitätsgereinigten Antiserums anti URIM #4134. Als Isotypkontrolle wurde ein weiterer Ansatz mit der äquivalenten Menge Präimmunserum (Isotypkontrolle) inkubiert. Als Positivkontrolle diente das Lysat aus 2×10^5 293T Zellen. Die Proteine aus allen Ansätzen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western Blot Verfahrens analysiert. Der Nachweis von Hira erfolgte durch den Antikörper WC119 (A). Urim wurde durch Inkubation mit dem affinitätsgereinigten Antiserum anti Urim #4134 nachgewiesen (B). Als Kontrolle diente die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem Antikörper anti Aktin (C).

3.2 Urim und Hira kolokalisieren in der M-Phase des Zellzyklus

Nachdem wir den Urim-Hira-Komplex durch Immunopräzipitation nachgewiesen haben, wurde in diesem Abschnitt die Lokalisation der Proteine in der Zelle analysiert. Insbesondere wurde untersucht, in welchen Kompartimenten Hira und Urim während des Zellzyklus lokalisiert sind. Dazu wiesen wir die Proteine Hira und Urim in 293T Zellen durch fluorochromgekoppelte Antikörper immunhistochemisch mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie nach.

3.2.1 Urim ist diffus im Zytoplasma und Zellkern verteilt

Um die Verteilung von Urim in 293T zu untersuchen, wurde das Protein immunhistochemisch gefärbt. Nach der Fixierung von 293T Zellen auf Ein-Kammer Objektträgern wurde Urim mit dem affinitätsgereinigten Antiserum anti Urim #4134 markiert und zur Visualisierung im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop mit einem Cy2 gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

In Interphase-Zellen ist Urim diffus im Zytoplasma und Zellkern verteilt, was durch eine Überlagerung der Farben von Cy2 und 7-AAD gezeigt wurde. In der M-Phase der 293T Zellen ist Urim weiterhin diffus in der Zelle verteilt. Typisch für Metaphase-Kerne ist die Anordnung der DNA in der Äquatorialebene. Durch die Überlagerung der Signale von Cy2 und 7-AAD ist die Verteilung von Urim im Zytoplasma und Zellkern gezeigt. Dieses trifft auch für Zellen in der Anaphase des Zellzyklus zu. Typisch für Kerne in Anaphase sind die sich trennenden Tochterchromatiden. Durch die Überlagerung des Cy2 und 7-AAD Signals wurde die Lokalisation von Urim im Zytoplasma und Zellkern in dieser Zellzyklusphase nachgewiesen.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass während Inter- und M-Phase des Zellzyklus Urim sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma diffus verteilt ist.

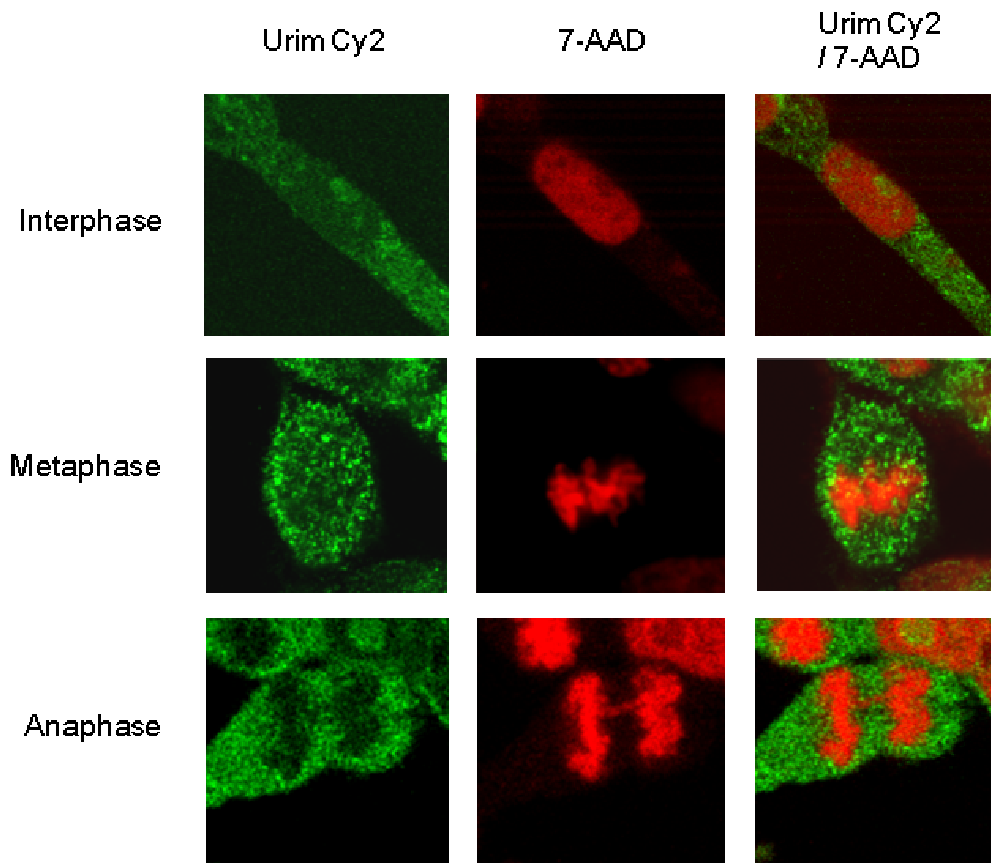


Abb.10: Urim ist in 293T Zellen in allen Phasen des Zellzyklus diffus im Zytoplasma und Zellkern verteilt. 293T Zellen (5×10^6) wurden auf Objektträgern für 24 h in RPMI-Medium kultiviert. Bei ca. 30 % Konfluenz wurden die Zellen mit 4% (w/v) PFA fixiert. Urim wurde durch den affinitätsgereinigten Antikörper anti Urim #4134 markiert und durch den Cy2 fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die DNA wurde mit 7-AAD gefärbt. Dargestellt sind 293T Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops CLSM 410 (Carl Zeiss AG, Jena) in einer 400 fachen Vergrößerung.

3.2.2 Hira befindet sich in Interphase- und M-Phase-Zellen in unterschiedlichen Zellkompartimenten

Um die Verteilung von Hira in 293T Zellen zu untersuchen, wurde das Protein immunhistochemisch mit Hilfe des affinitätsgereinigten Antikörpers anti Hira #4667 markiert. Zur Visualisierung im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop wurde es anschließend mit einem Cy2 gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

In Interphase-Zellen bildet Hira korpuskuläre Strukturen im Zellkern aus. Wir fanden jedoch kein Hira-Signal im Zytoplasma. Die 7-AAD Färbung zeigt eine homogene Verteilung der DNA, was typisch für Interphasekerne ist. In der M-Phase ist Hira diffus in der Zelle verteilt. Die DNA zeigt sich trennende Tochterchromatiden, was typisch für

Zellen in Anaphase ist. In dieser Phase des Zellzyklus ist Hira sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma lokalisiert.

Zusammengefasst zeigen diese Beobachtungen, dass Hira in Interphasezellen korpuskuläre, kernlokalisierte Strukturen ausbildet, die sich in der M-Phase, bei gleichzeitiger diffuser Verteilung von Hira über die gesamte Zelle, auflösen.

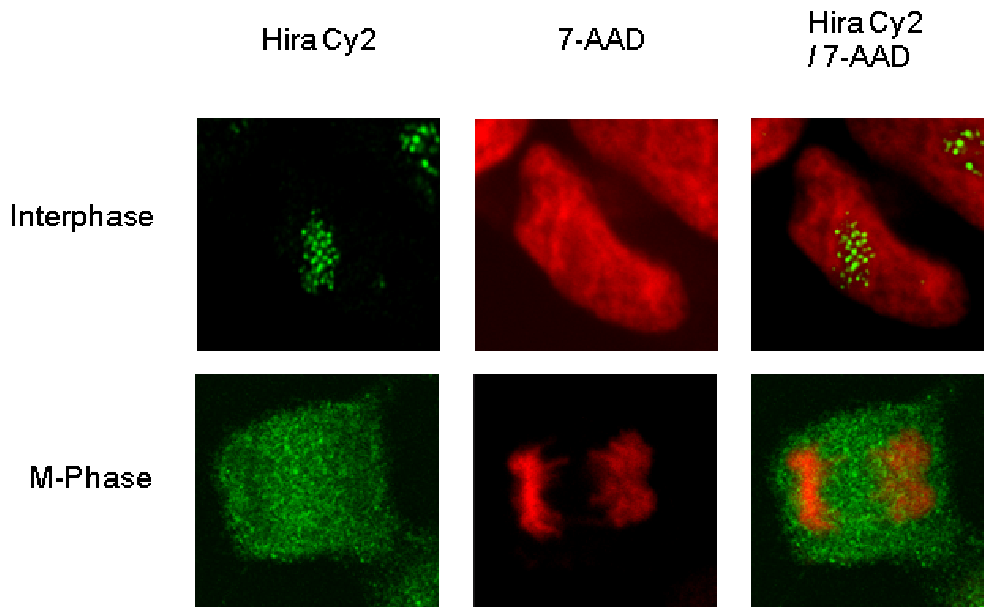


Abb.11: Hira ist in der Interphase korpuskulär im Zellkern und in der M-Phase diffus im Zellkern und Zytoplasma verteilt. 293T Zellen (5×10^6) wurden auf Objektträgern für 24 h in RPMI-Medium kultiviert. Bei ca. 30 % Konfluenz wurden die Zellen mit 4% (w/v) PFA fixiert. Hira wurde durch den affinitätsgereinigten Antikörper anti Hira #4667 markiert und durch den Cy2 fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die DNA wurde mit 7-AAD gefärbt. Dargestellt sind 293T Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops CLSM 410 (Carl Zeiss AG, Jena) in einer 400 fachen Vergrößerung.

3.2.3 Urim und Hira kolokalisieren in der M-Phase

Um die Kolokalisation von Urim und Hira in 293T Zellen zu zeigen, wurde eine Doppelfärbung beider Proteine durchgeführt. Nach der Fixierung von 293T Zellen auf Ein-Kammer Objektträgern wurde Hira mit dem affinitätsgereinigten Antiserum anti Hira #4667 und Urim mit dem affinitätsgereinigten Antiserum anti Urim #4134 markiert. Zur Visualisierung beider Proteine im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop wurde Urim mit einem Cy2 und Hira mit einem Cy5 fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

Während in Interphase-Zellen Urim diffus in der gesamten Zelle verteilt ist, bildet Hira nukleäre, korpuskuläre Strukturen aus. Ein geringer Anteil von Hira ist diffus in der Zelle verteilt. Eine Kolokalisation mit Urim in der Interphase ist an dem im Zytoplasma lokalisierten Hira zu beobachten. In der frühen Mitose löst sich die korpuskuläre Struktur von Hira im Kern vollständig auf und es ist nun wie Urim diffus in der Zelle verteilt. In dieser Phase sind Urim und Hira in der gesamten Zelle kolokalisiert. In einem frühen Stadium der Zytokinese, am Ende der Mitose, ist Urim weiterhin diffus verteilt und es beginnt die Ausbildung der korpuskulären Akkumulation von Hira im Zellkern. Auch hier kolokalisieren Urim und Hira. Im weiteren Verlauf der Zytokinese bildet Hira wieder kernlokalisierte, korpuskuläre Strukturen aus, während Urim diffus in der Zelle verteilt ist, ohne dass beide Proteine kolokalisieren. Zusammengefasst wurde gezeigt, dass Urim mit Hira in der M-Phase des Zellzyklus kolokalisiert, wenn Hira keine korpuskuläre Struktur ausbildet. An den korpuskulären Strukturen von Hira in der Interphase wurde keine Kolokalisation von Urim nachgewiesen.

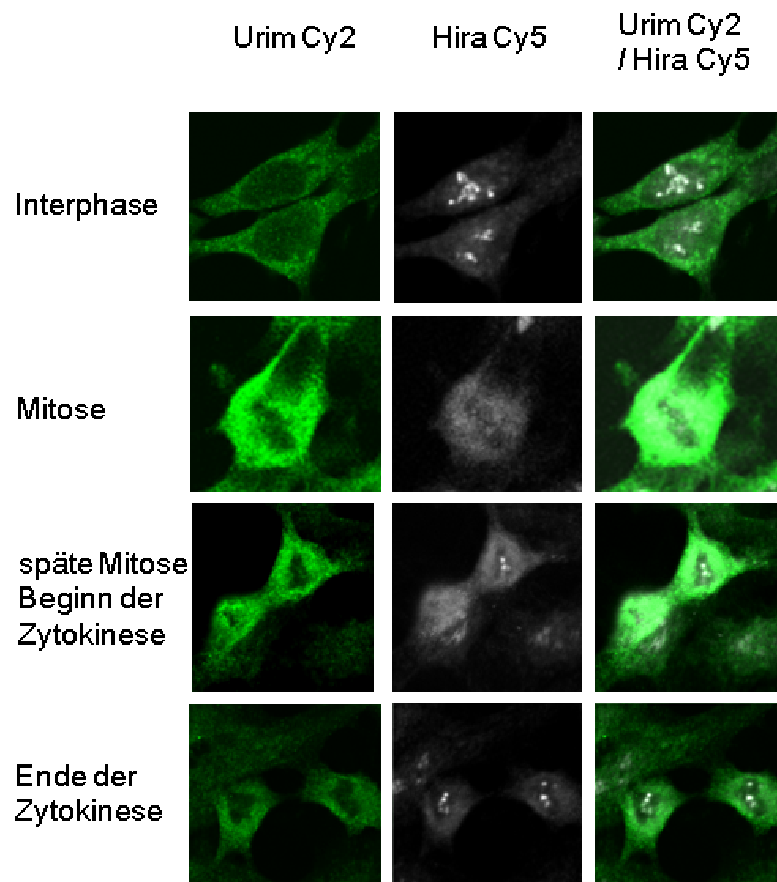


Abb.12: In der M-Phase sind Urim und Hira kolokalisiert. 293T Zellen (5×10^6) wurden auf Einkammer Objektträgern für 24 h in RPMI-Medium kultiviert. Bei ca. 30 % Konfluenz wurden die Zellen mit 4% (w/v) PFA fixiert. Urim wurde mit affinitätsgereinigtem Antiserum anti Urim #4134 markiert und

mit Hilfe des Cy2 fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Die Markierung von Hira erfolgte durch affinitätsgereinigtes Antiserum anti Hira #4667. Als fluorochromgekoppelter Sekundärantikörper diente Cy5 goat anti rabbit. Dargestellt sind 293T Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops CLSM 410 (Carl Zeiss AG, Jena) in einer 400 fachen Vergrößerung.

3.3 Hira ist im Komplex mit Urim an Threonin 555 phosphoryliert

Hira ist in unterschiedlichen Graden phosphoryliert. Die hyperphosphorylierte Form hat ein Molekulargewicht von 111 kDa, während die unphosphorylierte ein Molekulargewicht von 103 kDa aufweist (De Lucia *et al.*, 2001). Eine Phosphorylierungsstelle in Hira ist der Threonin-Rest an Position 555, welcher in der S-Phase des Zellzyklus durch die Cyclin A abhängige Kinase phosphoryliert wird (Hall *et al.*, 2001). Es stellte sich die Frage, welchen Phosphorylierungsstatus Hira aufweist, wenn es im Urim-Hira-Komplex vorliegt. Dazu wurden zwei Ko-Immunopräzipitationen durchgeführt. In einem Ansatz wurde Urim durch das affinitätsgereinigte anti Urim #4134 Antiserum präzipitiert. In einem zweiten Ansatz wurde Hira mit dem Antikörper anti Hira WC15 gefällt. Die eluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch das Western Blot Verfahren analysiert. Der Nachweis von Phospho-Threonin 555 in Hira erfolgte durch den Antikörper anti Phospho-Threonin-Prolin (Abb. 13A). Nur diese Position in der Aminosäuresequenz weist das Motiv Threonin-Prolin auf.

In einem Urim-Präzipitat wurde die hyperphosphorylierte und an Threonin 555 phosphorylierte Hira-Form mit einem Molekulargewicht von 111 kDa nachgewiesen. Das Hira-Präzipitat enthält erwartungsgemäß die hyperphosphorylierte und an Threonin 555 phosphorylierte Hira-Form des Molekulargewichts 111 kDa. Neben dieser Spezies ist auch nicht hyperphosphoryliertes, aber an Threonin 555 phosphoryliertes Hira mit einem Molekulargewicht von 103 kDa im Hira-Präzipitat nachzuweisen. Die Ko-Immunopräzipitation von Urim und der anschließende Nachweis von Hira durch den Antikörper anti Hira WC119 zeigte Hira mit einem Molekulargewicht von 111 kDa und damit die hyperphosphorylierte Form (Abb.:13B). Zusammengefasst wurde gezeigt, dass an Threonin 555 phosphoryliertes und gleichzeitig hyperphosphoryliertes Hira mit 111 kDa Molekulargewicht mit Urim interagiert.

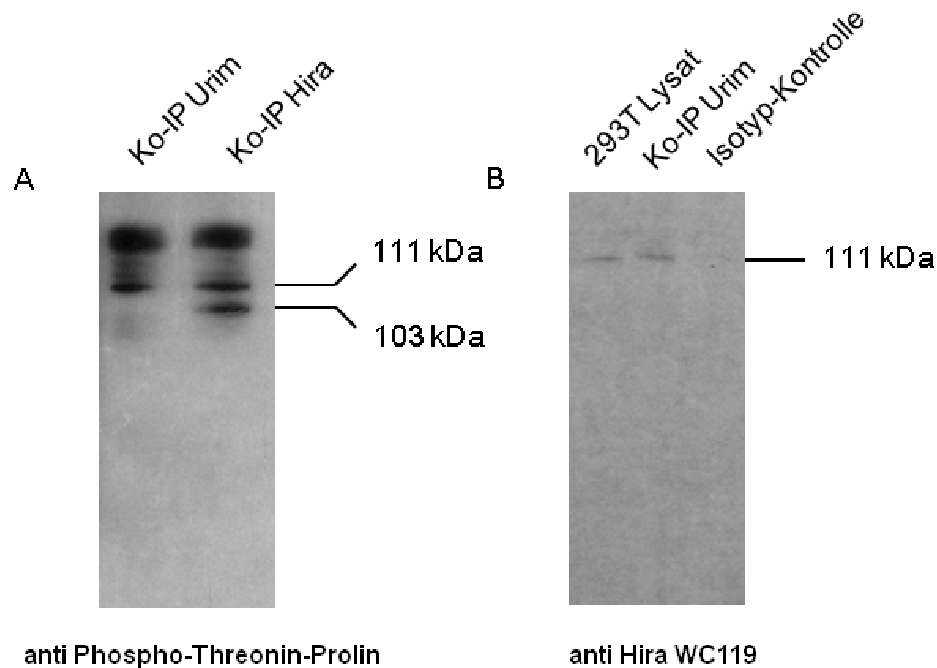


Abb.13: Mit Urim interagierendes Hira ist hyperphosphoryliert. Zellen der Linie 293T (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert. Die Ko-Immunopräzipitation von Urim erfolgte durch Inkubation des Lysats mit 3 μg des affinitätsgereinigten Antiserums anti Urim #4134. Die Ko-Immunopräzipitation von Hira erfolgte durch Inkubation des Lysats mit 3 μg des Antikörpers anti Hira WC15. **A)** Die Proteine der Ko-Immunopräzipitate wurden der Größe nach durch SDS-PAGE mit einem Tris-Acetat-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Der Nachweis von Phospho-Threonin 555 erfolgte durch den Antikörper anti Phospho-Threonin-Prolin. **B)** Die Proteine des Eluats einer weiteren Urim Ko-Immunopräzipitation wurden durch SDS-PAGE mit einem Bis-Tris-Gel der Größe nach aufgetrennt und durch Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis von Hira erfolgte mit dem anti Hira Antikörper WC119.

3.4 Urim interagiert mit der WD 40-Proteinbindedomäne von Hira

Die putitative Quadruplex-Faltung von Urim aus vier antiparallelen α -Helices ist eine Struktur, die bevorzugt an die WD 40-Domäne anderer Proteine bindet (Wall *et al.*, 1995). Die Interaktion von Urim und Hira wurde in den vorangegangenen Abschnitten der vorliegenden Doktorarbeit gezeigt. In den folgenden Abschnitten wurde untersucht, ob die WD 40-Domäne von Hira für die Interaktion mit Urim essentiell ist.

3.4.1 Klonierung von pcDNA4-TO-HIRA Δ WD-V5/His (#1000)

Wir klonierten eine Hira-Mutante deletierter N-terminaler WD 40-Domäne. Zugleich war am C-terminalen Ende ein Histidin Tag und V5-Epitop fusioniert. Ausgehend von pcDNA3.1V5/His-Hira (#734) wurden im offenen Leseraster von *HIRA V5/His* die

Basepaare von Position 4 bis 1101, entsprechend der Aminosäuren 2-367 im Hira-Protein, mittels der Primer Oligonukleotide #312 und #313 deletiert. Die amplifizierte DNA und der Zielvektor pcDNA4-TO (#558) wurden durch die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* gespalten und die überlappenden Enden ligiert. Das entstehende Plasmid pcDNA4-TO-HIRA Δ WD-V5/His (#1000) wurde in *E. coli*-Zellen transformiert und durch Sequenzierung kontrolliert.

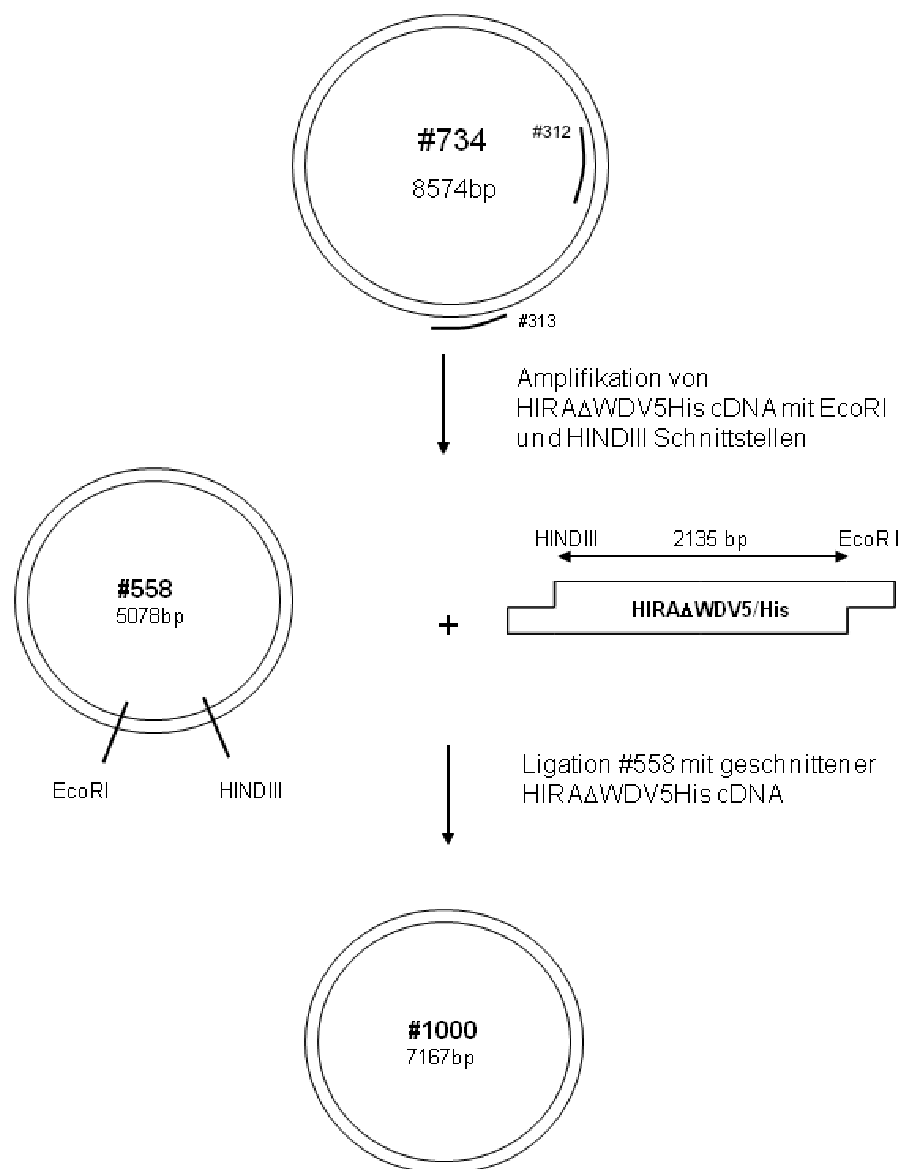


Abb.14: Klonierungsschema von pcDNA4-TO-Hira Δ WD-V5His. HIRA Δ WD V5/His wurde mit einer *HindIII* und *EcoRI* Schnittstelle aus dem Plasmid pcDNA3.1V5/His-Hira (#734) mit den Oligonukleotid-Primern #312 und #313 amplifiziert. Das Insert und die Vektor-DNA pcDNA4-TO (#558) wurden mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *EcoRI* gespalten. Anschließend wurden der geschnittene Vektor und die amplifizierte DNA zum Plasmid pcDNA4-TO-Hira Δ WD-V5/His (#1000) ligiert.

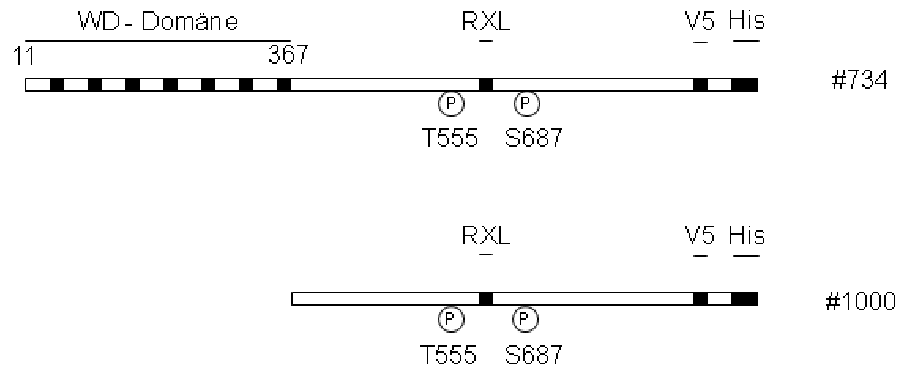


Abb.15: Schematische Darstellung von Hira-V5/His und HiraΔWD-V5/His. Wichtige Aminosäuren sind mit einer Zahl gekennzeichnet. RXL, für die Interaktion mit Cyclin-Cdk2 essentielles Aminosäuremotiv; V5, V5-Epitop; His, Histidin-Tag; P, Phosphatrest; T555, Threonin an Position 555; S687, Serin an Position 687.

3.4.2 Klonierung von pcDNA3.1V5/His WDAHira+52AS

Weiterhin klonierten wir eine Hira-Mutante, die aus der WD 40-Domäne und den folgenden 52 C-terminalen Aminosäuren, sowie C-terminalem Histidin Tag und V5-Epitop bestand.

Ausgehend von pcDNA3.1V5/His-Hira (#734) wurden im offenen Leseraster von *HIRA* V5/His die Basepaare von Position 1257 bis 3051, entsprechend der Aminosäuren 419-1017 im Hira-Protein, mittels der Mutagenese-Primer #401 und #461 durch Mutagenese-PCR deletiert. Die Oligonukleotid-Primer waren am 5'-Ende phosphoryliert. Im Anschluss an die PCR wurden die phosphorylierten 5'-Enden der amplifizierten DNA mit den 3'-Enden ligiert. Das entstandene Plasmid pcDNA3.1V5/His-WDAHira+52AS (#1096) wurde in *E.coli*-Zellen transformiert und durch Sequenzierung kontrolliert. Die Auswertung der Sequenzierung zeigte, dass nach der Aminosäure an Position 418, weitere 24 Aminosäuren inseriert wurden. Die codierenden Nukleotidbasen befanden sich im Leseraster. Das bedeutet, dass C-terminal der WD-Domäne+52AS weitere 24 AS folgen, die als linker zwischen der WD 40-Domäne und dem V5-Epitop und dem His-Tag fungieren.

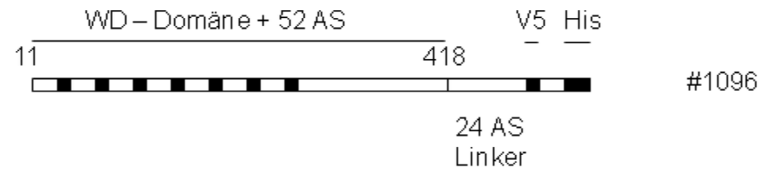


Abb.16: Schematische Darstellung von WDAHira+52AS-V5/His. Wichtige Aminosäuren sind mit einer Zahl gekennzeichnet. V5, V5-Epitop; His, Histidin-Tag; AS, Aminosäure.

3.4.3 Klonierung von pcDNA4-TO-Urim

Um Urim durch Tetrazykininduktion zu überexprimieren, wurde Urim in den Vektor pcDNA4-TO kloniert. Das offene Leseraster von *URIM* wurde mittels der Primer Oligonukleotide #407 und #408 aus dem Vektor pCR2.1-Urim (#556) mit einer *Xba*I und *Eco*RI Schnittstelle amplifiziert. Nach der Spaltung des Inserts und des Zielvektors mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Eco*RI, wurden Vektor und amplifizierte DNA ligiert. Das entstehende Plasmid pcDNA4-TO-Urim (#602) wurde in *E.coli*-Zellen transformiert und das Insert durch Sequenzierung überprüft.

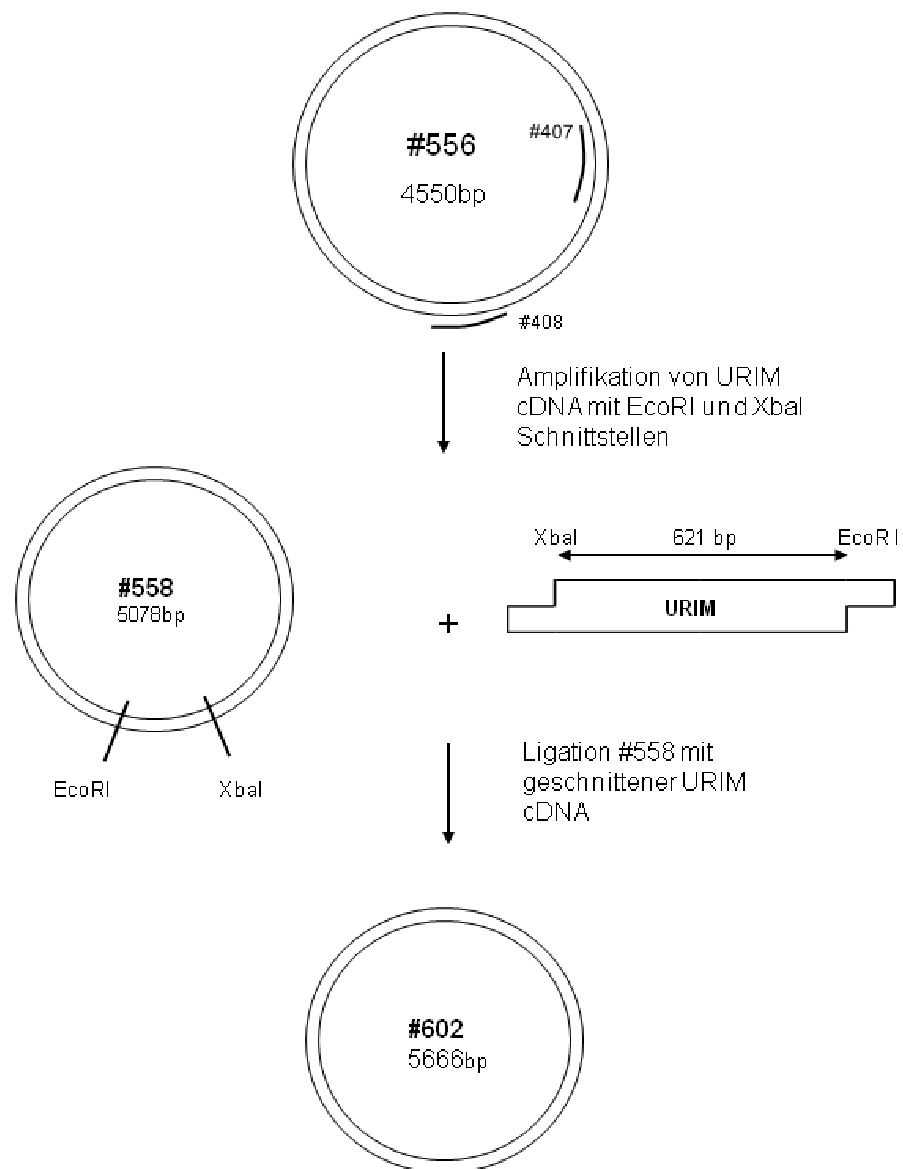


Abb.17: Klonierungsschema von pcDNA4-TO-Urim. URIM wurde mit einer XbaI und EcoRI Schnittstelle aus dem Plasmid pcR2.1-Urim (#556) mit den Oligonukleotid-Primern #407 und #408 amplifiziert. Das Insert und der Vektor pcDNA4-TO (#558) wurden mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und EcoRI gespalten. Anschließend wurden der geschnittene Vektor und die amplifizierte DNA zum Plasmid pcDNA4-TO-Urim (#602) ligiert.

3.4.4 Optimierung der transienten Calciumphosphat-Transfektion von Plasmiden in 293T Zellen

Die Transfektion von 293T Zellen erfolgte durch Calciumphosphat-Präzipitation. Abbildung 18 zeigt die durchflusszytometrische Analyse der transienten Calciumphosphat-Transfektion des GFP kodierenden Plasmids pQBI-25 (#852) in 293T

Zellen bei Verwendung von 2 x HEBS-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten. Gemessen wurde die GFP-Fluoreszenz im FITC-A Kanal im Vergleich zu untransfizierten 293T Zellen. Bei Verwendung von 2 x HEBS, pH 6,9 wurde nach 24 h keine GFP-Fluoreszenz detektiert. Unter Verwendung von 2 x HEBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 wurde jedoch eine ausreichend hohe Transfektionsrate erzielt. Nach 24 h exprimierten 78% der 293T Zellen GFP.

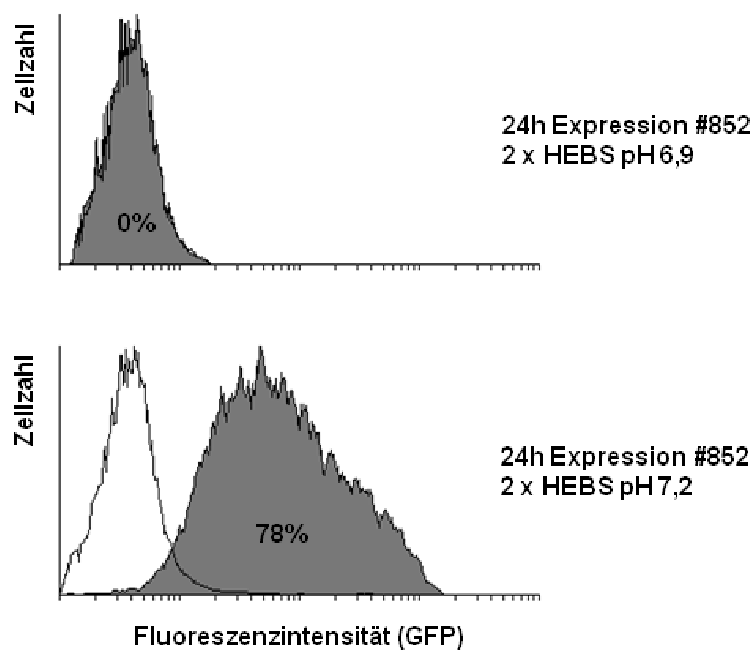


Abb.18: Die Ermittlung des optimalen pH-Wertes von 2 x HEBS-Puffer für die Calciumphosphat-Transfektion. Zellen einer 60% konfluenten 293T Zellkultur wurden unter Verwendung von 2 x HEBS-Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten transient durch Calciumphosphat-Transfektion mit dem Plasmid pQBI-25 (#852) transfiziert. Nach 24 h Inkubationszeit wurden 5×10^5 Zellen geerntet und die GFP-Fluoreszenz durchflusszytometrisch im FITC-A Kanal gemessen. Dargestellt sind die übereinandergelegten Histogramme der transfizierten Zellen (graue Kurve) mit den untransfizierten 293T Zellen (farblose Kurve).

