

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Irina Frenz

aus Mosbach/Baden

Tag der mündlichen Prüfung:

THEMA

Hap46

Ein vielseitiges Protein

Gutachter Prof. Dr. Gabriele Petersen
Prof. Dr. Peter Angel

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
1 Einleitung	5
1.1 Identifikation und Klonierung von Hap/BAG-1	5
1.2 Die molekulare Organisation von Hap/BAG-1	6
1.2.1 Vom Gen zum Protein	6
1.2.2 Die BAG-Domäne	8
1.2.3 Weitere charakteristische Bereiche von Hap/BAG-1	10
1.2.4 Regulation der Expression von Hap/BAG-1	11
1.2.5 Lokalisation der Hap/BAG-1 Isoformen in der Zelle und in Geweben	11
1.3 Interaktionspartner von Hap/BAG-1	13
1.3.1 Hap/BAG-1 und hsc70	14
1.3.2 DNA-Bindung und transkriptionelle Stimulation	17
1.3.3 Interaktion mit c-Jun	19
2 Zielsetzung	21
3 Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Chemikalien und Substanzen	23
3.1.2 Bakterienstämme	24
3.1.3 Purifizierte Proteine und Enzyme	24
3.1.4 Verwendete Antikörper	25
3.1.5 Eukaryotische Expressionsvektoren	25
3.1.6 Prokaryotische Expressionsvektoren	26
3.2 Allgemeine Methoden DNA	27
3.2.1 Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	27

3.2.2	Gewinnung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab	27
3.2.3	Analyse von DNA auf Agarosegelen	28
3.2.4	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
3.2.5	Aufreinigung von PCR-Fragmenten	29
3.2.6	DNA Konzentrationsbestimmung	29
3.2.7	Ligation	29
3.2.8	Herstellung elektrokompenter Zellen	30
3.2.9	Elektroporation	30
3.2.10	Anlegen einer Glycerin-Dauerkultur	31
3.2.11	Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	31
3.2.12	Generierung sich überlappender Fragmente des CMV-Promotors über PCR	31
3.2.13	Sequenzierung	32
3.2.14	Klonierung von pRSV-Hap46, Hap46 Δ N16, Hap46 Δ C47	33
3.2.15	Site-directed-Mutagenese	34
3.2.16	Radioaktive End-Markierung von DNA mittels terminaler Polynukleotid- Kinase	35
3.3	Allgemeine Methoden Proteine	35
3.3.1	Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	35
3.3.2	Proteinmengenbestimmung über Bradford	37
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.3.4	Immuno-Blotting	38
3.3.5	Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie	38
3.3.6	Peptidsynthese	39
3.4	Allgemeine Methoden Zellkultur	41
3.4.1	Zellkultur von F9 und Hela Zellen	41
3.4.2	Bestimmung der Zellzahl	42
3.4.3	Transfektion mit Transfektin	42
3.4.4	Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität in transfizierten Zellen	42
3.4.5	Nachweis der Luciferase in Extrakten transfizierter Zellen	43
3.5	Spezielle Methoden und Versuchsaufbau	43

3.5.1	Gel-Retardationsanalysen	43
3.5.2	Analyse membrangebundener Peptide	44
3.5.3	Bindungsstudien mit Hap46, hsc70 und c-Jun mittels der Elisa-Methode	45
3.5.4	Interaktionsanalyse von Hap46 mit Matrix-gekoppelten Jun-Varianten	45
3.5.5	JNK-abhängige Phosphorylierung von c-Jun in Gegenwart von Hap46	46
3.5.6	Einfluß von Hap46 auf die c-Jun abhängige Transkription <i>in vivo</i>	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Charakterisierung der Bindung von Hap46 und hsc70	49
4.1.1	Beitrag der Aminosäuren der Regionen I und IV von hsc70 bei der Bindung an Hap46	49
4.1.2	Außer der C-terminalen Domäne von Hap46 sind noch andere Regionen bei der Bindung an hsc70 von Bedeutung	52
4.1.3	Der N-terminale Bereich von Hap46 ist wichtig für die Bindung an hsc70	55
4.2	Analysen zur Bindung von Hap46 an DNA	56
4.2.1	Optimierung der Gel-Retardationsanalysen mit Hap46 und DNA	57
4.2.2	Hohe Flexibilität der Aminosäuren von Hap46 bei der Bindung an DNA	59
4.3	Hap46 und c-Jun	62
4.3.1	Teil I - Interaktions-Analysen von Hap46 und c-Jun	62
4.3.2	Teil II - Interaktions-Analysen von Hap46 und c-Jun	66
4.3.3	Einfluß von Hap46 auf die c-Jun abhängige Transkription-Ausblicke	74
5	Diskussion	77
5.1	Interaktion von Hap46 und hsc70	77
5.2	Interaktion von Hap46 und DNA	81
5.3	Interaktion von Hap46 und c-Jun	84
A	Abkürzungsliste	91
B	Publikationen	93
C	Danksagung	95
	Literatur	97

Zusammenfassung

Hap46 ist ein multifunktionales Protein, welches über direkte Bindungspartner oder indirekt, über hsc70 als Brückenprotein, auf zelluläre Vorgänge wie Apoptose, Transkription, Signaltransduktion und Proliferation einwirken kann. Zudem fungiert es als Co-Chaperon von hsc70. Um die vielfältigen Funktionen von Hap46 innerhalb der Zelle besser verstehen und einordnen zu können, vor allem im Hinblick darauf, daß Hap46 bei vielen Tumorarten eine veränderte Expression aufweist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Interaktion von Hap46 mit dem Chaperon hsc70, mit DNA und mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun näher untersucht.

Auf einer hervorstehenden Protuberanz der ATPase-Domäne von hsc70 konnten für die Bindung an Hap46 wichtige Aminosäuren identifiziert werden: Glutamin²² und Lysin²⁵. Interaktionsregionen von hsc70 auf Hap46 wurden durch Analyse membrangebundener Peptide identifiziert. Der quantitative Beitrag dieser Interaktionsregionen wurde mittels Elisa-Analysen mit gekoppeltem hsc70 und Deletionsmutanten von Hap46 überprüft. Es zeigte sich, daß außer dem C-Terminus von Hap46, welcher für die Bindung an hsc70 essentiell ist (BAG-Domäne), auch die N-terminalen ersten zehn Aminosäuren einen wesentlichen Beitrag für die Interaktion der beiden Proteine leisten. Diese N-terminalen Aminosäuren sind essentiell für die DNA-Bindung von Hap46. Mutationsanalysen des DNA-Bindungsmotivs mit anschließender Überprüfung des Bindungsverhaltens über Gel-Retardationsassays ergaben, daß die beiden mittleren Aminosäuren zweier basischer Triplets, das Lysin³ und Arginin⁷, zusammen mit den jeweils benachbarten Aminosäuren eine wichtige Rolle spielen. Die Bindung von Hap46 an DNA zeigte zudem eine hohe Flexibilität, die dann zum Tragen kommt, wenn Hap46 außer mit DNA mit anderen Proteinen interagiert. So konnte ebenfalls in Gel-Retardationsassays nachgewiesen werden, daß an DNA gebundenes Hap46 immer noch mit c-Jun interagieren kann. Dies ist insofern von Bedeutung, da die DNA-Bindungsregion von Hap46 als eine wichtige Interaktionsplattform von c-Jun identifiziert wurde. Mittels Elisa-Analysen wurde gezeigt, daß sich die Affinität der Deletionsmutante Hap46 Δ N16, bei der die ersten 16 Aminosäuren von Hap46 deletiert sind, zu c-Jun um 60% verringerte. Umgekehrt konnten über Analyse membrangebundener Peptide Interaktionsregionen von Hap46 auf c-Jun identifiziert werden. Diese umfassen die DNA-Bindungsdomäne von c-Jun, den Leuzin-Zipper und die JNK-Binderegion. Letztere Region wurde hierbei näher untersucht, wobei über Mutationsanalysen die Aminosäuren Lysin an den Positionen 32, 35, 50 und 56, und Arginin an Position 54 als für die Bindung an Hap46 notwendig identifiziert wurden. Obwohl die Bindungsregionen von Hap46 und JNK auf c-Jun identisch sind, beeinträchtigt die Bindung von Hap46 an c-Jun *in vitro* die Phosphorylierung durch JNK nicht. *In vivo* weisen jedoch vorläufige Daten darauf hin, daß Hap46 die c-Jun abhängige Transkription reprimiert.

Abstract

Hap46 is a multifunctional protein that contributes to many cellular processes, like apoptosis, transcription, and proliferation, by interacting either directly with other molecules or indirectly, with hsc70 as a bridging protein. In addition, it also functions as a co-chaperone for hsc70. Especially since Hap46 is known to have an altered expression in many tumors, the interaction of Hap46 with the chaperone hsc70, with DNA, and with the transcription factor c-Jun was examined in more detail to obtain a deeper understanding of the various roles of Hap46 in the processes inside a cell. On a prominent protuberance within the ATPase-domain of hsc70 amino acids were identified that are important for the interaction with Hap46: glutamin²² and lysin²⁵. Furthermore, by means of analysis of membrane-bound peptides, interaction regions of hsc70 on Hap46 were identified. The quantitative contribution of these interaction regions were examined by applying the Elisa-technique with coupled hsc70 and using deletion-mutants of Hap46. It was shown that not only the C-terminal part of Hap46 (BAG-domain), that is essential for hsc70 binding, but also the N-terminal first ten amino acids have a substantial contribution to the interaction of the two proteins. These N-terminal amino acids are essential for the DNA-binding of Hap46. Mutational analyses of the DNA-binding motif with subsequent examination of the binding by gel-retardation-assays showed that the lysin³ and the arginin⁷, together with their neighboring amino acids contribute strongly to the binding to DNA. Furthermore, these amino acids show a high flexibility by the interaction with DNA. This flexibility is important if Hap46 interacts simultaneously with DNA and other proteins. So it was shown, also in gel-retardation-analyses, that Hap46 bound to DNA is still able to interact with c-Jun. This is so far of relevance as the DNA-binding region of Hap46 could be identified as an important interaction platform for c-Jun. Using the Elisa-technique it was shown that the affinity for the deletion mutant Hap46 Δ N16, a variant of Hap46 missing the first 16 amino acids, to bind to c-Jun was reduced by 60%. Vice versa, analyses of membrane bound peptides identified interaction regions of Hap46 on c-Jun. These include the DNA-binding domain of c-Jun, the Leucin-Zipper, and the JNK docking-site. Mutational analyses of the last showed that lysin at positions 32, 35, 50, and 56, and arginine, at position 54, are important for the interaction with Hap46. Although the binding regions of Hap46 and JNK on c-Jun are identical, Hap46 does not hinder the JNK-dependent phosphorylation of c-Jun *in vitro*. However, preliminary data suggest that Hap46 reduces c-Jun dependent transcription *in vivo*.

1

Einleitung

Das ubiquitär exprimierte Hap46 ist ein multifunktionales Protein, welches bei der Modulation vielfältiger zellulärer Prozesse beteiligt ist. Hap46 kann mit verschiedensten Molekülen direkt oder indirekt interagieren und so zur Regulation von Apoptose, Transkription, Signaltransduktion, Proliferation und der zellulären Streßantwort beitragen. Zum einen lassen sich viele dieser pleiotropen Effekte von Hap46 durch Interaktion mit molekularen Chaperonen der hsp70/hsc70-Familie erklären, zum anderen existieren verschiedene Isoformen des hsc70-assoziierten Proteins, mit teilweise unterschiedlichen Eigenschaften. Da Hap46 bei vielen humanen Krebsarten eine veränderte Expression aufweist, wird die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die von Hap46 beeinflusst werden, besonders wichtig.

1.1 Identifikation und Klonierung von Hap/BAG-1

Hap46/BAG-1M wurde von drei Arbeitsgruppen bei der Suche nach Interaktionspartnern für die jeweiligen Proteine, die im Mittelpunkt deren Forschung standen, unabhängig voneinander entdeckt [125, 107, 5]. Gehring et al. [125, 126] konnten bei der Durchsuchung einer humanen Expressions-Bank aus Leber mit dem aus Sf9-Insektenzellen gewonnenen aktivierten Glukokortikoid-Rezeptor eine 1322bp lange cDNA identifizieren und klonieren, welche für ein Protein mit einer Länge von 274 Aminosäuren kodiert. Das gefundene Protein wurde zuerst RAP46 benannt, was für Rezeptor-assoziiertes Protein mit einer apparenten Größe von 46 kDa steht (GeneBank accession no. Z35491). Da sich bei weiteren Versuchen jedoch das Hitzeschockprotein hsp70/hsc70 als ein bedeutender Interaktionspartner herausstellte, wurde die Bezeichnung hsp70/hsc70-assoziiertes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 46 kDa (Hap46) eingeführt. Zeitgleich dazu durchsuchten Takayama et al. [107] eine Maus-Embryo cDNA-Bank mit dem anti-apoptotischen Protein bcl-2 und fanden eine cDNA, welche für ein Protein mit 219 Aminosäuren kodiert. Nach Überexpression in Zellen, wurde festge-

stellt, daß diese weniger auf apoptotische Stimuli ansprechen, daher wurde der Name bcl-2 assoziiertes Athanogen gewählt (aus dem griechischen athanatos: gegen den Tod). Bardelli et al. [5] konnten beim Durchsuchen der gleichen Datenbank mit dem Plasma-Membran-Rezeptor des Hepatocyten Wachstumsfaktors ähnliche Sequenzen wie Takayama et al. klonieren. Das murine BAG-1 (mBAG-1) zeigt eine große Übereinstimmung zu Hap46, bis auf 55 weitere Aminosäuren, welche nur im humanen Protein vorhanden waren. Das von mehreren Arbeitsgruppen klonierte humane Homolog zu Hap46, wurde als BAG-1M (GeneBank accession no. S83171) bezeichnet, und weist eine 100% Übereinstimmung mit Hap46 auf [104].

1.2 Die molekulare Organisation von Hap/BAG-1

1.2.1 Vom Gen zum Protein

Das Gen für das humane BAG-1 konnte auf Chromosom 9p12 durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit Cosmid-Klonen von hBAG-1 lokalisiert werden. Diese Region wird mit erblich bedingten Krankheiten in Verbindung gebracht, die Störungen des programmierten Zelltods während der Entwicklung aufweisen. So werden zum Beispiel bei der kutanen Syndaktylie die Hautfalten zwischen den einzelnen Fingern nicht zurückgebildet und beim Cryptophthalmos-Syndrom unterbleibt die Ausbildung der Augenlidspalte, die normalerweise durch programmierten Zelltod während der Entwicklung entsteht. Das humane BAG-1 Gen enthält sieben Exons und hat eine Länge von 10 kb [104]. Von einer einzigen transkribierten mRNA, mit einer ungefähren Länge von 1,5 kb werden außer Hap46/BAG-1M noch drei weitere Varianten, Hap50/BAG-1L, Hap33/BAG-1S und Hap29/BAG-1S über alternative Translationsinitiation, d.h. durch Verwendung unterschiedlicher Startcodons, für die Translation generiert. So teilen sich die Isoformen von Hap/BAG-1 gleiche carboxyterminale Enden und die längeren Isoformen weisen individuelle aminoternale Sequenzen auf (Abb. 1.2.1). Es gibt 7 potentielle Startcodons für die Translationsinitiation der Hap-Isoformen, welche sich im gleichen Leseraster befinden. Die Translation der Isoformen Hap46/BAG-1M, Hap33/BAG-1S und Hap29/BAG-1S wird an drei kanonischen AUG Startcodons (AUG_1 , AUG_2 und AUG_3) initiiert, wohingegen das stromaufwärts gelegene CUG (CUG_1), eines von vier nichtkanonischen Startcodons (CUG_1 bis CUG_4), für die Translationsinitiation von Hap50/BAG-1L zur Verfügung steht. Allerdings ist das erste kanonische Startcodon, AUG_1 , in der murinen Sequenz nicht konserviert, daher fehlt bei Mäusen die Isoform Hap46/BAG-1M [120, 74, 105]. Maßgeblich unterscheiden sich die Isoformen durch ihr Molekulargewicht. Die längste Isoform Hap50/BAG-1L hat 345 Aminosäuren und aufgrund ihres Arginin-reichen aminoternalen Bereiches, der allen übrigen Isoformen fehlt, einen isoelektrischen Punkt von 8,3. Die drei kürzeren Isoformen Hap46/BAG-1M mit 274 Aminosäuren, Hap33/BAG-1S mit 230 Ami-

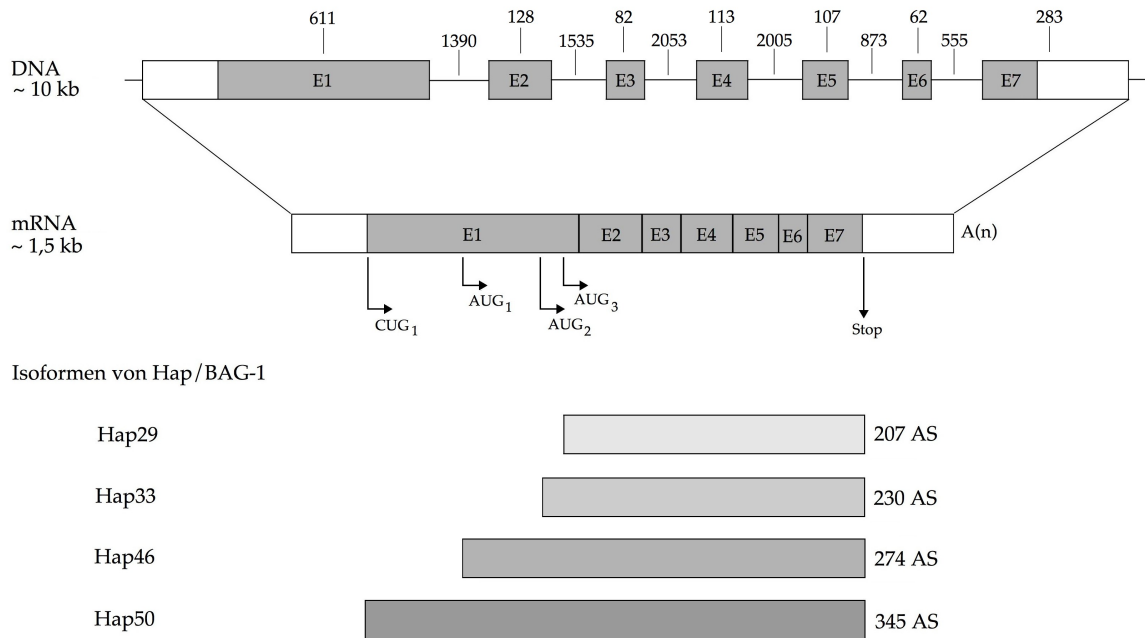


ABBILDUNG 1.2.1. Hap/BAG-1- vom Gen zum Protein: Das Gen für Hap/BAG-1 besteht aus 7 Exons (E1 bis E7). Die jeweiligen Längen der einzelnen Exons und Introns sind angegeben. Ausgehend von einer einzigen mRNA mit einer ungefähren Länge von 1,5 kb werden über Translationsinitiation an 4 verschiedenen Startcodons unterschiedlich lange Isoformen von Hap/BAG-1 gebildet (Hap29/BAG-1S, Hap33/BAG-1S, Hap46/BAG-1M und Hap50/BAG-1L).

Isoform	Startcodon	Länge in AS	apparentes Molekulargewicht (kDa)	berechnetes Molekulargewicht (kDa)	berechneter IEP
Hap50/BAG-1L	<i>CUG</i> ₁	345	50	39	8,3
Hap46/BAG-1M	<i>AUG</i> ₁	274	46	31	5,1
Hap33/BAG-1S	<i>AUG</i> ₂	230	33	26	5,2
Hap29/BAG-1S	<i>AUG</i> ₃	207	29	23	5,6

TABELLE 1.2.1. Isoformen von Hap/BAG-1 mit jeweiligen synonymialen Bezeichnungen, Startcodon der Translation, Anzahl der Aminosäuren, apparentem und berechnetem Molekulargewicht sowie dem errechneten isoelektrischen Punkt.

nosäuren und Hap29/BAG-1S mit 207 Aminosäuren weichen von dem errechneten pI von 5,1 kaum ab. In Tabelle 1.2.1 sind diese Daten nochmals zusammengefaßt.

Normalerweise werden Proteine über Cap-abhängige Translation generiert, wobei die 40S ribosomale Untereinheit, die das am 5'-Ende gekoppelte 7-Methylguanosin (Cap) erkennt und unter Mitwirkung weiterer Faktoren an diese Struktur bindet, an der mRNA entlang gleitet bis sie auf ein Startcodon trifft. Dieses ist meistens ein AUG, das für Methionin kodiert, aber in manchen Fällen, zum Beispiel für c-Myc, Int2 oder Hck, können auch ACG, CUG oder GUG diese Funktion übernehmen. Damit der Präinitiationskomplex das Startcodon gut erkennen kann, ist dies in einer geeigneten Sequenz, der sogenannten Kozak-Sequenz (GCCA/GCCAUGG) eingebettet [101]. Für die Translation der reichlich vorhandenen Isoform Hap33/BAG-1S müßte ein an der mRNA scannendes Ribosom zwei AUG und mehrere CUG Startcodons, manche im Leseraster und mit geeigneter Kozak-Sequenz, übergehen; dies wäre jedoch ein eher seltenes Ereignis. Proteine, deren mRNA's eine lange (über 300 nt), stark strukturierte 5'-untranslatierten Region mit mehreren Startcodons aufweisen, werden daher über einen alternativen Mechanismus, der IRES-abhängigen Translation, gebildet. Hierbei erfolgt die Assemblierung des Präinitiationskomplexes direkt an der internen Bindestelle für Ribosomen (IRES), unabhängig von der Cap-Struktur [17, 114, 36]. Für eine effiziente Aktivität der IRES Aktivität von Hap/BAG-1 sind unter anderem PTB (Polypyrimidine tract binding protein) und PCBP1 (poly r(C) binding protein 1) notwendig, welche die Funktion der IRES *in vitro* und *in vivo* stimulieren. Interessanterweise wird die Translation über diesen Mechanismus – im Gegensatz zur Cap-abhängigen Translation – auch bei Hitzestress und während der Apoptose aufrechterhalten, was erklären könnte, warum die Expression von Hap/BAG-1 Proteinen unter solchen Bedingungen stattfinden kann [77].

1.2.2 Die BAG-Domäne

Die minimale BAG-Domäne mit circa 70 Aminosäuren ist innerhalb der Familie der BAG-Proteine evolutionär konserviert und erlaubt die Interaktion mit Chaperonen der hsp70/hsc70-Familie (Hitzeschockproteine mit einer relativen molekularen Masse von 70 kDa). So konnten Homologe unter anderem in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), Invertebraten (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*), Amphibien (*Xenopus laevis*), Säugetieren (Mensch, Maus) und Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*) gefunden werden. Beim Menschen wurden bislang folgende sechs verschiedene Mitglieder identifiziert: BAG-1/Hap, BAG-2, BAG-3 (CAIR-1, Bis), BAG-4 (SODD), BAG-5 und BAG-6 (Scythe, BAT3). Die N-terminalen Regionen dieser BAG-Domänen Proteine sind allerdings vollständig unterschiedlich [9, 106, 95]. NMR Analysen zeigten, daß die BAG-Domäne aus drei antiparallelen α -Helices besteht, wovon Helix 2 und 3 zur direkten Interaktion mit hsp70/hsc70 beitragen [9, 96] (siehe Abb. 1.2.2)

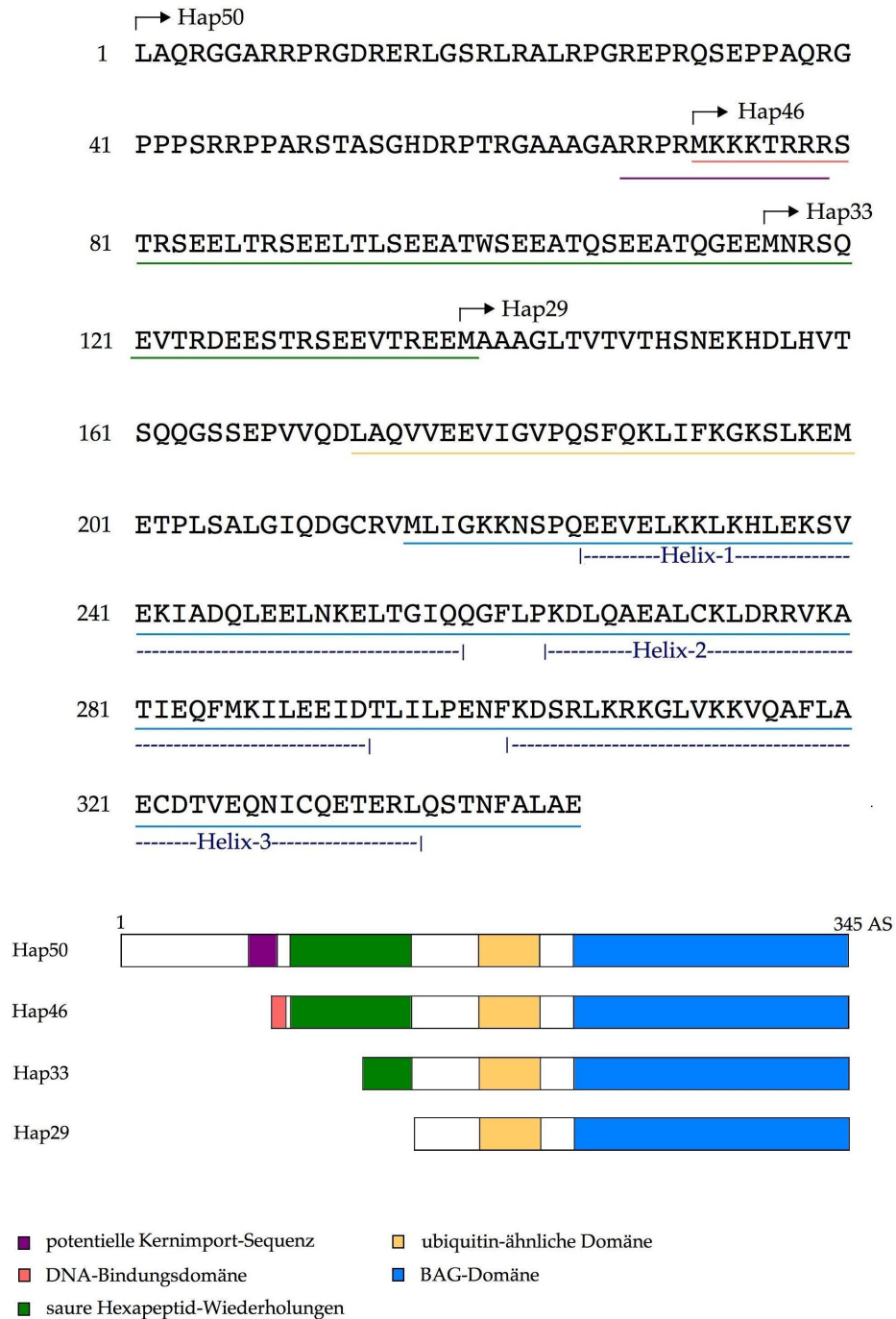


ABBILDUNG 1.2.2. Proteindomänen von Hap/BAG-1: Die verschiedenen Proteindomänen von Hap/BAG-1 wurden in der angegebenen Aminosäuresequenz und in Balkenmodellen von Hap/BAG-1 farbig gekennzeichnet. Die Pfeile in der Aminosäuresequenz geben den Anfang der jeweiligen Hap-Isoform an. Potentielle Kernimportsequenz (lila), DNA-Bindungsdomäne (lachs), saure Hexapeptid-Wiederholungen (grün), Ubiquitin-ähnliche Domäne (gelb), BAG-Domäne (blau) mit den 3 α -Helices (dunkelblau).

1.2.3 Weitere charakteristische Bereiche von Hap/BAG-1

Die Hap/BAG-1 Isoformen weisen außer der C-terminalen BAG-Domäne noch weitere charakteristische Bereiche auf. Alle Isoformen von Hap/BAG-1 besitzen eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (siehe Abb. 1.2.2) Ubiquitin ist ein kleines Protein, welches mittels der E3-Ligasen kovalent an andere Proteine binden kann und sie so für den proteasomalen Abbau markiert. Die Ubiquitin-ähnliche Domäne in Hap/BAG-1 weist ein konserviertes Lysin (Position 195 der Hap50 Isoform) auf, dessen Äquivalent in Ubiquitin für die kovalente Bindung weiterer Ubiquitin-Moleküle verantwortlich ist, um so Multi-Ubiquitin-Ketten auszubilden.

Hap/BAG-1 wird ebenfalls ubiquitinyliert, ist aber eher ein stabiles Protein. Daher ist es unwahrscheinlich, daß es im allgemeinen ein Ziel für die Degradation über das Ubiquitin/Proteasom-System darstellt. Andere Proteine mit Ubiquitin-ähnlichen Domänen sind für die Regulation des Ubiquitin-Systems zuständig. Und auch für Hap/BAG-1 konnte eine Interaktion mit den E3-Ligasen CHIP und Siah-1, und eine Stimulation der CHIP vermittelten Ubiquitinylierung von Substraten gezeigt werden [21, 55, 1, 98]. Unter anderem wird die Ubiquitin-ähnliche Domäne für die Bindung an das 26 S Proteasom benötigt, und stellt somit eine Verbindung des Proteasoms mit hsc70 Hitzeschock-Proteinen für einen erleichterten Abbau von Proteinen her [21, 55].

Die humanen Isoformen Hap46/BAG-1M und Hap50/BAG-1L haben neun Kopien eines sauren Hexapeptid-motivs mit der Konsensus-Sequenz TR/QSEEX, wohingegen die kürzere Isoform Hap33/BAG-1S nur drei Wiederholungen und Hap29/BAG-1S sogar keine aufweist (siehe Abb. 1.2.2). Die vorhergesagte Struktur dieser Domäne ist eine α -Helix, deren saure Aminosäuren in eine Richtung weisen. Die Funktion dieses Abschnittes ist noch unklar, und obwohl das Hexapeptid eine Erkennungssequenz für die Kreatinkinase-2 darstellt, konnte kein Einfluß bei der Regulation des Glukokortikoid-Rezeptors festgestellt werden [87].

Die ersten 8 bis 10 Aminosäuren der Isoform Hap46/BAG-1M konnten vor kurzem als DNA-Bindungsdomäne identifiziert werden [126] (siehe Abb. 1.2.2). Dieser kurze Abschnitt weist eine stark basische Sequenz mit drei Lysinen und drei Argininen (MKKKTRRRST) auf, welche für die Sequenz-unabhängige Bindung an DNA essentiell sind. [126, 102] Auch für die Sequenz-unabhängige Aktivierung der Transkription und die inhibitorische Funktion von Hap46 auf die Glukokortikoid-Rezeptor abhängige Transkription dürfen die ersten 10 Aminosäuren nicht fehlen.[86, 126, 69]

Eine potentielle Kernimportsequenz konnte der nukleären Isoform Hap50/BAG-1L zugeordnet werden (siehe Abb. 1.2.2), diese Sequenz überlappt zum Teil mit der DNA-Bindungsdomäne von Hap46/BAG-1M. Die Sequenz ist in humanem und murinem BAG-1 konserviert und weist Ähnlichkeit mit der Kernimportsequenz des SV40 T-Antigens (PKKKRKV) auf [74].

1.2.4 Regulation der Expression von Hap/BAG-1

Von mehreren Arbeitsgruppen konnte ein anti-apoptotischer Effekt von Hap/BAG-1, nach dessen Überexpression in verschiedenen Zellen, nachgewiesen werden [107, 5, 51, 111]. Daher ist es nicht verwunderlich, daß einige Faktoren, welche für das Überleben einer Zelle eine Rolle spielen, die Expression von Hap/BAG-1 induzieren [90, 16, 43, 66, 123, 82, 111]. In murinen BaF3 pro-B Zellen, deren Überleben und Proliferation von Interleukin-3 abhängig ist, konnte nach Entzug von Interleukin-3 eine verminderte Expression von Hap/BAG-1 festgestellt werden [16, 43]. In Übereinstimmung damit wurde in Interleukin-3 abhängigen BaF-BO3 Zellen nach Interleukin Entzug die Apoptose der Zellen mittels Überexpression von Hap33/BAG-1S hinausgezögert [16, 90]. In BaF-BO3 Zellen und in murinen 32D Myeloid-Vorläuferzellen konnte gezeigt werden, daß Interferon- γ die Neusynthese von Hap/BAG-1 RNA stimuliert [90]. Dennoch ist darauf hinzuweisen, daß die Regulation der Hap/BAG-1 Expression eher Zelltypspezifisch ist. Hap/BAG-1 wird in manchen Zellen durch Interleukin-3 bzw. Interferon- γ reguliert, in murinen 32D.3 oder FDCP-1.2 Myeloid-Vorläuferzellen ist die Expression von Hap46 jedoch nicht von Interleukin-3 bzw. in humanen RPMI8266 Myelomazellen nicht von Interferon- γ abhängig [90].

Der Promotor von Hap/BAG-1 enthält wie einige andere Promotoren, unter anderem die der Haushaltsgene, keine TATA-Box. Dafür sind aber andere typische Promotorelemente wie eine CAAT-Box an Position -468 bis -464 und sechs GC-Boxen vorhanden, die Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NF-1 und SP-1 aufweisen. Neben diesen Bindungsstellen gibt es noch viele weitere Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren, unter anderem für AP-1, CREB, GATA-1, RXR β , RAR α . An Position -472 bis -200 liegt eine CpG-Insel, daher könnte auch Methylierung eine Rolle bei der Regulation der Transkription für Hap/BAG-1 spielen.

1.2.5 Lokalisation der Hap/BAG-1 Isoformen in der Zelle und in Geweben

Die verschiedenen Isoformen von Hap/BAG-1 weisen innerhalb der Zelle eine differentielle Lokalisation auf. So findet man Hap50/BAG-1L fast ausschließlich im Nukleus, wohingegen die kürzeren Isoformen Hap29/BAG-1S und Hap33/BAG-1S vorwiegend im Cytoplasma vorliegen [10, 120, 105, 74, 69, 50]. Die mittlere Isoform Hap46/BAG-1M ist sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus anzutreffen. So wird Hap46/BAG-1M nach Hitzeschock vom Cytoplasma in den Zellkern transloziert. Dort kann Hap46/BAG-1M eine transkriptionelle Stimulation bewirken [126]. Auch bei der Herunterregulation des Glukokortikoid-Rezeptors scheint die nukleäre Translokation von Hap46/BAG-1M eine wichtige Rolle zu spielen [88]. Die Überexpression verschiedener Interaktionspartner von Hap/BAG-1 kann ebenfalls die Relokalisation von Hap/BAG-1 in intrazelluläre Organellen, in die Plasmamembran oder in den Zellkern bewirken, abhängig vom jeweiligen Bindungspartner [105, 57, 53, 4]. Auch während der

Differenzierung ändern sich Expression [24] und Lokalisation von Hap/BAG-1 [46, 75, 18, 89]. Die Expression der Hap/BAG-1 Isoformen ist gewebsspezifisch, ebenso wie die intrazelluläre Lokalisation der Isoformen in unterschiedlichen Zell-Linien [105, 34]. Die am häufigsten vorkommende Isoform ist Hap33/BAG-1S. Die Expression von Hap50/BAG-1L und Hap46/BAG-1M ist sehr variabel, in einigen normalen oder malignen Zell-Linien konnten diese Isoformen nicht nachgewiesen werden. Die kleinste Isoform, Hap29/BAG-1S, konnte in den meisten untersuchten Zell-Linien gar nicht nachgewiesen werden [105].