3.4.5 *HIRA-V5/HIS*, *HIRA Δ WD-V5/HIS* und *WD Δ HIRA+52AS-V5/HIS* werden nach transients Transfektion in 293T Zellen exprimiert

Um *HIRA-V5/His*, *HIRA Δ WD-V5/His* und *WD Δ HIRA+52AS-V5/His* zu exprimieren, wurden 293T Zellen durch Calciumphosphat-Transfektion jeweils mit den Konstrukten pcDNA3.1V5/His-Hira (#734), pcDNA4-TO-HIRA Δ WD-V5/His (#1000) und pcDNA3.1V5/His-WD Δ Hira+52AS (#1096) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen

lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Hira-Mutanten mittels des Antikörpers anti V5 durch Western Blot Analyse nachgewiesen.

In einem Lysat aus mit dem Plasmid #734 transfizierten 293T Zellen, wurde Hira-V5/His bei einem Molekulargewicht von 116 kDa detektiert. Das Lysat der mit dem Plasmid #1000 transfizierten 293T Zellen enthält Hira Δ WD-V5/His mit dem erwarteten Molekulargewicht von 77 kDa. WDAHira+52AS-V5/His wurde nach der Transfektion von 293T Zellen mit dem Plasmid #1096 im Lysat bei einem Molekulargewicht von 44 kDa detektiert. Die zu erwartenden Proteingrößen wurden durch die Translation der Nukleotidsequenz der Konstrukte in ihre Aminosäuresequenz mit dem Programm Vector NTI[®] ermittelt.

Damit wurde gezeigt, dass die offenen Leseraster von *HIRA-V5/His*, *HIRA Δ WD-V5/His* und *WDAHIRA-V5/His* nach transients Calciumphosphat-Transfektion in 293T Zellen exprimiert werden.

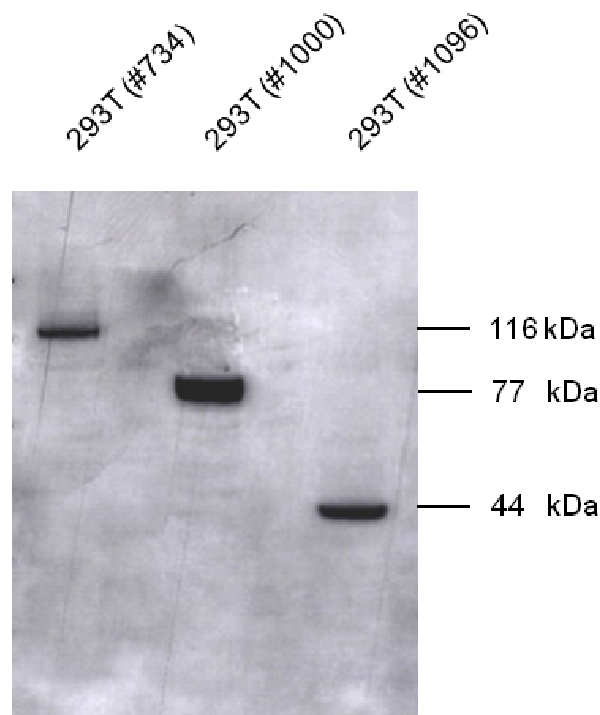


Abb.19: *HIRA-V5/His*, *HIRA Δ WD-V5/His* und *WDAHIRA+52AS-V5/His* werden in 293T Zellen exprimiert. Zellen einer 60% konfluenten 293T Zellkultur wurden durch Calciumphosphat-Transfektion mit den Plasmiden #734, #1000 und #1096 transient transfiziert. Nach 24 h wurden die transfizierten 293T Zellen unter reduzierenden Bedingungen mit Triton X 100 Lysepuffer lysiert, die Proteine aus 2×10^5 Zellen durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Hira-Mutanten im Western Blot Verfahren durch den Antikörper anti V5 nachgewiesen.

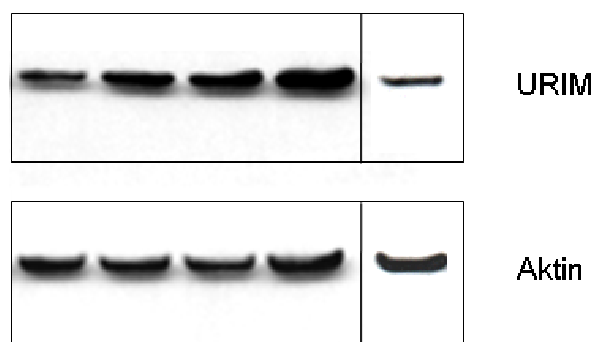
3.4.6 Die Expression von Urim wird durch Tetrazyklin induziert

Da sich in Vorversuchen zeigte, dass die Überexpression von Urim cytotoxisch wirkt, wurde für die transgene Expression des Proteins ein Tetrazyklin-induzierbares Expressionssystem verwendet. Dazu wurden 293T Zellen mit dem Tetrazyklin induzierbaren Plasmid pcDNA4-TO-Urim (#602) und dem Plasmid pcDNA6-TR (#559) ko-transfiziert und die Expression von *URIM* durch die Zugabe von Tetrazyklin induziert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Zellen lysiert und Urim mit dem affinitätsgereinigten Antiserum anti Urim #4134 durch das Western-Blot-Verfahren nachgewiesen. Die Urim-Signale wurden densitometrisch vermessen. Als Referenzbanden diente der Nachweis von Aktin auf der gleichen Nitrozellulosemembran.

Das Urim-Signal nimmt bis zu 24 h nach Tetrazyklin-Zugabe zu. Zum Vergleich steigt das Urim-Signal ohne Tetrazyklin-Induktion in dieser Beobachtungszeit nicht an. Damit steht ein Werkzeug zur Verfügung um Urim in transfizierten 293T Zellen zu überexprimieren.

A

#602 / #559	+	+	+	+	-
Tetrazyklin	-	+	+	+	+
Inkubationszeit	0h	2h	6h	24h	24h



B

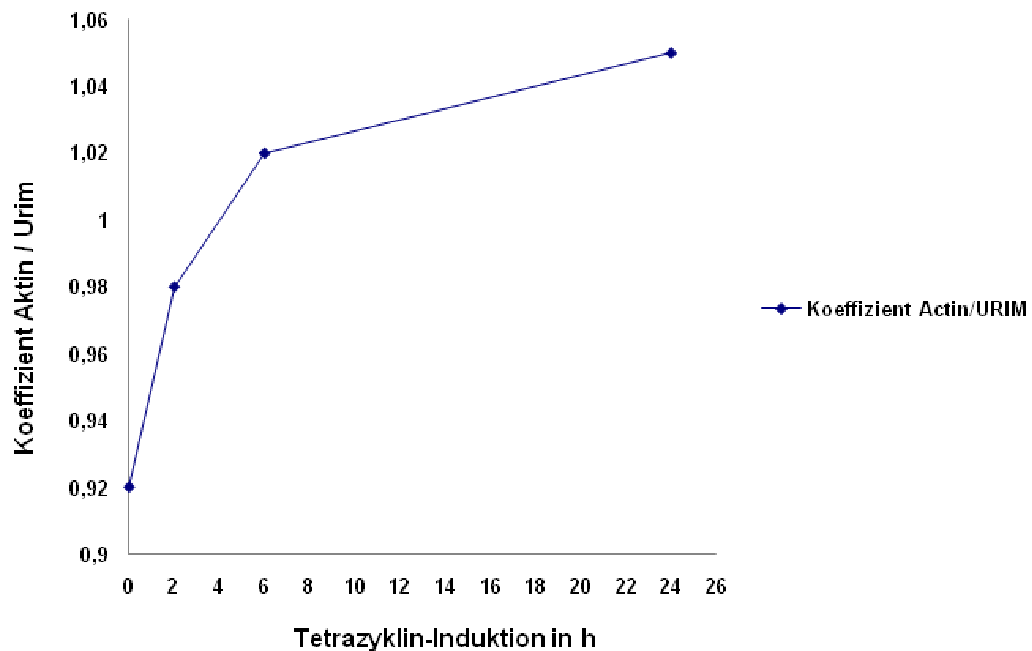


Abb.20: Tetrazyklin induziert die Expression von Urim in pcDNA4-TO-Urim. A) Zellen einer 60% konfluenten 293T Zellkultur wurden transient mit den Konstrukten pcDNA4-TO-Urim (#602) und pcDNA6-TR (#559) ko-transfiziert. Nach 24 h wurde die Expression von Urim durch 1µg/ml Tetrazyklin induziert. Nach 2, 6 und 24 h Inkubation wurden die Zellen reduzierend lysiert, die Proteine aus 2×10^5 Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Urim durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 im Western Blot nachgewiesen. Als Referenzbande für die densitometrische Auswertung der Urim-Signalstärken diente der Nachweis von Aktin auf der gleichen Nitrozellulosemembran. B) Die graphische Auswertung der densitometrischen Bestimmung der Bandendicke von Urim zeigt den Koeffizienten aus den Signalstärken der Aktin- und Urim-Banden, aufgetragen gegen die Dauer der Tetrazyklin-Inkubation.

3.4.7 Die Interaktion von Hira-V5/His mit Urim wird durch das C-terminale V5-Epitop und den Histidin-Tag nicht beeinflusst

Um auszuschließen, dass der Histidin-Tag und das V5-Epitop am C-Terminus von Hira-V5/His die Interaktion mit Urim beeinträchtigt, wurden 293T Zellen mit den Plasmiden #734, # 602 und #559 transfiziert und die Urim-Expression durch die Zugabe von Tetrazyklin induziert. Die Zellen wurden lysiert und Hira aus dem Lysat mit dem anti V5 Antikörper präzipitiert. Die Proteine aus dem Säuleneluat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und Urim mittels Western Blot durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 nachgewiesen. Als Kontrolle diente der Nachweis von Hira-V5/His durch den anti V5 Antikörper in dem Präzipitat.

Im Präzipitat der 293T Zellen mit Tetrazyklin-induzierter Urim-Expression wurde Urim mit einem Molekulargewicht von 24 kDa nachgewiesen (Abb. 21A). Das Protein wurde in einem Lysat aus 293T Zellen ebenfalls detektiert. Ohne Tetrazyklininduktion der Urim-Expression wurde Urim nicht mit Hira-V5/His kopräzipitiert. Bei Verwendung eines Präimmunserums wurde Urim nicht detektiert. Nach induzierter Expression von Urim wurden zusätzlich zur 24 kDa Bande mehrere schwächere Signale detektiert, die wahrscheinlich auf proteolytischen Abbau von Urim zurückzuführen sind. Erwartungsgemäß wurde nach Präzipitation mit dem anti V5 Antikörper, Hira-V5/His mit einem Molekulargewicht von 116 kDa in den Präzipitaten nachgewiesen (Abb. 21B).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass transgen exprimiertes Hira V5/His in 293T Zellen bei Urim-Überexpression mit dem Protein Urim in einem Komplex vorliegt. Der Histidin-Tag und das V5-Epitop von Hira beeinflussen die Interaktion von Urim mit Hira V5/His offensichtlich nicht.

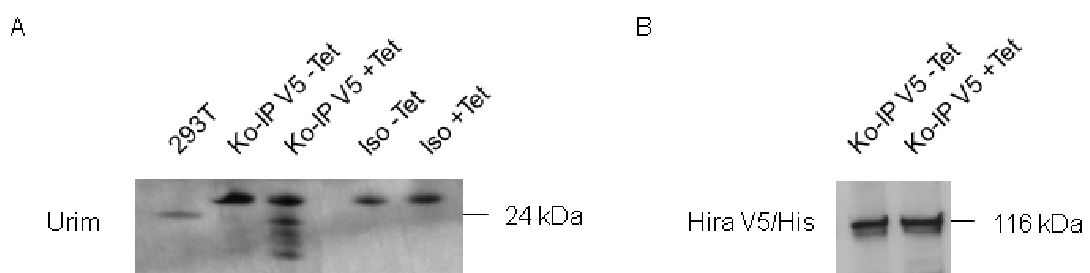


Abb.21: Der Histidin-Tag und das V5-Epitop in Hira-V5/His beeinflussen die Interaktion mit Urim nicht. Zellen der Linie 293T wurden simultan mit den Plasmiden #734, #602 und #559 transfiziert. Die Expression von Urim wurde durch Inkubation der Zellen mit 1µg/ml Tetrazyklin induziert (+Tet). Die transfizierten Zellen (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert und das Protein Hira-V5/His aus dem Lysat durch Ko-Immunopräzipitation mit dem Antikörper anti V5 präzipitiert. Als Isotypkontrolle wurde die äquivalente Menge von Maus IgG1 κ Isotypkontrolle eingesetzt. Als Positivkontrolle des Proteinnachweises diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen, die unter reduzierenden Bedingungen lysiert wurden. Die Proteine aus den Säuleneluat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western-Blot-Verfahrens analysiert. Der Nachweis von Urim erfolgte durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 (A), der Nachweis von Hira-V5/His durch den anti V5 Antikörper (B).

3.4.8 Die Deletion der WD 40-Domäne in Hira führt zum Verlust der Bindefähigkeit an Urim

Um die Frage zu beantworten, ob die Deletion der WD 40-Domäne in Hira zum Verlust der Interaktion zwischen Hira und Urim führt, wurden 293T Zellen mit den Plasmiden

#1000, #602, und #559 simultan transfiziert und die Expression von Urim durch Tetrazyklin induziert. Die Zellen wurden lysiert und Hira Δ WD-V5/His aus dem Lysat mit Hilfe des anti V5 Antikörpers präzipitiert. Urim wurde mittels Western Blot durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 nachgewiesen. Als Kontrolle diente der Nachweis von Hira Δ WD-V5/His in den Ko-Immunopräzipitationen durch den anti V5 Antikörper.

In einem Gesamtzelllysat der 293T Zellen ist Urim mit einem Molekulargewicht von 24 kDa nachzuweisen. Aus 293T Zellen ohne Tetrazyklin Induktion wurde kein Urim mit Hira Δ WD-V5/His kopräzipitiert. Auch nach Tetrazyklin Induktion wurde kein Urim im Hira Δ WD-V5/His Komplex präzipitiert (Abb. 22A), während Wildtyp Hira-V5/His Urim präzipitiert (Abb. 22C). In den Isotypkontrollen ist Urim nicht ko-immunopräzipitiert. Die Präzipitation ist spezifisch, da Hira Δ WD-V5/His mit einem Molekulargewicht von 77 kDa in beiden Ko-Immunopräzipitationsspuren nachgewiesen wurde (Abb. 22B).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Hira ohne WD 40-Domäne Urim nicht zu binden vermag, auch wenn Urim überexprimiert wird. Wir schließen daraus, dass Urim die WD 40-Domäne von Hira zur Bildung des Urim-Hira-Komplexes benötigt.

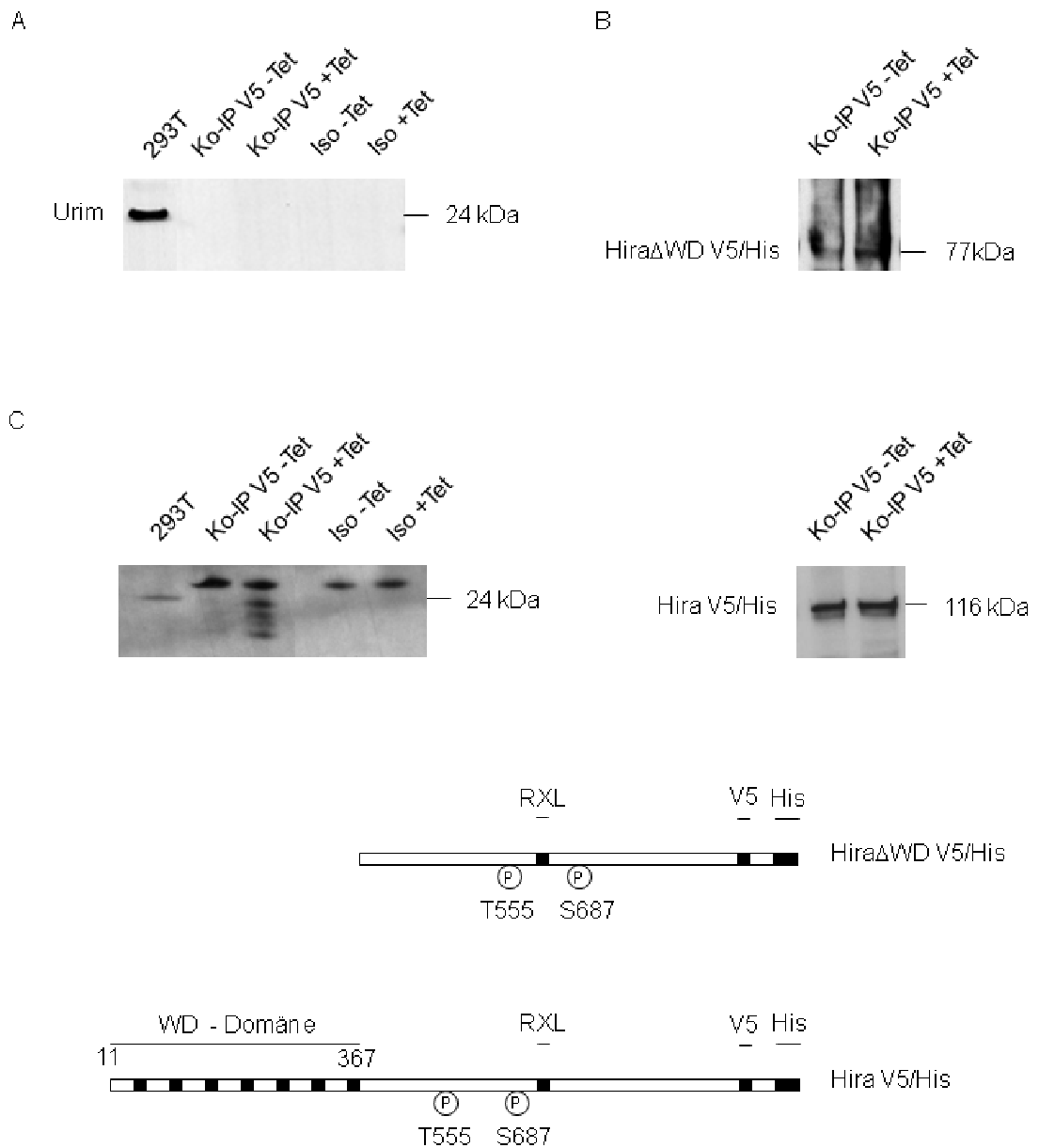


Abb.22: Nach Deletion der WD 40-Domäne von Hira bindet Urim nicht mehr an Hira. Zellen der Linie 293T wurden transient mit den Plasmiden #1000, #602 und #559 transfiziert. Die Expression von Urim wurde durch die Inkubation mit 1 μ g/ml Tetrazyklin induziert (+Tet). Die transfizierten Zellen (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert und das Lysat in einer Ko-Immunopräzipitation mit dem Antikörper anti V5 eingesetzt. Als Isotypkontrolle wurde die äquivalente Menge Maus IgG1 κ Isotypkontrolle eingesetzt. Als Positivkontrolle des Proteinnachweises diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen, die unter reduzierenden Bedingungen lysiert wurden. Die Proteine des Präzipitats wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western-Blot-Verfahrens analysiert. Der Nachweis von Urim erfolgte durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 (A), der Nachweis von Hira Δ WD-V5/His durch den anti V5 Antikörper (B). Zur Veranschaulichung wurden Hira-V5/His und Hira Δ WD-V5/His schematisch dargestellt und die Ko-Präzipitation von Urim durch Hira V5/His gezeigt (C). RXL, Aminosäuremotiv zur Cyclin cdk2-Interaktion; V5, V5-Epitop; His, Histidin-Tag; P, Phosphat-Rest; T555, Threonin 555; S687, Serin687

3.4.9 Die isolierte WD 40-Domäne aus Hira ist nicht in der Lage Urim zu binden

Um zu untersuchen, ob die isolierte WD 40-Domäne von Hira in der Lage ist Urim zu binden, wurden 293T Zellen mit den Plasmiden #1096, #602, und #559 simultan transfiziert und die Expression von Urim durch Tetrazyklin induziert. Die Zellen wurden lysiert und WD Δ Hira+52AS-V5/His mit dem anti V5 Antikörper aus dem Lysat präzipitiert. Die Proteine aus dem Säuleneluat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und Urim mittels Western Blot durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 nachgewiesen. Als Kontrolle diente der Nachweis von WD Δ Hira+52AS-V5/His in den Spuren der Ko-Immunopräzipitationen durch den anti V5 Antikörper.

In einem 293T Lysat ist Urim erwartungsgemäß mit einem Molekulargewicht von 24 kDa zu detektieren. In dem Präzipitat aus 293T Zellen ohne Tetrazyklin Induktion wurde kein Urim nachgewiesen. Auch wurde nach Tetrazyklin Induktion kein Urim durch den anti V5 Antikörper mit WD Δ Hira+52AS-V5/His kopräzipitiert (Abb. 23A). In den Isotypkontrollen wurde Urim nicht nachgewiesen. Die Präzipitation ist spezifisch, da WD Δ Hira+52AS-V5/His mit einem Molekulargewicht von 44 kDa in beiden Ko-Immunopräzipitationsspuren nachgewiesen wurde (Abb. 23B).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die isolierte Hira WD 40-Domäne, auch nach Urim-Überexpression, nicht in der Lage ist Urim zu binden. Eine Interaktion von Urim mit der WD 40-Domäne ohne den C-terminalen Teil von Hira ist nicht möglich.

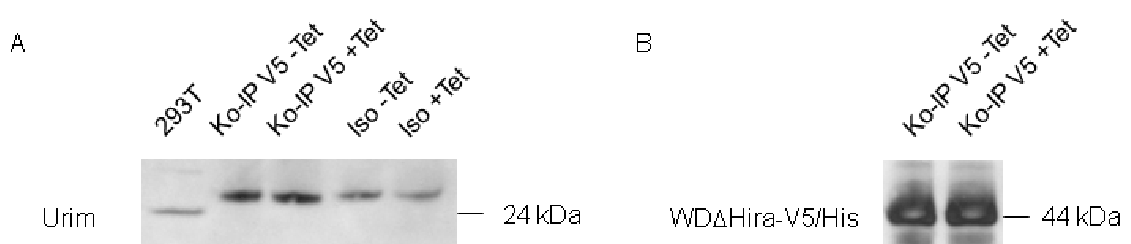


Abb.23: Die isolierte WD 40-Domäne von Hira kann nicht mit Urim interagieren. Zellen der Linie 293T wurden transient mit den Plasmiden #1096, #602 und #559 transfiziert. Die Expression von Urim wurde durch die Inkubation mit 1 μ g/ml Tetrazyklin induziert (+Tet). Die transfizierten Zellen (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert und das Lysat in einer Ko-Immunopräzipitation mit dem Antikörper anti V5 eingesetzt. Als Isotypkontrolle wurde die äquivalente Menge Maus IgG1 κ Isotypkontrolle eingesetzt. Als Positivkontrolle des Proteinnachweises diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen, die unter reduzierenden Bedingungen lysiert wurden. Die Proteine aus den Säuleneluaten wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western-Blot-Verfahrens analysiert. Der Nachweis von Urim erfolgte durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134, der Nachweis von WD Δ Hira+52AS-V5/His durch den anti V5 Antikörper.

3.4.10 Punktmutationen in der WD 40-Domäne von Hira führen zu einer Öffnung der β -Propeller Ringstruktur

Wenn die WD 40-Domäne von Hira für die Bindung von Urim essentiell ist, so sollten Mutationen innerhalb dieser Domäne ebenfalls zur Verhinderung der Urim-Hira-Bindung führen. Bei der Planung dieser Mutationen kam uns zur Hilfe, dass Lindsey Boltz *et al.*, 2001 in der WD 40-Domäne des Proteins Prp17p aus der Hefe *S.cerevisiae* konservierte, exponiert in den loop Regionen zwischen den WD-Wiederholungen lokalisierte Aminosäuren durch unpolare Reste ausgetauscht haben. In Anlehnung an diese Vorgehensweise wurden mögliche Aminosäure-Austauschkandidaten in der humanen Hira WD 40-Domäne durch einen Sequenzvergleich bestimmt. Abbildung 24 zeigt den Sequenzvergleich der 381 N-terminalen Aminosäuren des humanen Proteins Hira mit den 379 N-terminalen Aminosäuren von Hira aus *Drosophila melanogaster* durch die Alignment-Software *ClustalX*. Der N-Terminus der Proteine besteht aus konservierten Aminosäureresten. In diesem Bereich befindet sich die phylogenetisch hoch konservierte WD 40-Domäne von Hira. Durch das Sequenzalignment wurden die Aminosäuren RNHSG zwischen den WD-Wiederholungen #2 und #3 und RGHSG zwischen WD #3 und #4 in humanem Hira identifiziert, die sich in Analogie zu den Arbeiten von Lindsey Boltz *et al.*, 2000 zur Mutagenese der WD-Wiederholungen eignen könnten.

```

1
hHira  MKLLKPTWVNHNGKPIFSVDIHPDGTKFATGGQGQDSGKVVWVWNSPVLQEDDEKDENIP
dHira  MRLLKPAWVHHDDKQIFSVDIHKDCTKFATGGQSDCGRVVIWVWNSPVLSDKAEFDADVP
*:****:*:*:*:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1
WD1

hHira  KMLCQMDNHLACVNCVRWSNSGMYLASGGDDKLIWVWKRATYIGPSTVFGSSGKLANVEQ
dHira  KMLCQMDQHLACVNCVRWSQNGQNLASGSDDKLIWVWKRATYIGPSTVFGSSGKLANVEQ
*****:*****:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
WD2

hHira  WRCVSIILRNHSGDVMDVAWSPHDAWLASCSVDNTVVIWNAVVFPEILATLRRGHSGLVKGL
dHira  WKCFYTLRGHDGVDLDAWSPNDVYLASCSIDNTVVIWDAQAFPHSVAATLRRGHTGLVKGV
*:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AAAAI WD3 AAAAI

hHira  TWDPVGKYIASQADDRSLKVVRTLDWQLETSITKPFDEC GGTTHVLRLSWSPDGHYLVSA
dHira  SWDPLGRFLASQSDDRSIKIWNMTMWSLSHTITEPFEEC GGTTHILRLSWSPDQYLVSA
:****:*:*:*:*:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
WD4 WD5

hHira  HAMNNSGPTAQIIEREGWKTNMDFVGHKRAVTVVKFNPKIFKKKQKNGSSAKPSCPYPCCC
dHira  HAMNGGPTAQIIEREGWCKDKDFVGHKRAVTVVRFHNSILSRQENDGSPSKP-LQYCCL
**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
WD6

```

```

hHira  AVGSKDRSLSVWLTCLKRPLVVIHELFDKSIMDISWTLNGLGILVCSMDGSAFLDFSQD
dHira  AVGSRDRSLSVWMTALQRPMVVIHELFNASILDLTWGPQECLLMACSVDGSIACLKFTEE
      ****:*****:*. *:***:*****: **:::* : :. :**:*:* * . *:::
                                         WD7
                                         381
hHira  ELGDPLSEEEKSRIHQSTYGK
dHira  ELGKAISEEEQNAIIRKMYGK
      ***.:*****:. * :. ***
                                         379

```

Abb.24: Sequenzvergleich des N-Terminus von Hira aus *Homo sapiens* und *Drosophila melanogaster*. Sequenzabgleich der N-terminalen Aminosäuren der Hira Proteine aus *Homo sapiens* (hHira) und *Drosophila melanogaster* (dHira). Die WD-Wiederholungen 1-7 (WD 1-7) beider Proteine sind schwarz markiert. Konservierte Aminosäurereste sind mit * gekennzeichnet. Die Aminosäure-Austauschkandidaten sind durch einen Kasten hervorgehoben. Unter den Aminosäure-Austauschkandidaten befinden sich fett gedruckt die Ein-Buchstaben-Codes der durch Mutagenese-PCR eingefügten Aminosäuren.

Mit Hilfe eines hypothetischen Strukturmodells der WD 40-Domäne von Hira wurde deren räumliche Anordnung nach Austausch der zuvor identifizierten Aminosäuren überprüft. Abbildung 25A zeigt das Modell der WD 40-Domäne von Hira aus *Homo sapiens*. In der β -Propellerstruktur aus 7 WD-Wiederholungen (1-7) sind die Positionen der ausgetauschten Aminosäuren farbig hervorgehoben. Die Darstellung der WD-Polypeptidkette zeigt die Lokalisation beider Aminosäuresequenzbereiche in den loop Regionen zwischen WD #2 / #3 und WD #3 / #4. Die Darstellung der Oberfläche der WD 40-Domäne zeigt die augetauschten Aminosäuren in exponierter Lage innerhalb der gesamten Struktur. Sowohl in der WD 40-Polypeptidketten-Darstellung, als auch in der WD 40-Oberflächendarstellung wird durch Austausch der Aminosäuren RGHSG durch AAAAI eine Öffnung der β -Propellerstruktur herbeigeführt (Abb. 25B). Durch hypothetischen Austausch der Aminosäuren RNHSG mit den unpolaren Resten AAAII, zeigte sich ebenfalls eine Öffnung der Struktur der WD 40-Domäne, sowohl in der Darstellung der WD 40 Polypeptidkette, als auch in der WD 40-Oberflächendarstellung. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Oligopeptidsequenzen RNHSG und RGHSG in exponierten Bereichen der Hira WD 40-Domäne lokalisiert sind. Daraus leiten wir ab, dass die Konformation der WD 40-Domäne nach Austausch dieser Aminosäuren gegen unpolare Reste von einer geschlossenen Ringstruktur in eine offenere Struktur übergeht.

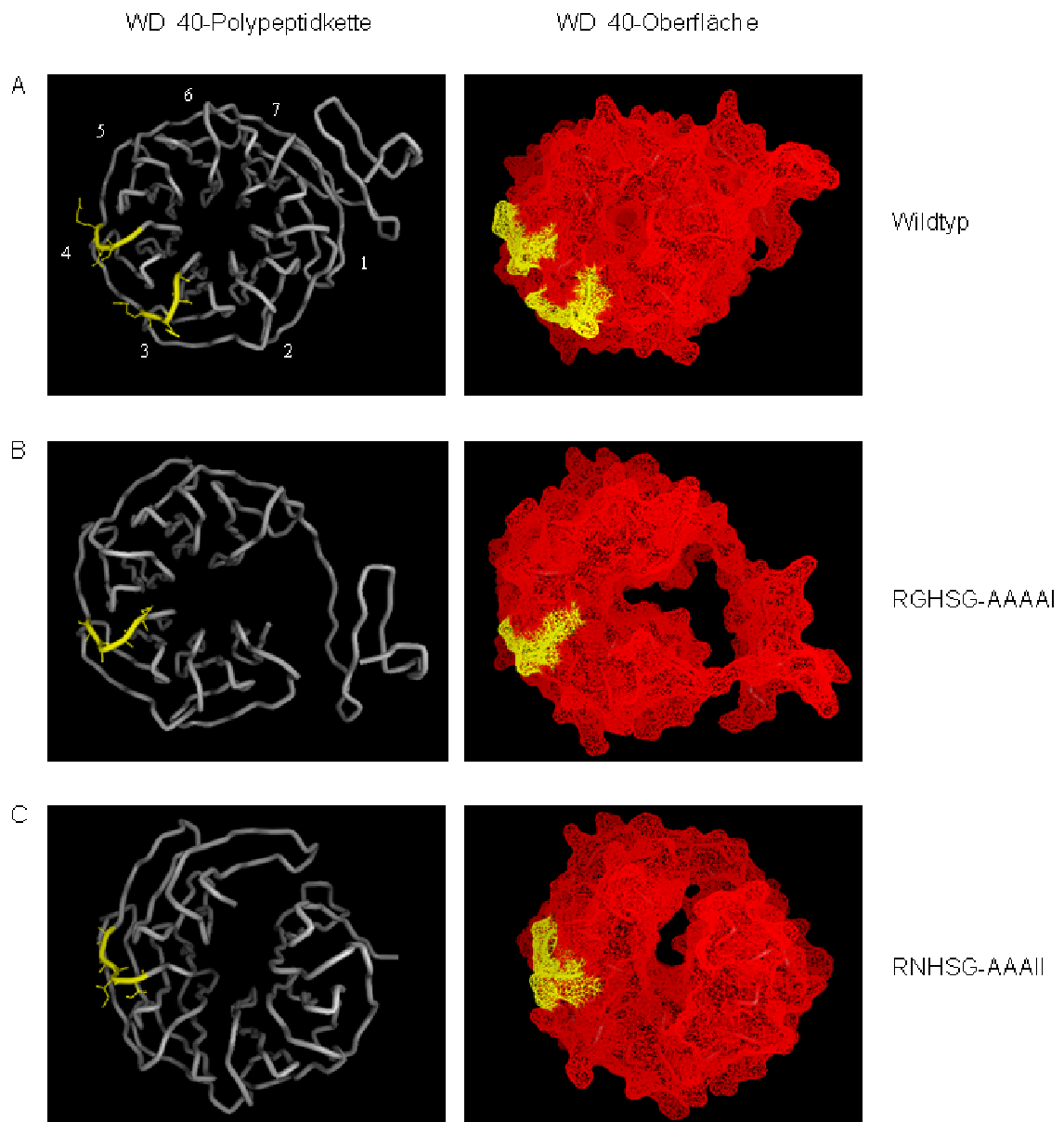


Abb.25: Der Austausch von wenigen Aminosäuren zwischen den WD-Modulen durch unpolare Aminosäurereste führt zur Öffnung der WD-Konformation. Wir generierten mit Hilfe des Protein modelling servers „Swiss Prot“ Modelle der WD 40-Domäne von Hira. **WD 40-Polypeptidkette:** Aminosäurekette mit gelb markierten Oligopeptiden, die durch unpolare Aminosäurereste ausgetauscht wurden. **WD 40-Oberfläche:** Aufgrund energetischer Kalkulationen berechnete Oberfläche der WD 40-Domäne. Gelb markiert sind die Bereiche der Aminosäurekette, die durch unpolare Aminosäurereste ausgetauscht wurden. **A)** Modell der WD 40-Domäne von Hira vor dem Austausch der Aminosäuren RGHSG und RNHSG durch unpolare Aminosäuren. Die Ziffern entsprechen den Positionen der WD-Wiederholungen 1-7 der β -Propellerstruktur. **B)** Modell der WD 40-Domäne nach Austausch der Aminosäuren RGHSG gegen die Reste AAAAAI zwischen WD #3 und #4. **C)** Modell der WD 40-Domäne nach Austausch der Aminosäuren RNHSG gegen die Reste AAAIL zwischen WD #2 und #3.

3.4.11 Klonierung der Hira Mutanten mit Punktmutationen in der WD 40-Domäne

Hira-Mutanten mit entfalteter WD 40-Domäne (Abb. 26) wurden ausgehend von pcDNA3.1V5/His-HIRA (#734) durch Mutagenese-PCR gewonnen. Zum Austausch der Aminosäuren RNHSG gegen die Aminosäuren AAAAI in der WD 40-Sequenz von Hira wurden im offenen Leseraster von *HIRA V5/His* die Basenpaare von Position 384 bis 396 zur Kodierung der Aminosäuren RNHSG durch die Basen *GCG GCA GCC GCT ATA* zur Kodierung der Aminosäuren AAAAI ausgetauscht. Die ersetzten Aminosäuren entsprechen den Positionen 128 bis 132 in der Polypeptidkette von Hira. Es entstand das Konstrukt pcDNA3.1V5/His-HIRA RNHSG-AAAAI. Zur Generierung des Konstrukts pcDNA3.1V5/His-HIRA RGHSG-AAAAI wurden die Basenpaare 513-525 zur Kodierung der Aminosäuren RGHSG gegen *GCG GCA GCC GCT ATA* zur Kodierung von AAAAI ausgetauscht. Die ersetzten Aminosäurepositionen entsprechen den Positionen 171 bis 175 in der Polypeptidkette von Hira. Die eingefügten Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt.

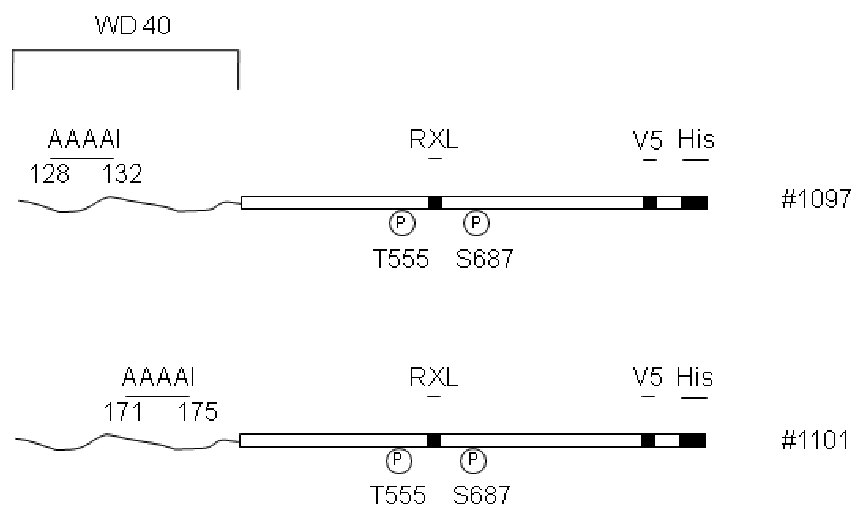


Abb.26: Hira-Konstrukte mit entfalteter WD 40-Domäne. Schematische Darstellung der durch Mutagenese-PCR klonierten Hira-Konstrukte mit entfalteter WD 40-Domäne. Wichtige Aminosäuren sind mit einer Zahl gekennzeichnet. RXL, für die Interaktion mit Cyclin-Cdk2 essentielles Aminosäuremotiv; V5, V5-Epitop; His, Histidin-Tag; P, Phosphatrest; T555, Kinasierungsstelle Threonin an Position 555; S687, Kinasierungsstelle Serin an Position 687; A, Alanin; I, Isoleucin.

3.4.12 Der Austausch der Aminosäuren RNHSG durch AAAAI zwischen WD #2 und WD #3 der Hira WD 40-Domäne führt zum Verlust der Urim-Bindung

Wir stellten uns die Frage, ob die Entfaltung der WD 40-Domäne von Hira durch den Austausch der Aminosäuren RNHSG durch AAAAI zum Verlust der Bindefähigkeit mit Urim führt. Dazu wurden 293T Zellen mit den Plasmiden #1097, #602 und #559 simultan transfiziert und die Urim-Expression durch Tetrazyklin induziert. Die Zellen wurden lysiert und Hira-RNHSG-AAAAI-V5/His mit dem Antikörper anti V5 präzipitiert. Die Proteine des Präzipitats wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Urim wurde in den Präzipitatproben mittels Western Blot durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 nachgewiesen. Als Kontrolle diente der Nachweis von Hira RNHSG-AAAAI-V5/His durch den anti V5 Antikörper.

Erwartungsgemäß wurde in einem Lysat der 293T Zellen Urim mit einem Molekulargewicht von 24 kDa nachgewiesen. Aus 293T Zellen ohne Tetrazyklin Induktion wurde kein Urim im Präzipitat nachgewiesen. Auch nach Tetrazyklin Induktion wurde kein Urim durch den anti V5 Antikörper mit Hira RNHSG-AAAAI-V5/His kopräzipitiert. In den Isotypkontrollen wurde Urim nicht nachgewiesen (Abb. 27A). Die Präzipitation ist spezifisch, da Hira RNHSG-AAAAI-V5/His mit einem Molekulargewicht von 116 kDa in den Ko-Immunopräzipitationsspuren nachgewiesen wurde (Abb.: 27B).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Hira RNHSG-AAAAI-V5/His aus einem Lysat von transfizierten 293T Zellen präzipitiert wird, jedoch kein Urim in dem Hira RNHSG-AAAAI-V5/His-Komplex vorliegt. Offensichtlich führt die Entfaltung der WD 40-Domäne von Hira durch den Austausch der Aminosäuren RNHSG mit AAAAI in Hira zum Verlust der Interaktionsfähigkeit mit Urim.

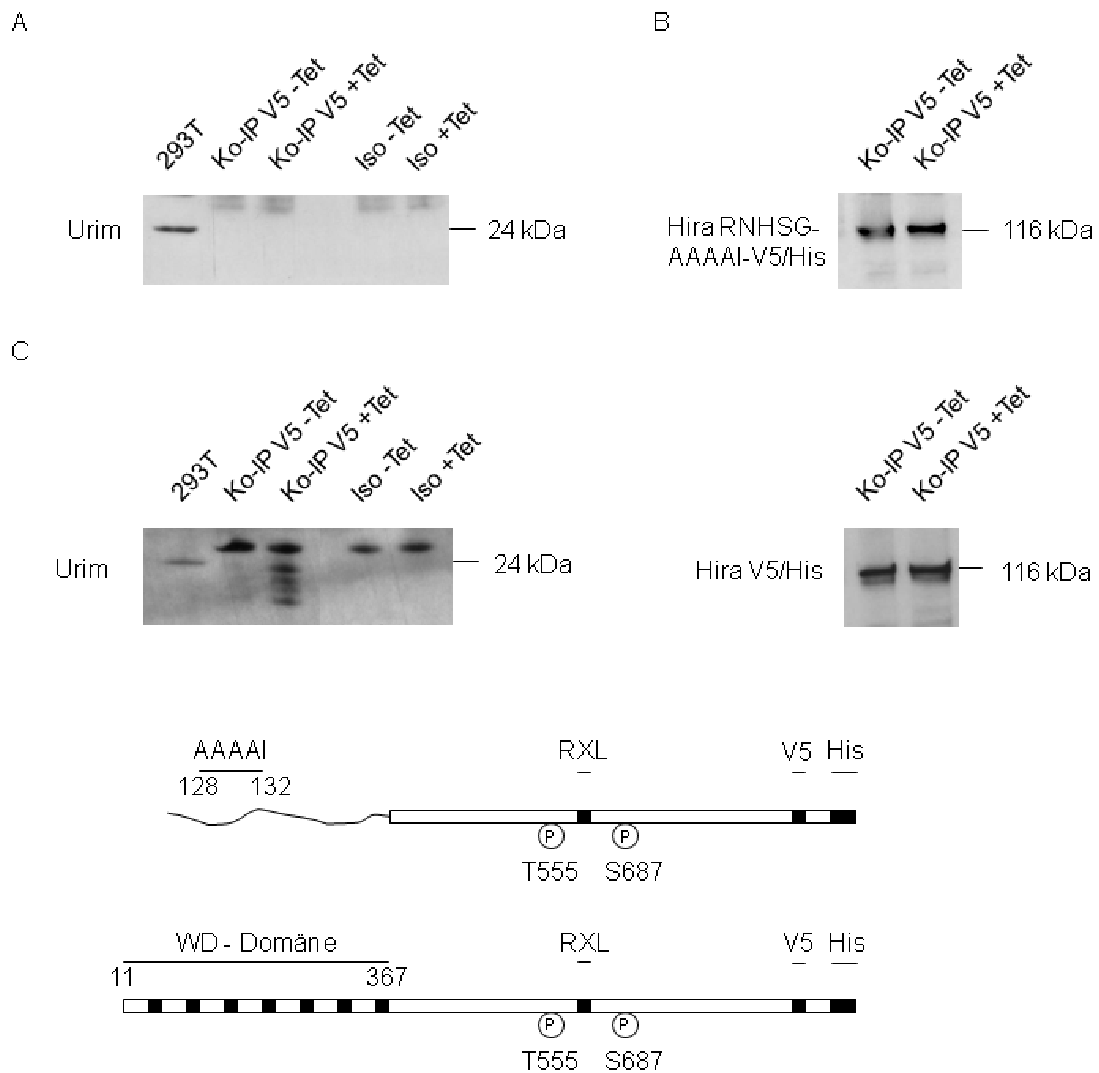


Abb.27: Der Austausch der Aminosäuren RNHSG durch AAAAI in Hira führt zum Verlust der Bindung von Urim. Zellen der Linie 293T wurden transient mit den Plasmiden #1097, #602 und #559 transfiziert. Die Expression von Urim wurde durch die Inkubation mit 1µg/ml Tetracyclin induziert (+Tet). Die transfizierten Zellen (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert und Hira RNHSG-AAAAI-V5/His mit dem Antikörper anti V5 präzipitiert. Als Isotypkontrolle wurde die äquivalente Menge von Maus IgG1 κ Isotypkontrolle eingesetzt. Als Positivkontrolle des Proteinnachweises diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen, die unter reduzierenden Bedingungen lysiert wurden. Die Proteine aus den Präzipitaten wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western-Blot-Verfahrens analysiert. Der Nachweis von Urim erfolgte durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 (A), der Nachweis von Hira RNHSG-AAAAI-V5/His durch den Antikörper anti V5 (B). Zur Veranschaulichung wurden Hira RNHSG-AAAAI-V5/His und Hira-V5/His schematisch dargestellt und die Ko-Präzipitation von Urim durch Hira-V5/His gezeigt. RXL, Aminosäuremotiv zur Cyclin cdk2-Interaktion; V5, V5-Epitop; His, Histidin-Tag; P, Phosphat-Rest; T555, Threonin 555; S687, Serin687; A, Alanin; I, Isoleucin; R, Arginin; N, Asparagin; H, Histidin; S, Serin; G, Glycin

3.4.13 Der Austausch der Aminosäuren RGHSG durch AAAAI zwischen WD #3 und WD #4 in Hira führt ebenfalls zum Verlust der Urim-Bindung

Anschließend stellten wir uns die Frage, ob der Austausch der Aminosäuren RGHSG durch AAAAI zwischen der WD 40-Wiederholungen 3 und 4 ebenfalls zum Verlust der Hira-Urim-Interaktion führt. Um das zu zeigen, wurden 293T Zellen mit den Plasmiden #1101, #602 und #559 simultan transfiziert und die Urim-Expression durch Tetrazyklin induziert. Die Zellen wurden lysiert und das transgen exprimierte Hira durch eine Ko-Immunopräzipitation mit dem Antikörper anti V5 präzipitiert. Die Proteine des Präzipitats wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Urim wurde in den Präzipitatproben mittels Western Blot durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 nachgewiesen. Als Kontrolle diente der Nachweis von Hira RGHSG-AAAAI-V5/His durch den anti V5 Antikörper.

In Abbildung 28A ist Urim mit einem Molekulargewicht von 24 kDa in der Spur mit einem 293T Gesamtzelllysat gezeigt. In den Präzipitaten aus Tetrazyklin uninduzierten und induzierten 293T Zellen wurde jedoch kein Urim nachgewiesen. In den Isotypkontrollen ist Urim nicht ko-immunopräzipitiert. Die Präzipitation war spezifisch, da Hira RGHSG-AAAAI-V5/His mit einem Molekulargewicht von 116 kDa in den Ko-Immunopräzipitationsspuren nachgewiesen wurde (Abb.: 28B).

Diese Daten zeigen, dass die Hira-Mutante RGHSG-AAAAI-V5/His Urim nicht zu binden vermag. Die Entfaltung der WD 40-Domäne von Hira durch den Austausch der Aminosäuren RGHSG mit AAAAI in Hira führt offensichtlich, wie auch der Austausch der Aminosäuren RNHSG gegen AAAAI, zu einem Verlust der Interaktionsfähigkeit mit Urim.

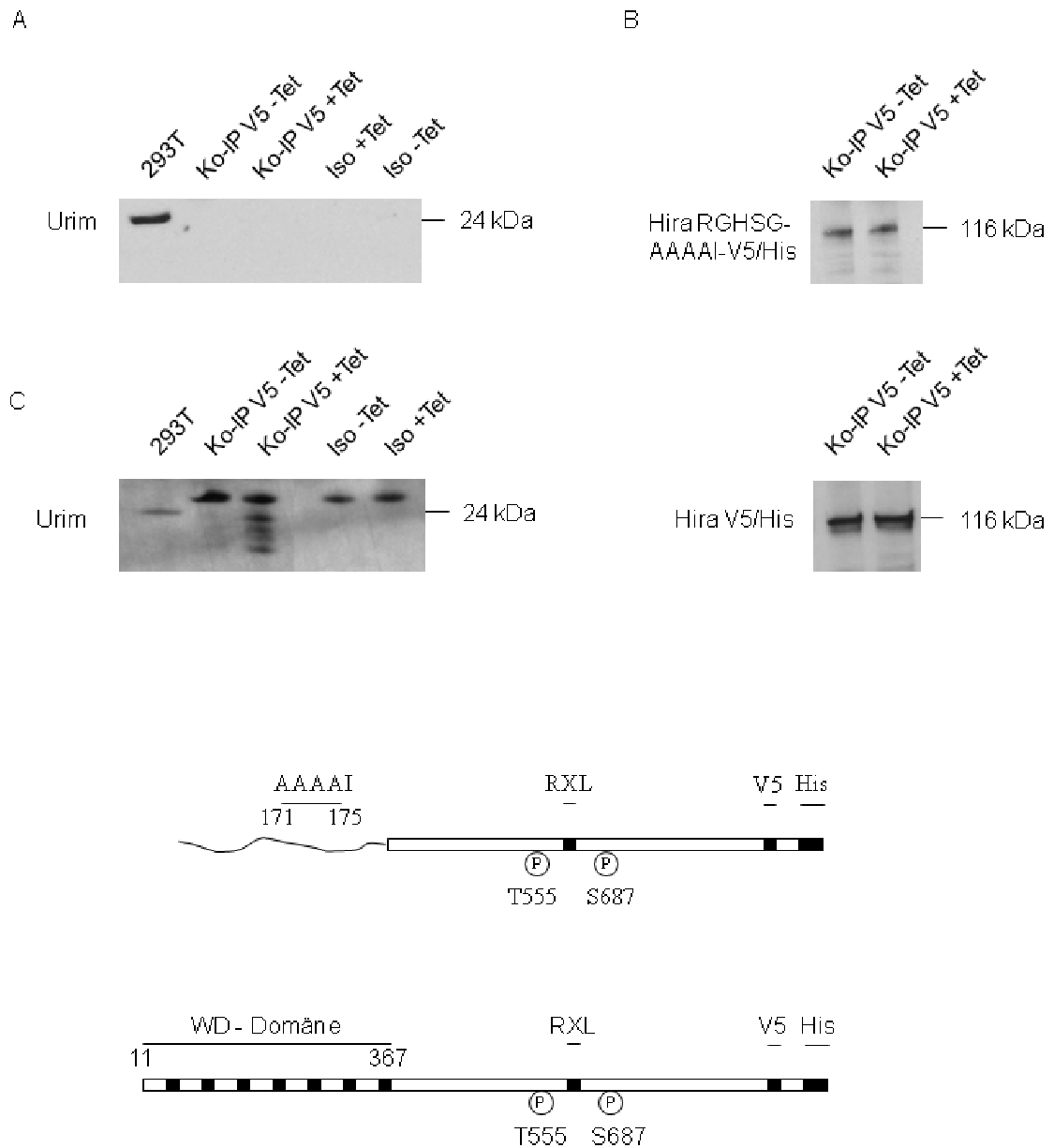


Abb.28: Der Austausch der Aminosäuren RGHSG durch AAAAI in Hira führt zum Verlust der Bindung von Urim. Zellen der Linie 293T wurden transient mit den Plasmiden #1101, #602 und #559 transfiziert. Die Expression von Urim wurde durch die Inkubation mit 1µg/ml Tetrazyklin induziert (+Tet). Die transfizierten Zellen (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert und Hira RGHSG-AAAAI-V5/His mit dem Antikörper anti V5 präzipitiert. Als Isotypkontrolle wurde die äquivalente Menge von Maus IgG1 κ Isotypkontrolle eingesetzt. Als Positivkontrolle des Proteinnachweises diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen, die unter reduzierenden Bedingungen lysiert wurden. Die Proteine aus den Säuleneluat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western-Blot-Verfahrens analysiert. Der Nachweis von Urim erfolgte durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 (A). Der Nachweis von Hira RGHSG-AAAAI-V5/His erfolgte durch den Antikörper anti V5(B). Zur Veranschaulichung wurden Hira RGHSG-AAAAI-V5/His und Hira-V5/His schematisch dargestellt und die Ko-Präzipitation von Urim durch Hira-V5/His gezeigt. RXL, Aminosäuremotiv zur Cyclin cdk2-Interaktion; V5, V5-Epitop; His, Histidin-Tag; P, Phosphat-Rest; T555, Threonin 555; S687, Serin687; A, Alanin; I, Isoleucin; R, Arginin; N, Asparagin; H, Histidin; S, Serin; G, Glycin

3.4.14 Die Mutation der Aminosäure Arginin 227 in humanem Hira zerstört die Bindung mit Urim

Die Mutation *sesame* in *Drosophila melanogaster* ist gekennzeichnet durch einen Aminosäureaustausch in der Hira WD 40-Domäne und führt zur Sterilität weiblicher Individuen. Der Arginin-Rest an Position 225 ist in dieser Mutante durch einen Lysin-Rest ersetzt (Loppin *et al.*, 2005). Nach der Befruchtung kann im männlichen Pronukleus der Austausch der die Spermien-DNA verpackenden Protamine durch Histone nicht mehr erfolgen. Um zu zeigen, ob die *Drosophila melanogaster* Aminosäure Arginin 225 in humanem Hira konserviert ist, wurden die Basenpositionen 1-379 der *Drosophila* Hira-Sequenz mit den Basenpositionen 1-381 der humanen Sequenz durch das Programm *ClustalX* abgeglichen. In Abbildung 29 ist das Sequenzalignment gezeigt. In der WD-Wiederholung 5 ist der Arginin-Rest an Position 227 in humanem Hira identifiziert. Die Aminosäure liegt in einem hoch konservierten Bereich der Hira-Proteine.

```

1
hHira  MKLLKPTWVNHNGKPIFSVDIHPDGTKFATGGQGQDSGKVVWVWNSPVLQEDDEKDENIP
dHira  MRLLKPAWVHDDKQIFSVDIHKDCTKFATGGQSDCGRVVIWVWNSPVLQEDDEKDFDADVP
*:****:*:*:*:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1
WD1

hHira  KMLCQMDNHLACVNCVWRWSNSGMYLASGGDDKLIWVWKRATYIGPSTVFGSSGKLANVEQ
dHira  KMLCQMDQHLACVNCVWRWSQNGQNLASGSDDKLIWVWKRK-AGSSGVFGTGGMQKNHES
*****:*****:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
WD2

hHira  WRCVSI LRNHSGDVMDVAWSPHDAWLASCSVDNTVVIWNAVKFPEILATLRGHSGLVKGL
dHira  WKCFYTLRGHDGDVLDLAWSPNDVYLASCSIDNTVVIWDAQAFPHSVA TLKGHTGLVKGV
*: * . * * . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
WD3

hHira  TWDPVGGKYIASQADDRSLKVWRITLDWQLETSITKPFDECGGTTHVLRLSWSPDGHYLVSA
dHira  SWDPLGRFLASQSDDRSIKIWNMTMNWSLSHTITEPFEECGGTTHILRLSWSPDQYLVSA
:****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
WD4 WD5

hHira  HAMNNSGPTAQIIEREGWKTNMDFVGHKRAVTVVKFNPKIFKKKQKNGSSAKPSCPYPCCC
dHira  HAMNGGPTAQIIEREGWCKDKDFVGHKRAVTCVRFHNSILSRQENDGSPSKP-LQYCC
* * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
WD6

hHira  AVGSKDRSLSVWLTCLKRPLVVIHELFDKSISWTLNGLGILVCSMDGSAFLDFSQD
dHira  AVGSRDRSLSVWMTALQRPMVVIHELFNASILDLTWGPQECLLMACSVDGSIACLKFTTE
*****:*****:* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
WD7

381
hHira  ELGDPLSEEEKSRIHQSTYGK
dHira  ELGKAISEEEQNAIIRKMYGK
* * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
379

```

Abb.29: Sequenzvergleich des N-Terminus von Hira aus *Homo sapiens* und *Drosophila melanogaster*. Sequenzvergleich der N-terminalen Aminosäuren 1-381 des Proteins Hira aus *Homo sapiens* (hHira) und der Aminosäuren 1-379 aus *Drosophila melanogaster* (dHira). Die WD-Wiederholungen 1-7 (WD 1-7) beider Proteine sind schwarz markiert. Konservierte Aminosäurereste sind mit * gekennzeichnet. Der in der *Drosophila melanogaster* Mutante *sesame* gegen Lysin ausgetauschte Arginin-Rest 225 entspricht dem Arginin an Position 227 in der humanen Hira-Sequenz und ist durch einen Kasten hervorgehoben.

Wir generierten eine Hira-Mutante mit dem Aminosäureaustausch an Position 227. Ausgehend von pcDNA3.1V5/His-Hira (#734) wurde im offenen Leseraster von *HIRA* V5/His das Arginin-Codon in den Basenpositionen 681 bis 683 gegen das Lysin-Codon AAG mittels der Primer Oligonukleotide #401 und 461 durch Mutagenese-PCR ausgetauscht. Wir erhielten das Konstrukt pcDNA3.1V5/His-HIRA R227K (#1106). Eine schematische Darstellung der klonierten Hira-Variante zeigt Abbildung 30. Die eingefügte Mutation wurde durch Sequenzierung verifiziert.

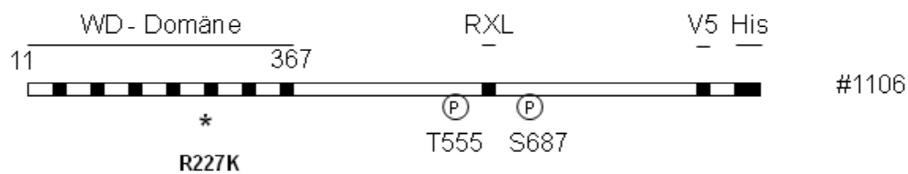


Abb.30: Hira-Mutante #1106 mit Arginin gegen Lysin Austausch an Position 227. Schematische Darstellung der Hira-Mutante mit Arginin-Lysin-Inversion an Aminosäureposition 227. RXL, für die Interaktion mit Cyclin-Cdk2 essentielles Aminosäuremotiv; V5, V5-Epitop; His, Histidin-Tag; P, Phosphatrest; T555, Threonin an Position 555; S687, Serin an Position 687; R, Arginin; K, Lysin; *, Position der eingefügten Mutation.

Interagiert Urim mit der Hira R227K-V5/His-Mutante? Um diese Frage zu beantworten, wurden 293T Zellen simultan mit den Plasmiden #1106, #602, und #559 transfiziert und die Expression von Urim durch Tetrazyklin induziert. Die Zellen wurden lysiert und Hira R227K-V5/His mit dem Antikörper anti V5 präzipitiert. Die Proteine aus dem Säuleneluat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und Urim mittels Western Blot durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 nachgewiesen. Als Kontrolle diente der Nachweis von HiraR227K-V5/His in dem Präzipitat durch den Antikörper anti V5.

Abbildung 31A zeigt den Nachweis von Urim mit einem Molekulargewicht von 24 kDa im 293T Gesamtzelllysate. Zusätzlich dazu wurde im 293T Lysat noch eine höhermolekulare Spezies unbekannter Herkunft detektiert. Im Hira Präzipitat wurde jedoch kein Urim nachgewiesen, auch nicht nach Tetrazyklin induzierter Überexpression von Urim. In dem Eluat der Isotypkontrollen wurde Urim nicht ko-immunopräzipitiert. Die Präzipitation war spezifisch, da HiraR227K-V5/His mit einem Molekulargewicht von 116 kDa in den Ko-Immunopräzipitationsspuren nachgewiesen wurde (Abb. 31B).

Diese Daten zeigen, dass die Hira-Mutante HiraR227K-V5/His mit dem Arginin-Lysin Austausch an Position 227 nicht in der Lage ist mit Urim zu interagieren.

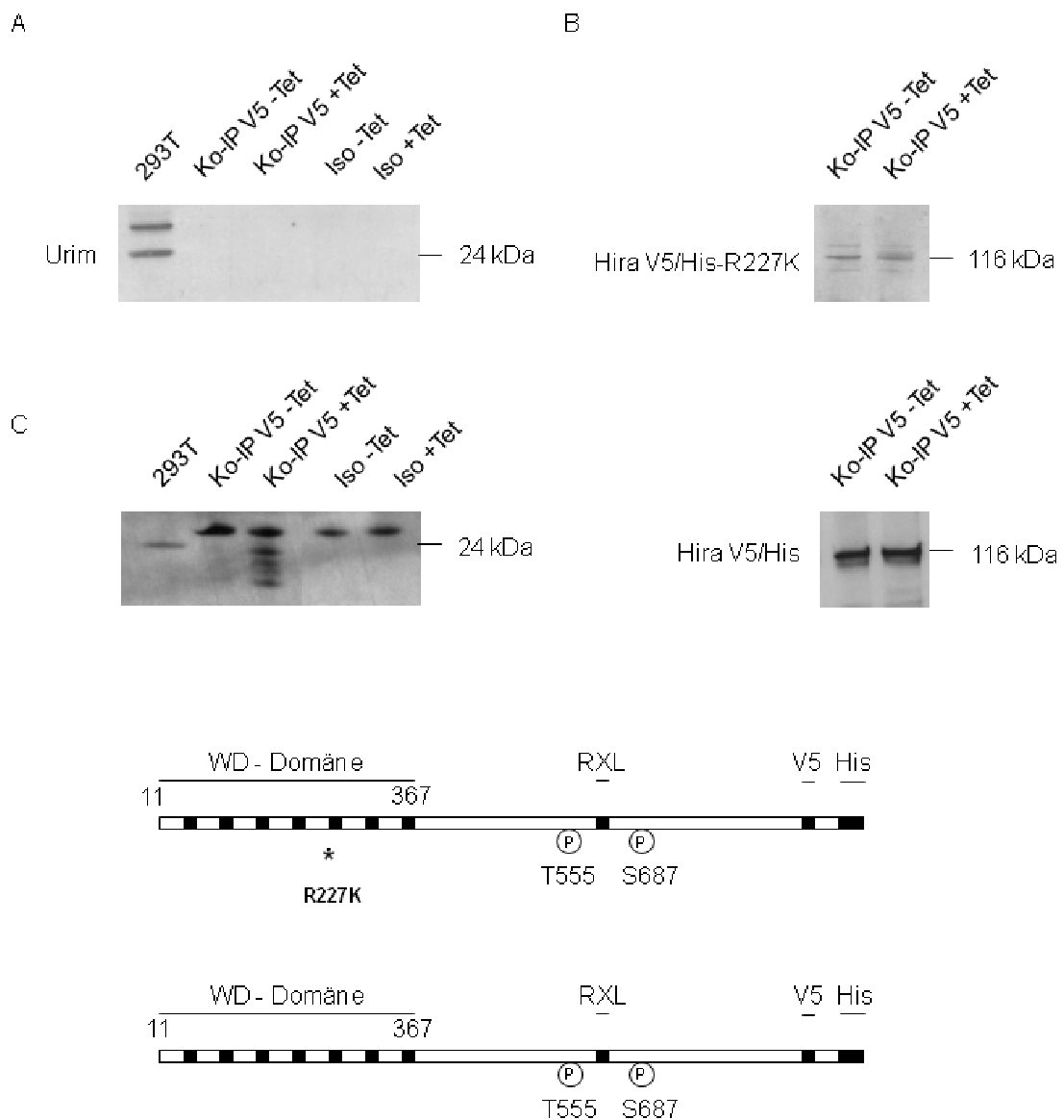


Abb.31: Der Austausch von Arginin 227 gegen Lysin in Hira führt zum Verkust der Hira-Urim-Bindung. Zellen der Linie 293T wurden transient mit den Plasmiden #1106, #602 und #559 transfiziert. Die Expression von Urim wurde durch die Inkubation mit 1µg/ml Tetrazyklin induziert (+Tet). Die transfizierten Zellen (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert und Hira R227K V5/His mit dem Antikörper anti V5 präzipitiert. Als Isotypkontrolle wurde die äquivalente Menge von Maus IgG1 κ Isotypkontrolle eingesetzt. Als Positivkontrolle des Proteinnachweises diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen, die unter reduzierenden Bedingungen lysiert wurden. Die Proteine aus den Säuleneluat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western-Blot-Verfahrens analysiert. Der Nachweis von Urim erfolgte durch das affinitätsgereinigte Antiserum anti Urim #4134 (A), der Nachweis von Hira R227K-V5/His durch den Antikörper anti V5 (B). Zur Veranschaulichung wurden Hira R227K-V5/His und Hira-V5/His schematisch dargestellt und die Ko-Präzipitation von Urim durch Hira-V5/His gezeigt. RXL, Aminosäuremotiv zur Cyclin-cdk2-Interaktion; V5, V5-Epitop; His, Histidin-Tag; P, Phosphat-Rest; T555, Threonin 555; S687, Serin687; R, Arginin; K, Lysin, *, Position der eingefügten Mutation.

3.5 Urim und Hira bilden einen Komplex mit den Histonen H2B und H4

3.5.1 Das Histon-Protein H4 ist ein weiteres Protein im Urim-Hira-Komplex

Im Anschluss an den Nachweis der Urim-Hira-Interaktion und der Identifizierung der Urim Bindedomäne in Hira, wurde der Frage nachgegangen, ob das Histon H4 ein Bestandteil des Komplexes ist. Dazu wurde Urim aus einem nicht reduzierten 293T Zellysat mittels Ko-Immunopräzipitation mit dem anti Urim Antikörper gefällt. Urim wurde erwartungsgemäß in dem Komplex als 24 kDa Protein mit dem affinitätsgereinigten Antiserum anti Urim #4134 detektiert. Im 293T Lysat ist Urim ebenfalls gezeigt. Unter Verwendung eines Urim-Präimmunserums als Kontrolle wurde Urim nicht nachgewiesen (Abb. 32B). Im Urim-Präzipitat wurde ebenfalls Histon H4 mit einem Molekulargewicht von 12 kDa nachgewiesen. Das Histon H4 Protein wurde mit demselben Molekulargewicht auch in einem Lysat von 293T Zellen detektiert. Unter Verwendung eines Urim-Präimmunserums als Kontrolle wurde Histon H4 nicht nachgewiesen (Abb. 32B). Als weitere Kontrolle wurde das Präzipitat auf der Nitrozellulosemembran mit dem Antikörper anti Aktin inkubiert (Abb.:32C). Es wurde kein Aktin in dem Präzipitat nachgewiesen. Ein Aktin-Signal bei einem Molekulargewicht von 43 kDa wurde nur im 293T Lysat detektiert. In der Spur der Isotypkontrolle war Aktin nicht nachzuweisen.

Dieser Ansatz zeigt, dass durch Präzipitation von Urim das Histon-Protein H4 aus 293T Zellen kopräzipitiert wird. Offensichtlich liegen Urim und Histon H4 in einem Komplex vor.

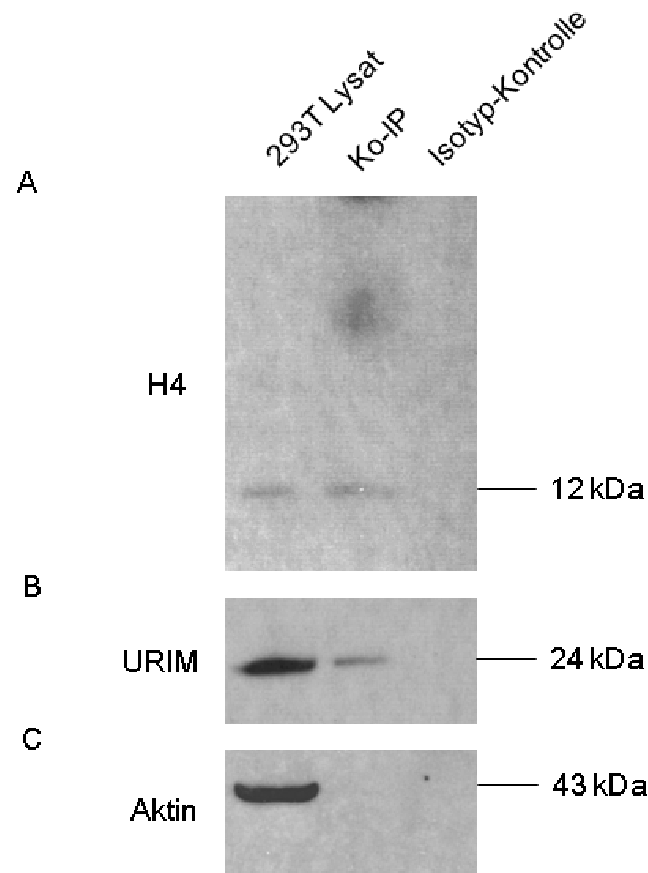


Abb.32: Durch Urim Ko-Immunopräzipitation wird das Histon-Protein H4 als ein weiterer Bestandteil des Urim-Komplexes nachgewiesen. Zellen der Linie 293T (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert. Die Präzipitation von Urim erfolgte durch Inkubation des Lysats mit $3 \mu\text{g}$ des affinitätsgereinigten Antiserums anti URIM #4134. Als Isotypkontrolle wurde ein weiterer Ansatz mit der äquivalenten Menge Urim Präimmunsereum inkubiert. Als Kontrolle diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen. Die Proteine aus allen Ansätzen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western Blot Verfahrens analysiert. Es erfolgte der Nachweis von Histon H4 (A), Urim (B) und als Spezifitätskontrolle Aktin (C).

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde eine weitere Ko-Immunopräzipitation mit dem Antikörper anti Hira WC15 durchgeführt. Hira wurde nach Präzipitation erwartungsgemäß im Western Blot mit dem Antikörper anti Hira WC119 detektiert (Abb. 33B). Das präzipitierte Hira weist mit 111 kDa dasselbe Molekulargewicht wie Hira im 293T Zelllysate auf. Die Präzipitation ist spezifisch, da Hira in dem Eluat der Ko-Immunopräzipitation mit der Isotypkontrolle nicht nachgewiesen wurde. Als weitere Kontrolle wurde das Präzipitat auf der Nitrozellulosemembran mit dem Antikörper anti Aktin inkubiert (Abb. 33C). Es wurde kein Aktin in dem Präzipitat nachgewiesen. Ein Aktin-Signal bei einem Molekulargewicht von 43 kDa wurde nur im 293T Lysat detektiert. Nach der Auftrennung des präzipitierten Hira-Komplexes wurde Histon H4

mit einem Molekulargewicht von 12 kDa durch Western Blot Analyse nachgewiesen (Abb. 33A). Histon H4 wurde bei Präzipitation mit dem Isotyp-Antikörper nicht nachgewiesen. Im 293T Zelllysat wurde das Protein detektiert. Insgesamt verifiziert dieser Ansatz die Anwesenheit von Histon H4 im Urim-Hira Proteinkomplex.

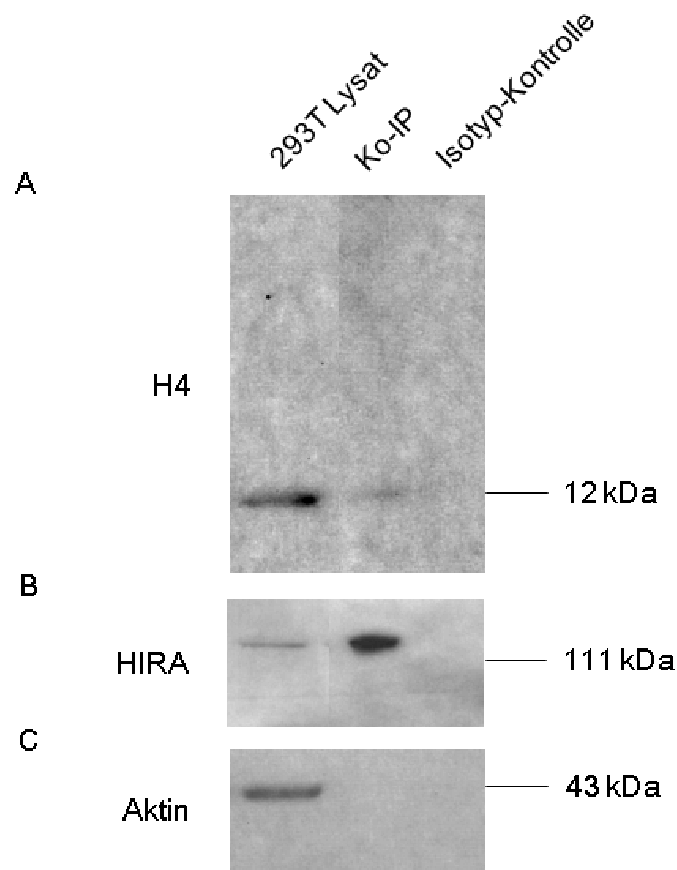


Abb.33: Durch eine Ko-Immunopräzipitation von Hira wurde die Interaktion von Histon H4 mit dem Urim-Hira-Komplex bestätigt. Zellen der Linie 293T (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert. Die Präzipitation von Hira erfolgte durch Inkubation des Lysats mit 3 μ g des Antikörpers anti Hira WC15. Als Isotypkontrolle wurde ein weiterer Ansatz mit der äquivalenten Menge Maus IgG1 κ Isotypkontrolle inkubiert. Als Kontrolle diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen. Die Proteine aus allen Ansätzen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western Blot Verfahrens analysiert. Es erfolgte der Nachweis von Histon H4 (A), Hira (B) und als Spezifitätskontrolle Aktin (C).