Die Expression von Hap/BAG-1 ist in vielen Tumorzell-Linien wie Leukämie-, Darm-, Cervix-, Prostata-, Lungen- oder Brustkarzinomen verändert [19, 120, 105, 121, 80]. In Tabelle 1.2.2 sind einige Studien bezüglich der veränderten Hap/BAG-1 Expression in verschiedenen Tumorzell-Linien aufgelistet.

Art des Tumor	prognostische Aussage der Studie	Referenz
Brustkrebs	Bessere Überlebensprognose innerhalb von 10 Jahren bei einer hohen cytoplasmatischen Hap/BAG-1 Expression	[113]
Ösophagus-Akanthom	Nukleäre Hap/BAG-1 Expression korreliert mit Tumorinvasion und einer schlechteren Überlebenschance in univariaten Analysen	[71]
Kolorektalkarzinom	Nukleäre Hap/BAG-1 Expression korreliert mit der Präsenz von entfernten Metastasen und schlechteren Überlebenschancen	[47]
Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	Allgemeine und cytoplasmatische Hap/BAG-1 Expression korreliert mit einer verbesserten Überlebenschance	[80]
Chronisch-lymphatische Leukämie	Gesteigerte Hap/BAG-1 Expression korreliert mit dem Verlust eines kompletten Ansprechens auf eine Chemotherapie	[49]
Larynx-Akanthom	Nukleäre Hap/BAG-1 Expression korreliert mit einer schlechteren Prognose für eine komplette Heilung nach einer radikalen Radiotherapie	[119]
Oral-Akanthom	Hap/BAG-1 Expression korreliert mit dem Vorhandensein von Metastasen und dem Grad des Tumors	[91]

TABELLE 1.2.2. Hap/BAG-1 Expression in Tumoren und klinisch-pathologische Relevanz

Die meisten Studien bezüglich der veränderten Expression wurden allerdings bei Tumoren der Brust durchgeführt [121, 10, 108]. So könnten Daten über die veränderte Expression und subzelluläre Lokalisation von Hap/BAG-1 eine Aussage über das Langzeit-Überleben bei Frauen mit Brustkrebs zulassen. In einer Studie von Turner et al. konnte eine erhöhte Expression von Hap/BAG-1 im Cytoplasma mit einer positiven Prognose für das Überleben von Patientinnen

in den folgenden 10 Jahren in Verbindung gebracht werden. Natürlich müssen noch weitere Studien folgen, da in anderen Arbeitsgruppen teilweise widersprüchliche Ergebnisse erhalten wurden. Sollte sich jedoch bestätigen, daß Patienten mit einer erhöhten BAG-1 Expression eine bessere Überlebenschance haben, könnte dieses Protein entscheidend für die Therapieplanung sein.

1.3 Interaktionspartner von Hap/BAG-1

Seit Hap/BAG-1 im Interesse der Forschung steht, konnten zahlreiche Interaktionspartner identifiziert werden (siehe Tabelle 1.3.1).

Funktion des Bindungspartners	Bindungspartner von Hap/BAG-1	Referenz
Signaltransduktion	Rezeptor für den HGF-Wachstumsfaktor	[5]
	Rezeptor für den PDGF-Wachstumsfaktor	[5]
	membranständiger Heparin-binding EGF-like Wachstumsfaktor	[53]
	Serine/Threonin-Kinase RAF-1	[97, 116]
Transkription	Nukleäre Hormon-Rezeptoren	[125, 51, 45, 33, 118, 54, 87, 50, 28, 20, 33]
	Retinoblastoma Protein	[4]
	DNA	[126, 70]
	c-Jun	[68, 27]
Translations-Regulation	GADD34	[41]
Apoptose	Bcl-2	[107]
Chaperon	hsc70 und hsp70	[124, 96]
Protein-Degradation	Proteasom	[55]
	CHIP	[21]
	Siah-1	[57]

TABELLE 1.3.1. Interaktionspartner von Hap/BAG-1

Eine große Gruppe sind die nukleären Hormon-Rezeptoren, wie der Glukokortikoid- (GR), Androgen- (AR), Progesteron- (PR), Östrogen- (ER), Thyroid- (TR), Retinoidsäure- (RAR) und der Vitamin- D_3 -Rezeptor, deren Aktivität von Hap/BAG-1 beeinflusst wird [125, 51, 45, 33, 118, 54, 87, 14]. So wird die Aktivierung der Transkription durch den Androgen-, Östrogen- und Vitamin- D_3 -Rezeptor durch das im Kern lokalisierte Hap50/BAG-1L stimuliert, nicht jedoch von Hap46/BAG-1M [50, 28, 20, 33]. Eine Inhibierung der Transaktivierungsaktivität durch Hap/BAG-1 wurde für den Retinoidsäure-Rezeptor berichtet, wobei die kleinere Isoform

Hap33/BAG-1S dafür ausreicht. Eine Interaktion bzw. Inhibierung der Aktivität konnte nur für RAR bzw. RAR:RXR Heterodimere, nicht aber für RXR bzw. RXR:RXR Homodimere festgestellt werden [54]. Über die Funktion von Hap/BAG-1 in Bezug auf den Glukokortikoid-Rezeptor existieren unterschiedliche Ergebnisse. So wurde zum einen nach Überexpression von Hap50/BAG-1L in verschiedenen Zellen, die von Glukokortikoiden stimulierte Expression eines Reporterkonstruktes gesteigert [70]. Zum anderen wurde von anderen Arbeitsgruppen berichtet, daß Hap46/BAG-1M einen negativen regulatorischen Effekt auf die Glukokortikoid-vermittelte Transkription hat [87, 86]. Außer den Kern-Rezeptoren gibt es für Hap/BAG-1 noch weitere Bindungspartner, welche bei der Weiterleitung zellulärer Signale beteiligt sind. Dazu zählen auch der HGF-Rezeptor, der PDGF-Rezeptor [5], der membranständige pro-HB-EGF Faktor [53] und die Serine/Threonin Kinase RAF-1, welche von Hap/BAG-1 unabhängig von Ras aktiviert werden kann. Die Bindestelle für die RAF-1 Kinase und hsc70 überlappen sich, und es konnte gezeigt werden, daß hsc70 und RAF-1 um die Bindung an Hap/BAG-1 kompetieren [97]. Hap/BAG-1 bindet unter anderem an das Proteasom und stellt somit eine Verbindung von hsc70 Hitzeschockproteinen mit dem Proteasom her [55]. Auch für Komponenten der Ubiquitinylierungsmaschinerie, wie die E3-Ligasen CHIP und Siah-, konnte eine Interaktion mit Hap/BAG-1 nachgewiesen werden [57, 21].

1.3.1 Hap/BAG-1 und hsc70

Hap/BAG-1 kann mit einer Vielzahl an Faktoren interagieren. Dies konnte jedoch mit der Interaktion von Hap/BAG-1 mit Chaperonen der hsc70-Familie erklärt werden, indem hsc70 bei manchen Bindungspartnern als Bindeglied fungierte.

Molekulare Chaperone, wie das durch Hitze oder andere Stressfaktoren induzierte hsp70 (Hitzeschockprotein mit einer molekularen Masse von 70 kDa) oder die konstitutiv exprimierte Form hsc70 (konstitutiv exprimierte Form der Hitzeschockproteine mit einer molekularen Masse von 70 kDa) [13], spielen bei zahlreichen Prozessen in der Zelle eine große Rolle. Unter anderem sind sie beteiligt bei der DNA Replikation und Transkription, dem Proteintransport durch das Endoplasmatische Retikulum und mitochondrialen Membranen, dem proteasomalen Proteinabbau, der Immunantwort und beim Überleben von Krebszellen [1, 83, 42, 59, 25, 44, 6, 64, 48]. Unter Streßbedingungen helfen Hsp70/hsc70 Chaperone Proteine vor Aggregati-

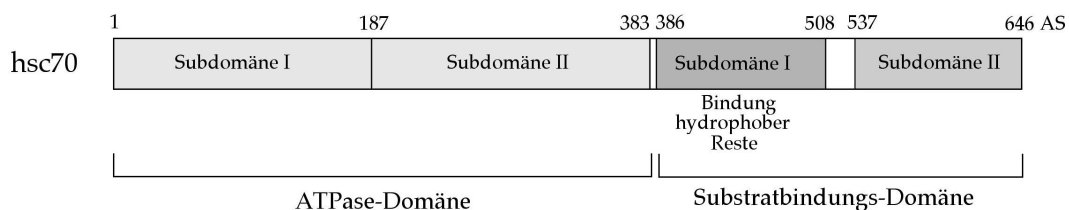


ABBILDUNG 1.3.1. Balkenmodell von hsc70 mit ATPase-Domäne und Substratbindungsdomäne

on zu schützen, indem sie hydrophobe Abschnitte binden und sie wieder in eine funktionelle Form bringen. Aber auch unter normalen Bedingungen sind diese Chaperone für die Faltung mißgefalteter oder neusynthetisierter Proteine verantwortlich.

Hsp70/hsc70 Chaperone bestehen aus zwei Domänen. Die aminoterminal gelegene ATPase-Domäne besteht aus zwei fast symmetrischen Subdomänen mit einem zentral gelegenen Spalt für die Bindung von ATP. Die Substratbindungsdomäne ist ebenfalls unterteilt, so ist Subdomäne I für die Bindung von hydrophoben Resten verantwortlich, während Subdomäne II eine Art Deckel für diese darstellt [26, 73], (siehe Abb. 1.3.1 und 1.3.2).

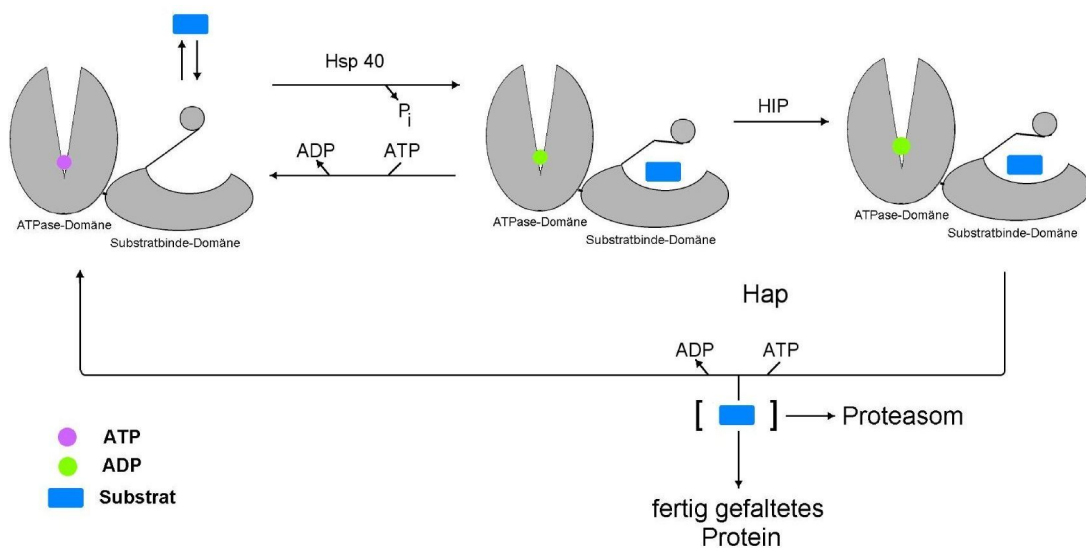


ABBILDUNG 1.3.2. Modell des ATPase-Zyklus von hsc70 mit den Co-Chaperonen Hap/BAG-1, hsp40 und Hip: Hsc70 bindet ATP und hydrolysiert es zu ADP + P_i , dieser Vorgang wird von hsp40 stimuliert. In der ATP-gebundenen Form ist die Substratbindetasche offen und die Affinität zu Substraten ist gering. Bindet nun ein Substrat an hsc70, so wird die ATP-Hydrolyse stimuliert, daraus resultiert ein stabilerer Komplex aus Substrat und ADP-gebundenem hsc70. Im letzten Schritt wird ADP gegen ATP ausgetauscht und das gefaltete Substrat wird entlassen. Hap46/BAG-1M stimuliert die ATPase-Aktivität, und bewirkt die Inhibition der ATP-abhängigen Chaperon-Funktion von hsc70. Wenn das Substrat freigegeben wurde, kann entweder ein neuer Faltungs-Zyklus erfolgen, oder das Substrat wird dem proteasomalen Abbau zugeführt.

Die Faltung von Proteinen ist von der Hydrolyse von ATP abhängig, welche mit Änderungen in der Konformation von hsp70/hsc70 einhergeht. In der ATP-gebundenen Form ist die Substratbindetasche offen und die Affinität zu Substraten ist gering. Bindet nun ein Substrat an hsc70, so wird die ATP-Hydrolyse stimuliert, daraus resultiert ein stabilerer Komplex aus Substrat und ADP-gebundenem hsc70. Im letzten Schritt wird ADP gegen ATP ausgetauscht und das gefaltete Substrat wird entlassen [99, 85, 109, 60, 95] (siehe Abb. 1.3.2). Die Hydrolyse von ATP zu ADP + P_i und der Nukleotid-Austausch, die zusammen Substratbindung und Substratfreisetzung regulieren, werden von Co-Chaperonen kontrolliert. So wird die Aktivität der

ATPase von hsp40, dem Homolog zum bakteriellen DnaJ, stimuliert [62] und das hsc70 interagierende Protein Hip inhibiert den Austausch von Nukleotiden [40, 72]. Unter anderem wirken die Co-Chaperone Hop/p60 (hsp70/hsp90-organisierendes Protein) und HspBP1 (hsp70 interagierendes Protein) inhibierend auf die Faltungsaktivität von hsc70 [31, 79]. Auch Hap/BAG-1 beeinflusst den ATPase Zyklus von hsc70; es inhibiert die Rückfaltung denaturierter Proteine [124, 72].

Allerdings bestehen kontroverse Meinungen darüber, wie Hap46/BAG-1M seine Funktion ausführt. In Bakterien wird der Austausch von ADP und ATP bei DnaK, dem bakteriellen Homolog zu hsc70, von GrpE forciert. Analysen mit Komplexen von GrpE und der ATPase-Domäne von DnaK zeigten, daß GrpE zwei Kontaktstellen aufweist, und bei Bindung an DnaK konnte gezeigt werden, daß sich der ATP-Bindungsspalt öffnete [58]. Da Hap46/BAG-1M ebenfalls Kontaktstellen auf beiden Subdomänen von hsc70 besitzt, wäre es möglich, daß es genau wie GrpE, die Öffnung des ATP-Bindungsspalt bewirkt, obwohl Hap/BAG-1 und GrpE nicht miteinander verwandt sind. Daher wird Hap/BAG-1 von manchen Arbeitsgruppen eine ähnliche Funktion wie GrpE zugeschrieben, nur daß Hap46/BAG-1M einzig als Austauschfaktor für ADP dient und somit das Substrat nicht mehr richtig gefaltet werden kann, da es früher aus der Substratbindetasche entlassen wird [39, 96, 72, 29]. Bimston et al. gehen davon aus, daß die Inhibition der hsc70 Rückfaltungsfunktion durch Hap46/BAG-1M von der Entkoppelung der Nukleotid-Hydrolyse und der Substratfreilassung erfolgt. Das heißt, Hap46 bewirkt eine konformationelle Änderung in hsc70, die das Substrat in einem ternären Komplex mit Hap46/BAG-1M und hsc70 hält [7]. Dennoch stimmen alle Studien überein, daß Hap46/BAG-1M die ATPase-Aktivität von hsc70 stimuliert. Gässler et al. konnten zudem unter physiologischen Konzentrationen an P_i , für geringe Mengen an Hap46/BAG-1M, eine Stimulation der Rückfaltung denaturierter Proteine durch hsc70 beobachten. Bei höheren Mengen an Hap46 zeigte sich ebenfalls eine Inhibition der hsc70 Faltungsaktivität [29].

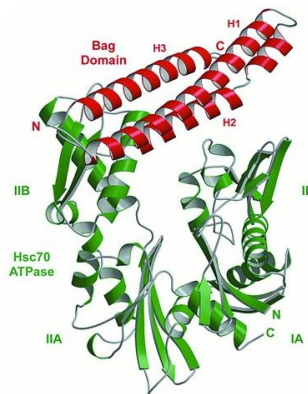


ABBILDUNG 1.3.3. Co-Kristallisation der Hsc70 ATPase-Domäne mit der BAG-Domäne von Hap/BAG-1. Die verschiedenen Subdomänen IA, IIA, IB und IIB von hsc70 sind jeweils angegeben [96].

Da Hap/BAG-1 mit der ATPase-Domäne von hsc70 interagiert, steht die Substratbindungsdomäne für die Bindung weiterer Proteine zur Verfügung [30, 39, 103, 124, 11]. So können trimere Komplexe entstehen mit hsc70 als Mediator zwischen Hap46/BAG-1M und einer Vielzahl anderer Proteine [103, 124, 69]. Die Hap/BAG-1 Isoformen binden mit ihrem carboxyterminalen Ende, der sogenannten BAG-Domäne an Hsc70 [103].

In Röntgenstrahl-Analysen und Nuklear-Magnet-Resonanz-Spektroskopie (NMR) wurde die Interaktion der BAG-Domäne mit hsc70 analysiert [9, 96]. Dabei konnte gezeigt werden, daß Aminosäuren der α -Helices 2 und 3 der BAG-Domäne von Hap/BAG-1 mit Subdomäne II B der ATPase-Domäne von hsc70 interagieren [9, 11]. Das Arginin an Position 237 in Hap46/BAG-1M ist für die Bindung an Subdomäne II B von hsc70 besonders wichtig [95] (siehe Abb. 1.3.3)

Mit der Methode des Phage-Display und über Analyse membrangebundener Peptide, welche die Aminosäuresequenz von hsc70 überspannen, konnten Petersen et al. [76] Interaktionsregionen von Hap46/BAG-1M auf hsc70, sowohl auf Subdomäne II als auch auf Subdomäne I identifizieren (siehe Abb. 1.3.4).