3.5.2 Das Histon-Protein H2B interagiert mit dem Urim-Hira-Komplex

Möglicherweise ist auch das Histon H2B ein Bestandteil des Urim-Hira-Komplexes. Dazu wurde Urim aus einem nicht reduzierten 293T Zelllysat mit dem Urim Antikörper gefällt und anschließend nach SDS-PAGE und Western Blot erwartungsgemäß mit dem affinitätsgereinigten Antiserum anti Urim #4134 detektiert. Im 293T Lysat ist Urim

ebenfalls gezeigt. Unter Verwendung eines Urim-Präimmunserums als Kontrolle wurde Urim nicht nachgewiesen (Abb. 34B). Abbildung 34A zeigt den Nachweis des Histon-Proteins H2B mit einem Molekulargewicht von 18 kDa im Urim-Präzipitat. In einem 293T Zelllysate wurde Histon H2B ebenfalls nachgewiesen. Die Präzipitation ist spezifisch, da als Kontrolle die Präzipitation mit einem Urim-Präimmunserum kein Histon H2B kopräzipitiert. Zusammengefasst zeigen diese Daten die Anwesenheit des Histon H2B-Proteins im Urim-Komplex.

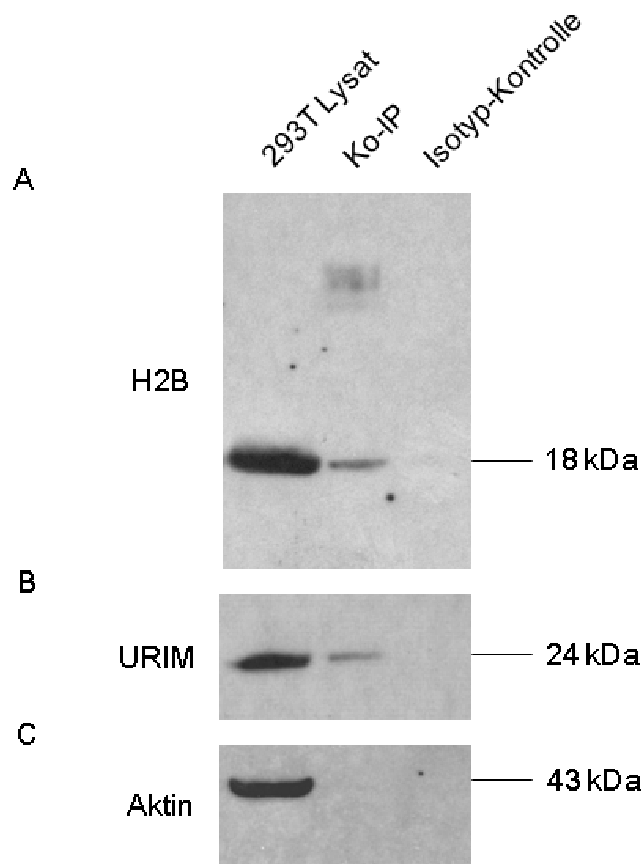


Abb.34: Das Histon-Protein H2B wurde durch eine Ko-Immunpräzipitation als ein Urim Interaktionspartner identifiziert. Zellen der Linie 293T (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert. Die Präzipitation von Urim erfolgte durch Inkubation des Lysats mit $3 \mu\text{g}$ des affinitätsgereinigten Antiserums anti URIM #4134. Als Isotypkontrolle wurde ein weiterer Ansatz mit der äquivalenten Menge Urim Präimmunserum inkubiert. Als Kontrolle diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen. Die Proteine aus allen Ansätzen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western Blot Verfahrens analysiert. Es erfolgte der Nachweis von Histon H2B (A), Urim (B) und als Spezifitätskontrolle Aktin (C).

Um die Kolokalisation von Histon H2B in dem Urim-Hira-Komplex zu verifizieren, wurde Hira mit dem Antikörper anti Hira WC15 präzipitiert. Erwartungsgemäß wurde

Hira mit dem Antikörper anti Hira WC119 im Präzipitat detektiert (Abb. 35B). Die Präzipitation war spezifisch, da im Ansatz mit der Isotyp-Kontrolle Hira nicht nachgewiesen wurde. Weiterhin wurde das Histon H2B im Hira-Präzipitat mit einem Molekulargewicht von 18 kDa nachgewiesen (Abb. 35A). Als Kontrolle der Immunpräzipitation diente die Verwendung eines Maus IgG1 κ Isotypkontroll-Antikörpers. Histon H2B wurde in diesem Ansatz nicht nachgewiesen. In einem 293T Zellysate wurde Histon H2B detektiert. Durch diesen Ansatz wurde bestätigt, dass die spezifische Präzipitation von Hira mit dem Antikörper anti Hira WC15 das Histon H2B kopräzipitiert. Offensichtlich liegt Histon H2B neben Histon H4 im Urim-Hira-Komplex vor.

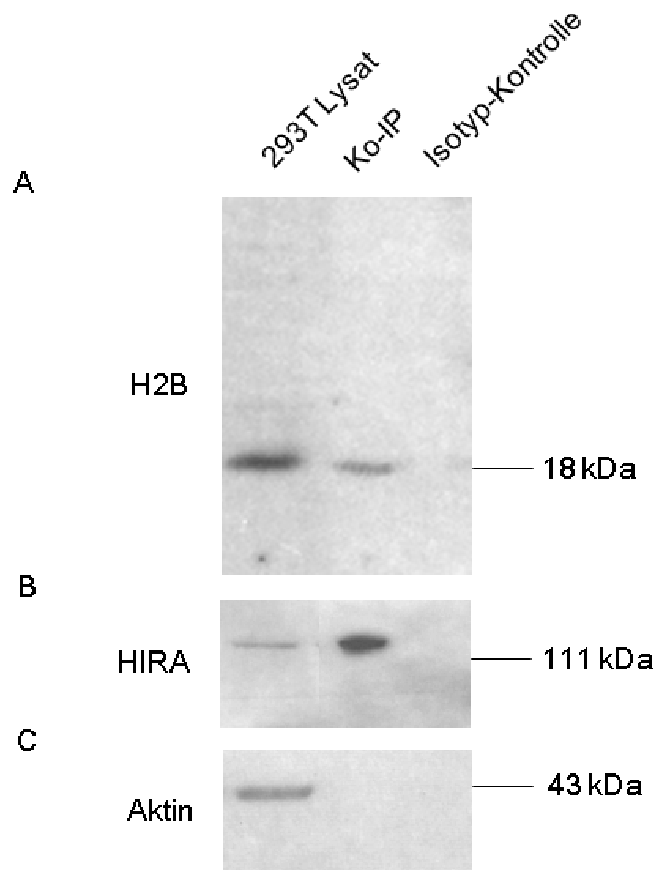


Abb.35: Durch eine Ko-Immunopräzipitation von Hira wurde die Interaktion von Histon H2B mit dem Urim-Hira-Komplex bestätigt. Zellen der Linie 293T (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert. Die Präzipitation von Hira erfolgte durch Inkubation des Lysats mit $3 \mu\text{g}$ des Antikörpers anti Hira WC15. Als Isotypkontrolle wurde ein weiterer Ansatz mit der äquivalenten Menge Maus IgG1 κ Isotypkontrolle inkubiert. Als Kontrolle diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen. Die Proteine aus allen Ansätzen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western Blot Verfahrens analysiert. Es erfolgte der Nachweis von Histon H2B (A), Hira (B) und als Spezifitätskontrolle Aktin (C).

3.6 Hira und Urim bilden einen alternativen Komplex zu Hira und Asf1a ausserhalb der S-Phase

Während des Chromatinaufbaus werden Histone durch Histon-Chaperone in die Nukleosomen eingebaut. Es sind zwei unterschiedliche Wege der Chromatinassemblierung bekannt. Während der replikationsabhängigen Chromatinassemblierung in der S-Phase des Zellzyklus wird das H3.1-H4 Histon Dimer durch die Proteine Asf1a oder Asf1b auf das Histon-Chaperon CAF-1 übertragen (Mousson *et al.*, 2007). Dieses überträgt das Histon Dimer anschließend in konstitutives Heterochromatin. Einen zweiten Weg des Histoneinbaus in DNA stellt die replikationsunabhängige Chromatinassemblierung dar. Es ist bekannt, dass ausserhalb der S-Phase Asf1a das Histon Dimer H3.3-H4 auf das Histon-Chaperon Hira überträgt, welches dann für den Einbau der Histone in transkriptionsaktives Euchromatin verantwortlich ist (Nakatani *et al.*, 2004). Im folgenden Teil wurde der Frage nachgegangen, ob der Urim-Hira-Komplex Asf1a bindet und wann der Komplex mit Histonen assembliert, was auf den Chromatinassemblierungsweg hinweist an dem der Hira-Urim-Komplex möglicherweise beteiligt ist.

3.6.1 Urim und Hira bilden einen alternativen Komplex zu Hira und Asf1a

Um das Protein Asf1a im Hira-Urim-Komplex nachzuweisen wurde Urim aus einem nicht reduzierten 293T Zelllysat mittels Ko-Immunopräzipitation mit affinitätsgereinigtem anti Urim Antiserum gefällt und nach SDS-PAGE und Western Blot mit dem affinitätsgereinigten Antiserum anti Urim #4134 detektiert (Abb.: 36B). Erwartungsgemäß wurde Urim im Präzipitat und im 293T Zelllysat mit einem Molekulargewicht von 24 kDa nachgewiesen. In dem Präzipitat mit dem Präimmenserum wurde Urim nicht kopräzipitiert. Das Protein Asf1a wurde im Urim-Präzipitat nicht nachgewiesen (Abb.: 36A). In einem 293T Lysat wurde das Protein mit einem Molekulargewicht von 23 kDa detektiert. In dem Ansatz mit der Isotypkontrolle wurde Asf1a nicht nachgewiesen. Dieses zeigt, dass Urim nicht im Komplex mit Asf1a vorliegt

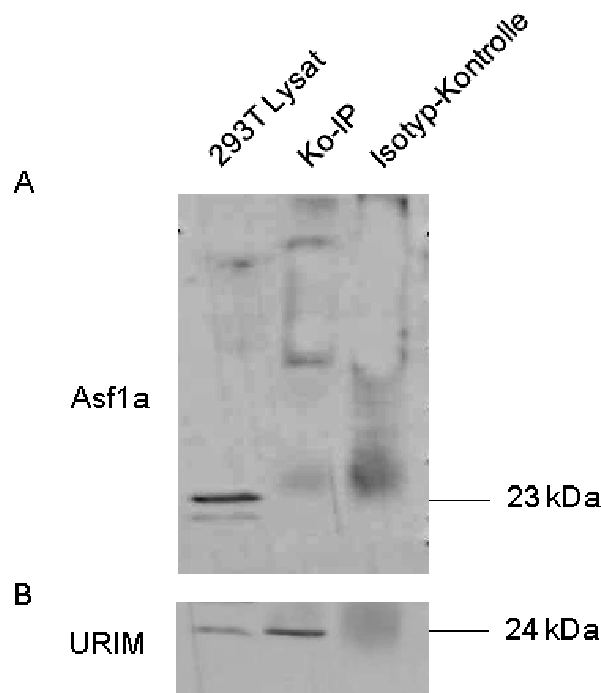


Abb.36: Das Histon-Chaperon Asf1a ist kein Bestandteil des Urim-Hira-Komplexes. Zellen der Linie 293T (1×10^7) wurden nicht reduzierend lysiert. Die Präzipitation von Urim erfolgte durch Inkubation des Lysats mit $3 \mu\text{g}$ des affinitätsgereinigten Antiserums anti URIM #4134. Als Isotypkontrolle wurde ein weiterer Ansatz mit der äquivalenten Menge Urim Präimmunsereum inkubiert. Als Kontrolle der Proteingröße diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen, die unter reduzierenden Bedingungen lysiert wurden. Die Proteine aus allen Ansätzen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western Blot Verfahrens analysiert. Der Nachweis von Asf1a erfolgte durch den Antikörper anti Asf1a (Proteintech Europe, Manchester, UK) (A). Urim wurde durch Inkubation mit dem affinitätsgereinigten Antiserum anti Urim #4134 nachgewiesen (B).

3.6.2 Der Urim-Hira-Komplex assembliert in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase mit den Histonen H2B, H4 und H3

a) Arretierung von 293T Zellen in der G0/1-Phase des Zellzyklus

293T Zellen wurden 18 h mit L-Mimosin inkubiert und der DNA-Gehalt von unsynchronisierten und L-Mimosin behandelten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb: 37A). Alternativ wurden die 293T Zellen zweimal 18 h mit L-Mimosin inkubiert. Zwischen den Inkubationen wurden die Zellen dabei 7 h in mimosinfreiem Medium kultiviert. Im Anschluss an den Doppelblock wurde ihr DNA-Gehalt im Vergleich zu unsynchronisierten 293T Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 37B).

Vor einem Einfachblock mit L-Mimosin befanden sich in der proliferierenden 293T Kultur 57% der Zellen in G0/1-Phase. Nach dem Einfachblock waren 75% der Zellen in G0/1-Phase. Nach einem L-Mimosin Doppelblock waren 76% der Zellen in G0/1-Phase, 23% befanden sich in S-Phase und 1% in G2/M-Phase.

Offensichtlich führen beide Arretierungsmethoden zu einer Anreicherung von Zellen in der G0/1-Phase des Zellzyklus. Der Anteil von S-Phase Kernen ändert sich zwischen unsynchronisierten und L-Mimosin arretierten Zellen bei beiden Synchronisationsmethoden nur unwesentlich. Der Mimosin-Doppelblock führt jedoch im Gegensatz zum L-Mimosin Einfachblock zu einem fast vollständigen Verschwinden von 293T Zellen in der G2/M-Phase.

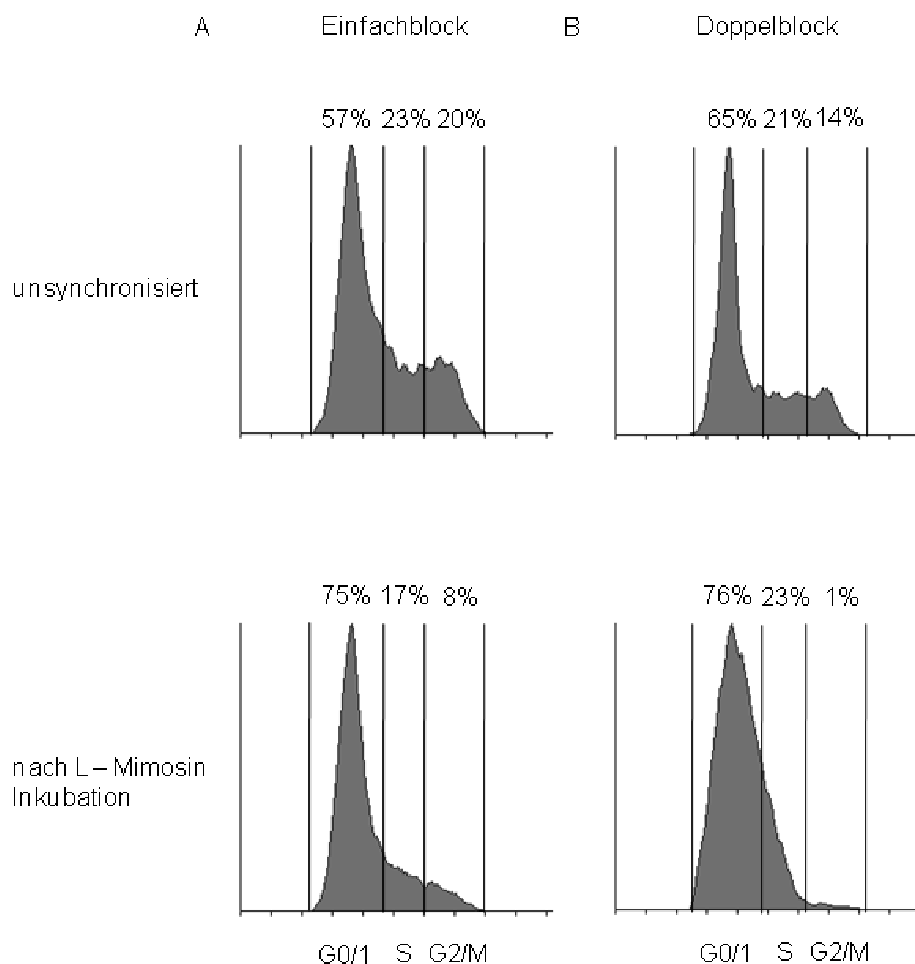


Abb.37: L-Mimosin arretiert proliferierende 293T Zellen in der G0/1-Phase des Zellzyklus. Durchflusszytometrische Analysen des DNA-Gehalts von 293T Zellen nach Fixierung mit 70% Ethanol und Inkubation mit 1 µg/ml PI zur Färbung der DNA. Dargestellt ist der DNA-Gehalt unsynchronisierter und mit L-Mimosin inkubierter (nach L-Mimosin-Inkubation) 293T Zellen.

b) Arretierung in der S-Phase und der M-Phase des Zellzyklus

Zur Arretierung der Zellen in der M-Phase wurden proliferierende 293T Zellen bei 60% Konfluenz zweimal für 18 h mit Aphidicolin inkubiert. Zwischen den Inkubationen wurden die Zellen 7 h in aphidicolinfreiem Medium inkubiert. Im Anschluss an die Aphidicolin-Inkubation wurden die Zellen weitere 6 h in aphidicolinfreiem DMEM-Medium kultiviert. Der DNA-Gehalt der arretierten Zellen wurde im Vergleich zu unsynchronisierten 293T Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

In der proliferierenden 293T Zellkultur (unsynchronisiert) waren 29% der Zellen in S-Phase. Nach einer 18 stündigen Inkubation mit Aphidicolin (Einfachblock) betrug der Anteil von S-Phase-Zellen 46%. Nach einem Doppelblock mit Aphidicolin (Doppelblock) waren 73% der Zellen in S-Phase. Durch eine sechsstündige Inkubation, der durch einen Aphidicolin Doppelblock in S-Phase arretierten 293T Zellen mit aphidicolinfreiem Medium, stieg der Anteil von Zellen in der G2/M-Phase von 9% auf 65%. In S-Phase befanden sich dann 27% der Zellen und der Anteil von 293T in G0/1-Phase betrug 8%.

Dieses Verfahren erlaubte es, durch Doppelblock mit Aphidicolin eine Arretierung von 73% der Zellen in S-Phase herbeizuführen. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine auf den Aphidicolin-Doppelblock folgende sechsstündige Inkubation der Zellen mit aphidicolinfreiem Medium zu einem synchronen Eintritt von 65% der 293T-Zellen in die G2/M-Phase führt.

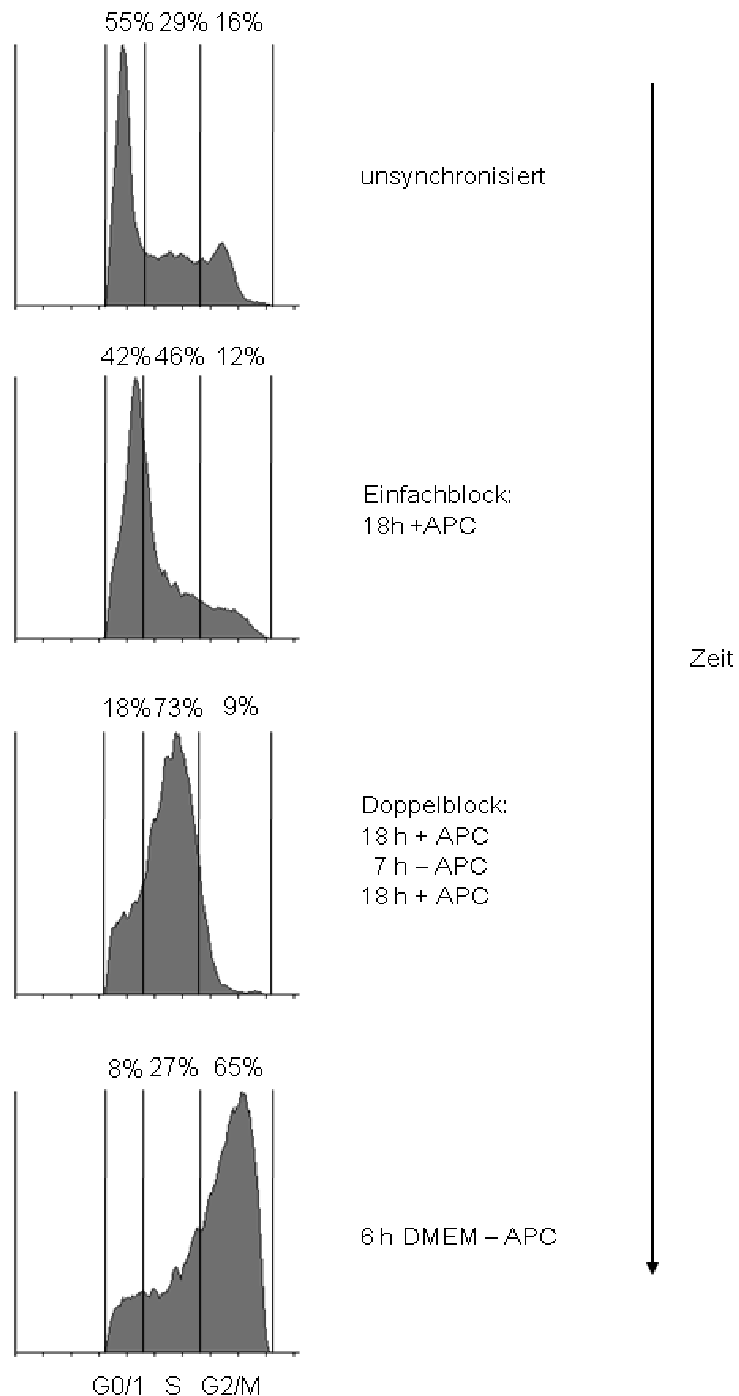


Abb.38: 293T Zellen werden durch Inkubation mit Aphidicolin in der S-Phase arretiert und treten nach Aphidicolinentzug synchron in die M-Phase ein. Durchflusszytometrische Analysen des DNA-Gehalts von 293T Zellen nach Fixierung mit 70% Ethanol und Inkubation mit 1 µg/ml PI zur Färbung der DNA. Dargestellt sind die Analysen von 293T Zellen ohne APC-Inkubation (unsynchronisiert), nach 18 h APC-Inkubation (Einfachblock), nach 2 x 18 h APC-Inkubation (Doppelblock) und nach darauf folgender 6 stündiger Inkubation mit APC-freiem Medium (6 h DMEM - APC).

Um die Assemblierung des Urim-Hira-Komplexes in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase zu untersuchen, wurden 293T Zellen in G0/1-Phase, S-Phase und

G2/M-Phase des Zellzyklus synchronisiert. Die Synchronisation der 293T Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen wurde durchflusszytometrisch anhand ihres DNA-Gehaltes im Vergleich zum DNA-Gehalt unsynchronisierter Zellen kontrolliert (Abb. 39A). Im Anschluss daran wurden die Zellen nicht reduzierend lysiert und der Urim-Hira-Komplex durch Immunopräzipitation mit dem affinitätsgereinigtem Antiserum anti Urim #4134 gefällt. Die Proteine des Präzipitats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch das Western Blot Verfahren hinsichtlich der Anwesenheit der Proteine Hira, Asf1a, Urim, Histon H2B, Histon H3, Histon H4 und Hira analysiert (Abb. 39A).

Erwartungsgemäß wurde in den Präzipitaten aus unsynchronisierten, G0/1-Phase arretierten, S-Phase arretierten und G2/M-Phase arretierten 293T Zellen Urim mit einem Molekulargewicht von 24 kDa nachgewiesen. In den 293T Gesamtzelllysaten wurde es ebenfalls gezeigt. In den Proben mit dem Präzipitat des Präimmunserums, wurde kein Urim nachgewiesen.

In G2/M-Phase arretierten 293T Zellen wurde Histon H3 mit einem Molekulargewicht von 16 kDa im Urim-Präzipitat nachgewiesen. In den Präzipitaten aus unsynchronisierten, G0/1-Phase und S-Phase arretierten Zellen wurde das Protein nicht nachgewiesen. In den 293T-Lysaten wurde Histon H3 detektiert, wohingegen es in den Isotypkontrollen nicht enthalten war.

Das Protein Asf1a wurde weder in den Urim-Präzipitaten aus unsynchronisierten, noch aus in G0/1-Phase, S-Phase und G2/M-Phase synchronisierten 293T Zellen nachgewiesen. In den 293T Gesamtzelllysaten wurde Asf1a mit einem Molekulargewicht von 23 kDa detektiert, in den Isotypkontrollen war es nicht enthalten. Histon H2B wurde im Urim-Präzipitat aus unsynchronisierten und in G2/M-Phase arretierten 293T Zellen mit einem Molekulargewicht von 17 kDa nachgewiesen. In den Präzipitaten von Ko-Immunopräzipitationen aus 293T Zellen in G0/1-Phase und S-Phase war es nicht enthalten. Sein Signal wurde in den Gesamtzelllysaten detektiert. In den Isotypkontrollen wurde das Protein nicht kopräzipitiert.

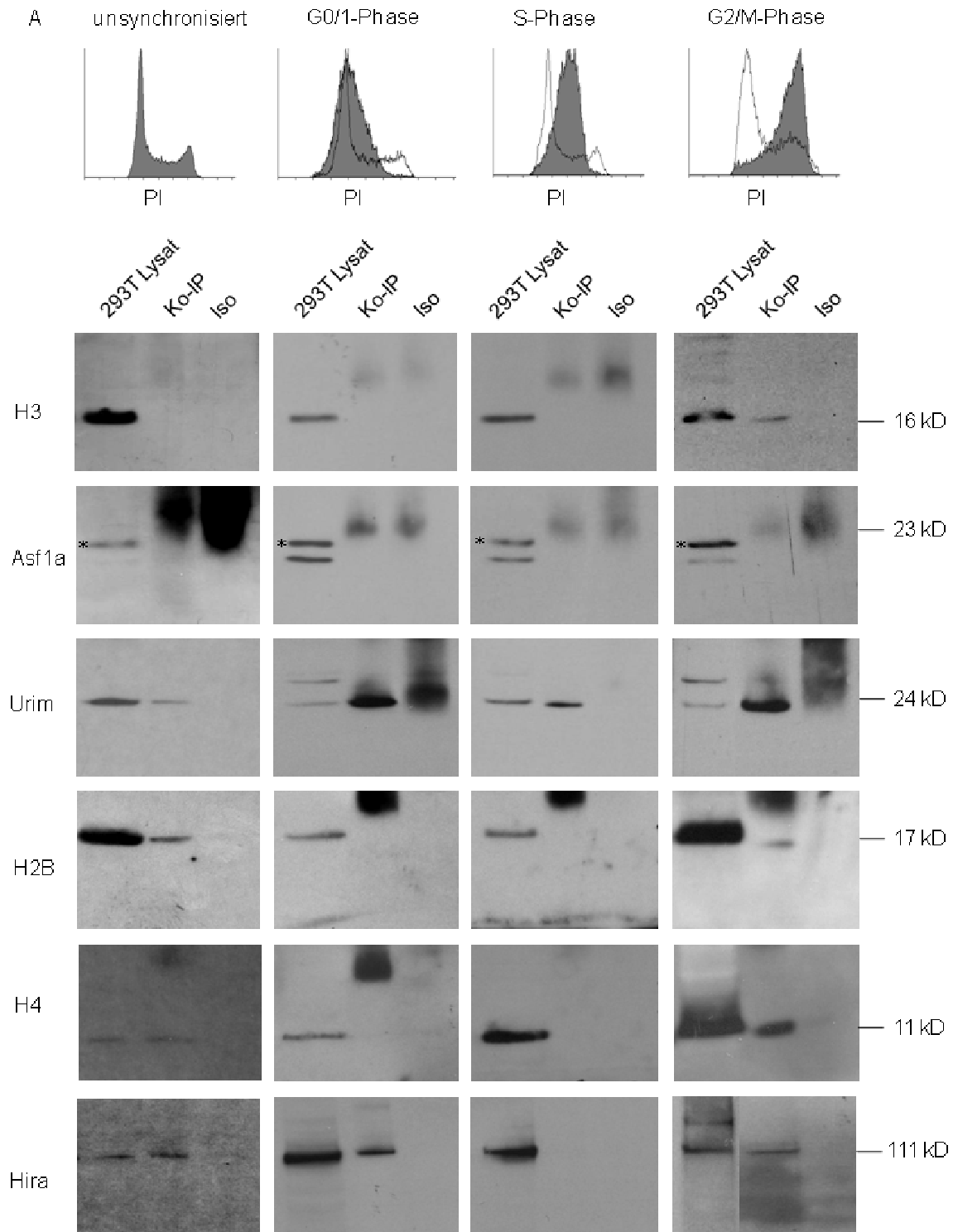
Das Histon-Protein H4 wurde im Urim-Präzipitat aus unsynchronisierten und in G2/M-Phase arretierten 293T Zellen mit einem Molekulargewicht von 11 kDa nachgewiesen. In den Präzipitaten aus G0/1- und S-Phase arretierten Zellen war es nicht enthalten. Sein Signal wurde ebenfalls in den Gesamtzelllysaten detektiert. In den Isotypkontrollen wurde es nicht nachgewiesen.

Hira wurde im Urim-Präzipitat aus unsynchronisierten, sowie in G0/1-Phase und G2/M-Phase arretierten 293T Zellen mit einem Molekulargewicht von 111 kDa nachgewiesen.

Im Präzipitat der Ko-Immunopräzipitation aus 293T Zellen in S-Phase war es nicht enthalten. Das Signal der 111 kDa großen Hira-Form wurde in den Gesamtzelllysaten detektiert. In den Isotypkontrollen wurde das Protein nicht kopräzipitiert.

In Abbildung 39B sind die mit Urim zellzyklusphasenabhängig gebildeten Komplexe schematisch dargestellt. Aus unsynchronisierten 293T Zellen wurden durch die Immunopräzipitation von Urim die Proteine Hira, Histon H2B und Histon H4 kopräzipitiert. In der G0/1-Phase wurde eine Interaktion von Urim und Hira nachgewiesen - Histon H3, H4 und H2B assemblieren jedoch in dieser Phase nicht mit Urim und Hira. In der S-Phase des Zellzyklus wurde keine Interaktion von Urim mit den anderen Komplexpartnern nachgewiesen. In der G2/M-Phase assembliert Urim mit den Proteinen Hira, Histon H3, Histon H4 und Histon H2B. Eine Interaktion von Urim mit dem Protein Asf1a wurde in keiner Zellzyklusphase nachgewiesen.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass der mit Urim gebildete Komplex zellzyklusphasenabhängig assembliert.



B

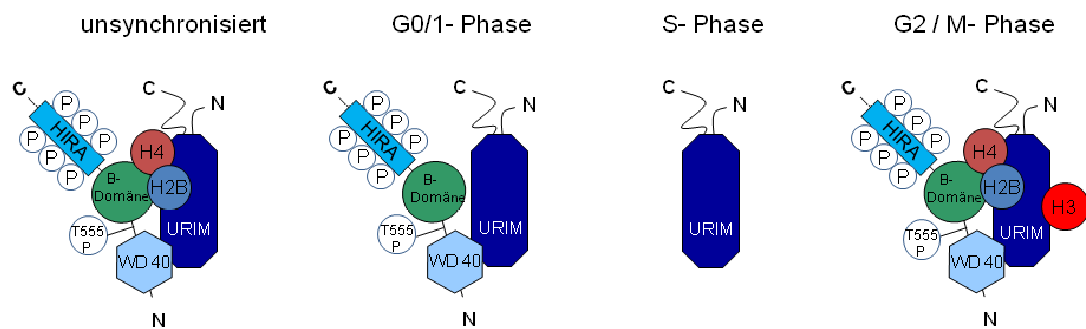


Abb.39: Der Urim-Hira-Komplex assembliert in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase. A) 293T Zellen wurden in G0/1-Phase, S-Phase und G2/M-Phase des Zellzyklus arretiert. Die Zellzyklusphase wurde durchflusszytometrisch anhand des DNA-Gehalts der Zellen verifiziert. Im Anschluss an die Messung der Zellzyklusphase wurden proliferierende und synchronisierte 293T Zellen (1×10^7) nicht reduzierend lysiert. Die Präzipitation von Urim erfolgte durch Inkubation des Lysats mit $3 \mu\text{g}$ des affinitätsgereinigten Antiserums anti Urim #4134. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit der äquivalenten Menge Urim Präimmunsereum inkubiert (Iso). Als Positivkontrolle des Proteinnachweises diente ein Lysat aus 2×10^5 293T Zellen, die unter reduzierenden Bedingungen lysiert wurden (293T Lysat). Die Proteine aus allen Ansätzen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des Western Blot Verfahrens analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Inkubation mit den Antikörpern anti Histon H3, anti Histon H2B, anti Histon H4, anti Asf1a, anti Hira WC119 und anti Urim #4134. **B)** Schematische Darstellung der mit Urim zellzyklusphasenabhängig assemblierten Komplexe. Abkürzungen: P, Phosphatrest; T555P, phosphoryliertes Threonin 555; H4, Histon H4; H2B, Histon H2B; H3, Histon H3; C, C-Terminus; N, N-Terminus.

4 Diskussion

Die Funktion und Bindepartner von Urim waren bisher unbekannt. Da Urim keine bekannten Strukturmerkmale aufweist, die das Protein einer putitiven Funktion zuordnen, erwies sich die Suche nach Bindepartner und Funktion als besonders schwierig. Eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Modellierung der putitiven 3D-Struktur gruppiert Urim zu der Gruppe von Proteinen, die vier antiparallele α -Helices aufweisen (unveröffentlichte Daten von Prof. Dr. Timo Schinköthe). Diese Proteine interagieren bevorzugt mit Proteinen die als Strukturmerkmal eine WD 40-Domäne besitzen (Wall *et al.*, 1995). Diese Gruppe umfasst unter anderem Proteine wie die G-Protein β -Untereinheit, Zellzyklusregulatoren wie Coronin und Mad2, das Apoptoseprotein Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) und RNA-Synthese Proteine wie TBP (TATA box-binding protein) und TAFs (TATA box-binding protein associated factors) (Li und Roberts, 2001). Ein weiteres Protein mit N-terminaler WD 40-Domäne ist das Histon-Chaperon Hira. Aufgrund seiner Ko-Expression mit *URIM* in der embryonalen Entwicklung der Maus und der räumlichen Nähe der *URIM* und *HIRA* chromosomalen Loci, kam Hira als ein putitiver Bindepartner von Urim in Frage. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Ko-Immunopräzipitation Interaktionspartner von Urim identifiziert. Unter Bedingungen von geringer Salzkonzentration (150 mM) mit nicht ionischem Detergenz wurde Urim spezifisch aus einem Lysat von 293T Zellen präzipitiert.

Weiterhin wurde geprüft ob Hira ein Interaktionspartner von Urim ist. Nach Ko-Immunopräzipitation von Urim wurde Hira im Präzipitat nachgewiesen. Da das präzipitierte Hira ein Molekulargewicht von 111 kDa aufweist, schließen wir, dass Hira in der gebundenen Form mit Urim hyperphosphoryliert ist (De Lucia *et al.*, 2001). Die hyperphosphorylierte Form von Hira ist ebenfalls in einem Lysat aus 293T Zellen nachzuweisen. Nach Präzipitation der 111 kDa großen Hira Form war Urim im Präzipitat jedoch nicht nachzuweisen. Möglicherweise ist die Bindestelle für den anti Hira Präzipitationsantikörper durch die Interaktion von Urim mit Hira verdeckt. Desweiteren muss in Betracht gezogen werden, dass der Großteil der endogenen Urim-Proteine mit Hira interagiert, aber nur ein geringer Teil der endogenen Hira-Proteine mit Urim in Interaktion tritt. In einer Ko-Immunopräzipitation von Urim wären in diesem Fall verhältnismäßig mehr Hira-Proteine ko-präzipitierbar. Die Interaktion von Urim mit Hira ist bisher nicht bekannt, jedoch ist die Interaktion von Hira mit anderen

Proteinen gezeigt. Hira interagiert z.B. mit Transkriptionsfaktoren wie Pax3 und Pax7 (Magnaghi *et al.*, 1998), HIRIP3 (Hira interacting protein 3) (Lorain *et al.*, 1998), sowie mit Transkriptionselongationsfaktoren wie Spt4, 5, 6 und 16 (DeSilva *et al.*, 1998; Formosa *et al.*, 2002). Urim ist offensichtlich keiner dieser Interaktionspartner, da die Proteine unterschiedliche Aminosäuresequenzen zu Urim aufweisen.