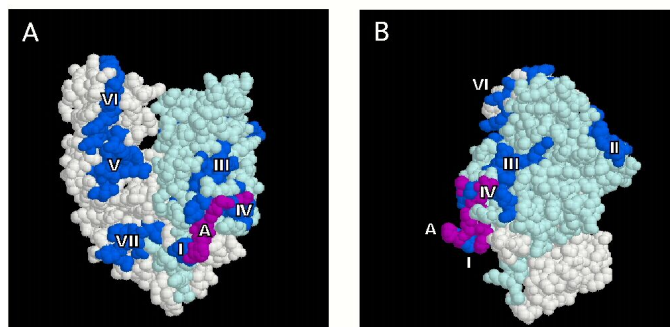


ABBILDUNG 1.3.4. Hsc70 ATPase-Domäne aus verschiedenen Perspektiven mit Darstellung der Regionen I bis VII (blau), welche von Petersen et al. [76] als Interaktionsregionen von Hap46 mit hsc70 über Peptidanalyse identifiziert wurden, Region A, welche über Phage-Display gefunden wurde ist in lila markiert.

1.3.2 DNA-Bindung und transkriptionelle Stimulation

Zeiner et al. [126] konnten 1999 bei der Suche nach Molekülen, die direkt mit Hap46/BAG-1M interagieren, DNA als Bindungspartner identifizieren. Sowohl ringförmige, verdrillte und lineare DNA-Moleküle können mit Hap46/BAG-1M interagieren, wobei mehrere Hap/BAG-1 Moleküle an ein DNA-Fragment binden [69]. Diese Aspekte lassen eher eine Sequenz-unspezifische Bindung von Hap46/BAG-1M an DNA vermuten. Für die Bindung an DNA ist ein ungewöhnliches Bindemotiv, ein kurzer basischer Abschnitt mit je drei Lysinen (2 bis 4) und Argininen (6 bis 8), am N-Terminus von Hap46/BAG-1M verantwortlich (siehe Abb. 1.2.2). Dieser Bereich überlappt mit dem NLS der längeren Isoform Hap50/BAG-1L, die ebenfalls mit

DNA interagieren kann [69, 38], den kürzeren Isoformen Hap33/BAG-1S und Hap29/BAG-1S fehlt dieser Bereich und sie sind somit nicht in der Lage mit DNA eine Wechselwirkung einzugehen. Bei Austausch von einem der beiden basischen Blöcke gegen Alanin, geht die Bindungsfähigkeit von Hap46/BAG-1M an DNA verloren, das heißt, daß einige dieser Aminosäuren maßgeblich zur Interaktion mit DNA beitragen [126, 86, 27]. Bei Hap50 reicht der Austausch der entsprechenden Aminosäuren (Lysine 73-75 und Arginine 77-79) gegen Alanin jedoch nicht aus, die Interaktion mit der DNA zu zerstören, was einen Hinweis darauf gibt, daß weitere Bereiche in Hap50 für die DNA-Bindung zuständig sind [38]. Ein interessanter Aspekt ist die Tatsache, daß an DNA gebundenes Hap46/BAG-1M immer noch in der Lage ist mit hsc70 zu interagieren [70]. Wie schon im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurde, kann Hap46/BAG-1M mit seinem carboxyterminalen Ende über hsc70 mit anderen Faktoren in Wechselwirkung treten. Da der N-Terminus von Hap46/BAG-1M noch frei für die Interaktion mit DNA ist, können Komplexe der Form DNA-Hap46-hsc70 mit einer Vielzahl weiterer Moleküle interagieren.

Da Hap46/BAG-1M und Hap50/BAG-1L DNA-bindende Proteine sind, lag die Vermutung einer möglichen Beteiligung an der Transkription nahe. In *in vitro* Versuchen führte die Zugabe von Hap46/BAG-1M zu einer vermehrten Steigerung der Transkription, wobei es keine Rolle spielt ob für die Transkriptionsaktivierung eukaryotische oder prokaryotische DNA Fragmente, oder DNA-Matrizen ohne Promotor verwendet wurden. Da die erhaltenen Transkripte unterschiedlich lang waren, war anzunehmen, daß die Transkriptionsinitiation unspezifisch ist. Wie erwartet führt die Deletion der ersten 10 Aminosäuren von Hap46/BAG-1M zu einem Verlust der Transkriptionsstimulation. Auch mit einer Variante deren C-terminale Aminosäuren, die wichtig sind für die Interaktion mit hsc70, deletiert waren ergab sich eine verminderte Transkriptionssteigerung. Dies deutet auf eine Beteiligung von hsc70 bei der Hap46/BAG-1 vermittelten Steigerung der Transkription hin [69, 68].

Auch in lebenden Zellen konnte nach Überexpression von Hap46/BAG-1M ein Effekt auf die Transkription festgestellt werden. Dazu wurden transfizierte Zellen einem Hitzeschock unterzogen, woraufhin Hap46/BAG-1M in den Kern transloziert wird. Unter Hitzestress werden normalerweise Transkriptionsvorgänge in der Zelle reduziert. Diese streßbedingte Reduktion der Transkription konnte durch Hap46/BAG-1M kompensiert werden. Für Hap50/BAG-1L ist im Gegensatz zu Hap46/BAG-1M für die Transkriptionssteigerung *in vivo* kein Hitzeschock nötig. Für Hap50/BAG-1L konnte gezeigt werden, daß nach dessen Überexpression in unterschiedlichen Zellen, die Expression von Reportergenen unter der Kontrolle verschiedener Promotoren gesteigert wurde. Aber auch die Expression einiger endogener Proteingene wie c-Jun oder der Glukokortikoid-Rezeptor war im Vergleich zu Actin erhöht.

1.3.3 Interaktion mit c-Jun

Da Hap46/BAG-1M stimulierend auf die Transkription wirkt, stellte sich die Frage, wie Hap46/BAG-1M mit dem Transkriptionsapparat interagiert. Dazu wurden Hap46/BAG-1M-spezifische Matrizes mit *in vitro* translatierten Transkriptionsfaktoren inkubiert. In Gegenwart von hsc70 konnten mit Hap46/BAG-1M der Glukokortikoid-Rezeptor, der Östrogen-Rezeptor, der Core-binding-Faktor A1 (CbfA1), das cAMP-Response-Element (CREB) und c-fos gebunden werden, nicht aber mit der Mutante Hap46 Δ C47, welche nicht mehr mit hsc70 interagieren kann. Dies macht nochmals deutlich, daß hsc70 ein wichtiges Bindeglied zwischen Hap46/BAG-1 und dem Transkriptionsapparat ist. Aber auch unabhängig von hsc70 konnten Transkriptionsfaktoren von Hap46/BAG-1M oder der Mutante Hap46 Δ C47 gebunden werden, darunter waren c-Jun und das Homöobox-Protein Gax [69, 68]. Interessanterweise sind c-Fos und c-Jun beide Mitglieder der AP-1 Familie, während c-fos nur in Abhängigkeit von hsc70 mit Hap46/BAG-1M interagieren konnte, wurde für c-Jun auch mit aufgereinigtem rekombinanten Protein und Hap-spezifischen Matrizes eine direkte Interaktion mit Hap46 nachgewiesen.

C-Jun wurde ursprünglich aufgrund seiner Homologie zu v-Jun, einem Onkogen aus dem avianen Sarkoma Virus ASV17, entdeckt [56, 2, 115]. AP-1 Transkriptionsfaktoren sind an der Kontrolle zellulärer Prozesse beteiligt, die Proliferation, Immunantwort, Apoptose, Streß oder Antwort auf genotoxische Reagenzien regulieren. Der AP-1 Komplex setzt sich aus zwei Proteinen zusammen, welche von Genen der Jun-, Fos- oder ATF-Familie codiert werden [3]. Nach der Bildung von Heterodimeren oder Homodimeren über den Leuzin-Zipper (siehe Abb. 1.3.5), binden diese über eine basische DNA-Bindungsregion (siehe Abb. 1.3.5) an TRE-Elemente (TPA-response element) mit der Konsensus-Sequenz TGACTCA [52, 115], in der Promotorregion von Zielgenen. Mitglieder der Jun- und der ATF-Familie können Heterodimere mit Proteinen der anderen Familien als auch Homodimere mit Mitgliedern der eigenen Familie bilden, wohingegen Mitglieder der Fos-Familie nur Heterodimere bilden können [35, 3, 115].



ABBILDUNG 1.3.5. Balkenmodell von c-Jun mit der δ -Domäne (orange), den beiden Serinen in der Transaktivierungsdomäne, der DNA-Bindungsregion (grün) und dem Leuzin-Zipper (blau).

Die Zusammensetzung der AP-1 Komplexe bestimmt die Art von Genen, die exprimiert werden. So regulieren zum Beispiel c-Jun Homodimere die Expression der humanen Kollagenase und die von Cyclin D1 [35]. C-Jun enthält eine Bindestelle (δ -Domäne) für die Jun-N-terminale Kinase (JNK), welche die Serine an Position 63 und 73, die sich in der Transaktivierungsdomäne befinden (Abbildung 1.3.5), phosphoryliert. Durch diese Phosphorylierung wird die transkrip-

tionelle Aktivität von c-Jun stimuliert [8, 93, 22, 115]. Ein Regulationsmechanismus der c-Jun Aktivität besteht darin, daß inaktives JNK an die δ -Domäne bindet und die Funktion von c-Jun als Transkriptionsaktivator hemmt. Sobald JNK aktiviert wird phosphoryliert es c-Jun und dissoziiert. Da in v-Jun die δ -Domäne deletiert ist kann inaktives JNK nicht binden. So umgeht v-Jun die Regulation durch JNK, das heißt v-Jun wird nicht phosphoryliert ist aber dauerhaft transkriptionell aktiv [8, 93, 22, 115]. Außer den beiden Serinen (Ser⁶³ und Ser⁷³) gibt es noch weitere Aminosäuren die phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung der am C-terminalen Ende gelegenen Aminosäuren Threonin²³¹, Threonin²³⁹, Serin²⁴³ und Serin²⁴⁹ bewirkt eine Reduktion der DNA Bindung von c-Jun [78].

C-Jun ist ein bekanntes Proto-Onkogen und kann wie sein virales Homolog v-Jun onkogene Transformation von Zellen induzieren. C-Jun kann in manchen Zellen alleine eine onkogene Transformation auslösen, in manchen Fällen benötigt Jun einen zweiten Effektor, wie zum Beispiel mutiertes Ras. Die Effektivität von c-Jun als transkriptioneller Aktivator variiert stark innerhalb verschiedener Zell-Typen, dies könnte Variationen in der Onkogenität erklären. So kann c-Jun in avianen Fibroblasten-Kulturen als einzelnes Onkogen Transformation bewirken. In Säugetier-Zellen benötigt Jun dazu normalerweise die Kooperation zusätzlicher Wachstumsstimulierender Faktoren [115].

2

Zielsetzung

Das hsc70-assoziierte Protein Hap46 kann mit einer Vielzahl an Molekülen interagieren und so auf Apoptose, Proliferation, Signaltransduktion und Transkription einwirken. Durch die Interaktion mit hsc70 Chaperonen lassen sich viele der pleiotropen Effekte des Hap46 in Bezug auf seine Multifunktionalität erklären. Zusammen mit anderen Co-Chaperonen kann Hap46 außerdem die Funktion von hsc70 als Faltungshelfer modulieren, indem es über Bindung an die ATPase-Domäne von hsc70 den Nukleotidaustausch beeinflusst. Zudem dient hsc70 als Brückenprotein zwischen Hap46 und anderen Proteinen. Hap46 kann jedoch über direkte Wechselwirkungen mit den unterschiedlichsten Molekülen in Prozesse innerhalb der Zelle eingreifen. Dabei verfügt Hap46 über eine DNA-Bindungsregion, welche für seine Rolle als Transkriptionsaktivator von entscheidender Bedeutung ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktionen des Hap46 mit dem Chaperon hsc70, mit DNA und mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun näher zu charakterisieren, um so ein besseres Verständnis über Hap46 und seine Aufgaben und Bedeutung innerhalb der Zelle zu erlangen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Interaktion von hsc70 mit Hap46 voller Länge näher untersucht werden, da sich zu diesem Zeitpunkt die meisten Bindungsstudien und biochemischen Analysen auf die BAG-Domäne, die bei allen Hap-Isoformen vorhanden ist, beschränkten. Die Identifikation weiterer Regionen von Hap46, die bei der Bindung an hsc70 beteiligt sind, sollte über Analyse membrangebundener Peptide erfolgen. Außerdem sollten, basierend auf Ergebnissen von Petersen et al., welche auf hsc70 sechs Interaktionsregionen von Hap46 identifizierten, in den Bindungsregionen I und IV, wichtige Aminosäuren für die Bindung an hsc70 über Mutationsanalyse lokalisiert werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Bindung von Hap46 an DNA. In früheren Studien wurde gezeigt, daß Hap46 nur die ersten 10 Aminosäuren seines Aminoterminus benötigt, um unspezifisch an DNA zu binden. Zudem ist die DNA-Bindungsdomäne zum einen für den transkriptions-stimulierenden Effekt von Hap46 nötig, zum anderen binden au-

ßer der DNA auch Proteine innerhalb dieser Region. Innerhalb dieser kurzen, N-terminalen Sequenz sollten nun Aminosäuren ausgetauscht werden, um so über Gel-Retardationsanalysen die für die DNA-Bindung wichtigen Aminosäuren identifizieren zu können.

Im dritten Teil sollte die Interaktion von Hap46 mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun näher untersucht werden. Daher sollten zuerst die Kontaktstellen der beiden Proteine über Elisa-Analysen bzw. über Analyse membrangebundener Peptide ermittelt werden. Da Hap46 und c-Jun beide an DNA binden können, sollte die Fähigkeit beider Proteine, an DNA zu binden, in Anwesenheit des jeweils anderen getestet werden. Letztendlich sollte der Einfluß der Bindung von Hap46 auf die Transkription der Zielgene von c-Jun *in vivo* analysiert werden. Im Hinblick auf das transformierende Potential von c-Jun und die Tatsache, daß Hap46 in vielen Tumorarten eine veränderte Expression aufweist, sollten diese Untersuchungen entscheidend zu einem besseren Verständnis der vielfältigen Funktionen von Hap46 beitragen.

3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Substanzen

Acrylamid/Bisacrylamid 1:29	Applichem	Glutathion red.	Merck
Agar	Invitrogen	Glucose	Merck
Agarose Seakem LE	Biozym	Glycerol	Gerbu
Aminocaprinsäure	Riedel-deHaen	Hefeextrakt	Invitrogen
Ammoniumpersulfat, APS	Serva	Hepes	Applichem
Ampicillin	Serva	IPTG	Applichem
Borat	Merck	Isopropanol	Theoretikum
Bromphenolblau	Serva	Kaliumchlorid	Merck
Comassie brilliant blue R-250	Roth	Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Cumarinsäure	Sigma	Kalium-Ferricyanid	Merck
Dichlormethan	Theoretikum	Kalium-Ferrocyanid	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	Luminol	Fluka
DMF	SDS GmbH	Magnesiumchlorid	Merck
DMSO	Merck	Magnesiumsulfat	Merck
DTT	Applichem	β -Mercaptoethanol	Sigma
EDTA	Merck	Natriumchlorid	Merck
Ethanol, absolut	Riedel-deHaen	Natriumhydrogenphosphat	Applichem
Ethidiumbromid	Serva	Natriumhydroxid	Baker
Essigsäure	Roth	NMP	Fluka
Essigsäureanhydrid	Riedel-deHaen	Pepton	Invitrogen
Formaldehyd	Riedel-deHaen	Piperidin	Fluka
Glutaraldehyd	Sigma	Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs

Salzsäure	Merck
SDS	Applichem
TEMED	Roth
Trifluoressigsäure	Merck
Triisobutylsilan	Aldrich
Tris	Roth
Triton X-100	Serva
Trypanblau	Serva
Tween 20	Serva
Wasserstoffperoxid	Merck
X-Gal	Applichem
<hr/>	
Fmoc-Aminosäuren für Peptidsynthese	Bachem
Oligonukleotide	Thermo Electron

3.1.2 Bakterienstämme

XI 10-Gold

E.coli *Tet^r Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte (F' proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r)*

BI21(DE3)

E.coli *F⁻ ompT hsdS_B (r_B - m_B -) gal dcm λ(DE3) T1R*

3.1.3 Purifizierte Proteine und Enzyme

rekombinantes AP1 (c-Jun, humanes)	Promega (E3061)
rekombinantes bovines hsc70 ATPase-Fragment	Stressgen (SPP-752)
bovines hsc70 präpariert aus Rinderhirn	Präparation B. Segnitz-Labor Gehring
JNK2/SAPK1a	Upstate (14-258)
c-Jun (1-169)-GST	Upstate (14-195)
Thrombin-Protease	Amersham (27-0846-01)
Taq-DNA Polymerase	
Pfu-DNA Polymerase	MBI Fermentas ()
<i>T₄</i> Polynukleotidkinase	MBI Fermentas ()
<i>T₄</i> Ligase	
Restriktionsenzyme Typ II	New England Biolabs

3.1.4 Verwendete Antikörper

Primär-Antikörper

CC9E8	Spezifischer monoklonaler Antikörper gegen Hap/BAG-1 welcher freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde von A. Pater, St. John's Kanada
MA3-007	Spezifischer monoklonaler Antikörper gegen hsp70/hsc70 (Epitop: Aminosäuren 122-264) von Affinity Bioreagents Inc. (über Dianova erhältlich)
K19	polyclonales Serum gegen hsc70 von Santa Cruz
MSA-103	Spezifischer monoklonaler Antikörper gegen Glutathione-S-Transferase (GST) von Stressgen

Sekundär-Antikörper

Ziege anti-Maus konjugiert mit Merrettich-Peroxidase (Dianova)
Kaninchen anti-Ziege konjugiert mit Merrettich-Peroxidase (Dianova)

3.1.5 Eukaryotische Expressionsvektoren

Ein Expressionsvektor mit c-Jun unter der Kontrolle des RSV (Rous Sarcoma Virus)-Promotors, ebenso wie der leere Vektor, und ein Plasmid mit der Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des Kollagenase-Promotors, wurden freundlicherweise vom Labor Peter Angel (DKFZ) zur Verfügung gestellt. Um Hap46 und Hap-Varianten ebenfalls unter der Kontrolle des RSV-Promotors zu haben, wurde die cDNA von Hap46 und Hap-Varianten in den leeren Vektor (pRSV) inkloniert.