Um die Bindung von Urim und Hira im Detail zu untersuchen, wurden Hira-Deletionsmutanten kloniert. Alle Proteine zeigten Mutationen in der WD 40-Domäne oder sind vollständig WD 40 deletiert. Zusätzlich waren die Proteine mit C-terminalem V5-Epitop und Histidin-Tag markiert. Die Proteine wurden zusammen mit einem tetrazyklininduzierbarem Urim in 293T Zellen ko-exprimiert. Ein Tetrazyklin-Induktionssystem zur induzierten Expression von Urim wurde eingesetzt, da in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass eine Überexpression von Urim cytotoxisch wirkt (unveröffentlichte Daten von Prof. Dr. T. Schinköthe). Die Urim-Expression wurde gezielt induziert um den cytotoxischen Effekt von überexprimiertem Urim zeitlich zu begrenzen. Durch die Überexpression von Urim wurde das Gleichgewicht der Urim und Hira Proteine zugunsten der Bindung von Urim an Hira verschoben. Die markierte Form von Wildtyp-Hira-V5/His wurde aus 293T Zellen mit dem erwarteten Molekulargewicht von 116 kDa präzipitiert. Urim wurde in dem Hira-Präzipitat aus Tetrazyklin induzierten 293T Zellen nachgewiesen, jedoch nicht in 293T Zellen, welche nicht durch Tetrazyklin induziert wurden. Die Urim Interaktion mit Hira wird durch das C-terminale V5/Epitop und den Histidin-Tag offensichtlich nicht in der Weise beeinflusst, dass eine Bindung von Urim an Hira unmöglich wird. Die Hira-Deletionsmutanten deuten darauf hin, dass Urim an die WD 40-Domäne bindet, jedoch nicht an das C-terminale Ende von Hira. Dieses Ergebnis wurde dadurch bestätigt, dass Hira Δ WD-V5/His ausschließlich ohne Urim präzipitiert wurde, auch, wenn die Urim-Expression induziert wurde. Die Hira-Variante mit deletierter WD 40-Domäne ist offensichtlich nicht in der Lage mit Urim zu interagieren. Da nach der Deletion großer Bereiche der Polypeptidkette das Protein starken Konformationsveränderungen unterworfen ist, musste ausgeschlossen werden, dass die Bindung von Urim an WD 40-trunkiertes Hira nur durch die starke Konformationsveränderung aufgehoben wird. Aus diesem Grund wurden zwei Hira-Mutanten mit entfalteter WD 40-Domäne generiert, analog zu Lindsey-Boltz *et al.*, 2000, die die Entfaltung der WD 40-Domäne des *Drosophila* Proteins Prp17p zeigten. Dort wurden konservierte, exponiert in den loop Regionen zwischen den WD-Wiederholungen lokalisierte Aminosäuren durch unpolare

Reste ausgetauscht. Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen von Hira aus *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* identifizierten wir die Oligopeptide RNHSG zwischen WD-Wiederholung #2 und #3 und RGHSG zwischen WD-Wiederholung #3 und #4 als Aminosäure-Austauschkandidaten. Ein hypothetisches Proteinmodell der WD 40-Domäne von Hira, auf der Basis von Sequenzdaten und dem Abgleich mit ähnlichen Sequenzen von Proteinen mit bekannter Struktur, sagte voraus, dass die auszutauschenden Oligopeptide exponiert in loop-Regionen zwischen den WD-Wiederholungen lokalisiert waren. Im Anschluss daran wurden diese Oligopeptide durch die unpolaren Aminosäurereste AAAAI ausgetauscht, um die Hira-Mutanten Hira V5/His-RNHSG-AAAAI und Hira V5/His-RGHSG-AAAAI zu erhalten. In Kopräzipitationen der Hira-Mutanten wurde kein Urim nachgewiesen. Offensichtlich ist Urim nicht in der Lage an Hira mit entfalteter WD 40-Domäne zu binden. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Aminosäure Lysin an Position 227 in der WD 40-Domäne von Hira für die Bindung von Urim essentiell ist. Insgesamt bestätigen diese Daten unsere Hypothese, dass Urim als Protein mit einer Struktur aus 4 antiparallelen α -Helices über die Bindung an die WD 40-Domäne mit Hira interagiert. Die isolierte WD 40-Domäne vermag Urim nicht zu binden. Dieses könnte sich dadurch erklären lassen, dass die Urim-Bindung an Hira die Bindung weiterer Faktoren C-terminal der WD 40-Domäne in Hira voraussetzt. Für andere WD-Proteine wurde jedoch gezeigt, dass auch eine isolierte WD 40-Domäne in der Lage ist seinen Interaktionspartner zu binden (Lindsey-Boltz *et al.*, 2000).

In vitro wurde gezeigt, dass die Interaktion von Hira mit den Histonen H2B und H4 an überlappenden Domänen am C-Terminus des Proteins stattfindet (Lorain *et al.*, 1998). In Urim-Präzipitaten aus 293T Zellen wurden neben Hira die Histone H2B und H4 nachgewiesen. Das Histon H3 wurde im Urim-Präzipitat jedoch nicht nachgewiesen.

Ein weiterer Hira Interaktionspartner ist das Histon-Chaperon Asf1a (Daganzo *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). Daten aus *Xenopus* Oozyten-Extrakten zeigen, dass Hira und Asf1a zusammen im replikationsunabhängigen Nukleosomenaufbau agieren (Ray-Gallet *et al.*, 2002). Die Histone H3 und H4 werden nach der Interaktion mit beiden Histon-Chaperonen durch Hira replikationsunabhängig in die Nukleosomen eingebaut. In dieser Arbeit zeigen wir, dass Hira und Urim einen Komplex bilden, in den Asf1a nicht integriert ist. Es ist nicht bekannt, mit welcher Assoziation Hira bevorzugt vorliegt. Ray-Gallet *et al.*, 2007 zeigten, dass eine Immunodepletion von Asf1a und Hira aus *Xenopus*-Oozyten Extrakten zu einer Störung der replikationsunabhängigen

Chromatinassemblierung führt. Durch Supplementierung der Extrakte mit Hira und Histon-H3/H4-Dimer wurde die Aufhebung der Störung erzielt. Überraschenderweise konnte durch Zugabe von Asf1a und H3/H4-Histon-Dimer der replikationsunabhängige Nukleosomenaufbau nicht wiederhergestellt werden. Diese Beobachtungen zeigten, dass Hira für den Histon H3/H4-Einbau in die DNA bei der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung notwendig ist, wohingegen Asf1a entbehrlich zu sein scheint. Es stellt sich die Frage, ob es neben dem Hira-Asf1a abhängigen Weg einen alternativen Weg gibt, der zum replikationsunabhängigen Einbau der H3/H4-Histone in die Nukleosomen führt. Komplextiertes Hira und Urim bilden möglicherweise diesen alternativen Weg. Dies kann mit Hilfe des o.g. Oocyten Systems ebenso gezeigt werden.

Die *Drosophila melanogaster* Mutante *sesame* besitzt eine Mutation in der Hira WD 40-Domäne, wobei der Arginin-Rest an Position 225 in der *Drosophila* Mutante durch einen Lysin-Rest ersetzt ist (Loppin *et al.*, 2005). Diese Mutation hat zur Folge, dass nach der Befruchtung im männlichen Pronukleus der Austausch der die Spermien-DNA verpackenden Protamine durch Histone nicht mehr erfolgt. Die Histon-Chaperon Funktion von Hira bei der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung ist durch diese Punktmutation gestört. Im Rahmen dieser Arbeit haben wir den konservierten Arginin-Rest an Position 227 in Hira aus *Homo sapiens* gegen Lysin ausgetauscht, um die Frage zu beantworten, ob diese Hira-Mutante in der Lage ist mit Urim zu interagieren. In einem Präzipitat dieser Hira R227K Mutante war Urim nicht mehr nachzuweisen, während die Wildtyp-Form von Hira Urim bindet. Offensichtlich führt der Austausch der Aminosäure Arginin durch Lysin dazu, dass Hira die Fähigkeit verliert, Urim zu binden. Es stellt sich nun die Frage, ob Hira für den Austausch von Protaminen durch Histone im männlichen Pronukleus die Bindung von Urim benötigt. Durch die Generierung von Δ HIRA-Zellen und die Untersuchung der Hira R227K-Histon Komplexassemblierung bei diesem genetischen Hintergrund könnte gezeigt werden, ob durch die fehlende Interaktion mit Urim auch eine Bindung der Histone an Hira nicht mehr möglich ist.

Da Urim und Hira mit Histonen in einem Komplex vorliegen, lag die Vermutung nahe, dass dieser Komplex eine Funktion in der Chromatinassemblierung haben könnte. Da dieses ein zellzyklusabhängiger Prozess ist, untersuchten wir die Komplexassemblierung des Hira-Urim-Komplexes in synchronisierten 293T Zellen. Um die Zellzyklusphase zu bestimmen, in der der Urim-Hira-Komplex assembliert,

wurden Urim-Präzipitate aus synchronisierten 293T Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen hergestellt und die mit Urim kopräzipitierten Proteine bestimmt. In einem Urim-Präzipitat aus 293T Zellen in G2/M-Phase, wurden die Proteine Hira, Histon H2B, Histon H4 und zusätzlich das Histon H3 nachgewiesen. Die Urim-Hira Komplexassemblierung in der M-Phase in Anwesenheit von Histon H3 und H4 ist mit unserer Hypothese vereinbar, dass der Komplex an der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung beteiligt ist. Dieses wird gestützt durch immunhistochemische Färbungen, welche die Kolo-kalisation beider Proteine im Zytoplasma und Zellkern in der M-Phase zeigten. Da in der S-Phase Chromatin replikationsabhängig assembliert wird (Tagami *et al.*, 2004), liegen Urim und Hira in dieser Zellzyklusphase nicht in einem Komplex vor. Eine Interaktion von Urim mit Hira, Histon H2B, H4 und H3 wurde folglich in dieser Zellzyklusphase nicht nachgewiesen. Durch die fehlende Interaktion von Urim und Hira in der S-Phase ist es unwahrscheinlich, dass Urim an der replikationsabhängigen Chromatinassemblierung beteiligt ist. In G0/1Phase Zellen bindet Urim an Hira, jedoch ohne die Histone H2B, H4 und H3, was uns zu dem Schluss führt, dass die Bindung der Histone an Hira keine Voraussetzung für die Bindung von Urim an Hira ist. Insgesamt zeigten die Zellzyklusanalysen, dass der mit Hira und Urim gebildete Komplex zellzyklusphasenabhängig assembliert. Da in keiner Zellzyklusphase Asf1a im Urim-Präzipitat nachgewiesen wurde, bilden Urim und Hira einen alternativen Komplex zu Asf1a und Hira.

Hira ist ein Substrat von Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk), die als Schlüsselproteine wichtige Funktionen in der Regulation des eukaryotischen Zellzyklus ausüben (Hall *et al.*, 2001). Cyclin A und E cdk2 fördern den Übergang der Zelle von der G1-Phase in und durch die S-Phase (Connell-Crowley *et al.*, 1998; Resnitzky *et al.*, 1994; Resnitzky und Reed, 1995). Hira wird durch die Cyclin E und A abhängigen cdk2 Kinasen in RXL abhängiger Weise phosphoryliert (Hall *et al.*, 2001). Das RXL-Motiv wiederum ist ein Aminosäuremotiv der Inhibitoren der Cyclin abhängigen Kinasen p21^{cip1}, p27^{kip1} und p57^{kip2} (Adams *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1995) und von Cdk-Substraten wie pRB (Adams *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 1996) und ist für die effiziente Bindung der Cyclin abhängigen Kinasen an das Substrat-Protein notwendig (Brown *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1996). Die Hira Aminosäurereste T555 und S687 werden in der S-Phase des Zellzyklus phosphoryliert und die Phosphorylierung von Threonin 555 wird *in vitro* durch Cyclin A-cdk2 katalysiert (Hall *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Urim mit der an T555 phosphorylierten Hira-Form interagiert. Da jedoch

Urim und Hira in der S-Phase des Zellzyklus nicht interagieren, ist davon auszugehen, dass die Interaktion von T555 phosphoryliertem Hira mit Urim unabhängig von Ereignissen in der S-Phase ist. Das steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Hall *et al.*, 2001, die gezeigt haben, dass die Phosphorylierung von S687 und T555 in Hira nicht für den Durchlauf der Zellen durch die S-Phase benötigt wird. Der Austausch beider phosphorylierter Aminosäurereste durch unphosphorylierbares Alanin hat keinen Einfluss auf den Zellzyklusablauf (Hall *et al.*, 2001). Ob die T555 Phosphorylierung in Hira für die Interaktion mit Urim essentiell ist, muss durch weitere Experimente geklärt werden.

De Lucia *et al.*, 2001 zeigten, dass Hira aus mitotischen Zellen hyperphosphoryliert und nicht mit kondensiertem Chromatin assoziiert ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Urim ausschließlich mit der hyperphosphorylierten, 111 kDa großen Hira Form interagiert. Dieses wird gestützt durch den in dieser Arbeit durch Ko-Immunopräzipitation und immunhistochemische Doppelfärbung beider Proteine erbrachten Nachweis der Interaktion von Hira und Urim in der M-Phase und steht in Übereinstimmung mit De Lucia *et al.*, 2001 die zeigen konnten, dass die hyperphosphorylierte Form von Hira seine mitotische Form darstellt. Die mitotische Phosphorylierung könnte der Zelle einen Weg eröffnen, Hira-Komplexe zu unterschiedlichen Chromatinregionen in den Tochterzellen zu führen. (De Lucia *et al.*, 2001). In den Doppelfärbungen war jedoch auch eine partielle Kolokalisation beider Proteine in der G0/1-Phase im Zytoplasma zu beobachten. Ausserdem assoziiert Urim in der G0/1-Phase mit hyperphosphoryliertem Hira. Viele nukleäre, in der M-Phase phosphorylierte Proteine werden anschließend degradiert, so dass sie in der G1-Phase fehlen. Hira wird jedoch im Anschluss an die M-Phase stufenweise dephosphoryliert, da es nicht zellzyklusphasenabhängig synthetisiert und degradiert wird (De Lucia *et al.*, 2001). In der G1-Phase könnte mit Urim interagierendes Hira noch am Beginn der stufenweisen Dephosphorylierung stehen und damit noch annähernd hyperphosphoryliert sein. In Folgeexperimenten muss nun geklärt werden, ob die Hyperphosphorylierung von Hira eine Voraussetzung für die Bindung mit Urim ist und ob folglich die Dephosphorylierung von Hira die Interaktion im Verlauf der G1-Phase aufhebt.

In der M-Phase des Zellzyklus ist Hira nicht an die DNA gebunden. In den übrigen Zellzyklusphasen ist Hira unphosphoryliert und mit der DNA assoziiert (De Lucia *et al.*, 2001). In immunhistochemischen Färbungen von 293T Zellen wurde gezeigt, dass Hira

in Interphase-Zellen im Zellkern unter Ausbildung von korpuskulären Strukturen lokalisiert ist. Eine Kolo-kalisation von Urim mit korpuskulär angeordnetem Hira ausserhalb der M-Phase wurde nicht beobachtet. Da Hira ausserhalb der M-Phase unphosphoryliert ist (De Lucia *et al.*, 2001), stimmt diese Beobachtung damit überein, dass wir auch durch Ko-Immunopräzipitationen keine Interaktion von Urim mit unphosphoryliertem Hira nachgewiesen haben. In der M-Phase liegt Hira diffus verteilt innerhalb der Zelle bei gleichzeitiger Kolo-kalisation mit Urim vor. Das steht in Übereinstimmung mit der fehlenden DNA-Assoziation von Hira in der M-Phase, da die Verteilung der mit Urim komplexierten Hira Proteine im Zytoplasma eine Assoziation des Urim-Hira Komplexes mit der DNA aufgrund der unterschiedlichen Kompartimente der Proteine und der DNA nicht mehr zulässt. Diese Untersuchungen schließen jedoch nicht aus, dass der im Nukleus verbleibende Teil der mit Urim komplexierten Hira-Proteine ebenfalls nicht DNA- oder kernmatrixassoziiert ist. Um eine Assoziation des Urim-Hira Komplexes mit der DNA zu untersuchen, sollte in weiteren Experimenten die Interaktion der Proteine mit der DNA- und der Kernmatrix zellzyklusphasenabhängig untersucht werden.

Die replikationsunabhängige Chromatinassemblierung stellt einen Weg zur Aktivierung und Stilllegung von Genen dar. Die Identifizierung von Urim in diesem Weg ist ein wichtiger Schritt im Verständnis der Funktionsweise dieses Proteins. Handelt es sich bei den durch den Urim-Hira-Komplex beeinflussten Genen um Gene, die mit der Prolifertion oder Migration von Zellen assoziiert sind, könnte die Korrelation der Überexpression von Urim mit dem Metastasierungspotential von malignen Tumoren erklärt werden. In folgenden Untersuchungen sollte untersucht werden, ob Urim noch weitere Bindepartner in Analogie zu CAF-1 und seinen Untereinheiten hat und ob sich Chromatinregionen, wie Promotorbereiche von Genen, bestimmen lassen, für deren Assemblierung die Interaktion von Hira und Urim essentiell ist. Möglicherweise lässt sich dadurch ebenfalls klären, warum durch die Deletion der „DiGeorge kritischen Region“ auf Chromosom 22q11 Krankheitsbilder wie das DGS und VCS hervorgerufen werden, die scheinbar mit einer gestörten Wanderung von Neuralkammzellen in die Kiemenbögen assoziiert sind.

Zusammenfassung

Das Protein Urim (Up regulated in metastasis) wurde zunächst differentiell exprimiert in metastasierenden und nicht-metastasierenden Tumorzellen gefunden. Weitere Untersuchungen zeigten dessen Homologie mit dem Protein NLVCF (Nuclear localization signal containing protein deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome). Die Funktion und die Bindepartner von Urim waren bisher unbekannt.

Durch Ko-Immunopräzipitationen identifizierten wir Hira als einen Interaktionspartner. Mit Hilfe von Hira WD 40-Mutanten zeigten wir, dass Urim an die N-terminale WD 40-Domäne von Hira bindet. Weiterhin sind im Urim-Hira-Komplex die Histone H2B, H3 und H4 als Interaktionspartner gebunden, was eine Beteiligung des Komplexes am Histonmetabolismus und der Chromatinassemblierung wahrscheinlich macht.

Der Hira-Urim-Komplex wird zellzyklusphasenabhängig assembliert. Hira, Urim und die Histone H2B, H3 und H4 kolokalisieren in der M-Phase, jedoch nicht in den anderen Phasen des Zellzyklus. Dieses steht in Übereinstimmung mit der Kolokalisation von Hira und Urim im Zytoplasma und Zellkern von M-Phase Zellen, wie es durch Doppelmarkierungen beider Proteine in der Zelle nachgewiesen wurde. In den übrigen Phasen des Zellzyklus liegt zytoplasmatisches Urim unabhängig von im Zellkern lokalisiertem Hira vor. Da Urim und Hira in der S-Phase des Zellzyklus, in dem die replikationsabhängige Chromatinassemblierung erfolgt, nicht interagieren, ist eine Beteiligung des Komplexes an Ereignissen in dieser Zellzyklusphase unwahrscheinlich. Durch die Komplexierung der Proteine Urim und Hira mit Histonen in der M-Phase ohne Bindung des Histon-Chaperons Asf1a liegt eine Beteiligung an der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung nahe.

Möglicherweise bilden Hira und Urim einen alternativen Weg der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung, der nicht auf die Bindung von Asf1a an Hira angewiesen ist. Urim hat somit durch Bindung von Hira möglicherweise seine Funktion in der Bereitstellung eines Asf1a unabhängigen Weges der replikationsunabhängigen Chromatinassemblierung.

6 Anhang

Gezeigt werden die DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit hergestellten Mutagenese Konstrukte von HIRA und das humane Urim. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wird oberhalb der DNA-Sequenz im Ein-Buchstaben Code und fett gedruckt aufgeführt. Ein * kennzeichnet ein Stop-Codon. An Stellen, an denen Aminosäuren ausgetauscht wurden, wurde zusätzlich die Nukleotidsequenz fett gedruckt und die dazugehörige Aminosäuresequenz unterstrichen.

6.1 Aminosäure- und Nukleotidsequenz der langen HIRA Isoform

```
      M K L L K P T W V N H N G K P I F .
1  ATGAAGCTCC TGAAGCCGAC CTGGGTCAAC CACAATGGCA AGCCGATTTT
   TACTTCGAGG ACTTCGGCTG GACCCAGTTG GTGTTACCGT TCGGCTAAAA

      .S V D I H P D G T K F A T G G Q G .
51  TTCAGTTGAT ATTCACCCTG ACGGGACCAA GTTCGCAACT GGAGGACAAG
   AAGTCAACTA TAAGTGGGAC TGCCCTGGTT CAAGCGTTGA CCTCCTGTTC

      . Q D S G K V V I W N M S P V L Q
101 GGCAGGATTC TGGGAAGGTT GTGATCTGGA ATATGTCTCC AGTCCTCCAG
   CCGTCTAAG ACCCTTCCAA CACTAGACCT TATACAGAGG TCAGGAGGTC

      E D D E K D E N I P K M L C Q M D .
151 GAGGATGACG AGAAGGATGA AAATATTCCC AAGATGCTTT GCCAGATGGA
   CTCTACTGCT TCTTCTACT TTTATAAGGG TTCTACGAAA CGGTCTACCT

      .N H L A C V N C V R W S N S G M Y .
201 CAATCACTTA GCATGTGTGA ACTGTGTGCG GTGGTCAAAC AGTGGGATGT
   GTTAGTGAAT CGTACACACT TGACACACGC CACCAGTTTG TCACCCTACA

      . L A S G G D D K L I M V W K R A
251 ATTTAGCTTC TGGGGGAGAT GACAAACTGA TTATGGTGTG GAAGCGGGCT
   TAAATCGAAG ACCCCCTCTA CTGTTTGACT AATACCACAC CTTCGCCCGA

      T Y I G P S T V F G S S G K L A N .
301 ACGTACATCG GCCCAGCAC CGTGTTCTGGC TCCAGTGGTA AGCTTGCCAA
   TGCATGTAGC CGGGTCTGTG GCACAAGCCG AGGTCACCAT TCGAACGGTT

      .V E Q W R C V S I L R N H S G D V .
351 TGTGGAGCAG TGGCGGTGTG TCTCTATCCT CCGGAATCAT TCAGGCGATG
   ACACCTCGTC ACCGCCACAC AGAGATAGGA GGCCTTAGTA AGTCCGCTAC

      . M D V A W S P H D A W L A S C S
401 TGATGGATGT AGCATGGTCT CCCACGATG CCTGGCTAGC CTCATGCAGC
   ACTACCTACA TCGTACCAGA GGGGTGCTAC GGACCGATCG GAGTACGTG

      V D N T V V I W N A V K F P E I L .
451 GTGGATAACA CTGTCGTTCAT CTGGAATGCT GTAAAGTTCC CAGAAATTCT
   CACCTATTGT GACAGCAGTA GACCTTACGA CATTTCAAGG GTCTTTAAGA

      .A T L R G H S G L V K G L T W D P .
501 AGCTACTCTG AGAGGTCATT CTGGCTTGGT CAAAGGGTTG ACATGGGACC
   TCGATGAGAC TCTCCAGTAA GACCGAACCA GTTCCCAAC TGTACCCTGG

      . V G K Y I A S Q A D D R S L K V
551 CTGTTGGTAA ATACATAGCT TCTCAAGCTG ATGACCGCAG CCTAAAGGTG
   GACAACCATT TATGTATCGA AGAGTTCGAC TACTGGCGTC GGATTTCCAC
```

W R T L D W Q L E T S I T K P F D .
 601 TGGAGGACGC TGGACTGGCA GTTGGAGACC AGCATCACCA AGCCTTTTGA
 ACCTCCTGCG ACCTGACCGT CAACCTCTGG TCGTAGTGGT TCGGAAAAC

· E C G G T T H V L R L S W S P D G ·
 651 TGAGTGTGGA GGAACGACCC ATGTGTTGCG GCTCAGCTGG TCACCTGATG
 ACTCACACCT CCTTGCTGGG TACACAACGC CGAGTCGACC AGTGGACTAC

· H Y L V S A H A M N N S G P T A
 701 GGCATTACCT GGTGTCTGCC CATGCCATGA ACAACTCAGG CCCCCTGACC
 CCGTAATGGA CCACAGACGG GTACGGTACT TGTGAGTCC GGGGTGACGG

Q I I E R E G W K T N M D F V G H ·
 751 CAGATCATCG AACGGGAGGG ATGGAAGACC AACATGGACT TTGTTGGGCA
 GTCTAGTAGC TTGCCCTCCC TACCTTCTGG TTGTACCTGA AACAAACCGT

· R K A V T V V K F N P K I F K K K ·
 801 CCGAAAAGCT GTGACTGTCTG TGAATTTCAA CCCAAAAATC TTCAAAAAGA
 GGCTTTTCGA CACTGACAGC ACTTTAAGTT GGGTTTTTAG AAGTTTTTCT

· Q K N G S S A K P S C P Y C C C
 851 AGCAGAAGAA TGGGAGTTCT GCGAAGCCTA GCTGCCCGTA CTGCTGCTGT
 TCGTCTTCTT ACCCTCAAGA CGCTTCGGAT CGACGGGCAT GACGACGACA

A V G S K D R S L S V W L T C L K ·
 901 GCTGTGCGCA GCAAGGACCG CTCGCTTTCT GTCTGGCTCA CATGTCTGAA
 CGACAGCCGT CGTTCCTGGC GAGCGAAAGA CAGACCGAGT GTACAGACTT

· R P L V V I H E L F D K S I M D I ·
 951 ACGGCCGCTG GTGGTCATCC ATGAACTGTT TGACAAATCC ATCATGGATA
 TGCCGGCGAC CACCAGTAGG TACTTGACAA ACTGTTTAGG TAGTACCTAT

· S W T L N G L G I L V C S M D G
 1001 TTTCCTGGAC TCTGAATGGG CTGGGCATCT TGGTATGCTC TATGGACGGC
 AAAGGACCTG AGACTTACCC GACCCGTAGA ACCATACGAG ATACCTGCCG

S V A F L D F S Q D E L G D P L S ·
 1051 TCTGTGGCAT TCCTCGACTT CTCCAGGAT GAGCTTGGCG ATCCCTGAG
 AGACACCGTA AGGAGCTGAA GAGGGTCTTA CTCGAACCGC TAGGGGACTC

· E E E K S R I H Q S T Y G K S L A ·
 1101 CGAGGAGGAG AAGAGCCGCA TTCACCAGTC CACCTATGGC AAGAGCCTAG
 GCTCCTCCTC TTCTCGGCGT AAGTGGTCAG GTGGATAACG TTCTCGGATC

· I M T E A Q L S T A V I E N P E
 1151 CCATCATGAC CGAGGCCAG CTCTCCACAG CCGTCATTGA GAACCTGAG
 GGTAGTACTG GCTCCGGGTC GAGAGGTGTC GGCAGTAACT CTTGGGACTC

M L K Y Q R R Q Q Q Q Q L D Q K S ·
 1201 ATGCTCAAGT ACCAGCGAAG GCAGCAGCAG CAGCAGCTGG ACCAGAAGAG
 TACGAGTTCA TGGTCGCTTC CGTCGTCGTC GTCGTCGACC TGGTCTTCTC
 BstXI
 ~~~~~~

· A A T R E M G S A T S V A G V V N ·  
 1251 TGCTGCGACC AGGAGATGG GCTCAGCCAC CTCAGTCGCA GGCGTTGTCA  
 ACGACGCTGG TCCCTCTACC CGAGTCGGTG GAGTCAGCGT CCGCAACAGT

· G E S L E D I R K N L L K K Q V  
 1301 ACGGGGAGAG TCTTGAAGAT ATCAGGAAGA ATCTTTTGA GAAACAAGTT  
 TGCCCTCTC AGAACTTCTA TAGTCTTCT TAGAAAATT CTTTGTTCAA

E T R T A D G R R R I T P L C I A ·  
 1351 GAGACTCGGA CAGCAGATGG CCGGAGAAGA ATCACGCCTC TCTGCATAGC  
 CTCTGAGCCT GTCGTCTACC GGCCTTCT TAGTGCGGAG AGACGTATCG

· Q L D T G D F S T A F F N S I P L ·  
 1401 ACAGCTGGAC ACTGGGGACT TCTCCACGGC ATTCTTTAAC AGCATCCCC  
 TGTCGACCTG TGACCCCTGA AGAGGTGCCG TAAGAAATTG TCGTAGGGG

· S G S L A G T M L S S H S S P Q  
 1451 TCTCGGGCTC CCTGGCGGGC ACCATGCTCT CTTCTCATAG CAGTCCACAG  
 AGAGCCCGAG GGACCGCCG TGGTACGAGA GAAGAGTATC GTCAGGTGTC

L L P L D S S T P N S F G A S K P ·  
 1501 CTA CTG GCCAC TGGACTCCAG TACCCCTAAC TCCTTCGGCG CCTCGAAGCC  
 GATGACGGTG ACCTGAGGTC ATGGGGATTG AGGAAGCCGC GGAGCTTCGG

· C T E P V V A A S A R P A G D S V ·  
 1551 TTGCACAGAG CCTGTGGTGG CTGCCAGTGC CAGACCTGCA GGCATTCTG  
 AACGTGTCTC GGACACCACC GACGGTCACG GTCTGGACGT CCGCTAAGAC

· N K D S M N A T S T P A A L S P  
 1601 TCAATAAAGA CAGTATGAAT GCTACCTCTA CTCCTGCTGC ATTGTACCT  
 AGTTATTTCT GTCATACTTA CGATGGAGAT GAGGACGACG TAACAGTGGA

S V L T T P S K I E P M K A F D S ·  
 1651 TCTGTGTTAA CGACCCCGTC CAAGATCGAA CCCATGAAAG CGTTTGACTC  
 AGACACAATT GCTGGGGCAG GTTCTAGCTT GGGTACTTTC GCAAACCTGAG

· R F T E R S K A T P G A P A L T S ·  
 1701 CCGGTTTACA GAGCGGTCCA AAGCCACACC AGGTGCTCCT GCCCTGACCA  
 GGCCAAGTGT CTCGCCAGGT TTCGGTGTGG TCCACGAGGA CGGGACTGGT

· M T P T A V E R L K E Q N L V K  
 1751 GCATGACTCC GACAGCTGTG GAAAGGTTAA AAGAGCAGAA CCTTGTGAAA  
 CTACTGAGG CTGTCGACAC CTTTCCAATT TTCTCGTCTT GGAACACTTT

E L R P R D L L E S S S D S D E K ·  
 1801 GAGCTGAGGC CCCGAGACCT CCTGGAGAGC AGCAGTGACA GCGATGAGAA  
 CTCGACTCCG GGGCTCTGGA GGACCTCTCG TCGTCACTGT CGCTACTCTT

· V P L A K A S S L S K R K L E L E ·  
 1851 AGTCCCTTTG GCTAAGGCTT CCTCACTGTC CAAGCGAAAA CTGAGCTTG  
 TCAGGGAAAC CGATTCCGAA GGAGTGACAG GTTCGCTTTT GAACTCGAAC

· V E T V E K K K K G R P R K D S  
 1901 AGGTAGAGAC AGTAGAGAAG AAGAAGAAAG GGCGCCTCG GAAGGACTCT  
 TCCATCTCTG TCATCTCTTC TTCTTCTTTC CCGCCGGAGC CTTCTGAGA

R L M P V S L S V Q S P A A L T A ·  
 1951 CGTCTCATGC CTGTGTCTCT GTCTGTCCAG TCTCCAGCTG CCCTAACCGC  
 GCAGAGTACG GACACAGAGA CAGACAGGTC AGAGGTCGAC GGGATTGGCG

· E K E A M C L S A P A L A L K L P ·  
 2001 AGAGAAGGAG GCCATGTGTC TGTCTGCACC AGCACTTGCA CTGAAGCTGC  
 TCTTCTCCTC CGGTACACAG ACAGACGTGG TCGTGAACGT GACTTCGACG

· I P S P Q R A F T L Q V S S D P  
 2051 CAATFCCAAG CCCCCAGAGA GCATTCACCC TCCAGGTCAG CTCGATCCT  
 GTTAAGGTTT GGGGGTCTCT CGTAAGTGGG AGGTCCAGTC GAGGCTAGGA

S M Y I E V E N E V T V V G G V K ·  
 2101 TCCATGTACA TTGAGGTGGA GAATGAAGTG ACAGTGGTGG GGGCGTGAA  
 AGGTACATGT AACTCCACCT CTTACTTCAC TGTCACCACC CCCCCTACTT

· L S R L K C N R E G K E W E T V L ·  
 2151 GCTGAGCCGC CTGAAGTGCA ACCGGGAAGG GAAGGAGTGG GAGACGGTAC  
 CGACTCGGCG GACTTCACGT TGGCCCTTCC CTTCTCACC CTCTGCCATG

BamHI  
 ~~~~~~

· T S R I L T A A G S C D V V C V
 2201 TCACCAGCCG GATCCTCACT GCTGCGGGCA GCTGTGACGT GGTGTGTGTC
 AGTGGTCGGC CTAGGAGTGA CGACGCCCGT CGACACTGCA CCACACACAG

A C E K R M L S V F S T C G R R L ·
 2251 GCCTGTGAAA AAAGGATGCT GTCAAGTGTTC TCCACCTGTG GTCGCCGTCT
 CCGACACTTT TTTCCTACGA CAGTCACAAG AGGTGGACAC CAGCGGCAGA

·L S P I L L P S P I S T L H C T G ·
 2301 CCTCTCTCCC ATCCTCCTGC CATCCCCGAT CTCTACTTTG CATTGCACAG
 GGAGAGAGGG TAGGAGGACG GTAGGGGCTA GAGATGAAAC GTAACGTGTG

· S Y V M A L T A A A T L S V W D
 2351 GCTCCTACGT CATGGCGCTC ACCGCTGCAG CCACACTCTC TGTCTGGGAT
 CGAGGATGCA GTACCGCGAG TGGCGACGTC GGTGTGAGAG ACAGACCCTA

V H R Q V V V V K E E S L H S I L ·
 2401 GTTCACAGAC AGGTGGTTGT GGTGAAAGAA GAGTCTCTAC ACTCCATCCT
 CAAGTGTCTG TCCACCAACA CCACTTTCTT CTCAGAGATG TGAGGTAGGA

·A G S D M T V S Q I L L T Q H G I ·
 2451 GGAGGAAGT GATATGACGG TATCACAGAT CTTGCTGACG CAGCATGGAA
 CCGTCTTCA CTATACTGCC ATAGTGTCTA GAACGACTGC GTCGTACCTT

· P V M N L S D G K A Y C F N P S
 2501 TCCCAGTAAT GAACCTGTCC GATGGGAAGG CGTACTGCTT TAATCCGTCA
 AGGGTCATTA CTTGGACAGG CTACCCTTCC GCATGACGAA ATTAGGCAGT

L S T W N L V S D K Q D S L A Q C ·
 2551 CTTTCCACAT GGAACCTGGT TTCTGACAAG CAGGACTCAC TGGCTCAGTG
 GAAAGGTGTA CCTTGGACCA AAGACTGTTC GTCCTGAGTG ACCGAGTCAC

·A D F R S S L P S Q D A M L C S G ·
 2601 TGCAGACTTT AGGAGCAGCC TGCCATCCCA GGACGCCATG CTGTGCTCAG
 ACGTCTGAAA TCCTCGTCGG ACGGTAGGGT CCTGCGGTAC GACACGAGTC

· P L A I I Q G R T S N S G R Q A
 2651 GACCGTTAGC CATAATCCAG GGCCGCACCT CCAACTCGGG AAGGCAGGCT
 CTGGCAATCG GTATTAGGTC CCGGCGTGGA GGTGAGCCC TTCCGTCCGA

A R L F S V P H V V Q Q E T T L A ·
 2701 GCCCGGCTCT TCTCCGTGCC TCATGTGGTG CAGCAAGAGA CCACCCTGGC
 CGGGCCGAGA AGAGGCACGG AGTACACCAC GTCGTTCTCT GGTGGGACCG

·Y L E N Q V A A A L T L Q S S H E ·
 2751 CTACCTAGAG AACCAGGTGG CAGCAGCACT CACCCTGCAG TCCAGCCACG
 GATGGATCTC TTGGTCCACC GTCGTCGTGA GTGGGACGTC AGGTCGGTGC

· Y R H W L L V Y A R Y L V N E G
 2801 AGTACCGCCA TTGGCTCCTC GTCTACGCAC GGTACCTCGT AAACGAAGGG
 TCATGGCGGT AACCGAGGAG CAGATGCGTG CCATGGAGCA TTTGCTTCCC

F E Y R L R E I C K D L L G P V H ·
 2851 TTTGAATACC GACTTCGAGA AATATGCAAG GACTTACTGG GTCCGGTTCA
 AACTTATGG CTGAAGCTCT TTATACGTTT CTGAATGACC CAGGCCAAGT

·Y S T G S Q W E S T V V G L R K R ·
 2901 CTACTCCACT GGAAGCCAGT GGGAGTCAAC AGTAGTGGGT CTGCGGAAGA
 GATGAGGTGA CCTTCGGTCA CCCTCAGTTG TCATCACCCA GACGCCTTCT

· E L L K E L L P V I G Q N L R F
 2951 GGGAGCTGCT GAAGGAGCTG CTACCAGTCA TCGGGCAGAA CCTCCGATTC
 CCCTCGACGA CTTCCCTCGAC GATGGTCAGT AGCCCGTCTT GGAGGCTAAG

Q R L F T E C Q E Q L D I L R D K ·
 3001 CAGCGCCTCT TCACCGAGTG TCAGGAACAG CTCGACATCC TGAGGGACAA
 GTCGCGGAGA AGTGGCTCAC AGTCCTTGTC GAGCTGTAGG ACTCCCTGTT

·*
 3051 GTAG
 CATC

6.2 Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Hira-RNHSG-AAAI V5/His

```

M K L L K P T W V N H N G K P I .
1 ATGAAGC TCCTGAAGCC GACCTGGGTC AACCACAATG GCAAGCCGAT
TACTTCG AGGACTTCGG CTGGACCCAG TTGGTGTAC CGTTCGGCTA

· F S V D I H P D G T K F A T G G Q ·
48 TTTTTCAGTT GATATTCACC CTGACGGGAC CAAGTTCGCA ACTGGAGGAC
AAAAAGTCAA CTATAAGTGG GACTGCCCTG GTTCAAGCGT TGACCTCCTG

· G Q D S G K V V I W N M S P V L
98 AAGGCAGGA TTCTGGGAAG GTTGTGATCT GGAATATGTC TCCAGTCCTC
TTCCCGTCCT AAGACCCTTC CAACACTAGA CCTTATACAG AGGTCAGGAG

Q E D D E K D E N I P K M L C Q M ·
148 CAGGAGGATG ACGAGAAGGA TGAAAATATT CCCAAGATGC TTGCCAGAT
GTCTCCTAC TGCTCTTCTT ACTTTTATAA GGTTTCTACG AAACGGTCTA

· D N H L A C V N C V R W S N S G M ·
198 GGACAATCAC TTAGCATGTG TGAAGTGTGT GCGGTGGTCA AACAGTGGGA
CCTGTTAGTG AATCGTACAC ACTTGACACA CGCCACCAGT TTGTCACCCT

· Y L A S G G D D K L I M V W K R
248 TGTATTTAGC TTCTGGGGGA GATGACAAAC TGATTATGGT GTGGAAGCGG
ACATAAATCG AAGACCCCTT CTAAGTGTGG ACTAATACCA CACCTTCGGC
HindIII
~~~~~
A T Y I G P S T V F G S S G K L A ·
298 GCTACGTACA TCGGCCCCAG CACCGTGTTC GGCTCCAGTG GTAAGCTTGC
CGATGCATGT AGCCGGGGTC GTGGCACAAG CCGAGGTCAC CATTCGAACG

· N V E Q W R C V S I L A A A A I D ·
348 CAATGTGGAG CAGTGGCGGT GTGTCTCTAT CCTCGCGGCA GCCGCTATAG
GTTACACCTC GTCACCGCCA CACAGAGATA GGAGCGCCGT CGGGCATATC

· V M D V A W S P H D A W L A S C
398 ATGTGATGGA TGTAGCATGG TCTCCCCACG ATGCCTGGCT AGCCTCATGC
TACACTACCT ACATCGTACC AGAGGGGTGC TACGGACCGA TCGGAGTACG

S V D N T V V I W N A V K F P E I ·
448 AGCGTGGATA ACACTGTCTG CATCTGGAAT GCTGTAAAGT TCCAGAAAT
TCGACCTAT TGTGACAGCA GTAGACCTTA CGACATTTCA AGGGTCTTTA

· L A T L R G H S G L V K G L T W D ·
498 TCTAGTACT CTGAGAGGTC ATTCTGGCTT GGTCAAAGGG TTGACATGGG
AGATCGATGA GACTCTCCAG TAAGACCGAA CCAGTTTCCC AACTGTACCC

· P V G K Y I A S Q A D D R S L K
548 ACCTGTTGG TAAATACATA GCTTCTCAAG CTGATGACCG CAGCCTAAAG
TGGGACAACC ATTTATGTAT CGAAGAGTTC GACTACTGGC GTCGGATTTT

V W R T L D W Q L E T S I T K P F ·
598 GTGTGGAGGA CGCTGGACTG GCAGTTGGAG ACCAGCATCA CCAAGCCTTT
CACACCTCCT GCGACCTGAC CGTCAACCTC TGGTCGTAGT GGTTTCGGAAA

· D E C G G T T H V L R L S W S P D ·
648 TGATGAGTGT GGAGGAACGA CCCATGTGTT GCGGCTCAGC TGGTCACCTG
ACTACTCACA CCTCCTTGCT GGGTACACAA CGCCGAGTCG ACCAGTGGAC

· G H Y L V S A H A M N N S G P T
698 ATGGGCATTA CCTGGTGTCT GCCCATGCCA TGAACAATC AGGCCCACT
TACCCGTAAT GGACCACAGA CGGGTACGGT ACTTGTTGAG TCCGGGGTGA

A Q I I E R E G W K T N M D F V G ·
748 GCCCAGATCA TCGAACGGGA GGGATGGAAG ACCAACATGG ACTTTGTTGG
CGGGTCTAGT AGCTTGCCCT CCCTACCTTC TGGTGTACC TGAAACAACC

```



```

·H R K A V T V V K F N P K I F K K ·
798 GCACCGGAAA GCTGTGACTG TCGTGAAATT CAACCCAAAA ATCTTCAAAA
   CGTGGCCTTT CGACACTGAC AGCACTTTAA GTTGGGTTTT TAGAAGTTTT

· K Q K N G S S A K P S C P Y C C
848 AGAAGCAGAA GAATGGGAGT TCTGCGAAGC CTAGCTGCCC GTACTGCTGC
   TCTTCGTCTT CTTACCCTCA AGACGCTTCG GATCGACGGG CATGACGACG

C A V G S K D R S L S V W L T C L ·
898 TGTGCTGTCTG GCAGCAAGGA CCGCTCGCTT TCTGTCTGGC TCACATGTCT
   ACACGACAGC CGTCGTTCTT GCGGAGCGAA AGACAGACCG AGTGATACAGA

·K R P L V V I H E L F D K S I M D ·
948 GAAACGGCCG CTGGTGGTCA TCCATGAACT GTTTGACAAA TCCATCATGG
   CTTTGCCGGC GACCACCAGT AGGTACTTGA CAAACTGTTT AGGTAGTACC

· I S W T L N G L G I L V C S M D
998 ATATTTCTCTG GACTCTGAAT GGGCTGGGCA TCTTGGTATG CTCTATGGAC
   TATAAAGGAC CTGAGACTTA CCCGACCCGT AGAACCATAC GAGATACCTG

G S V A F L D F S Q D E L G D P L ·
1048 GGCTCTGTGG CATTCCTCGA CTCTCCCAG GATGAGCTTG GCGATCCCCT
   CCGAGACACC GTAAGGAGCT GAAGAGGGTC CTACTIONAC CGTAGGGGA

·S E E E K S R I H Q S T Y G K S L ·
1098 GAGCGAGGAG GAGAAGAGCC GCATTCACCA GTCCACCTAT GGCAAGAGCC
   CTCGCTCCTC CTCTTCTCGG CGTAAGTGGT CAGGTGGATA CCGTTCTCGG

· A I M T E A Q L S T A V I E N P
1148 TAGCCATCAT GACCGAGGCC CAGCTCTCCA CAGCCGTCAT TGAGAACCCT
   ATCGGTAGTA CTGGCTCCGG GTCGAGAGGT GTCGGCAGTA ACTCTTGGGA

E M L K Y Q R R Q Q Q Q Q L D Q K ·
1198 GAGATGCTCA AGTACCAGCG AAGGCAGCAG CAGCAGCAGC TGGACCAGAA
   CTCTACGAGT TCATGGTCGC TTCCGTCGTC GTCGTCGTCG ACCTGGTCTT

·S A A T R E M G S A T S V A G V V ·
1248 GAGTGCTGCG ACCAGGGAGA TGGGCTCAGC CACCTCAGTC GCAGGCGTTG
   CTCACGACGC TGGTCCCTCT ACCCGAGTCG GTGGAGTCAG CGTCCGCAAC
   EcoRV
   ~~~~~

· N G E S L E D I R K N L L K K Q
1298 TCACCGGGGA GAGTCTTGAA GATATCAGGA AGAATCTTTT GAAGAAACAA
   AGTTGCCCTT CTCAGAACTT CTATAGTCCT TCTTAGAAAA CTCTTTTGT

V E T R T A D G R R R I T P L C I ·
1348 GTTGAAGACTC GGACAGCAGA TGGCCGGAGA AGAATCACGC CTCTCTGCAT
   CAACTCTGAG CCTGTCTGCT ACCGGCCTCT TCTTAGTGCG GAGAGACGTA

·A Q L D T G D F S T A F F N S I P ·
1398 AGCACAGCTG GACACTGGGG ACTTCTCCAC GGCATTCTTT AACAGCATCC
   TCGTGTCTGAC CTGTGACCCC TGAAGAGGTG CCGTAAGAAA TTGTCTGATG

· L S G S L A G T M L S S H S S P
1448 CCCTCTCGGG CTCCCTGGCG GGCACCATGC TCTCTTCTCA TAGCAGTCCA
   GGGAGAGCCC GAGGGACCGC CCGTGGTACG AGAGAAGAGT ATCGTCAGGT

Q L L P L D S S T P N S F G A S K ·
1498 CAGTACTGTC CACTGGACTC CAGTACCCCT AACTCCTTCG GCGCCTCGAA
   GTCGATGACG GTGACCTGAG GTCATGGGGA TTGAGGAAGC CGCGGAGCTT

·P C T E P V V A A S A R P A G D S ·
1548 GCCTTGACACA GAGCCTGTGG TGGCTGCCAG TGCCAGACCT GCAGGCGATT
   CGGAACGTGT CTCGGACACC ACCGACGGTC ACGGTCTGGA CGTCCGCTAA

· V N K D S M N A T S T P A A L S
1598 CTGTCAATAA AGACAGTATG AATGCTACCT CTACTIONCTGC TGCATTGTCA
   GACAGTTATT TCTGTCATAC TTACGATGGA GATGAGGACG ACGTAACAGT

```

P S V L T T P S K I E P M K A F D ·
 1648 CCTTCTGTGT TAACGACCCC GTCCAAGATC GAACCCATGA AAGCGTTTGA
 GGAAGACACA ATTGCTGGGG CAGGTTCTAG CTTGGGTACT TTCGAAACT

·S R F T E R S K A T P G A P A L T ·
 1698 CTCCCGGTTT ACAGAGCGGT CCAAAGCCAC ACCAGGTGCT CCTGCCCTGA
 GAGGCCAAG TGTCTCGCCA GGTTCGGTG TGGTCCACGA GGACGGACT

· S M T P T A V E R L K E Q N L V
 1748 CCAGCATGAC TCCGACAGCT GTGAAAGGT TAAAAGAGCA GAACCTTGTG
 GGTCTACTG AGGCTGTCTCA CACCTTTCCA ATTTTCTCGT CTGGAACAC

K E L R P R D L L E S S S D S D E ·
 1798 AAAGAGCTGA GGCCCCGAGA CCTCCTGGAG AGCAGCAGTG ACAGCGATGA
 TTCTCGACT CCGGGGCTCT GGAGGACCTC TCGTCGTACAC TGTCGCTACT

·K V P L A K A S S L S K R K L E L ·
 1848 GAAAGTCCCT TTGGCTAAGG CTTCCTCACT GTCCAAGCGA AACTTTGAGC
 CTTTCAGGGA AACCGATTCC GAAGGAGTGA CAGGTTCTGCT TTTGAACTCG

· E V E T V E K K K K G R P R K D
 1898 TTGAGGTAGA GACAGTAGAG AAGAAGAAGA AAGGGCGGCC TCGGAAGGAC
 AACTCCATCT CTGTCATCTC TTCTTCTTCT TTCCCGCCGG AGCCTTCTG

S R L M P V S L S V Q S P A A L T ·
 1948 TCTCGTCTCA TGCCTGTGTC TCTGTCTGTC CAGTCTCCAG CTGCCCTAAC
 AGAGCAGAGT ACGGACACAG AGACAGACAG GTCAGAGGTC GACGGGATTG

·A E K E A M C L S A P A L A L K L ·
 1998 CGCAGAGAAG GAGGCCATGT GTCTGTCTGC ACCAGCACTT GCACTGAAGC
 GCGTCTCTTC CTCCGGTACA CAGACAGACG TGGTCGTGAA CGTGACTTCG

· P I P S P Q R A F T L Q V S S D
 2048 TGCCAATTCC AAGCCCCCAG AGAGCATTCA CCTCCAGGT CAGCTCCGAT
 ACGGTTAAGG TTCGGGGGTC TCTCGTAAGT GGGAGGTCCA GTCGAGGCTA

P S M Y I E V E N E V T V V G G V ·
 2098 CCTTCCATGT ACATTGAGGT GGAGAATGAA GTGACAGTGG TGGGGGGCGT
 GGAAGGTACA TGTAACCTCA CCTCTTACTT CACTGTCACC ACCCCCCGCA

·K L S R L K C N R E G K E W E T V ·
 2148 GAAGCTGAGC CGCCTGAAGT GCAACCGGGA AGGGAAGGAG TGGGAGACGG
 CTTGACTCG GCGACTTCA CGTTGGCCCT TCCCTTCTC ACCCTCTGCC
 BamHI
 ~~~~~~

· L T S R I L T A A G S C D V V C  
 2198 TACTCACCAG CCGATCCTC ACTGCTGCGG GCAGCTGTGA CGTGGTGTGT  
 ATGAGTGGTC GGCCTAGGAG TGACGACGCC CGTCGACACT GCACCACACA

V A C E K R M L S V F S T C G R R ·  
 2248 GTCGCCTGTG AAAAAAGGAT GCTGTCAAGT TTCTCCACCT GTGGTCCGG  
 CAGCGGACAC TTTTTCCTA CGACAGTCAC AAGAGGTGGA CACCAGCGGC

·L L S P I L L P S P I S T L H C T ·  
 2298 TCTCCTCTCT CCCATCCTCC TGCCATCCCC GATCTCTACT TTGCATTGCA  
 AGAGGAGAGA GGTAGGAGG ACGGTAGGGG CTAGAGATGA AACGTAACGT

· G S Y V M A L T A A A T L S V W  
 2348 CAGGCTCCTA CGTCATGGCG CTCACCGCTG CAGCCACACT CTCTGTCTGG  
 GTCCGAGGAT GCAGTACCGC GAGTGGCGAC GTCGGTGTGA GAGACAGACC

D V H R Q V V V V K E E S L H S I ·  
 2398 GATGTTTACA GACAGGTGGT TGTGGTGAAA GAAGAGTCTC TACTACTCCAT  
 CTACAAGTGT CTGTCCACCA ACACCACTTT CTCTCAGAG ATGTGAGGTA

·L A G S D M T V S Q I L L T Q H G ·  
 2448 CCTGGCAGGA AGTGATATGA CGGTATCACA GATCTTGCTG ACGCAGCATG  
 GGACCGTCTC TCACTATACT GCCATAGTGT CTAGAACGAC TGCGTCTGAC

```

      · I P V M N L S D G K A Y C F N P
2498 GAATCCAGT AATGAACCTG TCCGATGGGA AGGCGTACTG CTTTAATCCG
      CTTAGGGTCA TTACTTGGAC AGGCTACCCT TCCGCATGAC GAAATTAGGC

      S L S T W N L V S D K Q D S L A Q ·
2548 TCACTTTCCA CATGGAACCT GGTTCCTGAC AAGCAGGACT CACTGGCTCA
      AGTGAAAGGT GTACCTTGGG CCAAAGACTG TTCGTCCTGA GTGACCGAGT

      · C A D F R S S L P S Q D A M L C S ·
2598 GTGTGCAGAC TTTAGGAGCA GCCTGCCATC CCAGGACGCC ATGCTGTGCT
      CACACGTCTG AAATCCTCGT CGGACGGTAG GGTCTGCGG TACGACACGA

      · G P L A I I Q G R T S N S G R Q
2648 CAGGACCGTT AGCCATAATC CAGGGCCGCA CCTCCAACCTC GGAAGGCAG
      GTCTGGCAA TCGGTATTAG GTCCCGCGT GGAGTTGAG CCCTTCCGTC

      A A R L F S V P H V V Q Q E T T L ·
2698 GCTGCCCGGC TCTTCTCCGT GCCTCATGTG GTGCAGCAAG AGACCACCCT
      CGACGGGCCG AGAAGAGGCA CGGAGTACAC CACGTCGTTC TCTGGTGGGA

      · A Y L E N Q V A A A L T L Q S S H ·
2748 GGCTACCTA GAGAACCAGG TGGCAGCAGC ACTCACCTTG CAGTCCAGCC
      CCGGATGGAT CTCTTGGTCC ACCGTCGTCG TGAGTGGGAC GTCAGGTCGG

      · E Y R H W L L V Y A R Y L V N E
2798 ACGAGTACCG CCATTGGCTC CTCGTCTACG CACGGTACCT CGTAAACGAA
      TGCTCATGGC GGTAACCGAG GAGCAGATGC GTGCCATGGA GCATTTGCTT

      G F E Y R L R E I C K D L L G P V ·
2848 GGGTTTGAAT ACCGACTTCG AGAAATATGC AAGGACTTAC TGGGTCCGGT
      CCCAAACTTA TGGCTGAAGC TCTTTATACG TTCCTGAATG ACCCAGGCCA

      · H Y S T G S Q W E S T V V G L R K ·
2898 TCACTACTCC ACTGGAAGCC AGTGGGAGTC AACAGTAGTG GGCTGCGGA
      AGTGATGAGG TGACCTTCGG TCACCCTCAG TTGTCATCAC CCAGACGCCT

      · R E L L K E L L P V I G Q N L R
2948 AGAGGGAGCT GCTGAAGGAG CTGCTACCAG TCATCGGGCA GAACCTCCGA
      TCTCCCTCGA CGACTTCCTC GACGATGGTC AGTAGCCCGT CTTGGAGGCT

      F Q R L F T E C Q E Q L D I L R D ·
2998 TTCCAGCGCC TCTTCACCGA GTGTCAGGAA CAGCTCGACA TCCTGAGGGA
      AAGGTCGCGG AGAAGTGGCT CACAGTCCTT GTCGAGCTGT AGGACTCCCT
      XhoI
      ~~~~~~
 EcoRV
      ~~~~~~
      XbaI
      ~~~

 · K K G N S A D I Q H S G G R S S L ·
3048 CAAGAAGGGC AATTCCTGAG ATATCCAGCA CAGTGGCGGC CGCTCGAGTC
 GTTCTTCCCG TTAAGACGTC TATAGGTCGT GTCACCGCCG GCGAGCTCAG
 XbaI
      ~~~~~

      · E G P R F E G K P I P N P L L G
3098 TAGAGGGCCC GCGGTTGAA GGTAAGCCTA TCCTAACCC TCTCCTCGGT
      ATCTCCCGGG CGCCAAGCTT CCATTCCGAT AGGGATTGGG AGAGGAGCCA

      L D S T R T G H H H H H H *
3148 CTCGATTCTA CGCGTACCGG TCATCATCAC CATCACCATT GA
      GAGCTAAGAT GCGCATGGCC AGTAGTAGTG GTAGTGGTAA CT

```

### 6.3 Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Hira-RGHSG-AAAAI V5/His

```

M K L L K P T W V N H N G K P I .
1 ATGAAGC TCCTGAAGCC GACCTGGGTC AACCACAATG GCAAGCCGAT
  TACTTCG AGGACTTCGG CTGGACCCAG TTGGTGTAC CGTTCCGCTA

· F S V D I H P D G T K F A T G G Q ·
48 TTTTTCAGTT GATATTCACC CTGACGGGAC CAAGTTCGCA ACTGGAGGAC
  AAAAAAGTCAA CTATAAGTGG GACTGCCCTG GTTCAAGCGT TGACCTCCTG

· G Q D S G K V V I W N M S P V L
98 AAGGGCAGGA TTCTGGGAAG GTTGTGATCT GGAATATGTC TCCAGTCCTC
  TTCCCGTCCT AAGACCCTTC CAACACTAGA CCTTATACAG AGGTCAGGAG

Q E D D E K D E N I P K M L C Q M ·
148 CAGGAGGATG ACGAGAAGGA TGAAAATATT CCCAAGATGC TTTGCCAGAT
  GTCTCCTAC TGCTCTTCTT ACTTTTATAA GGGTTCTACG AAACGGTCTA

· D N H L A C V N C V R W S N S G M ·
198 GGACAATCAC TTAGCATGTG TGAAGTGTGT GCGGTGGTCA AACAGTGGGA
  CCTGTTAGTG AATCGTACAC ACTTGACACA CGCCACCAGT TTGTCACCCT

· Y L A S G G D D K L I M V W K R
248 TGTATTTAGC TTCTGGGGGA GATGACAAAC TGATTATGGT GTGGAAGCGG
  ACATAAATCG AAGACCCCTT CTTACTGTTTG ACTAATACCA CACCTTCGGC

                                                                 HindIII
                                                                 ~~~~~
A T Y I G P S T V F G S S G K L A ·
298 GCTACGTACA TCGGCCCCAG CACCGTGTTT GGCTCCAGTG GTAAGCTTGC
 CGATGCATGT AGCCGGGGTC GTGGCACAAG CCGAGGTCAC CATTCGAACG

· N V E Q W R C V S I L R N H S G D ·
348 CAATGTGGAG CAGTGGCGGT GTGTCTCTAT CCTCCGGAAT CATTCAGGCG
 GTTACACCTC GTCACCGCCA CACAGAGATA GGAGGCCTTA GTAAGTCCGC

· V M D V A W S P H D A W L A S C
398 ATGTGATGGA TGTAGCATGG TCTCCCCACG ATGCCTGGCT AGCCTCATGC
 TACACTACCT ACATCGTACC AGAGGGGTGC TACGGACCGA TCGGAGTACG

S V D N T V V I W N A V K F P E I ·
448 AGCGTGGATA ACACTGTCGT CATCTGGAAT GCTGTAAAGT TCCCAGAAAT
 TCGCACCTAT TGTGACAGCA GTAGACCTTA CGACATTTCA AGGGTCTTTA

· L A T L A A A A I L V K G L T W D ·
498 TCTAGCTACT CTGGCGGCAG CCGCTATATT GGTCAAAGGG TTGACATGGG
 AGATCGATGA GACCGCCGTC GCGGATATAA CCAGTTTCCC AACTGTACCC

· P V G K Y I A S Q A D D R S L K
548 ACCCTGTTGG TAAATACATA GCTTCTCAAG CTGATGACCG CAGCCTAAAG
 TGGGACAACC ATTTATGTAT CGAAGAGTTC GACTACTGGC GTCGGATTTC
V W R T L D W Q L E T S I T K P F ·
598 GTGTGGAGGA CGCTGGACTG GCAGTTGGAG ACCAGCATCA CCAAGCCTTT
 CACACCTCCT GCGACCTGAC CGTCAACCTC TGGTCGTAGT GGTTCGGAAA

· D E C G G T T H V L R L S W S P D ·
648 TGATGAGTGT GGAGGAACGA CCCATGTGTT GCGGCTCAGC TGGTACACTG
 ACTACTCACA CCTCCTTGCT GGGTACACAA CGCCGAGTCG ACCAGTGGAC

· G H Y L V S A H A M N N S G P T
698 ATGGGCATTA CCTGGTGTCT GCCCATGCCA TGAACAACCTC AGGCCCCACT
 TACCCGTAAT GGACCACAGA CGGGTACGGT ACTTGTTGAG TCCGGGGTGA

```

A Q I I E R E G W K T N M D F V G ·  
 748 GCCCAGATCA TCGAACGGGA GGGATGGAAG ACCAACATGG ACTTTGTTGG  
 CGGGTCTAGT AGCTTGCCCT CCCTACCTTC TGGTTGTACC TGAAACAACC

·H R K A V T V V K F N P K I F K K ·  
 798 GCACCGGAAA GCTGTGACTG TCGTGAAATT CAACCCAAAA ATCTTCAAAA  
 CGTGGCCTTT CGACACTGAC AGCACTTTAA GTTGGGTTTT TAGAAGTTTT

· K Q K N G S S A K P S C P Y C C ·  
 848 AGAAGCAGAA GAATGGGAGT TCTGCGAAGC CTAGCTGCCC GTACTGCTGC  
 TCTTCGTCTT CTTACCCTCA AGACGCTTCG GATCGACGGG CATGACGACG

C A V G S K D R S L S V W L T C L ·  
 898 TGTGCTGTCTG GCAGCAAGGA CCGCTCGCTT TCTGTCTGGC TCACATGTCT  
 ACACGACAGC CGTCGTTCTT GCGGAGCGAA AGACAGACCG AGTGTACAGA

·K R P L V V I H E L F D K S I M D ·  
 948 GAAACGGCCG CTGGTGGTCA TCCATGAACT GTTTGACAAA TCCATCATGG  
 CTTTGCCGGC GACCACCAGT AGGTACTTGA CAAACTGTTT AGGTAGTACC

· I S W T L N G L G I L V C S M D ·  
 998 ATATTTCTCTG GACTCTGAAT GGGCTGGGCA TCTTGGTATG CTCTATGGAC  
 TATAAAGGAC CTGAGACTTA CCCGACCCGT AGAACCATAC GAGATACCTG

G S V A F L D F S Q D E L G D P L ·  
 1048 GGCTCTGTGG CATTCCTCGA CTTCTCCAG GATGAGCTTG GCGATCCCCT  
 CCGAGACACC GTAAGGAGCT GAAGAGGGTC CTAAGTGAAC CGTAGGGGA

·S E E E K S R I H Q S T Y G K S L ·  
 1098 GAGCGAGGAG GAGAAGAGCC GCATTACCA GTCCACCTAT GGCAAGAGCC  
 CTCGCTCCTC CTCTTCTCGG CGTAAGTGGT CAGGTGGATA CCGTTCTCGG

· A I M T E A Q L S T A V I E N P ·  
 1148 TAGCCATCAT GACCGAGGCC CAGCTCTCCA CAGCCGTCAT TGAGAACCCT  
 ATCGGTAGTA CTGGCTCCGG GTCGAGAGGT GTCGGCAGTA ACTCTTGGGA

E M L K Y Q R R Q Q Q Q Q L D Q K ·  
 1198 GAGATGCTCA AGTACCAGCG AAGGCAGCAG CAGCAGCAGC TGGACCAGAA  
 CTCTACGAGT TCATGGTTCG TTCCGTCGTC GTCGTCGTCG ACCTGGTCTT

·S A A T R E M G S A T S V A G V V ·  
 1248 GAGTGCTGCG ACCAGGGAGA TGGGCTCAGC CACCTCAGTC GCAGGCGTTG  
 CTCACGACGC TGGTCCCTCT ACCCGAGTCG GTGGAGTCAG CGTCCGCAAC  
 EcoRV  
 ~~~~~~

· N G E S L E D I R K N L L K K Q ·  
 1298 TCAACGGGGA GAGTCTTGAA GATATCAGGA AGAATCTTTT GAAGAAACAA  
 AGTTGCCCTC CTCAGAACTT CTATAGTCCT TCTTAGAAAA CTCTTTTGTT

V E T R T A D G R R R I T P L C I ·  
 1348 GTTGAGACTC GGACAGCAGA TGGCCGGAGA AGAATCACGC CTCTCTGCAT  
 CAACTCTGAG CCTGTCTGCT ACCGGCCTCT TCTTAGTGCG GAGAGACGTA

·A Q L D T G D F S T A F F N S I P ·  
 1398 AGCACAGCTG GACACTGGGG ACTTCTCCAC GGCAATCTTT AACAGCATCC  
 TCGTGTGAC CTGTGACCCC TGAAGAGGTG CCGTAAGAAA TTGTCTGTTG

· L S G S L A G T M L S S H S S P ·  
 1448 CCCTCTCGGG CTCCCTGGCG GGCACCATGC TCTCTTCTCA TAGCAGTCCA  
 GGGAGAGCCC GAGGGACCGC CCGTGGTACG AGAGAAGAGT ATCGTCAGGT

Q L L P L D S S T P N S F G A S K ·  
 1498 CAGTACTGC CACTGGACTC CAGTACCCCT AACTCCTTCG GCGCCTCGAA  
 GTCGATGACG GTGACCTGAG GTCATGGGGA TTGAGGAAGC CGCGGAGCTT

·P C T E P V V A A S A R P A G D S ·  
 1548 GCCTTGACA GAGCCTGTGG TGGCTGCCAG TGCCAGACCT GCAGGCGATT  
 CGGAACGTGT CTCGGACACC ACCGACGGTC ACGGTCTGGA CGTCCGCTAA

· V N K D S M N A T S T P A A L S  
 1598 CTGTCAATAA AGACAGTATG AATGCTACCT CTA CTCTCCTGC TGCATTGTCA  
 GACAGTTATT TCTGTCATAC TTACGATGGA GATGAGGACG ACGTAACAGT

P S V L T T P S K I E P M K A F D ·  
 1648 CCTTCTGTGT TAACGACCCC GTCCAAGATC GAACCCATGA AAGCGTTTGA  
 GGAAGACACA ATTGCTGGGG CAGGTTCTAG CTTGGGTACT TTCGCAAAT

· S R F T E R S K A T P G A P A L T ·  
 1698 CTCCCGGTTT ACAGAGCGGT CCAAAGCCAC ACCAGGTGCT CCTGCCCTGA  
 GAGGGCCAAG TGTCTCGCCA GGTTCGGTG TGGTCCACGA GGACGGGACT

· S M T P T A V E R L K E Q N L V  
 1748 CCAGCATGAC TCCGACAGCT GTGGAAAGGT TAAAAGAGCA GAACCTTGTG  
 GGTCGTA CTG AGGCTGTCTGA CACCTTTCCA ATTTTCTCGT CTGGAAAC

K E L R P R D L L E S S S D S D E ·  
 1798 AAAGAGCTGA GGCCCCGAGA CCTCCTGGAG AGCAGCAGTG ACAGCGATGA  
 TTCTCGACT CCGGGGCTCT GGAGGACCTC TCGTCGTAC TGTCTGACT

· K V P L A K A S S L S K R K L E L ·  
 1848 GAAAGTCCCT TTGGCTAAGG CTTCCTCACT GTCCAAGCGA AAACCTTGAGC  
 CTTTCAGGGA AACCGATTCC GAAGGAGTGA CAGGTTCTGCT TTTGAACTCG

· E V E T V E K K K K G R P R K D  
 1898 TTGAGGTAGA GACAGTAGAG AAGAAGAAGA AAGGGCGGCC TCGGAAGGAC  
 AACTCCATCT CTGTCATCTC TTCTTCTTCT TTCCCGCCGG AGCCTTCTCT

S R L M P V S L S V Q S P A A L T ·  
 1948 TCTCGTCTCA TGCCTGTGTC TCTGTCTGTC CAGTCTCCAG CTGCCCTAAC  
 AGAGCAGAGT ACGGACACAG AGACAGACAG GTCAGAGGTC GACGGGATTG

· A E K E A M C L S A P A L A L K L ·  
 1998 CGCAGAGAAG GAGGCCATGT GTCTGTCTGC ACCAGCACTT GCACTGAAGC  
 GCGTCTCTTC CTCCGGTACA CAGACAGACG TGGTCGTGAA CGTGACTTCG

· P I P S P Q R A F T L Q V S S D  
 2048 TGCCAATTCC AAGCCCCCAG AGAGCATTCA CCCTCCAGGT CAGCTCCGAT  
 ACGGTTAAGG TTCGGGGGTC TCTCGTAAGT GGGAGGTCCA GTCGAGGCTA

P S M Y I E V E N E V T V V G G V ·  
 2098 CCTTCCATGT ACATTGAGGT GGAGAATGAA GTGACAGTGG TGGGGGGCGT  
 GGAAGGTACA TGTAACCTCA CCTCTTACTT CACTGTCACC ACCCCCCGCA

· K L S R L K C N R E G K E W E T V ·  
 2148 GAAGCTGAGC CGCCTGAAGT GCAACCGGGA AGGGAAGGAG TGGGAGACGG  
 CTTCGACTCG GCGGACTTCA CGTTGGCCCT TCCCTTCTC ACCCTCTGCC  
 BamHI  
 ~~~~~~

· L T S R I L T A A G S C D V V C  
 2198 TACTCACCAG CCGATCCTC ACTGCTGCGG GCAGCTGTGA CGTGGTGTGT  
 ATGAGTGGTC GGCCTAGGAG TGACGACGCC CGTCGACACT GCACCACACA

V A C E K R M L S V F S T C G R R ·  
 2248 GTCGCCTGTG AAAAAAGGAT GCTGTCAGTG TTCTCCACCT GTGGTCCGGC  
 CAGCGGACAC TTTTTCCTA CGACAGTCAC AAGAGGTGGA CACCAGCGGC

· L L S P I L L P S P I S T L H C T ·  
 2298 TCTCCTCTCT CCCATCCTCC TGCCATCCCC GATCTCTACT TTGCATTGCA  
 AGAGGAGAGA GGGTAGGAGG ACGGTAGGGG CTAGAGATGA AACGTAACGT

· G S Y V M A L T A A A T L S V W  
 2348 CAGGCTCCTA CGTCATGGCG CTCACCGCTG CAGCCACACT CTCTGTCTGG  
 GTCCGAGGAT GCAGTACCGC GAGTGGCGAC GTCGGTGTGA GAGACAGACC

D V H R Q V V V V K E E S L H S I ·  
 2398 GATGTTTACA GACAGGTGGT TGTGGTGAAA GAAGAGTCTC TACTCTCCAT  
 CTACAAGTGT CTGTCCACCA ACACCACTTT CTCTCAGAG ATGTGAGGTA

```

·L A G S D M T V S Q I L L T Q H G ·
2448 CCTGGCAGGA AGTGATATGA CGGTATCACA GATCTTGCTG ACGCAGCATG
GGACCGTCCT TCACTATACT GCCATAGTGT CTAGAACGAC TGCCTCGTAC

· I P V M N L S D G K A Y C F N P
2498 GAATCCAGT AATGAACCTG TCCGATGGGA AGGCGTACTG CTTTAATCCG
CTTAGGGTCA TTAAGGAC AGGCTACCCT TCCGCATGAC GAAATTAGGC

S L S T W N L V S D K Q D S L A Q ·
2548 TCACTTTCCA CATGGAACCT GGTTCCTGAC AAGCAGGACT CACTGGCTCA
AGTGAAAGGT GTACCTTGGA CCAAAGACTG TTCGTCCTGA GTGACCGAGT

·C A D F R S S L P S Q D A M L C S ·
2598 GTGTGCAGAC TTTAGGAGCA GCCTGCCATC CCAGGACGCC ATGCTGTGCT
CACACGTCTG AAATCCTCGT CGGACGGTAG GGTCTGCGG TACGACACGA

· G P L A I I Q G R T S N S G R Q
2648 CAGGACCGTT AGCCATAATC CAGGGCCGCA CCTCCAATC GGAAGGCAG
GTCTGGCAA TCGTATTAG GTCCCGCGT GGAGTTGAG CCCTTCCGT

A A R L F S V P H V V Q Q E T T L ·
2698 GCTGCCCGG TCTTCTCCGT GCCTCATGTG GTGCAGCAAG AGACCACCCT
CGACGGCCG AGAAGAGGCA CGGAGTACAC CACGTCGTTT TCTGGTGGGA

·A Y L E N Q V A A A L T L Q S S H ·
2748 GGCTACCTA GAGAACCAGG TGGCAGCAGC ACTCACCTG CAGTCCAGCC
CCGATGGAT CTCTTGGTCC ACCGTCGTCG TGAGTGGGAC GTCAGGTCGG

· E Y R H W L L V Y A R Y L V N E
2798 ACGAGTACCG CCATTGGCTC CTCGTCTACG CACGGTACCT CGTAAACGAA
TGCTCATGGC GGTAACCGAG GAGCAGATGC GTGCCATGGA GCATTTGCTT

G F E Y R L R E I C K D L L G P V ·
2848 GGGTTTGAAT ACCGACTTCG AGAAATATGC AAGGACTTAC TGGGTCCGGT
CCAAACTTA TGGCTGAAGC TCTTTATACG TTCCTGAATG ACCAGGCCA

·H Y S T G S Q W E S T V V G L R K ·
2898 TCACTACTCC ACTGGAAGCC AGTGGGAGTC AACAGTAGTG GGTCTGCGGA
AGTGATGAGG TGACCTTCGG TCACCCTCAG TTGTCATCAC CCAGACGCCT

· R E L L K E L L P V I G Q N L R
2948 AGAGGGAGCT GCTGAAGGAG CTGCTACCAG TCATCGGGCA GAACCTCCGA
TCTCCCTCGA CGACTTCCTC GACGATGGTC AGTAGCCCGT CTTGGAGGCT