Plasmid	Protein	Klonierung
pRSV	leerer Vektor	Labor P. Angel (DKFZ)
pRSV β	β -Galaktosidase	Labor G. Petersen
pRSV-c-Jun	humanes c-Jun	Labor P. Angel (DKFZ)
pRSV-Hap46	Hap46	Das Hap46-Fragment mit Hind III und Nsi I Schnittstellen wurde über Hind III und Pst I Schnittstellen im Vektor inkloniert
pRSV-Hap46 Δ N16	Hap46 Δ N10	Das Hap46 Δ N10-Fragment mit Hind III und Nsi I Schnittstellen wurde über Hind III und Pst I Schnittstellen im Vektor inkloniert
pRSV-Hap46 Δ C47	Hap46 Δ C47	Das Hap46 Δ C47-Fragment mit Hind III und Nsi I Schnittstellen wurde über Hind III und Pst I Schnittstellen im Vektor inkloniert
pcoll-Luciferase	Firefly-Luciferase	Labor P. Angel (DKFZ)

TABELLE 3.1.1. Eukaryotische Vektoren für Transfektionsversuche mit F9 und Hela Zellen mit Angabe des exprimierten Proteins. Für die neu klonierten Plasmiden ist angegeben wie sie kloniert wurden.

3.1.6 Prokaryotische Expressionsvektoren

Plasmid	Protein	Ausgangsplasmid	Primer
pGex-2T	GST-Protein	Pharmacia	
pGex-2T-Hap46	Hap46	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46ΔN16	Hap46ΔN16	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46Δ12-62	Hap46Δ12-62	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46Δ96-129	Δ96-129	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46ΔC47	Hap46ΔC47	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46K2-4A	Hap46K2-4A	pGex-2T-Hap46	5'-GCGTGGATCCATGCCCGCAGCAACCCGGCGCCGC-3' 5'-GCGGCGCCGGTTGCTGCGGCCATGGATCCACGC-3'
pGex-2T-Hap46K2A	Hap46K2A	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46K3A	Hap46 K3A	pGex-2T-Hap46	5'-GGATCCATGAAGGCGAAAACCCGGCG-3' 5'-CGCCGGTTTTTCGCCTTCATGGATCC-3'
pGex-2T-Hap46K4A	Hap46K4A	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46K2/3A	Hap46K2/3A	pGex-2T-K3A	5'-CGTGGATCCATGGCTGCGAAAACCCGG-3' 5'-CCGGTTTTTCGAGCCATGGATCCACG-3'
pGex-2T-Hap46K3/4A	Hap46K3/4A	pGex-2T-K3A	5'-GGATCCATGAAGGCGCAACCCGGCGCCGCTC-3' 5'-GAGCGGCGCCGGTTGCCGCCTTCATGGATCC-3'
pGex-2T-Hap46K2/4A	Hap46K2/4A	pGex-2T-Hap46K2A	5'-GGATCCATGGCGAAGGCAACCCGGCGCCGCTC-3' 5'-GAGCGGCGCCGGTTGCTTAGCCATGGATCC-3'
pGex-2T-Hap46R6-8A	Hap46R6-8A	pGex-2T-Hap46	5'-GAAGAAGAAAACCCGGCGCCGCTCGACCCGGAGC-3' 5'-GCTCCGGTTCGAGGCGCCGGTTTTCTTCTTC-3'
pGex-2T-Hap46R6A	Hap46R6A	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46R7A	Hap46R7A	pGex-2T-Hap46	5'-GAAGAAAACCCGGGCGCCGCTCGACCCGG-3' 5'-CCGGTTCGAGCGGCGCCGGTTTTCTTC-3'
pGex-2T-Hap46R8A	Hap46R8A	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46R6/7A	Hap46R6/7A	pGex-2T-Hap46	5'-GAAGAAGAAAACCCGGCGCCGCTCGACCCGG-3' 5'-CCGGTTCGAGCGGCGCCGGTTTTCTTCTTC-3'
pGex-2T-Hap46R7/8A	Hap46R7/8A	pGex-2T-Hap46	5'-GAAGAAAACCCGGGCGCCGCTCGACCCGGAGC-3' 5'-GCTCCGGTTCGAGGCGCCGGTTTTCTTCTTC-3'
pGex-2T-Hap46R6/8A	Hap46R6/8A	pGex-2T-Hap46R8A	5'-ATGAAGAAGAAAACCCGGCGCCGCTCGACCCGG-3' 5'-CGGGTTCGAGGCGCCGGTTTTCTTCTTCAT-3'
pGex-2T-Hap46K2/R6A	Hap46K2/R6A	pGex-2T-Hap46K2A	5'-GGCGAAGAAAACCCGGCGCCGCTCGACC-3' 5'-GGTCGAGCGGCGCCGGTTTTCTTCGCC-3'
pGex-2T-Hap46T5A	Hap46T5A	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46T5E	Hap46T5E	pGex-2T-Hap46	5'-CCATGAAGAAGAAAGAGCGCGCCGCTCGAC-3' 5'-GTCGAGCGGCGCCGCTTTCTTCTTCATGG-3'
pGex-2T-Hap46InsATA	Hap46InsATA	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46Ins2AT2A	Hap46Ins2AT2A	Labor Gehring	
pGex-2T-Hap46Ins3AT3A	Hap46Ins3AT3A	pGex-2T-Hap46	5'-CCATGAAGAAGAAAGCAGCGCCACCGCTCGACCCGGCGCCGCTCGAC-3' 5'-GTCGAGCGGCGCCGGTTCGAGCGGTTCTTCTTCATGG-3'
pGex-3X-c-Jun1-166	c-Jun1-166	Labor Angel (DKFZ)	
pGex-3X-c-Jun ΔN223	c-Jun ΔN223	Labor Angel (DKFZ)	
pGex-3X-v-Jun1-119	v-Jun1-119	Labor Angel (DKFZ)	

TABELLE 3.1.2. Liste prokaryotischer Expressionsvektoren für Hap46-Varianten und Jun-Varianten mit Angabe des exprimierten Proteins. Für neu klonierte Plasmide sind die Ausgangsplasmide sowie die verwendeten Primer angegeben. Für die übrigen Plasmide ist angegeben von welchem Labor sie stammen.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, wurde Protein von Hap46 und Hap46-Varianten, als auch von Jun-Varianten benötigt. Einige der Expressionsvektoren für Hap46-Varianten wurden hierzu über site-directed-Mutagenese hergestellt, und sind in Tabelle 3.1.2 zusammen mit Ausgangsplasmid und verwendeten Primern dargestellt. Die übrigen Hap-Expressionskonstrukte (siehe Doktorarbeit Yilmaz Niyaz) wurden im Labor Gehring hergestellt und sind ebenfalls in der Tabelle 3.1.2 aufgelistet. Alle Proteine werden als GST-Fusion exprimiert. Je nach Versuch, wurden GST-Fusionen oder Thrombin-geschnittene Proteine ver-

wendet. Eine Ausnahme stellten Hap46-Varianten Hap46R7A, Hap46R6/7A und Hap46R7/8A dar, welche nur als GST-Fusion aufgereinigt werden konnte. Plasmide, mit Jun-Varianten wurden freundlicherweise von Peter Angel (DKFZ) zur Verfügung gestellt.

3.2 Allgemeine Methoden DNA

3.2.1 Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab erfolgte nach dem Endofree Plasmid Maxi Protokoll (Endofree Plasmid Maxi Kit, Qiagen). Die Bakterienkultur wurde bei 2000xg (6000 rpm, Sorvall GSA Rotor) 15 Min bei 4°C abzentrifugiert. Nach dem Vollständigen Entfernen des Mediums, wurde das Pellet in 10 ml des Puffers P1 resuspendiert und anschließend zur Lyse der Zellen mit 10 ml Puffer P2 versetzt und 5 Min bei RT inkubiert. Zur Präzipitation von Proteinen, genomischer DNA und Zelltrümmern, wurden 10 ml eiskalter Puffer P3 zugefügt. Die Lösung wurde sofort in eine vorbereitete Filter-Spritze gefüllt und für 10 Min bei RT inkubiert. Nun konnte das Zell-Lysat durch die Spritze filtriert werden, indem der Kolben eingeführt wurde. Nach der Zugabe von 2,5 ml Puffer ER folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis. Zwischenzeitlich konnte eine Säule mit Puffer QBT äquillibriert werden. Das filtrierte Lysat wurde auf die Säule gegeben, wobei der Durchfluß verworfen werden konnte. Die Säule wurde nun 2 Mal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen, bevor die DNA mit 15 ml Puffer QN eluiert werden konnte. Durch Zugabe von 10,5 ml (0,7 Volumen) Isopropanol wurde die DNA gefällt und sofort bei 4°C 15000xg für 30 Min abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde 2 Mal mit je 5 ml endotoxinfreiem 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in einem geeigneten Volumen gelöst. Die DNA wurde auf 1% Agarosegelen überprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt. Alle Rezepte für Puffer sind aus dem Qiagen-Protokoll zu entnehmen.

3.2.2 Gewinnung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Für Mini-Präparationen von Plasmid-DNA wurde das Wizard Plus SV DNA Purification System von Promega verwendet. 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (50µg/ml LB-Medium), wurden Bakterien, welche zuvor mit dem zu isolierenden Plasmid transformiert wurden, angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250µl Cell Resuspension Solution resuspendiert, bevor die Zellen mit 250µl Cell Lysis Solution und 10µl Alkaline Protease Solution gemischt und für 5 Min lysiert wurden. Die Zugabe von 350µl Neutralization Solution, bewirkte das Ausfallen der Proteine, welche nun bei 13000 rpm für 10 Min in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde in eine Säule überführt und für 1 Min zentrifugiert, wobei

der Durchfluß verworfen wurde. Die an die Säule gebundene DNA wurde zuerst mit 750 μ l und nochmals mit 250 μ l Wash Solution gewaschen. Zum Eluieren der DNA von der Säule wurden 100 μ l Nuklease freies Wasser verwendet. Alle Zentrifugationsschritte waren bei 13000 rpm in der Eppendorfszentrifuge. Die isolierte DNA wurde auf 1% Agarosegelen überprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt. Alle Rezepte für Puffer sind aus dem Promega Wizard-Protokoll zu entnehmen.

3.2.3 Analyse von DNA auf Agarosegelen

Um große DNA-Fragmente aufzutrennen wurden diese auf 1% Agarosegelen analysiert. Dazu wurde die Agarose in 1X-TAE-Puffer aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Die auf ca. 60°C abgekühlte Lösung wurde in einen horizontalen Gelträger gegossen. Nach Aushärten des Geles konnte der Kamm entfernt werden und das Gel mit 1X TAE-Puffer überschichtet werden. Die in 6X-Ladepuffer versetzte DNA (Endkonz. 1X) wurde nun, zusammen mit einem DNA-Standard (λ BstE,) in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 80 bis 90 Volt bis sich die Bromphenolblaubande im unteren Drittel des Geles befand. Das Gel wurde nun für 5 bis 10 Min in einem Ethidiumbromid-Bad inkubiert und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Ethidiumbromid ist eine in die DNA interkalierende Substanz, welche unter UV-Licht fluoresziert.

DNA-Marker (λ BstE I)

Als DNA Marker wurde die DNA des Phagen Lambda, welche mit BstE I verdaut wurde, verwendet.

6X-Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol
30% Glycerol in H_2O_d

50X TAE-Laufpuffer

242 g Tris
57 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA pH 8
ad 1l H_2O_d

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ 1 ml Ethidiumbromid gelöst in H_2O_d

3.2.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für Gel-Retardationsanalysen wurden in der Regel 6% Polyacrylamid-Gele eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurden die Gele in einen vertikalen Gelträger eingespannt und mit 1X TBE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 6X-Ladepuffer versetzt (Endkonz. 1X) und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 80 bis 90 Volt, bis die Bromphenolblau-Bande gerade ausgelaufen war. Die Gele wurden in eine Klarsichtfolie gepackt und in eine Filmkassette gelegt. Nach Auflegen eines Filmes (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) konnten die Banden über Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

10X TBE-Puffer

108 g (890 mM)	Tris
55 g (890 mM)	Borat
20 ml (20 mM)	0,5 M EDTA pH 8
ad 1l	H ₂ O _d

3.2.5 *Aufreinigung von PCR-Fragmenten*

Über PCR generierte Fragmente des CMV-Promotors wurden mittels des MinElute PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt. Dazu wurden 5 Volumen an Puffer P1 dem PCR-Ansatz beigefügt und auf eine Säule überführt. Nach dem Zentrifugieren für 1 Min wurde der Durchfluß verworfen und anschließend die gebundene DNA mit 750µl Puffer PE gewaschen. Nach zweimaligem Zentrifugieren für 1 Min konnte die DNA mit 10µl Puffer EB eluiert werden. Alle Zentrifugationsschritte waren bei 13000 rpm in der Eppendorffzentrifuge. Die DNA wurde auf 1% Agarosegelen überprüft. Alle Rezepte für Puffer sind aus dem entsprechenden Qiagen-Protokoll zu entnehmen.

3.2.6 *DNA Konzentrationsbestimmung*

Von der in H₂O_d gelösten DNA wurden geeignete Verdünnungen in H₂O_d, mit der auf einem Agarosegel zuvor abgeschätzten DNA, gemacht. Im Spektralphotometer wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm, die optische Dichte der DNA bestimmt. Über die Formel x Verdünnung, konnte die Konzentration der DNA berechnet werden. Die Reinheit der DNA wurde durch Bestimmung des Quotienten der OD_{260nm} zur OD_{280nm} ermittelt. Eine optische Dichte von eins entspricht einer DNA-Konzentration von 50µg pro ml. Eine weitere Möglichkeit die DNA-Konzentration zu bestimmen besteht darin, daß man auf einem Agarosegel die DNA mit einem DNA-Marker bekannter Konzentration vergleicht.

3.2.7 *Ligation*

Für Ligationen wurden zwischen 50ng und 100ng Vector-DNA und die dreifach molare Menge als auch äquimolare Mengen des zu inserierenden Fragmentes für Ansätze zwischen 10 und 50µl eingesetzt. Den Ansätzen wurde 1unit T4-Ligase (MBI-Fermentas), 1/10 Volumen des Ligase-Puffers und zum Auffüllen H₂O_d. Zudem wurde ein Parallelansatz ohne Fragment angesetzt. Die Ligation fand entweder bei 25°C für 1h oder über Nacht bei 14°C statt. Die Ligase wurde anschließend bei 65°C für 10 Min inaktiviert.

3.2.8 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Bakterien für Elektroporation wurden 25 ml LB-Medium mit *Escherichia coli* Bakterien des Typs XI-10 Gold oder BL21DE3 angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtskultur in 500 ml LB-Medium überführt und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) zwischen 0,5 und 0,6 weiter inkubiert. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten entweder auf Eis oder im Kühlraum. Die Bakterienlösung wurde für ca. 15 Min bei 4°C gekühlt und anschließend 15 Min lang bei 2000xg (6000 rpm; Sorvall GSA Rotor) und 4°C abzentrifugiert. Nach dem vollständigen Entfernen des LB-Mediums, wurde das Bakterienpellet in 500ml vorgekühlten sterilen H_2O_d resuspendiert. Der folgende Zentrifugationsschritt erfolgte wieder bei 2000xg (6000rpm; Sorvall GSA Rotor) und 4°C für 15 Min. Weitere Waschschrte folgten mit 500 ml vorgekühlten sterilen H_2O_d und 10% Glycerin. Schließlich wurde das Bakterienpellet in 500 μ l 10% Glycerin aufgenommen und sofort in Aliquots von 50 μ l schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zum Testen der Transformationseffizienz, wurde ein Aliquot mit 0,1ng des Plasmides puc18 transformiert und nach einer Inkubation von 30Min. bis 1h bei 37°C auf LB-Agarplatten, mit dem entsprechenden Resistenzantibiotikum, in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert. Über folgende Formel konnte die Transformationseffizienz berechnet werden:

(Anzahl der gewachsenen Kolonien / ng des Plasmides) x Verdünnungsfaktor

<u>LB-Medium</u>		<u>LB-Agar</u>	
10g	Pepton	10g	Pepton
5g	Hefeextrakt	5g	Hefeextrakt
10g	NaCl	10g	NaCl
ad 1l	H_2O_d	15g	Agar
		ad 1l	H_2O_d

3.2.9 Elektroporation

Die elektrokompetenten Bakterien wurden für 30 Min auf Eis aufgetaut und die Küvetten mit einem Spalt von 0,2 cm (Biorad) vorgekühlt. 10-50ng Plasmid-DNA oder Ligationsansatz wurden auf die Bakterien pipettiert, vorsichtig gemischt und für 1,5 Min auf Eis inkubiert. Die Einstellung am Elektroporator betrug 2,5 kV. Die Bakterienlösung mit der DNA wurden in den Spalt der Küvette pipettiert und dem Elektroschock unterzogen, anschließend wurden sie sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 30-60 Min bei 37°C geschüttelt. Bei Transformation von Ligationsansätzen wurden die Bakterien auf LB-Platten mit dem entsprechenden Resistenz-Antibiotikum in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank für 12-17h inkubiert. Ansonsten wurde die Bakteriensuspension in 200 ml - 500 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C im Schüttler für 12-17h inkubiert.