F Q R L F T E C Q E Q L D I L R D ·
2998 TTCCAGCGCC TCTTACCGA GTGTCAGGAA CAGCTCGACA TCCTGAGGGA
AAGTGCGGG AGAAGTGGCT CACAGTCCTT GTCGAGCTGT AGGACTCCCT
XhoI
~~~~~
EcoRV XbaI
~~~~~
·K K G N S A D I Q H S G G R S S L ·
3048 CAAGAAGGGC AATTCTGCAG ATATCCAGCA CAGTGGCGGC CGCTCGAGTC
GTTCTTCCCG TTAAGACGTC TATAGGTCGT GTCACCGCCG GCGAGCTCAG
XbaI
~~~~~

· E G P R F E G K P I P N P L L G
3098 TAGAGGGCCC GCGTTCGAA GGTAAGCCTA TCCTAACCC TCTCCTCGGT
ATCTCCCGGG CGCCAAGCTT CCATTCCGAT AGGGATTGGG AGAGGAGCCA

L D S T R T G H H H H H H *
3148 CTCGATTCTA CGCGTACCGG TCATCATCAC CATCACCATT GA
GAGCTAAGAT GCGCATGGCC AGTAGTAGTG GTAGTGGTAA CT

```

## 6.4 Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Hira $\Delta$ WD V5/His

```

M F S Q D E .
1 ATGTTCT CCCAGGATGA
  TACAAGA GGGTCCTACT

·L G D P L S E E E K S R I H Q S T ·
18 GCTTGGCGAT CCCCTGAGCG AGGAGGAGAA GAGCCGCATT CACCAGTCCA
   CGAACCGCTA GGGGACTCGC TCCTCCTCTT CTCGGCGTAA GTGGTCAGGT

· Y G K S L A I M T E A Q L S T A
68 CCTATGGCAA GAGCCTAGCC ATCATGACCG AGGCCAGCT CTCCACAGCC
   GGATACCGTT CTCGGATCGG TAGTACTGGC TCCGGGTCGA GAGGTGTCCG

V I E N P E M L K Y Q R R Q Q Q Q ·
118 GTCAATGAGA ACCCTGAGAT GCTCAAGTAC CAGCGAAGGC AGCAGCAGCA
   CAGTAACTCT TGGGACTCTA CGAGTTCATG GTCGCTTCCG TCGTCGTCGT

·Q L D Q K S A A T R E M G S A T S ·
168 GCAGCTGGAC CAGAAGAGTG CTGCGACCAG GGAGATGGGC TCAGCCACCT
   CGTCGACCTG GTCTTCTCAC GACGCTGGTC CCTCTACCCG AGTCGGTGGG
                                     EcoRV
                                     ~~~~~~

· V A G V V N G E S L E D I R K N
218 CAGTCGCAGG CGTTGTCAAC GGGGAGAGTC TTGAAGATAT CAGGAAGAAT
 GTCAGCGTCC GCAACAGTTG CCCTCTCAG AACTTCTATA GTCCTTCTTA

L L K K Q V E T R T A D G R R R I ·
268 CTTTGAAGA AACAAAGTTGA GACTCGGACA GCAGATGGCC GGAGAAGAAT
 GAAAACCTTCT TTGTTCAACT CTGAGCCTGT CGTCTACCGG CCTCTTCTTA

·T P L C I A Q L D T G D F S T A F ·
318 CACGCTCTC TGCATAGCAC AGCTGGACAC TGGGGACTTC TCCACGGCAT
 GTGCGGAGAG ACGTATCGTG TCGACCTGTG ACCCCTGAAG AGGTGCCGTA

· F N S I P L S G S L A G T M L S
368 TCTTTAACAG CATCCCCCTC TCGGGCTCCC TGGCGGGCAC CATGCTCTCT
 AGAAATTGTC GTAGGGGGAG AGCCCGAGGG ACCGCCGTG GTACGAGAGA

S H S S P Q L L P L D S S T P N S ·
418 TTCATAGCA GTCCACAGCT ACTGCCACTG GACTCCAGTA CCCCTAACTC
 AGAGTATCGT CAGGTGTGCA TGACGGTGAC CTGAGGTCAT GGGGATTGAG

·F G A S K P C T E P V V A A S A R ·
468 CTTGGGCGCC TCGAAGCCTT GCACAGAGCC TGTGGTGGCT GCCAGTGCCA
 GAAGCCGCGG AGCTTCGGAA CGTGTCTCGG ACACCACCGA CGGTACCGGT

· P A G D S V N K D S M N A T S T
518 GACCTGCAGG CGATTCTGTC AATAAAGACA GTATGAATGC TACCTCTACT
 CTGGACGTCC GCTAAGACAG TTATTTCTGT CATACTTACG ATGGAGATGA

P A A L S P S V L T T P S K I E P ·
568 CCTGCTGCAT TGTCACCTTC TGTGTTAACG ACCCCGTCCA AGATCGAACC
 GGACGACGTA ACAGTGAAG ACACAATTGC TGGGGCAGGT TCTAGCTTGG

·M K A F D S R F T E R S K A T P G ·
618 CATGAAAGCG TTTGACTCCC GGTTCACAGA GCGGTCCAAA GCCACACCAG
 GTACTTTCGC AACTGAGGG CCAAGTGTCT CGCCAGGTTT CGGTGTGGTC

· A P A L T S M T P T A V E R L K
668 GTGCTCCTGC CCTGACCAGC ATGACTCCGA CAGCTGTGGA AAGGTTAAAA
 CACGAGGACG GGAAGTGTG TACTGAGGCT GTCGACACCT TTCCAATTTT

E Q N L V K E L R P R D L L E S S ·
718 GAGCAGAACC TTGTGAAAGA GCTGAGGCC CGAGACCTCC TGAGAGCAG
 CTCGTCTTGG AACACTTTCT CACTCCGGG GCTCTGGAGG ACCTCTCGTC

```



```

·S D S D E K V P L A K A S S L S K ·
768 CAGTGACAGC GATGAGAAAG TCCCTTTGGC TAAGGCTTCC TCACTGTCCA
 GTCACTGTCTG CTACTCTTTC AGGGAAACCG ATTCCGAAGG AGTGACAGGT

· R K L E L E V E T V E K K K K G
818 AGCGAAACT TGAGCTTGAG GTAGAGACAG TAGAGAAGAA GAAGAAAGGG
 TCGCTTTTGA ACTCGAACTC CATCTCTGTC ATCTCTTCTT CTCTTTTCCC

R P R K D S R L M P V S L S V Q S ·
868 CGGCCTCGGA AGGACTCTCG TCTCATGCCT GTGTCTCTGT CTGTCCAGTC
 GCCGGAGCCT TCCTGAGAGC AGAGTACGGA CACAGAGACA GACAGGTACG

·P A A L T A E K E A M C L S A P A ·
918 TCCAGCTGCC CTAACCGCAG AGAAGGAGGC CATGTGTCTG TCTGCACCAG
 AGGTCGACGG GATTGGCGTC TCTTCTCCG GTACACAGAC AGACGTGGTC

· L A L K L P I P S P Q R A F T L
968 CACTTGCACT GAAGCTGCCA ATTCCAAGCC CCCAGAGAGC ATTCACCCTC
 GTGAACGTGA CTTCGACGGT TAAGGTTCCG GGGTCTCTCG TAAGTGGGAG

Q V S S D P S M Y I E V E N E V T ·
1018 CAGGTCAGCT CCGATCCTTC CATGTACATT GAGGTGGAGA ATGAAGTGAC
 GTCCAGTCGA GGCTAGGAAG GTACATGTAA CTCCACCTCT TACTTCACTG

·V V G G V K L S R L K C N R E G K ·
1068 AGTGGTGGGG GGCGTGAAGC TGAGCCGCCT GAAGTGCAAC CGGGAAGGGA
 TCACCACCCC CCGCACTTCG ACTCGGCGGA CTTACAGTTG GCCCTTCCCT
 BamHI
    ~~~~~~

· E W E T V L T S R I L T A A G S
1118 AGGAGTGGGA GACGGTACTC ACCAGCCGGA TCCTCACTGC TCGGGGCAGC
    TCCTCACCTC CTGCCATGAG TGGTCGGCCT AGGAGTGACG ACGCCCCTCG

C D V V C V A C E K R M L S V F S ·
1168 TGTGACGTGG TGTGTGTGCG CTGTGAAAAA AGGATGCTGT CAGTGTCTC
    ACACTGCACC ACACACAGCG GACACTTTTT TCCTACGACA GTCACAAGAG

·T C G R R L L S P I L L P S P I S ·
1218 CACCTGTGGT CGCCGTCTCC TCTCTCCAT CCTCCTGCCA TCCCCGATCT
    GTGGACACCA GCGCAGAGG AGAGAGGGTA GGAGGACGGT AGGGGCTAGA

· T L H C T G S Y V M A L T A A A
1268 CTACTTTGCA TTGCACAGGC TCCTACGTCA TGGCGCTCAC CGCTGCAGCC
    GATGAAACGT AACGTGTCCG AGGATGCAGT ACCGCGAGTG GCGACGTCCG

T L S V W D V H R Q V V V V K E E ·
1318 ACACTCTCTG TCTGGGATGT TCACAGACAG GTGGTTGTGG TGAAAGAAGA
    TGTGAGAGAC AGACCCTACA AGTGTCTGTC CACCAACACC ACTTTCTTCT

·S L H S I L A G S D M T V S Q I L ·
1368 GTCTCTACAC TCCATCCTGG CAGGAAGTGA TATGACGGTA TCACAGATCT
    CAGAGATGTG AGGTAGGACC GTCCTTCACT ATACTGCCAT AGTGTCTAGA

· L T Q H G I P V M N L S D G K A
1418 TGCTGACGCA GCATGGAATC CCAGTAATGA ACCTGTCCGA TGGGAAGGCG
    ACGACTGCGT CGTACCTTAG GGTCACTACT TGGACAGGCT ACCCTTCCGC

Y C F N P S L S T W N L V S D K Q ·
1468 TACTGCTTTA ATCCGTCCTT TTCCACATGG AACCTGGTTT CTGACAAGCA
    ATGACGAAAT TAGGCAGTGA AAGGTGTACC TTGGACCAA GACTGTTCGT

·D S L A Q C A D F R S S L P S Q D ·
1518 GGACTCACTG GCTCAGTGTG CAGACTTTAG GAGCAGCCTG CCATCCCAGG
    CCTGAGTGAC CGAGTCACAC GTCTGAAATC CTCGTCCGAC GGTAGGGTCC

· A M L C S G P L A I I Q G R T S
1568 ACCCATGCT GTGCTCAGGA CCGTTAGCCA TAATCCAGGG CCGCACCTCC
    TGCGGTACGA CACGAGTCCT GGCAATCGGT ATTAGGTCCC GGCGTGGAGG

```

```

      N S G R Q A A R L F S V P H V V Q .
1618 AACTCGGGAA GGCAGGCTGC CCGGCTCTTC TCCGTGCCTC ATGTGGTGCA
      TTGAGCCCTT CCGTCCGACG GGCCGAGAAG AGGCACGGAG TACACCACGT

      .Q E T T L A Y L E N Q V A A A L T .
1668 GCAAGAGACC ACCCTGGCCT ACCTAGAGAA CCAGGTGGCA GCAGACTCA
      CGTTCTCTGG TGGACCGGA TGGATCTCTT GGTCCACCGT CGTCGTGAGT

      . L Q S S H E Y R H W L L V Y A R
1718 CCCTGCAGTC CAGCCACGAG TACCGCCATT GGCTCCTCGT CTACGCACGG
      GGGACGTCAG GTCGGTGCTC ATGGCGGTAA CCGAGGAGCA GATGCGTGCC

      Y L V N E G F E Y R L R E I C K D .
1768 TACCTCGTAA ACGAAGGGTT TGAATACCGA CTTCGAGAAA TATGCAAGGA
      ATGGAGCATT TGCTTCCCAA ACTTATGGCT GAAGCTCTTT ATACGTTTCT

      .L L G P V H Y S T G S Q W E S T V .
1818 CTTACTGGGT CCGGTTCACT ACTCCACTGG AAGCCAGTGG GAGTCAACAG
      GAATGACCCA GGCCAAGTGA TGAGGTGACC TTCGGTCACC CTCAGTTGTG

      . V G L R K R E L L K E L L P V I
1868 TAGTGGGTCT GCGGAAGAGG GAGCTGCTGA AGGAGCTGCT ACCAGTCATC
      ATACCCAGA CGCCTTCTCC CTCGACGACT TCCTCGACGA TGGTCAGTAG

      G Q N L R F Q R L F T E C Q E Q L .
1918 GGGCAGAACC TCCGATTCCA GCGCCTCTTC ACCGAGTGTC AGGAACAGCT
      CCGTCTTGG AGGCTAAGGT CGCGGAGAAG TGCTCACAG TCCTTGTCGA
      EcoRV
      ~~~~~~
 .D I L R D K K G N S A D I Q H S G .
1968 CGACATCCTG AGGGACAAGA AGGGCAATTC TGCAGATATC CAGCACAGTG
 GCTGTAGGAC TCCCTGTTCT TCCCGTTAAG ACGTCTATAG GTCGTGTCAC
 XhoI
      ~~~~~~
      XbaI
      ~~~~~~
 . G R S S L E G P R F E G K P I P
2018 GCGGCCGCTC GAGTCTAGAG GGCCCGCGGT TCGAAGGTAA GCCTATCCCT
 CGCCGGCGAG CTCAGATCTC CCGGGCGCCA AGCTTCCATT CGGATAGGGA

 N P L L G L D S T R T G H H H H H .
2068 AACCTCTCC TCGGTCTCGA TTCTACGCGT ACCGGTCATC ATCACCATCA
 TTGGGAGAGG AGCCAGAGCT AAGATGCGCA TGGCCAGTAG TAGTGGTAGT

 .H *
2118 CCATTGA
 GGTAACT

```

## 6.5 Aminosäure- und Nukleotidsequenz von Hira R227K V5/His

```

 M K L L K P T W V N H N G K P I .
1 ATGAAGC TCCTGAAGCC GACCTGGGTC AACCAATG GCAAGCCGAT
 TACTTCG AGGACTTCGG CTGGACCCAG TTGGTGTTAC CGTTCGGCTA

 .F S V D I H P D G T K F A T G G Q .
48 TTTTTCAGTT GATATTCACC CTGACGGGAC CAAGTTCGCA ACTGGAGGAC
 AAAAAGTCAA CTATAAGTGG GACTGCCCTG GTTCAAGCGT TGACCTCTGT

 . G Q D S G K V V I W N M S P V L
98 AAGGGCAGGA TTCTGGGAAG GTTGTGATCT GGAATATGTC TCCAGTCCTC
 TTCCCGTCCT AAGACCCTTC CAACACTAGA CTTATACAG AGGTCAGGAG

```

Q E D D E K D E N I P K M L C Q M ·  
 148 CAGGAGGATG ACGAGAAGGA TGAAAATATT CCCAAGATGC TTTGCCAGAT  
 GTCTCCTAC TGCTCTTCT ACTTTTATAA GGGTTCTACG AAACGGTCTA

· D N H L A C V N C V R W S N S G M ·  
 198 GGACAATCAC TTAGCATGTG TGAAGTGTGT GCGGTGGTCA AACAGTGGGA  
 CCTGTTAGTG AATCGTACAC ACTTGACACA CGCCACCAGT TTGTACCCT

· Y L A S G G D D K L I M V W K R  
 248 TGTATTTAGC TTCTGGGGGA GATGACAAAC TGATTATGGT GTGAAGCGG  
 ACATAAATCG AAGACCCCTT C TACTGTTTG ACTAATACCA CACCTTCGCC  
 HindIII  
 ~~~~~

A T Y I G P S T V F G S S G K L A ·  
 298 GCTACGTACA TCGGCCCCAG CACCGTGTTT GGCTCCAGTG GTAAGCTTGC  
 CGATGCATGT AGCCGGGGTC GTGGCACAAG CCGAGGTCAC CATTGGAACG

· N V E Q W R C V S I L R N H S G D ·  
 348 CAATGTGGAG CAGTGGCGGT GTGTCTCTAT CCTCCGGAAT CATTCAGGCG  
 GTTACACCTC GTCACCGCCA CACAGAGATA GGAGGCCTTA GTAAGTCCGC

· V M D V A W S P H D A W L A S C  
 398 ATGTGATGGA TGTAGCATGG TCTCCCCACG ATGCCTGGCT AGCCTCATGC  
 TACTACTACCT ACATCGTACC AGAGGGGTGC TACGGACCGA TCGGAGTACG

S V D N T V V I W N A V K F P E I ·  
 448 AGCGTGGATA AACTGTGCGT CATCTGGAAT GCTGTAAAGT TCCCAGAAAT  
 TCGCACCTAT TGTGACAGCA GTAGACCTTA CGACATTTCA AGGGTCTTTA

· L A T L R G H S G L V K G L T W D ·  
 498 TCTAGTACT CTGAGAGGTC ATTCTGGCTT GGTCAAAGGG TTGACATGGG  
 AGATCGATGA GACTCTCCAG TAAGACCGAA CCAGTTTCCC AACTGTACCC

· P V G K Y I A S Q A D D R S L K  
 548 ACCGTGTTGG TAAATACATA GCTTCTCAAG CTGATGACCG CAGCCTAAAG  
 TGGGACAACC ATTTATGTAT CGAAGAGTTC GACTACTGGC GTCGGATTTT

V W R T L D W Q L E T S I T K P F ·  
 598 GTGTGGAGGA CGCTGGACTG GCAGTTGGAG ACCAGCATCA CCAAGCCTTT  
 CACACCTCCT GCGACCTGAC CGTCAACCTC TGGTCGTAGT GGTTGCGAAA

· D E C G G T T H V L **K** L S W S P D ·  
 648 TGATGAGTGT GGAGGAACGA CCCATGTGTT **GAAG**CTCAGC TGGTCACCTG  
 ACTACTACA CCTCCTTGCT GGGTACACAA **CTTC**GAGTCG ACCAGTGGAC

· G H Y L V S A H A M N N S G P T  
 698 ATGGGCATTA CCTGGTGTCT GCCCATGCCA TGAACAACCTC AGGCCCACT  
 TACCCGTAAT GGACCACAGA CGGGTACGGT ACTTGTTGAG TCCGGGGTGA

A Q I I E R E G W K T N M D F V G ·  
 748 GCCCAGATCA TCGAACGGGA GGGATGGAAG ACCAACATGG ACTTTGTTGG  
 CGGGTCTAGT AGCTTGCCCT CCCTACCTTC TGTTGTACC TGAACAACCC

· H R K A V T V V K F N P K I F K K ·  
 798 GCACCGGAAA GCTGTGACTG TCGTGAAATT CAACCCAAAA ATCTTCAAAA  
 CGTGGCCTTT CGACACTGAC AGCACTTTAA GTTGGGTTTT TAGAAGTTTT

· K Q K N G S S A K P S C P Y C C  
 848 AGAAGCAGAA GAATGGGAGT TCTGCGAAGC CTAGCTGCCC G TACTGCTGC  
 TCTTCGTCTT CTTACCCTCA AGACGCTTCG GATCGACGGG CATGACGACG

C A V G S K D R S L S V W L T C L ·  
 898 TGTGCTGTCT GCAGCAAGGA CCGCTCGCTT TCTGTCTGGC TCACATGTCT  
 ACACGACAGC CGTCGTTTCT GCGGAGCGAA AGACAGACCG AGTGTACAGA

· K R P L V V I H E L F D K S I M D ·  
 948 GAAACGGCCG CTGGTGGTCA TCCATGAACT GTTTGACAAA TCCATCATGG  
 CTTTGCCGGC GACCACCAGT AGTACTTGA CAAACTGTTT AGGTAGTACC

· I S W T L N G L G I L V C S M D  
 998 ATATTTCTCTG GACTCTGAAT GGGCTGGGCA TCTTGGTATG CTCTATGGAC  
 TATAAAGGAC CTGAGACTTA CCCGACCCGT AGAACCATAC GAGATACCTG

G S V A F L D F S Q D E L G D P L ·  
 1048 GGCTCTGTGG CATTCCTCGA CTTCTCCCAG GATGAGCTTG GCGATCCCCT  
 CCGAGACACC GTAAGGAGCT GAAGAGGGTC CTACTIONGAC CGCTAGGGGA

· S E E E K S R I H Q S T Y G K S L ·  
 1098 GAGCGAGGAG GAGAAGAGCC GCATTCACCA GTCCACCTAT GGCAAGAGCC  
 CTCGCTCCTC CTCTTCTCGG CGTAAGTGGT CAGGTGGATA CCGTTCTCGG

· A I M T E A Q L S T A V I E N P  
 1148 TAGCCATCAT GACCGAGGCC CAGCTCTCCA CAGCCGTCAT TGAGAACCCT  
 ATCGGTAGTA CTGGCTCCGG GTCGAGAGGT GTCGGCAGTA ACTCTTGGGA

E M L K Y Q R R Q Q Q Q Q L D Q K ·  
 1198 GAGATGCTCA AGTACCAGCG AAGGCAGCAG CAGCAGCAGC TGGACCAGAA  
 CTCTACGAGT TCATGGTCCG TCCGTCGTC GTCGTCGTCG ACCTGGTCTT

· S A A T R E M G S A T S V A G V V ·  
 1248 GAGTGCTGCG ACCAGGGAGA TGGGCTCAGC CACCTCAGTC GCAGGCGTTG  
 CTCACGACGC TGGTCCCTCT ACCCGAGTCG GTGGAGTCAG CGTCCGCAAC  
 EcoRV  
 ~~~~~

· N G E S L E D I R K N L L K K Q  
 1298 TCAACGGGGA GAGTCTTGAA GATATCAGGA AGAATCTTTT GAAGAAACAA  
 AGTTGCCCTT CTCAGAACTT CTATAGTCCT TCTTAGAAAA CTCTTTTGT

V E T R T A D G R R R I T P L C I ·  
 1348 GTTGAGACTC GGACAGCAGA TGGCCGGAGA AGAATCACGC CTCTCTGCAT  
 CAACTCTGAG CCTGTGCTCT ACCGGCCTCT TCTTAGTGCG GAGAGACGTA

· A Q L D T G D F S T A F F N S I P ·  
 1398 AGCACAGCTG GACACTGGGG ACTTCTCCAC GGCATTCTTT AACAGCATCC  
 TCGTGTGAC CTGTGACCCC TGAAGAGGTG CCGTAAGAAA TTGTGCTAGG

· L S G S L A G T M L S S H S S P  
 1448 CCCTCTCGGG CTCCTGGCG GGCACCATGC TCTCTTCTCA TAGCAGTCCA  
 GGGAGAGCCC GAGGGACCGC CCGTGGTACG AGAGAAGAGT ATCGTCAGGT

Q L L P L D S S T P N S F G A S K ·  
 1498 CAGTACTG CACTGGACTC CAGTACCCCT AACTCCTTCG GCGCCTCGAA  
 GTCGATGACG GTGACCTGAG GTCATGGGGA TTGAGGAAGC CGCGGAGCTT

· P C T E P V V A A S A R P A G D S ·  
 1548 GCCTTGCACA GAGCCTGTGG TGGCTGCCAG TGCCAGACCT GCAGGCGATT  
 CGGAACGTGT CTCGGACACC ACCGACGGTC ACGGTCTGGA CGTCCGCTAA

· V N K D S M N A T S T P A A L S  
 1598 CTGTCAATAA AGACAGTATG AATGCTACCT CTACTIONTGC TGCATTGTCA  
 GACAGTTATT TCTGTCATAC TTACGATGGA GATGAGGACG ACGTAACAGT

P S V L T T P S K I E P M K A F D ·  
 1648 CCTTCTGTGT TAACGACCCC GTCCAAGATC GAACCCATGA AAGCGTTTGA  
 GGAAGACACA ATTGCTGGGG CAGGTTCTAG CTTGGGTACT TTCGCAAAT

· S R F T E R S K A T P G A P A L T ·  
 1698 CTCCCGGTTT ACAGAGCGGT CCAAAGCCAC ACCAGGTGCT CCTGCCCTGA  
 GAGGGCCAAG TGTCTCGCCA GGTTCGGTG TGGTCCACGA GGACGGGACT

· S M T P T A V E R L K E Q N L V  
 1748 CCAGCATGAC TCCGACAGCT GTGGAAAGGT TAAAAGAGCA GAACCTTGTG  
 GTGCTACTG AGGCTGTCCA CACCTTTCCA ATTTTCTCGT CTTGAACAC

K E L R P R D L L E S S S D S D E ·  
 1798 AAAGAGCTGA GGCCCCGAGA CCTCCTGGAG AGCAGCAGTG ACAGCGATGA  
 TTTCCTCGACT CCGGGGCTCT GGAGGACCTC TCGTCGTAC TGTGCTACT

·K V P L A K A S S L S K R K L E L ·  
 1848 GAAAGTCCCT TTGGCTAAGG CTTCCTCACT GTCCAAGCGA AAACCTTGAGC  
 CTTTCAGGGA AACCGATTCC GAAGGAGTGA CAGGTTGCT TTTGAACTCG

· E V E T V E K K K K G R P R K D  
 1898 TTGAGGTAGA GACAGTAGAG AAGAAGAAGA AAGGGCGGCC TCGGAAGGAC  
 AACTCCATCT CTGTCATCTC TTCTTCTTCT TTCCCGCCGG AGCCTTCCTG

S R L M P V S L S V Q S P A A L T ·  
 1948 TCTCGTCTCA TGCCTGTGTC TCTGTCTGTC CAGTCTCCAG CTGCCCTAAC  
 AGAGCAGAGT ACGGACACAG AGACAGACAG GTCAGAGGTC GACGGGATTG

·A E K E A M C L S A P A L A L K L ·  
 1998 CGCAGAGAAG GAGGCCATGT GTCTGTCTGC ACCAGCACTT GCACTGAAGC  
 GCGTCTCTTC CTCCGGTACA CAGACAGACG TGGTCGTGAA CGTGACTTCG

· P I P S P Q R A F T L Q V S S D  
 2048 TGCCAATTCC AAGCCCCAG AGAGCATTCA CCTCCAGGT CAGCTCCGAT  
 ACGGTTAAGG TTCGGGGGTC TCTCGTAAGT GGGAGGTCCA GTCGAGGCTA

P S M Y I E V E N E V T V V G G V ·  
 2098 CCTTCCATGT ACATGAGGT GGAGAATGAA GTGACAGTGG TGGGGGGCGT  
 GGAAGGTACA TGTAACCTCA CCTCTTACTT CACTGTACC ACCCCCCGCA

·K L S R L K C N R E G K E W E T V ·  
 2148 GAAGCTGAGC CGCCTGAAGT GCAACCGGGA AGGGAAGGAG TGGGAGACGG  
 CTTCGACTCG GCGGACTTCA CGTTGGCCCT TCCCTTCTC ACCCTCTGCC  
 BamHI  
 ~~~~~~

· L T S R I L T A A G S C D V V C  
 2198 TACTCACCAG CCGGATCCTC ACTGCTGCGG GCAGCTGTGA CGTGGTGTGT  
 ATGAGTGGTC GGCCTAGGAG TGACGACGCC CGTCGACACT GCACCACACA

V A C E K R M L S V F S T C G R R ·  
 2248 GTGCCTGTG AAAAAAGGAT GCTGTCAGTG TTCTCCACCT GTGGTCGCCG  
 CAGCGGACAC TTTTTCCTA CGACAGTCAC AAGAGGTGGA CACCAGCGGC

·L L S P I L L P S P I S T L H C T ·  
 2298 TCTCCTCTCT CCCATCCTCC TGCCATCCCC GATCTCTACT TTGCATTGCA  
 AGAGGAGAGA GGGTAGGAGG ACGGTAGGGG CTAGAGATGA AACGTAACGT

· G S Y V M A L T A A A T L S V W  
 2348 CAGGCTCCTA CGTCATGGCG CTCACCGCTG CAGCCACACT CTCTGTCTGG  
 GTCCGAGGAT GCAGTACCGC GAGTGGCGAC GTCGGTGTGA GAGACAGACC

D V H R Q V V V V K E E S L H S I ·  
 2398 GATGTTTACA GACAGGTGGT TGTGGTGAAA GAAGAGTCTC TACTACTCCAT  
 CTACAAGTGT CTGTCCACCA ACACCACTTT CTCTCAGAG ATGTGAGGTA

·L A G S D M T V S Q I L L T Q H G ·  
 2448 CCTGGCAGGA AGTGATATGA CGGTATCACA GATCTTGCTG ACGCAGCATG  
 GGACCGTCTC TACTATACT GCCATAGTGT CTAGAACGAC TGCCTCGTAC

· I P V M N L S D G K A Y C F N P  
 2498 GAATCCAGT AATGAACCTG TCCGATGGGA AGGCGTACTG CTTTAATCCG  
 CTTAGGGTCA TTAAGTGGAC AGGCTACCCT TCCGATGAC GAAATTAGGC

S L S T W N L V S D K Q D S L A Q ·  
 2548 TCACTTTCCA CATGGAACCT GGTTCCTGAC AAGCAGGACT CACTGGCTCA  
 AGTGAAAGGT GTACCTTGGA CCAAAGACTG TTCGTCCTGA GTGACCGAGT

·C A D F R S S L P S Q D A M L C S ·  
 2598 GTGTGCAGAC TTTAGGAGCA GCCTGCCATC CCAGGACGCC ATGCTGTGCT  
 CACACGTCTG AAATCCTCGT CGGACGGTAG GGTCCGCGG TACGACACGA

```

 · G P L A I I Q G R T S N S G R Q
2648 CAGGACCGTT AGCCATAATC CAGGGCCGCA CCTCCAACCTC GGAAGGCAG
 GTCTTGGCAA TCGGTATTAG GTCCCGGCGT GGAGGTTGAG CCCTTCCGTC

 A A R L F S V P H V V Q Q E T T L ·
2698 GGTGCCCGGC TCTTCTCCGT GCCTCATGTG GTGCAGCAAG AGACCACCCT
 CGACGGGCCG AGAAGAGGCA CGGAGTACAC CACGTCGTTC TCTGGTGGGA

 ·A Y L E N Q V A A A L T L Q S S H ·
2748 GGCCTACCTA GAGAACCAGG TGGCAGCAGC ACTCACCTG CAGTCCAGCC
 CCGATGGAT CTCTTGGTCC ACCGTCGTCG TGAGTGGGAC GTCAGGTCGG

 · E Y R H W L L V Y A R Y L V N E
2798 ACGAGTACCG CCATTGGCTC CTCGTCTACG CACGGTACCT CGTAAACGAA
 TGTCATGGC GGTAACCGAG GAGCAGATGC GTGCCATGGA GCATTTGCTT

 G F E Y R L R E I C K D L L G P V ·
2848 GGGTTTGAAT ACCGACTTCG AGAAATATGC AAGGACTTAC TGGGTCCGGT
 CCCAAACTTA TGGCTGAAGC TCTTTATACG TTCCTGAATG ACCCAGGCCA

 ·H Y S T G S Q W E S T V V G L R K ·
2898 TCACTACTCC ACTGGAAGCC AGTGGGAGTC AACAGTAGTG GGTCTGCGGA
 AGTGATGAGG TGACCTTCGG TCACCCTCAG TTGTCATCAC CCAGACGCCT

 · R E L L K E L L P V I G Q N L R
2948 AGAGGGAGCT GCTGAAGGAG CTGCTACCAG TCATCGGGCA GAACCTCCGA
 TCTCCCTCGA CGACTTCTC GACGATGGTC AGTAGCCCGT CTTGGAGGCT

 F Q R L F T E C Q E Q L D I L R D ·
2998 TTCCAGCGCC TCTTCACCGA GTGTCAGGAA CAGCTCGACA TCCTGAGGGA
 AAGGTCGCGG AGAAGTGGCT CACAGTCCTT GTCGAGCTGT AGGACTCCCT
 XhoI
      ~~~~~~
      EcoRV
      ~~~~~~
 XbaI
      ~~~

      ·K K G N S A D I Q H S G G R S S L ·
3048 CAAGAAGGGC AATTCTGCAG ATATCCAGCA CAGTGGCGGC CGCTCGAGTC
      GTTCTTCCCG TTAAGACGTC TATAGGTCGT GTCACCGCCG GCGAGCTCAG
      XbaI
      ~~~~

 · E G P R F E G K P I P N P L L G
3098 TAGAGGGCCC GCGGTTGAA GGTAAGCCTA TCCCTAACCC TCTCCTCGGT
 ATCTCCCGGG CGCCAAGCTT CCATTCCGAT AGGGATTGGG AGAGGAGCCA

 L D S T R T G H H H H H H *
3148 CTCGATTCTA CGGTACCGG TCATCATCAC CATCACCATT GA
 GAGCTAAGAT GCGCATGGCC AGTAGTAGTG GTAGTGGTAA CT

```

## 6.6 Aminosäure- und Nukleotidsequenz von WΔHira+52AS V5/His

```

 M K L L K P T W V N H N G K P I ·
1 ATGAAGC TCCTGAAGCC GACCTGGGTC AACCACAATG GCAAGCCGAT
 TACTTCG AGGACTTCGG CTGGACCCAG TTGGTGTAC CGTTCGGCTA

 ·F S V D I H P D G T K F A T G G Q ·
48 TTTTTCAGTT GATATTCACC CTGACGGGAC CAAGTTCGCA ACTGGAGGAC
 AAAAAGTCAA CTATAAGTGG GACTGCCCTG GTTCAAGCGT TGACCTCCTG

```

· G Q D S G K V V I W N M S P V L  
 98 AAGGGCAGGA TTCTGGGAAG GTTGTGATCT GGAATATGTC TCCAGTCCTC  
 TTCCCGTCCT AAGACCCTTC CAACACTAGA CTTTATACAG AGGTCAGGAG

Q E D D E K D E N I P K M L C Q M ·  
 148 CAGGAGGATG ACGAGAAGGA TGAAAATATT CCCAAGATGC TTTGCCAGAT  
 GTCTCCTAC TGCTCTTCTT ACTTTTATAA GGTTTCTACG AAACGGTCTA

·D N H L A C V N C V R W S N S G M ·  
 198 GGACAATCAC TTAGCATGTG TGAACGTGTG GCGGTGGTCA AACAGTGGGA  
 CCTGTTAGTG AATCGTACAC ACTTGACACA CGCCACCAGT TTGTCACCCT

· Y L A S G G D D K L I M V W K R  
 248 TGTATTTAGC TTCTGGGGGA GATGACAAAC TGATTATGGT GTGGAAGCGG  
 ACATAAATCG AAGACCCCTT CTAAGTGTGG ACTAATACCA CACCTTCGCC

A T Y I G P S T V F G S S G K L A ·  
 298 GCTACGTACA TCGGCCCCAG CACCGTGTTC GGCTCCAGTG GTAAGCTTGC  
 CGATGCATGT AGCCGGGGTC GTGGCACAAG CCGAGGTCAC CATTGGAACG

·N V E Q W R C V S I L R N H S G D ·  
 348 CAATGTGGAG CAGTGGCGGT GTGTCTCTAT CCTCCGGAAT CATTGAGGCG  
 GTTACACCTC GTCACCGCCA CACAGAGATA GGAGGCCTTA GTAAGTCCGC

· V M D V A W S P H D A W L A S C  
 398 ATGTGATGGA TGTAGCATGG TCTCCCCACG ATGCCTGGCT AGCCTCATGC  
 TACTACTACCT ACATCGTACC AGAGGGGTGC TACGGACCGA TCGGAGTACG

S V D N T V V I W N A V K F P E I ·  
 448 AGCGTGATA AACTGTCTGT CATCTGGAAT GCTGTAAAGT TCCAGAAAT  
 TCGCACCTAT TGTGACAGCA GTAGACCTTA CGACATTTCA AGGGTCTTTA

·L A T L R G H S G L V K G L T W D ·  
 498 TCTAGTACT CTGAGAGGTC ATCTGGCTT GGTCAAAGGG TTGACATGGG  
 AGATCGATGA GACTCTCCAG TAAGACCGAA CCAGTTTCCC AACTGTACCC

· P V G K Y I A S Q A D D R S L K  
 548 ACCCTGTTGG TAAATACATA GCTTCTCAAG CTGATGACCG CAGCCTAAAG  
 TGGGACAACC ATTTATGTAT CGAAGAGTTC GACTACTGGC GTCGGATTTT

V W R T L D W Q L E T S I T K P F ·  
 598 GTGTGGAGGA CGCTGGACTG GCAGTTGGAG ACCAGCATCA CCAAGCCTTT  
 CACACCTCCT GCGACCTGAC CGTCAACCTC TGGTCGTAGT GGTTCGGAAA

·D E C G G T T H V L R L S W S P D ·  
 648 TGATGAGTGT GGAGGAACGA CCCATGTGTT GCGGCTCAGC TGGTCACCTG  
 ACTACTACA CCTCCTTGCT GGTACACAA CGCCGAGTCG ACCAGTGGAC

· G H Y L V S A H A M N N S G P T  
 698 ATGGGCATTA CCTGGTGTCT GCCATGCCA TGAACAATC AGGCCCACT  
 TACCCGTAAT GGACCACAGA CGGGTACGGT ACTTGTGAG TCCGGGGTGA

A Q I I E R E G W K T N M D F V G ·  
 748 GCCCAGATCA TCGAACGGGA GGGATGGAAG ACCAACATGG ACTTTGTTGG  
 CGGGTCTAGT AGCTTGCCCT CCCTACCTTC TGTTGTACC TGAAACAACC

·H R K A V T V V K F N P K I F K K ·  
 798 GCACCGGAAA GCTGTGACTG TCGTGAAATT CAACCCAAAA ATCTTCAAAA  
 CGTGGCCTTT CGACTGAC AGCACTTTAA GTTGGGTTTT TAGAAGTTTT

· K Q K N G S S A K P S C P Y C C  
 848 AGAAGCAGAA GAATGGGAGT TCTGCGAAGC CTAGCTGCCC GACTGCTGC  
 TCTTCGTCTT CTACCCTCA AGACGCTTCG GATCGACGGG CATGACGACG

C A V G S K D R S L S V W L T C L ·  
 898 TGTGCTGTCT GCAGCAAGGA CCGCTCGCTT TCTGTCTGGC TCACATGTCT  
 ACACGACAGC CGTCGTTCTT GCGAGCGAA AGACAGACCG AGTGTACAGA