SOC-Medium

2%	Pepton
0,5	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
<hr/>	
1 M	sterilfiltriertes MgCl (je 1 ml / 100 ml autoklaviertes Medium)
1 M	sterilfiltriertes MgSO ₄ (je 1ml / 100 ml autoklaviertes Medium)
1 M	sterilfiltrierte Glukose (Endkonzentration 20 mM)

3.2.10 *Anlegen einer Glycerin-Dauerkultur*

Zum Anlegen einer Glycerin-Dauerkultur, wurden 800 μ l Bakterienlösung einer Übernachtskultur mit 250 μ l 100% Glycerin vermischt und sofort bei -80°C gelagert.

3.2.11 *Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen*

Die Spaltung von DNA erfolgte mittels Endonukleasen, welche spezifisch Sequenzen auf der DNA erkennen und schneiden. Die Konzentration an Enzym sollte in einem Ansatz 1/10 des Volumens nicht überschreiten. Für die jeweiligen Enzyme gibt es optimale 10X Puffer, deren Endkonzentration im Ansatz 1X sein sollte. Zur Restriktionskontrolle von Plasmiden, wurden 200 bis 300ng DNA mit 5 bis 10 units Enzym gespalten. Restriktionsansätze für Klonierungen enthielten 1 bis 2 μ g DNA und 20 units Enzym.

3.2.12 *Generierung sich überlappender Fragmente des CMV-Promotors über PCR*

Für die Generierung sich überlappender Fragmente des CMV-Promotors, wurden mittels der in Tabelle 3.2.1 angezeigten Primer 6 Fragmente mit einer Länge von 130bp erzeugt, welche als F1 bis F6 bezeichnet wurden. Um Fragmente F7 bis F11, mit einer Länge von 235bp zu erzeugen, wurden die selben Primer verwendet, wie in Abb. 4.2.3 A dargestellt ist. Als DNA-Matrize diente das Plasmid pcDNA3.CAT (Invitrogen), welches das Chloramphenicol-Transferase-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors hat. Folgendes PCR-Programm wurde für die Amplifikation der DNA-Fragmente verwendet:

Zyklen		Temperatur	Zeit
1	initiale Denaturierung:	95°C	30 sec
	Denaturierung:	95°C	30 sec
25	Primer-Anlagerung:	50 bis 55°C	1 Min
	Verlängerung:	72°C	2 Min

Primer	Sequenz
CMV-1f	5'-CGATGTACGGGCCAGATATAC-3'
CMV-1r	5'-CGGGCCATTACCGTAAGTTA-3'
CMV-2f	5'-GCGTTAGATAACTTACGGTAAATGGCCC-3'
CMV-2r	5'-CCGTAAATAGTCCACCCATTGACG-3'
CMV-3f	5'-CCATTGACGTCAATGGGTGGA-3'
CMV-3r	5'-CTGGGCATAATGCCAGGCGGG-3'
CMV-4f	5'-ATGGCCCGCCTGGCATTATGC-3'
CMV-4r	5'-CTATCCACGCCCATTTGATGTA-3'
CMV-5f	5'-GCAGTACATCAATGGGCGTGG-3'
CMV-5r	5'-GGAGTTGTTACGACATTTTGG-3'
CMV-6f	5'-CTTTCCAAAATGTCGTAACAA-3'
CMV-6r	5'-AATTTCGATAAGCCAGTAAGC-3'

TABELLE 3.2.1. Primer für die Generierung sich überlappender Fragmente des CMV-Promotors

3.2.13 Sequenzierung

Für die Sequenzierung doppelsträngiger DNA mit Didesoxynukleotiden muß der Doppelstrang bevor der Oligonukleotid-Primer binden kann denaturiert werden. Dazu wurde die zyklische PCR-Sequenzierung angewandt. Unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase, verläuft die Reaktion in mehreren Zyklen aus Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen. Dabei werden Didesoxynukleotide für den Kettenabbruch verwendet. Die Konzentration der Didesoxynukleotide muß so gewählt sein, daß statistisch gesehen der Kettenabbruch an unterschiedlichen Positionen erfolgt. Ein Reaktionsansatz enthält die vier Desoxynukleotide und eine geringe Menge der vier Didesoxynukleotide, die mit vier unterschiedlich fluoreszierenden chemischen Gruppen markiert sind. Bei der Kapillargelelektrophorese werden die Proben in einer Kapillare, welche mit Polymer gefüllt ist aufgetrennt und die Fluoreszenzsignale an einem bestimmten Punkt von einem Detektor gemessen und aufgezeichnet. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt in Form eines Intensitätsprofils für jedes der vier unterschiedlichen Fluorophore.

Sequenzierungsprimer	Sequenz
pGex-2Tseqf.	5'- AGCTATCCCACAAATTGATAAGT-3'
pGex-2Tseqr	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'
pRSVseqf	5'-GCAACAGACGGGTCTGACATG-3'
Hap46-end-seqf	5'-AGGTTTCAGGCATTCCTAGCCG-3'
Hap46 Δ C47-end-seqf	5'-CTGCCCAAGGATTTGCAAG-3'

Big Dye (Applied Biosystems)

Taq Polymerase

Puffer

unmarkierte Desoxynukleotide (dATP/dCTP/dGTP/dTTP)

markierte Didesoxynukleotide (ddATP/ddCTP/ddGTP/ddTTP)

MgCl₂Reaktionsansatz für Sequenzierungs-PCR

Big Dye	2µl
DNA-Template	200 bis 300ng
Primer	5pmol
H ₂ O _d	ad 10µl

Thermocycler-Protokoll

Zyklen		Temperatur	Zeit
1	initiale Denaturierung	96°C	5 Min
	Denaturierung :	96°C	30 sec
25	Primer-Anlagerung :	58°C	15 sec
	Verlängerung :	72°C	2 Min

Zur Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung wurden diese mit 40µl H₂O_d aufgefüllt und anschließend mit dem 2,7-fachen Volumen an Ethanol und 1/10 Volumen an NaAc pH 5,2 versetzt. Nach kurzem Vortexen der Probe, wurde diese für 10 Min bei RT belassen. Danach fand ein Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm in der Eppendorfzentrifuge statt. Nach 2-maligem Waschen des DNA-Pellets mit je 200µl 70% Ethanol, wurde dies in 15-20µl H₂O_d aufgenommen. Die Proben konnten nun in den Kapillarsequenzierer (Abi Prism 310 Genetic Analyzer) gestellt werden. Für die Sequenzierung wurde eine grüne Kapillare mit einer Leseweite bis zu 500bp verwendet, welche mit einem Polymer (DT POP6) gefüllt war.

3.2.14 Klonierung von pRSV-Hap46, Hap46ΔN16, Hap46ΔC47

Für Reporteragen-Analysen in F9 und Hela Zellen, sollten Hap46 und Hap-Varianten in den Vektor pRSV inkloniert werden. Dazu wurde Hap46, Hap46ΔN16 und Hap46ΔC47 mit entsprechenden Primern aus pGex-2T-Hap46 herausamplifiziert. Die Primer hatten überhängende Enden mit einer Hind III bzw. einer Nsi I Schnittstelle. Der Vektor wurde mit Hind III und Pst I geschnitten. Da Nsi I und Pst I kompatible Enden haben, konnten so die Hap-Fragmente zielgerichtet inkloniert werden. Um eine spätere effiziente Transkription der Hap-Varianten zu gewährleisten, wurde über die Forward-Primer ebenfalls eine Kozak-Sequenz inkloniert.

Variante	Primer	Sequenz
Hap46	HIII-Koz-Hap46-f	5'-CCCAAGCTTGCCACCACCATGAAGAAGAAAACCCGGCGC-3'
	Hap46-NsiI-r	5'-CTGCAGAACCAATGCATTGGTCACTCGGCCAGGGCAAAG-3'
Hap46 Δ N16	HIII-Koz-Hap46 Δ N16-f	5'-CCCAAGCTTGCCACCACCATGCGGAGCGAGGAGTTGACC-3'
	Hap46-NsiI-r	siehe oben
Hap46 Δ C47	HIII-Koz-Hap46-f	siehe oben
	Hap46 Δ C47-NsiI-r	5'-CTGCAGAACCAATGCATTGGTCATGGCAGGATCAGTGT-3'

TABELLE 3.2.2. Primer zur Erzeugung der Hap-Fragmente für die Klonierung der eukaryotischen Expressionskonstrukte pRSV-Hap46, Hap46 Δ N16 und Hap46 Δ C47.

3.2.15 Site-directed-Mutagenese

Zur Herstellung von Hap46-Varianten, welche für Bindungsstudien mit DNA benötigt wurden, wurde die Methode der site-directed-Mutagenese herangezogen. Für diese Methode ist es notwendig, komplementäre Primer zu konstruieren, welche die gewünschte Mutation in der Mitte jedes Primers enthalten. Die Primer werden in einer PCR mittels Pfu/Turbo DNA-Polymerase verlängert, so entstehen mutierte Plasmide. Für die PCR wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

DNA-Matrize	10ng bis 20ng
10X Puffer für Pfu Polymerase	5 μ l
dNTP's (40mM)	1 μ l
vorwärts Primer	125ng
rückwärts Primer	125ng
Pfu Polymerase	2,5 u
H ₂ O _d	ad 50 μ l

Die Hap46-Mutanten, sowie die verwendeten Ausgangsplasmide und jeweiligen Primer sind in Tabelle 3.1.2 aufgelistet. Die Parameter der PCR für die site-directed-Mutagenese waren wie folgt:

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95°C	30 sec
	95°C	30 sec
12-18	55°C	1 Min
	68°C	12 Min

Nach der PCR wird zu den Amplifikationsansätzen das Enzym DpnI (10u) zugegeben, welches die parentale methylierte DNA verdaut bei 37°C für 1 h. Danach wurden die Ansätze mit Ethanol gefällt und in 10 μ l H₂O_d aufgenommen, davon wurden 2 μ l für die Transformation in XL 10-Gold eingesetzt. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Platten mit Ampicillin

(50 μg Amp/1 ml LB-Medium) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Gewachsene Kolonien konnten gepickt und die DNA mittels des Wizard Plus SV DNA Purification System von Promega isoliert werden. Nach Testen und Konzentrationsabschätzung der DNA auf 1% Agarosegelen, konnte diese sequenziert werden.

3.2.16 Radioaktive End-Markierung von DNA mittels terminaler Polynukleotid-Kinase

Für Gel-Retardationsanalysen wurde ein PCR-generiertes, 235bp langes Fragment des CMV-Promotors bzw. ein 20bp Oligonukleotid mit einer AP1 Konsensus-Sequenz (AP1 Consensus Oligonukleotide von Promega, E320A) an den 5' -Enden mittels der Vorwärts-Reaktion der T_4 -Polynukleotid-Kinase (MBI Fermentas) und γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol) markiert. Die T_4 -Polynukleotid-Kinase katalysiert die Übertragung des terminalen (γ)-Phosphates von ATP auf die 5'-Termini von DNA oder RNA. Die Komponenten wurden wie folgt zusammen pipettiert:

	235bp Fragment	AP1 Oligonukleotid
DNA	1 μg (6,5pmol)	115ng (8,75pmol)
10X Puffer A	3 μl	3 μl
BSA (10 mg/(ml))	1,5 μl	1,5 μl
H_2O_d	ad 30 μl	ad 30 μl
T_4 -Polynukleotid-Kinase	1 unit	1 unit
γ - ^{32}P -ATP	50 μCi (16,5pmol)	50 μCi (16,5pmol)

Die Ansätze wurden für 30 Min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der markierten DNA erfolgte über G-50-Säulen (Amersham Biosciences, Microspin G-50 Columns, 27-5330-01). Die Minisäulen wurden zuerst gevortext. Nach dem Entfernen der Verschlusskappe, wurde die Säule bei $735 \times g$ für 1 Minute zentrifugiert. Nun konnten die Markierungsansätze vorsichtig in die Mitte des Säulenmaterials pipettiert werden. Zum Eluieren der markierten DNA folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei $735 \times g$ für 2 Min. Die anschließende Aktivitätsbestimmung der markierten DNA erfolgte im Szintillationszähler und beruhte auf der Messung der Tscherenkow-Strahlung.

3.3 Allgemeine Methoden Proteine

3.3.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

3.3.1.1 Bakterielle Expression rekombinanter Proteine

25 ml LB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin wurden mit dem Escherichia coli Stamm BL21DE3 angeimpft. Dieser wurde zuvor mit den entsprechenden prokaryotischen Expressionsvektoren,

welche einen GST-Tag für die Aufreinigung über GSH-Sepharose beinhalten, transformiert. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Vorkultur in 500ml LB-Medium (mit 50µg/ml Amp) überführt, so daß eine OD_{600nm} von 0,04 resultierte. Die folgende Inkubationszeit betrug 3 bis 4 h, d.h. bis eine OD_{600nm} zwischen 0,5 und 0,7 erreicht war. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonz. 1mM) induziert, wobei die Temperatur 37°C und die Dauer der Inkubation 2h betrug. Die Bakterien wurden nun bei 5000 rpm in einem GSA-Rotor für 20 Min abzentrifugiert und nach Entfernen des Mediums das Pellet mit 1X HepBS gewaschen. Entweder wurde das Pellet bis zur Aufreinigung der Proteine bei -80°C gelagert oder zum sofortigen Weiterarbeiten in 4 ml HepBS Puffer resuspendiert (weiter siehe: Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine).

3.3.1.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Das in 4 ml 1X HepBS gelöste Bakterienpellet, wurde in 4 Eppendorfcups gleichmäßig aufgeteilt und zum Aufschluß der Zellen auf Eis für 1 x 15 sec und 2 x 10 sec bei 70W sonifiziert. Danach erfolgte die Zugabe von 100µl 10% Triton X-100. Die Lysate wurden bei 13000rpm bei 4°C für 15 Min zentrifugiert, um so Zelltrümmer zu Pelettieren. Bevor der Überstand auf eine GSH-Sepharose Matrix gegeben werden konnte, mußte diese vorbereitet werden. Dazu wurden für je 1ml Überstand aus der Proteinexpression 120µl 50% GSH-Sepharose (GSH-Sepharose 4B-Suspension, Amersham Pharmacia) mit 1ml HepBS 2 mal gewaschen und die Matrix mit einer Hamilton-Spritze trockengelegt. Der Überstand wurde auf die Matrix gegeben und bei 4°C über Nacht unter leichtem Drehen inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit 1X HepBS/1% Triton X-100 und 3 Waschschrte mit 1X HepBS. Die Proteine konnten entweder über GSH eluiert oder mit Thrombin abgespalten werden. Um GST-Fusionsproteine zu erhalten, wurde die Matrix mit 120µl GSH-Elutionspuffer für 15 Min bei RT auf der Drehstange inkubiert. Da die Fusionsproteine eine Schnittstelle für Thrombin zwischen GST-Anker und Protein besitzen, konnte dies in einem Thrombin-Cleavage-Puffer vom noch an die Matrix gebundenen GST-Anteil abgeschnitten werden. Die aufgereinigten Proteine wurden über SDS-PAGE analysiert und die Konzentration über Bradford bestimmt.

10X HepBS,

20 mM Hepes
100 mM KCl
mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

GSH-Elutionspuffer

50 mM Tris-HCl pH 8
10 mM GSH red.

Thrombin-Cleavage-Puffer

120µl 1 X HepBS
12units Thrombin Protease

3.3.2 Proteinmengenbestimmung über Bradford

Zu 200 μ l Dye Reagent (Biorad) wurden 700 μ l H_2O_d zugegeben. Anschließend wurde mikroliterweise Proteinlösung zugegeben bis ein leichter Farbumschlag ins Blaue zu erkennen war. Die Ansätze wurden mit H_2O_d auf 1 ml aufgefüllt. Ein Kontrollansatz ohne Protein, aber mit entsprechendem Volumen an Protein-Lagerungs-Puffer diente als Leerkontrolle. Die Ansätze inkubierten für 10 bis 30 Min bei RT. Die Messung im Spektrometer erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Anhand einer BSA-Eichkurve konnte die Proteinkonzentration abgelesen werden.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Größenfraktionierung der Proteine erfolgte auf 1mm dicken 10% Polyacrylamid-Gelen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Diese Gele bestehen aus einem unteren Trenngel und einem oberen Sammelgel. Protein-Proben wurden mit 1/4 Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und für 2 Min bei 100°C aufgekocht, bevor sie zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (High Marker, Sigma) auf das Gel aufgetragen wurden. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches nahezu alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Desweiteren bewirkt der dem Probenpuffer zugefügte β -Mercaptoethanol die Reduktion von Disulfidbrücken. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 25 mA im Sammelgel und wurde sobald die Proben ins Trenngel einliefen auf 35 mA erhöht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine entweder durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, oder auf eine PVDF-Membran transferiert.

<u>Trenngel</u>		<u>Trenngel 4X Puffer</u>	
3ml	H_2O_d	8,17g (1,5 M)	Tris pH 8,8
2,5ml	30% Aycrylamid-Bisacrylamid	4ml	10% SDS
1,9ml	Trenngel 4X Puffer	ad 100ml	H_2O_d
112 μ l	10 APS		
5 μ l	TEMED		

<u>Sammelgel</u>		<u>Sammelgel 4 \times Puffer</u>	
1ml	H_2O_d	6,06g (0,5 M)	Tris pH 6,8
200 μ l	30% Aycrylamid-Bisacrylamid	4ml	10% SDS
444 μ l	Sammelgel 4X Puffer	ad 100ml	H_2O_d
28 μ l	10% APS		
5 μ l	TEMED		

<u>SDS-Probenpuffer, 4 X</u>		<u>SDS-Laufpuffer, 10 X</u>	
2ml	Glycerol	30g (82 mM)	Tris
2ml	10% SDS	144g (0,64 mM)	Glycin
0,25mg	Bromphenolblau	100ml	10% SDS
2,5ml	β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)	ad 1l	H_2O_d
ad 10ml	H_2O_d		

<u>Proteine (High Marker, Sigma)</u>	<u>Molekulargewicht</u>
Myosin, Kaninchen Muskel	205 kDa
β -Galactosidase, E. coli	116 kDa
Phosphorylase b, Kaninchen Muskel	97,4 kDa
Albumin, Bovin	66 kDa
Albumin, Ei	45 kDa
Carbonische Anhydrase, Bovine Erythrocyten	29 kDa

3.3.4 Immuno-Blotting

Zum Transfer der Proteine aus SDS-Gelen wurde das Verfahren des semi-dry Blottens angewandt. Dazu wurde eine PVDF (Poly-Vinyl)-Membran () auf die Größe des Geles zurechtgeschnitten, kurz in Ethanol angefeuchtet und in H_2O_d gewaschen und 5 Min in Anodenpuffer II inkubiert. Parallel dazu wurde das Gel für 5 Min in Kathodenpuffer inkubiert. Anschließend wurden 2 Whatman-Papiere mit Anodenpuffer I getränkt und auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Dem folgte ein in Anodenpuffer II getränktes Whatman-Papier. Als nächstes wurde die Membran und anschließend das Gel aufgelegt. Schließlich wurde das Gel mit 3 in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papieren bedeckt. Nach Auflegen der Kathode der Blotapparatur erfolgte der Transfer der Proteine bei 110 mA pro Gel für 1h bei RT. Nach dem Blotten wurden die transferierten Proteine reversibel mit Poncau S angefärbt.

Transferpuffer

Anodenpuffer I:	300 mM	Tris pH 10,4
Anodenpuffer II:	25 mM	Tris pH 10,4
Kathodenpuffer:	40 mM	Aminocapronsäure
	25 mM	Tris pH 9,4

3.3.5 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie

Zum anfärben von Proteinen in SDS-Gelen wurden diese in Coomassie-Lösung gelegt, kurz aufgeköcht und für 15 Min bis über Nacht darin belassen. Anschließend wurde das Gel mit

H_2O_d gewaschen und in Entfärberlösung gelegt, welche wiederum kurz aufgekocht wurde. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis nur noch die Proteinbanden angefärbt waren.

Coomassie-Lösung

50%	Ethanol
10%	Eisessig
40%	H_2O_d
0,05%	Coomassie brilliant blue R-250

3.3.6 Peptidsynthese

Die von R. Frank weiterentwickelte Methode der Peptidsynthese (SPOT-synthesis, Frank 1992), ermöglicht mit immobilisierten Peptiden auf einer aktivierten Cellulosemembran, die Studie von Protein-Protein-Interaktionen. So können innerhalb einer bekannten Proteinsequenz lineare Epitope identifiziert werden. Dazu wurden auf eine mit einem PEG-Linker, gekoppelt mit Alanin, derivatisierten Cellulosemembran (Abimed, Amino-PEG500-UC sheet, AC01 12), Peptide mit einer Länge von 10 Aminosäuren synthetisiert und beginnt am C-Terminus des Peptids. Die Synthese selbst wird von einem automatisierten Pipettier-Roboter (Auto-Spot-Robot ASP222) übernommen, wohingegen die Waschschriffe zwischen den einzelnen Zyklen manuell erfolgen.

3.3.6.1 Programmierung des Pipettier-Roboters

Zunächst sind die drei Raumkoordinaten x , y und z , sowie der Abstand zwischen den einzelnen Peptid-Spots in x - und y -Richtung im Computer einzugeben. Über diese Werte kann das Programm jede beliebige Position auf der Membran berechnen, um eine gezielte Anordnung der Peptide auf der Membran zu erhalten. Die zu synthetisierende Sequenz der Peptide wird in einen Editor über verschiedene Programmierbefehle eingegeben. Das Programm erstellt ein Pep-Datei, die angibt an welcher Position ein Peptid synthetisiert wird.

gewünschte Peptide	Programmier-Befehl	Funktion
Individuelle Peptide	.pep	per Eingabe definiertes Peptid
Überlappende Peptide	.seq,a,b	Peptide mit einer Länge von a und einem Versatz von b
	.end	
Analoge Sequenzen	.analog,*=A,B,C,D	Der Platzhalter wird durch jede der als A, B, C bezeichneten Aminosäuren ersetzt
Analoge Sequenzen	.analog,*=*	Der Platzhalter wird durch jede der 20 proteinogenen Aminosäuren ersetzt

3.3.6.2 Vorbereitung der Aminosäuren

Je 1g lyophilisierter Aminosäure (Bachem) wurde in NMP gelöst, so daß eine Konzentration von 0,25mM resultierte. Die Aminosäurelösung wurde in 250 μ l Aliquots eingeteilt und bei -20°C eingefroren. Das Auftauen erfolgte bei RT im Vakuum.

3.3.6.3 Start der Synthese

Die aufgetauten Aminosäuren wurden in einen Halter am Roboter platziert. Dann wurden die Membranen, die ebenfalls im Vakuum aufgetaut wurden, auf die gereinigte Arbeitsfläche des Roboters gelegt und das Programm gestartet. Bei Auftrag der ersten Aminosäure entsteht eine Peptidbindung durch einen nukleophilen Angriff der Aminogruppe des PEG-Linkers mit der aktivierten Carboxylgruppe der Aminosäure. Um mögliche Verknüpfungen mit den Aminogruppen der Seitenketten zu verhindern tragen die Aminosäuren F-moc-Schutzgruppen.

3.3.6.4 Waschprotokoll zwischen den Syntheseschritten

Nach dem Auftragen der Aminosäuren, ist es erforderlich die noch freien Aminogruppen zu Acetylieren, um so die Entstehung unspezifischer Peptide zu verhindern. Dazu wurde die Membran zweimal in 25ml DMF mit 4% Essigsäureanhydrid für 30 sec bzw. 5 bis 10 Min gewaschen. Um Reste des Essigsäureanhydrids zu entfernen, mußte die Membran zweimal mit je 25 ml DMF gewaschen werden. Eine anschließende Inkubation in 25 ml DMF mit 20% Piperidin für 10 Min, war nötig, um die F-moc-Schutzgruppen der gebundenen Aminosäuren abzuspalten. Diese und das Piperidin wurden durch 10-maliges Waschen für je 2 Min in je 25ml DMF entfernt. Der Erfolg der Abspaltung wurde durch Anfärben der freien Aminogruppen überprüft, indem die Membran 5 Min mit 0,01% in DMF gelöstem Bromphenolblau inkubiert wurde. Zwei Waschschrte in je 25 ml absolutem Ethanol entfernten die Reste von DMF, Bromphenolblau und mögliche Kontaminationen mit Wasser. Nach dem Trocknen der Membran auf einem Whatman-Papier unter der Kaltstufe des Föhns, konnte ein nächster Synthesezyklus erfolgen.

3.3.6.5 Waschprotokoll nach dem letzten Synthesezyklus

Nach dem finalen Syntheseschritt wurden zunächst durch zweimaliges Waschen in je 25 ml DMF überschüssige Aminosäuren entfernt, bevor die F-moc-Schutzgruppen bei einer 10 minütigen Inkubation in 20% Piperidin abgespalten wurden. Analog zu oben folgten 10 Waschschrte in je 25 ml DMF für je 2 Min, und das Anfärben der freien Aminogruppen mit 0,01% in DMF gelöstem Bromphenolblau. Die Inkubation in 4% Essigsäureanhydrid erfolgte solange bis die Spots vollständig entfärbt waren. Wie oben wurde die Membran 2 Mal in je 25 ml absolutem Ethanol für 2 Min gewaschen und anschließend getrocknet. Zur Abspaltung weiterer

Schutzgruppen, die sich an den Seitenketten der Aminosäuren befinden, wurde die Membran für 1h in einer Lösung aus 5 ml Dichlormethan (Lösungsmittel für Abspaltung), 5 ml TFA (spaltet Schutzgruppen ab) und 250 μ l Triisobutylsilan (fängt Reaktionsprodukte ab) inkubiert. Nun folgten 4 Waschrunde für je 2 Min in Dichlormethan und 3 Waschrunde für je 2 Min in DMF. Nach zweimal Waschen der Membran für je 2 Min in absolutem Ethanol, konnte die Membran bis zum Gebrauch getrocknet im Kühlschrank aufbewahrt werden, oder sofort für Versuche eingesetzt werden.

3.4 Allgemeine Methoden Zellkultur

3.4.1 Zellkultur von F9 und Hela Zellen

Die F9 Zellen sind embryonalen Teratocarcinoma Zellen der Maus. Sie sind nicht ausdifferenziert und exprimieren in diesem Zustand kein c-Jun. Das verwendete Medium ist DMEM/F12 Mix mit L-Glucose und L-Glutamin (Gibco oder Cambrex) versetzt mit 1X β -Mercaptoethanol (Gibco, 31350-010), 10% FCS (Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) (jeweils Endkonzentration). Die Zellen wachsen in kleinen Kolonien und sollten daher alle 2 bis 3 Tage gesplittet werden. Zum Auftauen der Zellen (je Aliquot 2×10^6 Zellen), werden diese vom Stickstoff direkt auf Eis gelagert, dann sofort für 3 Min bei 37°C im Wasserbad geschwenkt und schließlich direkt in 25 ml vorbereitetes Medium in einer 25 cm² Zellkulturflasche (Gibco) überführt. Zum Splitten der Zellen wurden diese zuerst mit 1X PBS gewaschen bevor das Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA (Gibco) für 2 bis 5 Min im Brutschrank bei 37°C erfolgte. Zur Inaktivierung des Trypsin/EDTA wurde ein entsprechendes Volumen (Menge an Trypsin/EDTA in ml + 1 ml) an Vollmedium (mit allen Zusätzen) zugegeben. Nach dem Mischen der Zellen wurden 10 μ l zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Pro cm² Kulturgefäß sollten 25.000 bis 30.000 Zellen ausgesät werden. Eventuell können konfluente Zellen auch 1:4 gesplittet werden. HeLa Zellen stammen aus einem humanen Zervix-Karzinom. Das verwendete Medium ist RPMI 1640 mit GlutaMAX und 25 mM HEPES (Gibco oder Cambrex). Zusätze jeweils mit Endkonzentration sind 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Die konfluenten Zellen sollten alle 3 bis 5 Tage 1:6 gesplittet werden. Zum Auftauen und Splitten der Zellen wird wie oben beschrieben verfahren. Das Einfrieren von F9 und HeLa Zellen erfolgt in den entsprechenden Medien mit 10% FCS, 1% Pen/Strep und 10% DMSO in flüssigem Stickstoff.

10X PBS, pH 7,4

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,85 g	$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
0,24 g	KH_2PO_4
ad 1 l	H_2O

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Zum Zählen der Zellen wurden 10 μ l der Zellsuspension mit gleicher Menge an Trypanblau (färbt tote Zellen an) versetzt. 10 μ l dieser Mischung wurden in eine vorbereitete Neubaur-Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen gezählt. Die Berechnung der Zellen in einem Milliliter wurden über folgende Formel berechnet: Zellzahl \times 2 (Verdünnungsfaktor) \times 10⁴.

3.4.3 Transfektion mit Transfektin

Die Transfektion von F9 und Hela Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Transfectin von Biorad. Dazu wurden je Vertiefung einer 6-well-Platte 5 \times 10⁵ Zellen am Abend ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1X PBS (Gibco) gewaschen und mit 2 ml frischem Medium (mit 10% FCS, Pen/Strep) versehen. Die zu transfizierenden eukaryotischen Expressionsplasmide (siehe eukaryotischen Expressionsplasmide) wurden vorbereitet. Die Gesamt-DNA Menge in einem Ansatz betrug dabei 2,5 μ g. Zu den Ansätzen wurde jeweils 250 μ l serumfreies Medium und 7 μ l Transfectin zugegeben und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Min bei RT konnten die Ansätze auf die Zellen getropft werden. Die weitere Lagerung der Zellen mit Transfektionsreagenz betrug 24 h, danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen nochmals bis zu 24h weiter inkubiert, bevor sie für folgende Analysen wie Nachweis der β -Galactosidase, Immunoblot oder Luciferase-Assay weiter bearbeitet wurden.

3.4.4 Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität in transfizierten Zellen

Die Effizienz der Transfektion wurde über ein β -Galaktosidase exprimierendes Plasmid überprüft. Das Medium der Zellen wurde entfernt und mit 1X PBS gewaschen. Einer Inkubation von 5 Min in Fixativ folgte ein erneuter Waschschriff mit 1X PBS. Nun wurde eine Substrat-Färbelösung auf die Zellen gegeben. Diese enthält unter anderem X-Gal, welches ein Substrat für die β -Galaktosidase ist, die in transfizierten Zellen exprimiert wird. Nach 2h bei 37°C konnte die Transfektionsrate über das Verhältnis von gefärbten blauen zu nichtgefärbten Zellen bestimmt werden.

<u>Fixativ</u>		<u>Färbelösung</u>	
85 ml	H_2O_d	70 ml	H_2O_d
10 ml	10X PBS	10 ml	10X PBS
5 ml	37% Formaldehyd-Lösung	10 ml	50 mM K-Ferricyanid
0,2 ml	25% Glutaraldehyd	10 ml	50 mM K-Ferrocyanid
		0,2 ml	1 M $MgCl_2$
<u>Substrat-Färbelösung</u>			
20 ml	Färbelösung		
1 ml	X-Gal (20 mg/ ml)		

3.4.5 Nachweis der Luciferase in Extrakten transfizierter Zellen

Transfizierte Zellen wurden je Vertiefung einer 6-well Zellkulturschale mit 400 μ l 1X RLP (Reporter-Lyse-Puffer, Promega) für 45 Min bei RT lysiert, nachdem 1X mit PBS gewaschen wurde. Die Zell-Lysate wurden in ein Eppendorf-Cup überführt und bei 13000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Die Messung der Luciferase-Aktivität der Proben erfolgte, indem 20 μ l der Überstände in ein Luciferase-Röhrchen pipettiert wurden. Das Röhrchen wurde in den Luminometer gestellt, welcher nach Zugabe von 100 μ l Luciferase Assay Reagent die Chemolumineszens messen konnte. Bei Zugabe von Luciferase Assay Reagent wird das dort enthaltene Substrat (Beetle Luciferin) von der Luciferase in Oxyluciferin, AMP, PP_i und CO_2 gespalten, wobei Licht frei wird.

3.5 Spezielle Methoden und Versuchsaufbau

3.5.1 Gel-Retardationsanalysen

3.5.1.1 Interaktion von Hap46 und DNA

Gel-Retardationsanalysen zur Untersuchung der Interaktion von Hap46 und DNA, wurden in 5 bis 6% Polyacrylamid-Gelen gemacht. Dabei waren einige Optimierungsversuche notwendig. In ersten Versuchen wurden steigende Mengen Hap46 (0,2 μ g bis 10 μ g) mit 3ng radioaktiver DNA (Fragment 11 des CMV-Promotors, mit einer Länge von 235 bp), welche mit 50ng nichtradioaktiver DNA versetzt wurde, für 5 Min bei RT inkubiert. Desweiteren wurden 3ng radioaktive DNA mit bis zu 200ng unmarkierter DNA aufgefüllt und mit steigenden Mengen an Hap46-Protein (0,5 μ g bis 2 μ g) geschiftet. Um Nachzuweisen, daß Hap46 unspezifisch an den CMV-Promotor bindet, wurden 130bp Fragmente (F1 bis F6) und 235bp Fragmente (F7 bis F11) (je Ansatz 50ng unmarkierte DNA) mit 3 μ g Hap46 inkubiert. Für die Untersuchung der Aminosäuren von Hap46, welche für die Bindung an DNA erforderlich sind, wurden je Ansatz 3ng

radioaktiv markierte DNA des Fragments 11 des CMV Promotors mit 50ng unmarkierter DNA versetzt und mit 3 μ g bis 6 μ g Hap46 bzw. Hap46 Varianten geshiftet. Alle Inkubationen mit DNA und Protein erfolgten für 10 Min bei RT in einem Volumen zwischen 10 μ l und 20 μ l. Bevor die Ansätze auf nicht denaturierende PAA-Gele aufgetragen wurden, wurden diese mit 6X Ladepuffer versetzt. Nichtradioaktive Gel-Shifts wurden für 5 Min in Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht analysiert. DNA-Banden radioaktiver Gel-Shifts wurden über Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.5.1.2 Interaktionsanalyse mit DNA, Hap46 und c-Jun

Um Nachzuweisen, daß an DNA gebundenes Hap46 noch in der Lage ist mit c-jun zu interagieren, wurden Gel-Shifts gemacht, bei denen 3ng radioaktiv markierte DNA (235bp Fragment des CMV-Promotors), welche mit 80ng nicht markierter DNA aufgefüllt wurde, mit 4 μ g Hap46 und 3 μ g c-Jun in einem Volumen von 16 μ l für 30 Min bei RT inkubiert. Kontrollansätze mit DNA und Hap46 alleine wurden mit dem entsprechenden Volumen des Lagerungspuffers von c-jun aufgefüllt, da dieser 0,5 M Guanidinium-Hydrochlorid enthielt. Die Ansätze wurden auf einem 5% nativen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden über Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.5.1.3 Interaktionsanalysen mit an DNA gebundenem c-jun und Hap46

Hierfür wurden in einem ersten Versuch 0,76ng eines radioaktiv markierten AP1-Oligonukleotides (Promega) mit 150ng, 300ng und 1 μ g c-Jun inkubiert. Manche Ansätze enthielten zusätzlich 1 μ g Protein von Hap46. In einem zweiten Versuch wurde den Ansätzen zusätzlich ein Kompetitionsoligonukleotid (0,056pmol je Ansatz) zugefügt, welches durch Hybridisierung zweier komplementärer Primer (siehe prokaryotische Vektoren für die Proteinexpression: R6/8f und R6/8r) erhalten wurde. Die Hybridisierung je 100pmol der Primer fand bei 50°C statt. Außerdem wurden Ansätze mit 300ng c-jun mit steigenden Mengen von Hap46 (0,6 μ g bis 4 μ g) bzw. Hap46 Δ N16 (0,6 μ g bis 4 μ g) inkubiert. Hap46 und c-Jun wurden für 15 Min bei RT präinkubiert. nach Zugabe der DNA erfolgte die eigentliche Inkubation für 15 Min bei RT in einem Volumen von 10 μ l. Die Ansätze wurden auf 8% nativen PAA-Gelen aufgetrennt und die Banden über Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.5.2 Analyse membrangebundener Peptide