```

·K R P L V V I H E L F D K S I M D ·
948 GAAACGGCCG CTGGTGGTCA TCCATGAACT GTTTGACAAA TCCATCATGG
CTTTTGCCGGC GACCACCAGT AGGTACTTGA CAAACTGTTT AGGTAGTACC

· I S W T L N G L G I L V C S M D
998 ATATTTCTCTG GACTCTGAAT GGGCTGGGCA TCTTGGTATG CTCTATGGAC
TATAAAGGAC CTGAGACTTA CCCGACCCGT AGAACCATAC GAGATACCTG

G S V A F L D F S Q D E L G D P L ·
1048 GGCTCTGTGG CATTCCTCGA CTTCTCCCAG GATGAGCTTG GCGATCCCCT
CCGAGACACC GTAAGGAGCT GAAGAGGGTC CTA CTACTCGAAC CGCTAGGGGA

·S E E E K S R I H Q S T Y G K S L ·
1098 GAGCGAGGAG GAGAAGAGCC GCATTCACCA GTCCACCTAT GGCAAGAGCC
CTCGCTCCTC CTCTTCTCGG CGTAAGTGGT CAGGTGGATA CCGTTCTCGG

· A I M T E A Q L S T A V I E N P
1148 TAGCCATCAT GACCGAGGCC CAGCTCTCCA CAGCCGTCAT TGAGAACCCT
ATCGGTAGTA CTGGCTCCGG GTCGAGAGGT GTCGGCAGTA ACTCTTGGGA

E M L K Y Q R R Q Q Q Q Q L D Q K ·
1198 GAGATGCTCA AGTACCAGCG AAGGCAGCAG CAGCAGCAGC TGGACCAGAA
CTCTACGAGT TCATGGTCGC TTCCGTCGTC GTCGTCGTCG ACCTGGTCTT

·S A A D K K G N S A D I Q H S G G ·
1248 GAGTGCTGCG GACAAGAAGG GCAATTCTGC AGATATCCAG CACAGTGGCG
CTCACGACGC CTGTTCTTCC CGTTAAGACG TCTATAGGTC GTGTCACCCG

· R S S L E G P R F E G K P I P N
1298 GCCGCTCNAG TCTAGAGGGC CCGCGGTTCCG AAGGTAAGCC TATCCCTAAC
CGCGGAGNTC AGATCTCCCG GCGCGCAAGC TTCCATTCCG ATAGGGATTG

P L L G L D S T R T G H H H H H H ·
1348 CCTCTCCTCG GTCTCGATTG TACGCGTACC GGTCATCATC ACCATCACCA
GGAGAGGAGC CAGAGCTAAG ATGCGCATGG CCAGTAGTAG TGGTAGTGGT

.*
1398 TTGA
AACT

```

## 6.7 Aminosäure-und Nukleotidsequenz von Urim

```

M T A S V L R S I ·
1 ATGACG GCCTCCGTGC TGCGAAGTAT
TACTGC CGGAGGCACG ACGCTTCATA

·S L A L R P T S G L L G T W Q T Q ·
27 CTCGCTAGCC CTGCGCCCGA CTAGCGGGCT TCTGGGAACT TGGCAGACGC
GAGCGATCGG GACGCGGGCT GATCGCCCGA AGACCCTTGA ACCGTCTGCG

· L R E T H Q R A S L L S F W E L
77 AGCTTAGAGA GACTCACCAG CGAGCGTCAT TGTGTCTTT CTGGGAACTC
TCGAATCTCT CTGAGTGGTC GCTCGCAGTA ACAACAGAAA GACCCTTGAG

I P M R S E P L R K K K K V D P K ·
127 ATTCCCATGA GATCAGAACC TCTTCGAAAA AAGAAGAAGG TAGATCCTAA
TAAGGGTACT CTAGTCTTGG AGAAGCTTTT TTCTTCTTCC ATCTAGGATT

·K D Q E A K E R L K R K I R K L E ·
177 AAAAGACCAA GAAGCAAAGG AGCGCTTGAA AAGGAAGATC CGAAAACCTGG
TTTTCTGGTT CTTCGTTTCC TCGCGAACTT TTCCTTCTAG GCTTTTTGACC

· K A T Q E L I P I E D F I T P L
227 AAAAGGCTAC TCAAGAGCTA ATTCCATTG AAGATTTTAT TACCCCTCTA
TTTTCCGATG AGTTCTCGAT TAAGGATAAC TTCTAAAATA ATGGGGAGAT

```



K F L D K A R E R P Q V E L T F E ·  
 277 AAGTTCTTGG ATAAAGCAAG AGAGCGGCCT CAGGTGGAGC TCACCTTTGA  
 TTCAAGAACC TATTTGTTTC TCTCGCCGGA GTCCACCTCG AGTGGAACCT  
  
 · E T E R R A L L L K K W S L Y K Q ·  
 327 GGAGACTGAG AGGAGAGCTC TGCTTCTGAA GAAGTGGTCC TTGTACAAGC  
 CCTCTGACTC TCCTCTCGAG ACGAAGACTT CTCACCAGG AACATGTTCC  
  
 · Q E R K M E R D T I R A M L E A  
 377 AGCAAGAGCG TAAGATGGAG AGGGACACCA TCAGGGCTAT GCTAGAAGCC  
 TCGTTCTCGC ATTCTACCTC TCCCTGTGGT AGTCCCGATA CGATCTTCGG  
  
 Q Q E A L E E L Q L E S P K L H A ·  
 427 CAGCAGGAAG CTCTGGAGGA ACTGCAACTG GAATCCCCGA AGCTCCATGC  
 GTCGTCCTTC GAGACCTCCT TGACGTTGAC CTTAGGGGCT TCGAGGTACG  
 BamHI  
 ~~~~~~  
 · E A I K R D P N L F P F E K E G P ·  
 477 TGAGGCCATC AAGCGGGATC CTAACCTGTT CCCCTTTGAG AAGGAAGGGC  
 ACTCCGGTAG TTCGCCCTAG GATTGGACAA GGGGAAACTC TTCCTTCCCG  
  
 · H Y T P P I P N Y Q P P E G R Y  
 527 CACATTACAC ACCACCGATC CCTAACTACC AACCCCTGA AGGCAGGTAC  
 GTGTAATGTG TGGTGGCTAG GGATTGATGG TTGGGGGACT TCCGTCCATG  
  
 N D I T K V Y T Q V E F K R \*  
 577 AATGACATCA CCAAGGTGTA CACACAAGTG GAGTTTAAGA GATAG  
 TTACTGTAGT GGTTCACAT GTGTGTTTAC CTCAAATTCT CTATC

## Abkürzungsverzeichnis

Gebräuchliche Abkürzungen, sowie physikalische SI-Basiseinheiten werden nicht gesondert aufgeführt.

|                  |                                       |
|------------------|---------------------------------------|
| 7-AAD            | Aminoactinomycin                      |
| Abb.             | Abbildung                             |
| AK               | Antikörper                            |
| Amp              | Ampicillin                            |
| Amp <sup>R</sup> | Ampicillin-Resistenzgen               |
| APC              | Aphidicolin                           |
| AS               | Aminosäure                            |
| bidest.          | Bidestilliertes Wasser                |
| bp               | Basenpaare                            |
| BSA              | Rinderserumalbumin                    |
| DGS              | DiGeorge-Syndrom                      |
| dNTP             | Desoxynukleotid-Triphosphat           |
| DMEM             | Dulbecco's modified Eagle's Medium    |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                      |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure                |
| DTT              | 1,4 Dithiothreitol                    |
| EDTA             | Ethylendiamintetraessigsäure          |
| EtBr             | Ethidiumbromid                        |
| EtOH             | Ethanol                               |
| FACS             | Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer  |
| Fc               | Kristallisierbares Fragment           |
| FCS              | fetales Kälberserum                   |
| FITC             | Fluorescein-5-isocyanat               |
| HEBS             | HEPES-gepufferte Salzlösung           |
| Iso              | Isotypkontrolle                       |
| kb               | Kilobasen                             |
| Ko-IP            | Ko-Immunopräzipitation                |
| LB               | Luria-Broth-Vollmedium                |
| MACS             | magnetisch-assoziierte Zellsortierung |

|          |                                               |
|----------|-----------------------------------------------|
| MCS      | multiple Klonierungsstelle                    |
| min      | Minuten                                       |
| o.g.     | oben genannt                                  |
| ORF      | Open reading frame                            |
| PAGE     | Polyacrylamid-Gelelektrophorese               |
| PBS      | Phosphat- gepufferte Saline                   |
| PCR      | Polymerase-Kettenreaktion                     |
| PFA      | Paraformaldehyd                               |
| PI       | Propidiumiodid                                |
| RT       | Raumtemperatur                                |
| SDS      | Natriumdodecylsulfat                          |
| s        | Sekunden                                      |
| TAE      | Tris-HCl / Acetat / EDTA-Puffer               |
| TE       | Tris-HCl / EDTA-Lösung                        |
| Tet      | Tetrazyklin                                   |
| Tris-HCl | Tris-(hydroxymethyl)-Amonomethan-Hydrochlorid |
| ÜN       | Über Nacht                                    |
| VCFS     | Velo-Cardio-Facial Syndrom                    |

## Literaturverzeichnis

- Adams, P. D., Li, X., Sellers, W. R., Baker, K. B., Leng, X., Harper, J. W., Taya, Y. Kaelin, W. G., Jr.** Retinoblastoma protein contains a C-terminal motif that targets it for phosphorylation by cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*, 19: 1068-1080, 1999.
- Adams, P. D., Sellers, W. R., Sharma, S. K., Wu, A. D., Nalin, C. M. Kaelin, W. G., Jr.** Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol*, 16: 6623-6633, 1996.
- Annunziato, A. T. Hansen, J. C.** Role of histone acetylation in the assembly and modulation of chromatin structures. *Gene Expr*, 9: 37-61, 2000.
- Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E. Moudrianakis, E. N.** The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 10148-10152, 1991.
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M. Reinberg, D.** FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science*, 301: 1090-1093, 2003.
- Blank, T. A. Becker, P. B.** Electrostatic mechanism of nucleosome spacing. *J Mol Biol*, 252: 305-313, 1995.
- Brown, N. R., Noble, M. E., Endicott, J. A. Johnson, L. N.** The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol*, 1: 438-443, 1999.
- Burn, J. Goodship, J.** Developmental genetics of the heart. *Curr Opin Genet Dev*, 6: 322-325, 1996.
- Burnette, W. N.** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112: 195-203, 1981.
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B. D. Dutta, A.** Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21<sup>CIP1</sup>. *Mol Cell Biol*, 16: 4673-4682, 1996.
- Collins, J. E., Wright, C. L., Edwards, C. A., Davis, M. P., Grinham, J. A., Cole, C. G., Goward, M. E., Aguado, B., Mallya, M., Mokrab, Y., Huckle, E. J., Beare, D. M. Dunham, I.** A genome annotation-driven approach to cloning the human ORFeome. *Genome Biol*, 5: R84, 2004.
- Connell-Crowley, L., Elledge, S. J. Harper, J. W.** G1 cyclin-dependent kinases are sufficient to initiate DNA synthesis in quiescent human fibroblasts. *Curr Biol*, 8: 65-68, 1998.
- Corpet, F.** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16: 10881-10890, 1988.

- Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Lam, W. M., Skordalakes, E., Zhang, R., Franco, A. A., Brill, S. J., Adams, P. D., Berger, J. M., Kaufman, P. D.** Structure and function of the conserved core of histone deposition protein Asf1. *Curr Biol*, 13: 2148-2158, 2003.
- De Lucia, F., Lorain, S., Scamps, C., Galisson, F., MacHold, J., Lipinski, M.** Subnuclear localization and mitotic phosphorylation of HIRA, the human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional regulators Hir1p/Hir2p. *Biochem J*, 358: 447-455, 2001.
- DeSilva, H., Lee, K., Osley, M. A.** Functional dissection of yeast Hir1p, a WD repeat-containing transcriptional corepressor. *Genetics*, 148: 657-667, 1998.
- Dimova, D., Nackerdien, Z., Furgeson, S., Eguchi, S., Osley, M. A.** A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex. *Mol Cell*, 4: 75-83, 1999.
- Eitoku, M., Sato, L., Senda, T., Horikoshi, M.** Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly. *Cell Mol Life Sci*, 65: 414-444, 2008.
- Elgin, S. C., Schilling, J., Hood, L. E.** Sequence of histone 2B of *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry*, 18: 5679-5685, 1979.
- English, C. M., Adkins, M. W., Carson, J. J., Churchill, M. E., Tyler, J. K.** Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell*, 127: 495-508, 2006.
- Enomoto, S., McCune-Zierath, P. D., Gerami-Nejad, M., Sanders, M. A., Berman, J.** RLF2, a subunit of yeast chromatin assembly factor-I, is required for telomeric chromatin function in vivo. *Genes Dev*, 11: 358-370, 1997.
- Escargueil, A. E., Soares, D. G., Salvador, M., Larsen, A. K., Henriques, J. A.** What histone code for DNA repair? *Mutat Res*, 658: 259-270, 2008.
- Fletcher, T. M., Hansen, J. C.** The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 6: 149-188, 1996.
- Formosa, T., Ruone, S., Adams, M. D., Olsen, A. E., Eriksson, P., Yu, Y., Rhoades, A. R., Kaufman, P. D., Stillman, D. J.** Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure. *Genetics*, 162: 1557-1571, 2002.
- Franco, A. A., Lam, W. M., Burgers, P. M., Kaufman, P. D.** Histone deposition protein Asf1 maintains DNA replisome integrity and interacts with replication factor C. *Genes Dev*, 19: 1365-1375, 2005.
- Funke, B., Puech, A., Saint-Jore, B., Pandita, R., Skoultchi, A., Morrow, B.** Isolation and characterization of a human gene containing a nuclear localization signal from the critical region for velo-cardio-facial syndrome on 22q11. *Genomics*, 53: 146-154, 1998.

- Gaillard, P. H., Martini, E. M., Kaufman, P. D., Stillman, B., Moustacchi, E., Almouzni, G.** Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. *Cell*, 86: 887-896, 1996.
- Gavalas, A., Zalkin, H.** Analysis of the chicken GPAT/AIRC bidirectional promoter for de novo purine nucleotide synthesis. *J Biol Chem*, 270: 2403-2410, 1995.
- Green, E. M., Antczak, A. J., Bailey, A. O., Franco, A. A., Wu, K. J., Yates, J. R., 3rd Kaufman, P. D.** Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Curr Biol*, 15: 2044-2049, 2005.
- Greiner, M., Caesar, S., Schlenstedt, G.** The histones H2A/H2B and H3/H4 are imported into the yeast nucleus by different mechanisms. *Eur J Cell Biol*, 83: 511-520, 2004.
- Groth, A., Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Lukas, J., Bartek, J., Almouzni, G.** Human Asf1 regulates the flow of S phase histones during replicational stress. *Mol Cell*, 17: 301-311, 2005.
- Gunjan, A., Verreault, A.** A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell*, 115: 537-549, 2003.
- Halford, S., Wadey, R., Roberts, C., Daw, S. C., Whiting, J. A., O'Donnell, H., Dunham, I., Bentley, D., Lindsay, E., Baldini, A. et al.** Isolation of a putative transcriptional regulator from the region of 22q11 deleted in DiGeorge syndrome, Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease. *Hum Mol Genet*, 2: 2099-2107, 1993.
- Hall, C., Nelson, D. M., Ye, X., Baker, K., DeCaprio, J. A., Seeholzer, S., Lipinski, M., Adams, P. D.** HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol Cell Biol*, 21: 1854-1865, 2001.
- Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166: 557-580, 1983.
- Hansen, J. C.** Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31: 361-392, 2002.
- Hansen, J. C., Tse, C., Wolffe, A. P.** Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry*, 37: 17637-17641, 1998.
- Hentschel, C., Birnstiel, M. L.** The organization and expression of histone gene families. *Cell*, 25: 301-313, 1981.
- Hereford, L., Bromley, S., Osley, M. A.** Periodic transcription of yeast histone genes. *Cell*, 30: 305-310, 1982.
- Hereford, L. M., Osley, M. A., Ludwig, T. R., McLaughlin, C. S.** Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA. *Cell*, 24: 367-375, 1981.

- Hildebrandt, T., Preiherr, J., Klostermann, S., Kaul, S., Zendman, A. J., Van Muijen, G. N., Weidle, U. H.** Identification of URIM, a novel gene up-regulated in metastasis. *Anticancer Res*, 19: 525-530, 1999.
- Ito, T., Tyler, J. K., Kadonaga, J. T.** Chromatin assembly factors: a dual function in nucleosome formation and mobilization? *Genes Cells*, 2: 593-600, 1997.
- Kamakaka, R. T., Bulger, M., Kaufman, P. D., Stillman, B., Kadonaga, J. T.** Postreplicative chromatin assembly by Drosophila and human chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol*, 16: 810-817, 1996.
- Kaufman, P. D., Cohen, J. L., Osley, M. A.** Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I. *Mol Cell Biol*, 18: 4793-4806, 1998.
- Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N., Stillman, B.** The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell*, 81: 1105-1114, 1995.
- Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Stillman, B.** Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes Dev*, 11: 345-357, 1997.
- Kimura, H., Cook, P. R.** Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J Cell Biol*, 153: 1341-1353, 2001.
- Kirby, M. L., Waldo, K. L.** Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation*, 82: 332-340, 1990.
- Kirov, N., Shtilbans, A., Rushlow, C.** Isolation and characterization of a new gene encoding a member of the HIRA family of proteins from *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 212: 323-332, 1998.
- Krawitz, D. C., Kama, T., Kaufman, P. D.** Chromatin assembly factor I mutants defective for PCNA binding require Asf1/Hir proteins for silencing. *Mol Cell Biol*, 22: 614-625, 2002.
- Krude, T.** Chromatin assembly factor 1 (CAF-1) colocalizes with replication foci in HeLa cell nuclei. *Exp Cell Res*, 220: 304-311, 1995.
- Lamour, V., Lecluse, Y., Desmaze, C., Spector, M., Bodescot, M., Aurias, A., Osley, M. A., Lipinski, M.** A human homolog of the *S. cerevisiae* HIR1 and HIR2 transcriptional repressors cloned from the DiGeorge syndrome critical region. *Hum Mol Genet*, 4: 791-799, 1995.
- Langst, G., Becker, P. B.** Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J Cell Sci*, 114: 2561-2568, 2001.
- Laskey, R. A., Earnshaw, W. C.** Nucleosome assembly. *Nature*, 286: 763-767, 1980.

- Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D., Finch, J. T.** Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 275: 416-420, 1978.
- Lennartsson, A., Ekwall, K.** Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta*, 2009.
- Li, D., Roberts, R.** WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 58: 2085-2097, 2001.
- Lindsey-Boltz, L. A., Chawla, G., Srinivasan, N., Vijayraghavan, U., Garcia-Blanco, M. A.** The carboxy terminal WD domain of the pre-mRNA splicing factor Prp17p is critical for function. *Rna*, 6: 1289-1305, 2000.
- Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurencon, A., Karr, T. L., Couble, P.** The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature*, 437: 1386-1390, 2005.
- Lorain, S., Quivy, J. P., Monier-Gavelle, F., Scamps, C., Lecluse, Y., Almouzni, G., Lipinski, M.** Core histones and HIRIP3, a novel histone-binding protein, directly interact with WD repeat protein HIRA. *Mol Cell Biol*, 18: 5546-5556, 1998.
- Loyola, A., Huang, J. Y., LeRoy, G., Hu, S., Wang, Y. H., Donnelly, R. J., Lane, W. S., Lee, S. C., Reinberg, D.** Functional analysis of the subunits of the chromatin assembly factor RSF. *Mol Cell Biol*, 23: 6759-6768, 2003.
- Loyola, A., LeRoy, G., Wang, Y. H., Reinberg, D.** Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev*, 15: 2837-2851, 2001.
- Loyola, A., Reinberg, D.** Histone deposition and chromatin assembly by RSF. *Methods*, 31: 96-103, 2003.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J.** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389: 251-260, 1997.
- Magnaghi, P., Roberts, C., Lorain, S., Lipinski, M., Scambler, P. J.** HIRA, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional co-repressors, interacts with Pax3. *Nat Genet*, 20: 74-77, 1998.
- Majka, J., Burgers, P. M.** The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 78: 227-260, 2004.
- McKittrick, E., Gafken, P. R., Ahmad, K., Henikoff, S.** Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1525-1530, 2004.
- Meeks-Wagner, D., Hartwell, L. H.** Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity of mitotic chromosome transmission. *Cell*, 44: 43-52, 1986.



- Mello, J. A., Sillje, H. H., Roche, D. M., Kirschner, D. B., Nigg, E. A., Almouzni, G.** Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep*, 3: 329-334, 2002.
- Moggs, J. G., Grandi, P., Quivy, J. P., Jonsson, Z. O., Hubscher, U., Becker, P. B., Almouzni, G.** A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol Cell Biol*, 20: 1206-1218, 2000.
- Mosammaparast, N., Ewart, C. S., Pemberton, L. F.** A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *Embo J*, 21: 6527-6538, 2002a.
- Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Pemberton, L. F.** Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J Biol Chem*, 277: 862-868, 2002b.
- Mousson, F., Lautrette, A., Thuret, J. Y., Agez, M., Courbeyrette, R., Amigues, B., Becker, E., Neumann, J. M., Guerois, R., Mann, C., Ochsenbein, F.** Structural basis for the interaction of Asf1 with histone H3 and its functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 5975-5980, 2005.
- Mousson, F., Ochsenbein, F., Mann, C.** The histone chaperone Asf1 at the crossroads of chromatin and DNA checkpoint pathways. *Chromosoma*, 116: 79-93, 2007.
- Munakata, T., Adachi, N., Yokoyama, N., Kuzuhara, T., Horikoshi, M.** A human homologue of yeast anti-silencing factor has histone chaperone activity. *Genes Cells*, 5: 221-233, 2000.
- Nakagawa, T., Bulger, M., Muramatsu, M., Ito, T.** Multistep chromatin assembly on supercoiled plasmid DNA by nucleosome assembly protein-1 and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *J Biol Chem*, 276: 27384-27391, 2001.
- Nakatani, Y., Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Tagami, H., Almouzni, G.** Two distinct nucleosome assembly pathways: dependent or independent of DNA synthesis promoted by histone H3.1 and H3.3 complexes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 69: 273-280, 2004.
- Natsume, R., Eitoku, M., Akai, Y., Sano, N., Horikoshi, M., Senda, T.** Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4. *Nature*, 446: 338-341, 2007.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., Smith, T. F.** The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371: 297-300, 1994.
- Neves-Costa, A., Varga-Weisz, P.** The roles of chromatin remodelling factors in replication. *Results Probl Cell Differ*, 41: 91-107, 2006.
- Nicholson, J. M., Wood, C. M., Reynolds, C. D., Brown, A., Lambert, S. J., Chantalat, L., Baldwin, J. P.** Histone structures: targets for modifications by molecular assemblies. *Ann N Y Acad Sci*, 1030: 644-655, 2004.

- Osley, M. A., Lycan, D.** Trans-acting regulatory mutations that alter transcription of *Saccharomyces cerevisiae* histone genes. *Mol Cell Biol*, 7: 4204-4210, 1987.
- Paddock, S. W.** Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Mol Biotechnol*, 16: 127-149, 2000.
- Parthun, M. R., Widom, J., Gottschling, D. E.** The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell*, 87: 85-94, 1996.
- Peitsch, M. C., Wells, T. N., Stampf, D. R., Sussman, J. L.** The Swiss-3DImage collection and PDB-Browser on the World-Wide Web. *Trends Biochem Sci*, 20: 82-84, 1995.
- Prochasson, P., Florens, L., Swanson, S. K., Washburn, M. P., Workman, J. L.** The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF. *Genes Dev*, 19: 2534-2539, 2005.
- Quivy, J. P., Grandi, P., Almouzni, G.** Dimerization of the largest subunit of chromatin assembly factor 1: importance in vitro and during *Xenopus* early development. *Embo J*, 20: 2015-2027, 2001.
- Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Scamps, C., Martini, E. M., Lipinski, M., Almouzni, G.** HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell*, 9: 1091-1100, 2002.
- Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Sillje, H. W., Nigg, E. A., Almouzni, G.** The histone chaperone Asf1 is dispensable for direct de novo histone deposition in *Xenopus* egg extracts. *Chromosoma*, 116: 487-496, 2007.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., Reed, S. I.** Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol*, 14: 1669-1679, 1994.
- Resnitzky, D., Reed, S. I.** Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. *Mol Cell Biol*, 15: 3463-3469, 1995.
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M., Grunstein, M.** HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 14503-14508, 1996.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., Pavletich, N. P.** Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, 382: 325-331, 1996.
- Sanematsu, F., Takami, Y., Barman, H. K., Fukagawa, T., Ono, T., Shibahara, K., Nakayama, T.** Asf1 is required for viability and chromatin assembly during DNA replication in vertebrate cells. *J Biol Chem*, 281: 13817-13827, 2006.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74: 5463-5467, 1977.

- Santos-Rosa, H.Caldas, C.** Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*, 41: 2381-2402, 2005.
- Scambler, P. J., Kelly, D., Lindsay, E., Williamson, R., Goldberg, R., Shprintzen, R., Wilson, D. I., Goodship, J. A., Cross, I. E.Burn, J.** Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet*, 339: 1138-1139, 1992.
- Schermer, U. J., Korber, P.Horz, W.** Histones are incorporated in trans during reassembly of the yeast PHO5 promoter. *Mol Cell*, 19: 279-285, 2005.
- Schwartz, B. E.Ahmad, K.** Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev*, 19: 804-814, 2005.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N.Peitsch, M. C.** SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 31: 3381-3385, 2003.
- Sharp, J. A., Fouts, E. T., Krawitz, D. C.Kaufman, P. D.** Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing. *Curr Biol*, 11: 463-473, 2001.
- Sharp, J. A., Rizki, G.Kaufman, P. D.** Regulation of histone deposition proteins Asf1/Hir1 by multiple DNA damage checkpoint kinases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 171: 885-899, 2005.
- Sherwood, P. W.Osley, M. A.** Histone regulatory (hir) mutations suppress delta insertion alleles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 128: 729-738, 1991.
- Sherwood, P. W., Tsang, S. V.Osley, M. A.** Characterization of HIR1 and HIR2, two genes required for regulation of histone gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 13: 28-38, 1993.
- Shibahara, K.Stillman, B.** Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell*, 96: 575-585, 1999.
- Sillje, H. H.Nigg, E. A.** Identification of human Asf1 chromatin assembly factors as substrates of Tousled-like kinases. *Curr Biol*, 11: 1068-1073, 2001.
- Smith, S.Stillman, B.** Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell*, 58: 15-25, 1989.
- Smith, S.Stillman, B.** Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro. *Embo J*, 10: 971-980, 1991.
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K.Neer, E. J.** The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 24: 181-185, 1999.
- Sobel, R. E., Cook, R. G.Allis, C. D.** Non-random acetylation of histone H4 by a cytoplasmic histone acetyltransferase as determined by novel methodology. *J Biol Chem*, 269: 18576-18582, 1994.

- Sobel, R. E., Cook, R. G., Perry, C. A., Annunziato, A. T., Allis, C. D.** Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 1237-1241, 1995.
- Sogo, J. M., Stahl, H., Koller, T., Knippers, R.** Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *J Mol Biol*, 189: 189-204, 1986.
- Spector, M. S., Raff, A., DeSilva, H., Lee, K., Osley, M. A.** Hir1p and Hir2p function as transcriptional corepressors to regulate histone gene transcription in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Mol Cell Biol*, 17: 545-552, 1997.
- Sutton, A., Bucaria, J., Osley, M. A., Sternglanz, R.** Yeast ASF1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription. *Genetics*, 158: 587-596, 2001.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., Nakatani, Y.** Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, 116: 51-61, 2004.
- Tang, Y., Poustovoitov, M. V., Zhao, K., Garfinkel, M., Canutescu, A., Dunbrack, R., Adams, P. D., Marmorstein, R.** Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 13: 921-929, 2006.
- Taunton, J., Hassig, C. A., Schreiber, S. L.** A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, 272: 408-411, 1996.
- Thoma, F., Koller, T., Klug, A.** Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol*, 83: 403-427, 1979.
- Tsukiyama, T., Daniel, C., Tamkun, J., Wu, C.** ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell*, 83: 1021-1026, 1995.
- Tsukiyama, T., Wu, C.** Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell*, 83: 1011-1020, 1995.
- Tyler, J. K., Bulger, M., Kamakaka, R. T., Kobayashi, R., Kadonaga, J. T.** The p55 subunit of *Drosophila* chromatin assembly factor 1 is homologous to a histone deacetylase-associated protein. *Mol Cell Biol*, 16: 6149-6159, 1996.
- Tyler, J. K., Collins, K. A., Prasad-Sinha, J., Amiott, E., Bulger, M., Harte, P. J., Kobayashi, R., Kadonaga, J. T.** Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol Cell Biol*, 21: 6574-6584, 2001.
- Umehara, T., Horikoshi, M.** Transcription initiation factor IID-interactive histone chaperone CIA-II implicated in mammalian spermatogenesis. *J Biol Chem*, 278: 35660-35667, 2003.

- van der Heijden, G. W., Dieker, J. W., Derijck, A. A., Muller, S., Berden, J. H., Braat, D. D., van der Vlag, J.de Boer, P.** Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev*, 122: 1008-1022, 2005.
- Vaquero, A., Loyola, A.Reinberg, D.** The constantly changing face of chromatin. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2003: RE4, 2003.
- Varga-Weisz, P. D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M.Becker, P. B.** Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature*, 388: 598-602, 1997.
- Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R.Stillman, B.** Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell*, 87: 95-104, 1996.
- Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R.Stillman, B.** Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr Biol*, 8: 96-108, 1998.
- Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G.Sprang, S. R.** The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell*, 83: 1047-1058, 1995.
- White, J. H., Green, S. R., Barker, D. G., Dumas, L. B.Johnston, L. H.** The CDC8 transcript is cell cycle regulated in yeast and is expressed coordinately with CDC9 and CDC21 at a point preceding histone transcription. *Exp Cell Res*, 171: 223-231, 1987.
- Widom, J.** Chromatin: the nucleosome unwrapped. *Curr Biol*, 7: R653-655, 1997.
- Widom, J.** Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 27: 285-327, 1998.
- Wilming, L. G., Snoeren, C. A., van Rijswijk, A., Grosveld, F.Meijers, C.** The murine homologue of HIRA, a DiGeorge syndrome candidate gene, is expressed in embryonic structures affected in human CATCH22 patients. *Hum Mol Genet*, 6: 247-258, 1997.
- Woodcock, C. L., Grigoryev, S. A., Horowitz, R. A.Whitaker, N.** A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 9021-9025, 1993.
- Wu, D. Y., Ugozzoli, L., Pal, B. K., Qian, J.Wallace, R. B.** The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol*, 10: 233-238, 1991.
- Xu, H., Kim, U. J., Schuster, T.Grunstein, M.** Identification of a new set of cell cycle-regulatory genes that regulate S-phase transcription of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 12: 5249-5259, 1992.

**Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H. A., Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. A., Dunbrack, R. L., Pehrson, J. R., Berger, J. M., Kaufman, P. D. Adams, P. D.** Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell*, 8: 19-30, 2005.

**Zhu, L., Harlow, E. Dynlacht, B. D.** p107 uses a p21CIP1-related domain to bind cyclin/cdk2 and regulate interactions with E2F. *Genes Dev*, 9: 1740-1752, 1995.

**Zlatanova, J. Leuba, S. H.** Chromatin fibers, one-at-a-time. *J Mol Biol*, 331: 1-19, 2003.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hinrich Abken für die Betreuung meiner Arbeit. Dank der regelmäßigen Gespräche mit ihm über die experimentellen Fortschritte, seiner konstruktiven Kritik und den anregenden Diskussionen über erzielte Ergebnisse, wurde die Anfertigung dieser Arbeit überhaupt erst möglich. Seine Menschlichkeit und sein Verständnis-sowohl bei der Arbeit, als auch ausserhalb des Labors- haben mich sehr beeindruckt. Selbstverständlich bedanke ich mich auch für die Begutachtung dieser Dissertation.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Thomas Langer, in dessen Labor ich schon eine gute Zeit während meiner Diplomarbeit verbracht habe, für seine Bereitschaft die Betreuung dieser Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu übernehmen und für die Übernahme des Ko-Referats.

Weiterhin danke ich Frau PD Dr. Annette Schmidt von der Sporthochschule Köln für ihre Hilfe und Kompetenz am Laser-Scan Mikroskop und Prof. Dr. Timo Schinköthe für die Einführung in das Thema am Beginn dieser Arbeit.

Ein riesengroßes Dankeschön möchte ich allen meinen Kollegen in der AG Abken sagen. Es war mir eine Freude mit Euch zu arbeiten und zu feiern. Den Leuten in 708 kann ich nur danken, dass ihr mich mit meinen teilweise heftig schwankenden Launen ausgehalten habt.

Auch all meinen Freunden, die ich hier namentlich nicht erwähne, möchte ich danken. Ihr habt das gemacht, wozu Freunde eben da sind- Spass haben, zuhören, ablachen, Verständnis zeigen. Ich bin sehr dankbar, dass ich so gute Freunde wie Euch habe.

Meiner Familie danke ich für die große Unterstützung und dafür, dass ihr immer an mich glaubt. Ich liebe Euch sehr.

Mein Schatz- nun ist es soweit und wir sind unserem Traum wieder ein Schritt näher. Danke für Deine Liebe, Deine Geduld, Dein Verständnis... . Du bist das Beste was mir je passiert ist.  
Σ'αγαπω παρα πολυ.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Thomas Langer und Prof. Dr. Hinrich Abken betreut worden.

Köln, den 10. Februar 2009

---

Björn Friedrichs



## Lebenslauf

Name : Björn Friedrichs  
Geburtsdatum und -ort : 29.09.1975 in Stendal  
Staatsangehörigkeit : deutsch  
Familienstand : ledig  
Adresse : Vogelsanger Weg 48, 50354 Hürth  
E-mail : bjoern.friedrichs@uni-koeln.de

### Schulische Ausbildung :

1982-1991 Besuch der POS Pablo-Neruda in Stendal  
1991-1994 Besuch des Winckelmann-Gymnasiums Stendal, Abschluss: Abitur

### Akademische Ausbildung :

1995-1997 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
1997-2004 Studium der Biologie an der Universität zu Köln  
2004-2005 Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität Köln im Labor von Prof. Dr. Thomas Langer  
Thema : « Untersuchungen zur Prozessierung von Cytochrom *c*-Peroxidase aus *S.cerevisiae* », Abschluss mit Note : sehr gut  
2005-2009 Promotion am Institut für Genetik der Universität Köln ; externe Doktorarbeit im Labor für Tumorgenetik, Klinik I für Innere Medizin, Uniklinik Köln, Prof. Dr. H. Abken, Abschluss mit Note : sehr gut

### Publikationen :

#### **m-AAA protease driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria**

T Tatsuta, S Augustin, M Nolden, B Friedrichs, T Langer  
EMBO J. 2007 Jan 24; 26(2) : 325-35.

#### **Expression of coronin-3 (coronin-1C) in diffuse gliomas is related to malignancy**

DR Thal, C-P Xavier, A Rosentreter, S Linder, B Friedrichs, A Waha, T Pietsch, M Stumpf, AA Noegel, CS Clemen  
The Journal of Pathology 2007 Dec 11 ; 214(4) : 415-24