Die Cellulosemembranen mit gebundenen Peptiden wurden kurz in absolutem Ethanol inkubiert, wobei nach und nach der Ethanol gegen 1X HepBS ausgetauscht wurde. Anschließend wurden die Membranen in 1X HepBS mit 5% BSA /0,2% Tween über Nacht bei 4°C geblockt. Die Proteinlösung (5 bis 10 μ g Protein auf 10 ml Inkubationspuffer: 1X HepBS/1% BSA/0,02%

Tween) konnte nun für 1 bis 2h bei RT auf die Membranen gegeben werden. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper in Inkubationspuffer erfolgte bei RT für 1 bis 2 h, ebenso wie die anschließende Inkubation mit dem 2. Antikörper. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mittels ECL. Dazu wurden Lösung 1 und Lösung 2 vereinigt und die Membranen für 1 bis 2 Min darin geschwenkt, bevor sie zwischen 2 Folien gelegt und ein Film aufgelegt werden konnte. Alle Waschschrte erfolgten 3 mal für je 5 Min mit 1X HepBS/0,02% Tween 20.

membrangebundene Peptide	Inkubation mit Protein	1. Antikörper	2. Antikörper
von hsc70	Hap46ΔN16	CC9E8 (1:5000)	Ziege anti-Maus HRP (1:2000)
von c-Jun	Hap46	CC9E8 (1:5000)	Ziege anti-Maus HRP (1:2000)
	Hap46ΔN16		
von Hap46	bovines hsc70	K19 (1:2000)	Kaninchen anti-Ziege HRP (1:1000)
	hsc70 ATPase-Fragment	MA3-007 (1:2000)	Ziege anti-Maus HRP (1:2000)

3.5.3 Bindungsstudien mit Hap46, hsc70 und c-Jun mittels der Elisa-Methode

Für Elisa-Analysen wurden zwischen 500ng bzw. 2μg Protein (c-Jun: 500ng, hsc70: 1μg, Hap46: 2μg) in einem Volumen von je 100μl HepBS, an den Plastikträger für 2 bis 4h bei RT gebunden. Nach 3 maligem Waschen mit HepBS/0,02% Tween 20, wurde für 2h bei RT geblockt mit 200μl HepBS/5% BSA/0,2% Tween 20. Die Inkubation mit den entsprechenden Proteinen (Hap46 und Hap-Varianten: 1μg, GST-Jun-Varianten: 1μg) erfolgte für 2h bei RT in 100μl HepBS/1% BSA/0,02% Tween 20. Für die Detektion der gebundenen Proteine wurde ein Hap-spezifischer (CC9E8, 1: 4000) bzw. ein Antikörper gegen GST (MSA-103, 1:1000) verwendet. Die Inkubationszeit betrug 1 bis 2h bei RT in 100μl HepBS/1% BSA/0,02% Tween 20. Die anschließende Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper (1:1000-1:2000) erfolgte bei RT für 1h in in 100μl HepBS/1% BSA/0,02% Tween 20. Zur Sichtbarmachung der gebundenen Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte eine Inkubation in 100μl TMB-Lösung (Promega), welche als Substrat für die gekoppelte Peroxidase diente. Die Reaktion wurde mit 50μl H₂SO₄ abgestoppt, solange die Blaufärbung sich noch im linear meßbaren Bereich lag, daraufhin wechselte die Färbung in gelb, welche bei 450 nm gemessen werden konnte.

3.5.4 Interaktionsanalyse von Hap46 mit Matrix-gekoppelten Jun-Varianten

Je 50μg Protein der Jun-Varianten GST-c-Jun1-166, GST-c-JunΔN223 und GST-v-Jun1-119, wurden in 1ml HepBS an 20μl GSH-Sepharose für 2h bei RT gekoppelt. Danach wurde die Matrix 3 mal mit 1x HepBS/0,02%Tween 20 gewaschen und mit HepBS/ 5%BSA/ 0,2%Tween 20 für 2h bei RT geblockt. Nach 3 Mal Waschen wurde die Matrix in 100μl HepBS aufgenommen. Davon wurden je 10μl für ein 10% SDS-Gel entnommen, um die Ankopplung der Proteine zu kontrollieren. Für die folgende Inkubation mit je 15μg rekombinantem Hap46 bei RT für 2 h, wurden

gleiche Mengen an gekoppeltem Protein eingesetzt. Die Ansätze wurden 3 mal gewaschen und in 14 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen, aufgeköcht und auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen, zusammen mit 1 μ g Hap46. Nach dem Gellauf wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese wurde in HepBS/ 5% BSA/ 0,2% Tween 20 für 2h bei RT geblockt und anschließend mit einem polyclonalen Serum gegen Hap (Serum 4), welches 1: 4000 in HepBS/1% BSA/0,02% Tween 20 verdünnt war, für 2h inkubiert. Nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörper (1:2000) für 1h bei RT, wurden die Membranen für 1 bis 2 Min in Lösung 1 und 2 geschwenkt und zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Durch Auflegen eines Röntgenfilms (Amersham) und anschließende Entwicklung in der Entwicklermaschine konnten die detektierten Proteinbanden analysiert werden.

<u>Lösung 1</u>		<u>Lösung 2</u>	
17,7 ml	H_2O_d	18 ml	H_2O_d
2 ml	1 M Tris pH 8	2 ml	1 M Tris pH 8
200 μ l	Luminol	12 μ l	H_2O_2 (startet Reaktion)
88 μ l	Cumarinsäure		

3.5.5 JNK-abhängige Phosphorylierung von c-Jun in Gegenwart von Hap46

Um den Einfluß von Hap46 auf die JNK-abhängige Phosphorylierung von c-Jun zu untersuchen wurden die unten aufgelisteten Komponenten zusammenpipettiert, wobei das radioaktiv markierte γ - ^{32}P -ATP nach einer 10 bis 15 Minuten dauernden Präinkubation von Hap46 und c-Jun bei RT zu den Ansätzen gegeben wurde. Rekombinantes Protein von JNK, GST-c-Jun 1-169 und die verwendeten Puffer (Assay Delution Buffer I, Magnesium/ATP Cocktail) waren Bestandteil eines Phosphorylierungs-Kits (Upstate, 17-166), aus dessen Protokoll die Zusammensetzung der Puffer entnommen werden kann. Das c-Jun voller Länge ist bei Promega erhältlich. 10 μ l γ - ^{32}P -ATP wurden mit 90 μ l des Magnesium/ATP Cocktail gemischt. Je Ansatz betrug die Menge an γ - ^{32}P -ATP 1pmol (0,3 μ Ci/ μ l Ansatz). Die jeweiligen Kontrollansätze wurden mit entsprechenden Lagerungs-Puffern der einzelnen Proteine aufgefüllt.

Ansätze für Phosphorylierungsversuche mit c-Jun

	1	2a	2b
JNK	0,33 μ g	1 μ g	0,5 μ g
GST-c-Jun 1-169	0,33 μ g	-	-
c-Jun	-	0,1-1 μ g	0,25 μ g
rekombinantes Hap46	3,5 μ g	-	2,5 μ g
ADBI	3,3 μ l	10 μ l	5 μ l
Mg^{2+} /ATP mit γ - ^{32}P -ATP	3,3 μ l	10 μ l	5 μ l

Nachdem alle Komponenten vereinigt waren, wurden die Ansätze bei 30°C für 30 Min inkubiert. Anschließend wurde die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von 1/3 Volumen 4X SDS-Probenpuffer abgestoppt. Nach dem Aufkochen der Proben für 5 Min wurden diese auf einem 10% SDS Gel aufgetrennt und die Banden über Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.5.6 Einfluß von Hap46 auf die c-Jun abhängige Transkription *in vivo*

Um zu überprüfen, ob Hap46 auf die c-Jun vermittelte Transkription Einfluß nimmt wurden 5×10^5 F9 Zellen mit 0,5µg pcoll-Luci und je 1µg der Plasmide pRSV-c-Jun und pRSV-Hap46 bzw. pRSV-Hap46ΔN16 oder pRSVΔC47 transfiziert. Als Referenz dienten Ansätze mit 0,5µg pcoll-Luci, 1 µ pRSV-c-Jun und 1µg pRSV. Ansätze mit 0,5µg pcoll-Luci und 2µg pRSV bzw. 0,5µg pcoll-Luci, 1µg pRSV und 1µg pRSV-Hap46 bzw. pRSV-Hap46ΔN16 oder pRSVΔC47, dienten als Kontrollen. Die verwendeten Plasmide wurden über den Endofree Maxi Kit von Qiagen gewonnen. Alle Ansätze wurden in vierfacher Ausführung gemacht. Nach 32h wurde die Hälfte der Ansätze für 2h bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen die andere Hälfte verblieb bei 37°C. Nach weiteren 3h bzw. 16h wurden die Zellen für den Luciferase-Assay aufgearbeitet. Für die Messung am Luminometer wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt.

4

Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Bindung von Hap46 und hsc70

4.1.1 Beitrag der Aminosäuren der Regionen I und IV von hsc70 bei der Bindung an Hap46

In vorherigen Studien von Petersen et al., konnten potentielle Kontaktregionen von Hap46 auf der ATPase-Domäne von hsc70 identifiziert werden. Region A, welche über Phage Display gefunden wurde, überlappt partiell mit Regionen I und IV, die bei der Analyse membrangebundener Peptide von hsc70 mit Hap46 identifiziert werden konnten. Diese Regionen, welche auf Subdomäne I von hsc70 liegen, bilden zusammen eine distinkte Struktur, welche eine hervorstehende Protuberanz beinhaltet (Abb. 4.1.1). Aufgrund dieses strukturellen Merkmals scheint diese Region geeignet für Protein-Protein Interaktionen und somit für die Interaktion von Hap46 und hsc70.

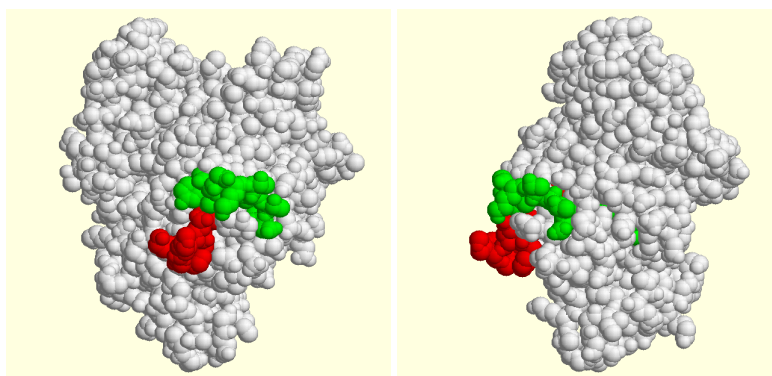


ABBILDUNG 4.1.1. Hsc70 ATPase-Domäne aus verschiedenen Perspektiven mit Darstellung der Regionen I (rot) und IV (grün), welche von Petersen et al. als Interaktionsregionen von Hap46 mit hsc70 über Peptidanalyse identifiziert wurden

Im Rahmen dieser Arbeit, wurden die einzelnen Aminosäuren der Regionen I und IV, deren Aminosäuresequenz in Tabelle 4.1.1 angegeben ist, einer genaueren Untersuchung bezüglich der Bindung an Hap46 unterzogen.

Region	Aminosäure	Sequenz
I	17-25	CVGVFQHGK
IV	134-142	YLGKTVTNA

TABELLE 4.1.1. Interaktionsregionen I und IV von Hap46 auf hsc70, welche über Peptidanalyse identifiziert wurden.

Für Mutationsanalysen, wurden Peptide (10mere), welche die Aminosäuresequenzen der Regionen I und IV überspannen, auf einer Cellulosemembran synthetisiert. Dabei wurde jede Aminosäure der zu untersuchenden Regionen jeweils gegen jede der 20 proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht. Die Membranen wurden mit rekombinantem Hap46 Δ N16 inkubiert und die Peptid-Protein-Komplexe mit einem monoklonalen Antikörper (CC9E8), spezifisch gegen Hap46, sichtbar gemacht. In Abbildung 4.1.2, Spalte 21 wurden Peptide ohne Aminosäureaustausch als Positivkontrollen synthetisiert. Spalten 1 bis 20 zeigen Peptide, mit an der entsprechenden Position, gegen Aminosäuren A bis V, ausgetauschten Aminosäuren. Die Position der mutierten Aminosäure innerhalb des Peptids ist mit einem Sternchen gekennzeichnet (Abb. 4.1.2) und die zu mutierende Aminosäure selbst ist nochmals in Abbildung 4.1.2, Spalte 0 angegeben.

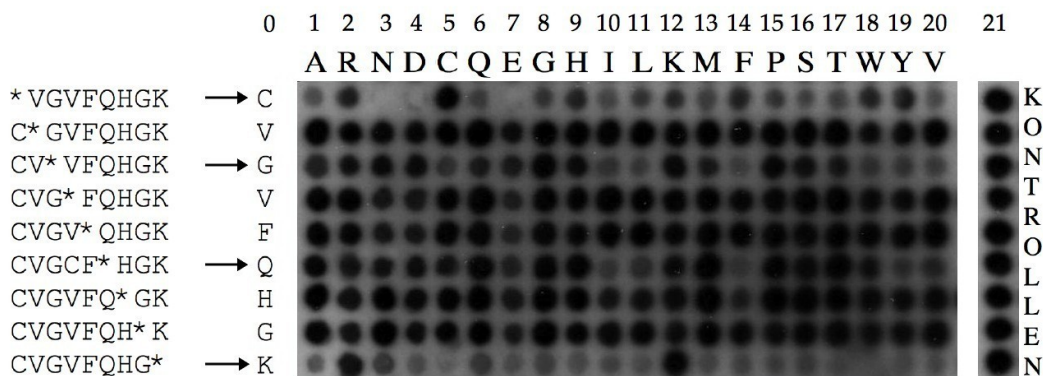


ABBILDUNG 4.1.2. Mutationsanalyse der Interaktionsregion I von Hap46 auf hsc70: Mutierte Peptide der Region I von hsc70 wurden auf eine Cellulosemembran synthetisiert und mit Hap46 Δ N16 inkubiert. Gebundenes Hap-Protein wurde über einen spezifischen Antikörper detektiert. Spalte 21 zeigt Peptide ohne Aminosäureaustausch, als Positivkontrollen. Spalten 1 bis 20 zeigen Peptide, mit an der entsprechenden Position, gegen Aminosäuren A bis V, ausgetauschten Aminosäuren. Die Position der mutierten Aminosäure innerhalb des Peptids ist mit einem Sternchen gekennzeichnet, und die Aminosäure, welche mutiert wurde, ist nochmals in Spalte 0 angegeben. Die mit einem Pfeil markierten Aminosäuren weisen bei Mutation der entsprechenden Aminosäure eine reduzierte Affinität zu Hap46 auf.

Bei Mutation der Aminosäuren Cys¹⁷, Gly¹⁹ und Gln²² (in Abb. 4.1.2 gekennzeichnet mit Pfeilen) sind beim Austausch gegen manche Aminosäuren dunklere oder hellere Punkte zu sehen, oder sogar kein Signal. Bei schwachen Intensitäten ist anzunehmen, daß bei Austausch der Aminosäuren Cys¹⁷, Gly¹⁹ oder Gln²² gegen eine andere Aminosäure, die Bindungsaffinität in Region I von hsc70 und Hap46 abnimmt. Ist kein Signal mehr zu sehen, so scheint die Bindungsfähigkeit komplett zerstört zu sein. Das Lysin an Position 25 (Abb. 4.1.2 siehe Pfeil) scheint somit eine entscheidende Rolle bei der Interaktion von Hap46 mit Region I von hsc70 zu spielen, da sie nur gegen eine ihr verwandte, ebenfalls basische Aminosäure, das Arginin (Abb. 4.1.2 Spalte 2), ausgetauscht werden kann, ohne kompletten Bindungsverlust. Also sind es vier Aminosäuren aus Region I, welche mehr oder weniger an der Bindung von Hap46 beteiligt sind, allerdings liegen Cys¹⁷ und Gly¹⁹ innerhalb des Moleküls und können somit zur direkten Bindung nicht beitragen. Möglicherweise werden sie zur Stabilisierung der Bindung benötigt. Betrachtet man die Lage der beiden anderen Aminosäuren Gln²² und Lys²⁵, so ist festzustellen, daß sich diese im äußeren Bereich der Protuberanz befinden (Abb. 4.1.3) und so für Hap46 gut zugänglich sind.

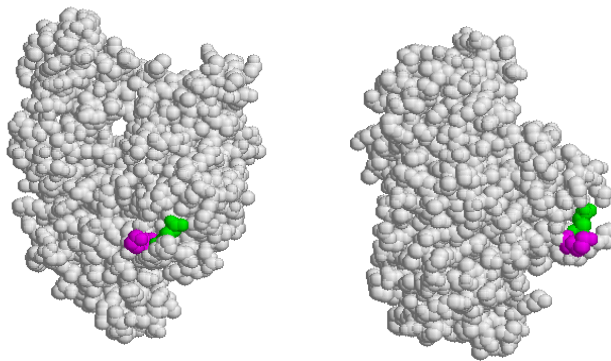


ABBILDUNG 4.1.3. Hsc70 ATPase-Domäne mit Lage der Aminosäuren Gln²² (grün) und Lys²⁵ (magenta): In Region I auf hsc70, konnten über Mutationsanalysen mittels membrangebundener Peptide, die Aminosäuren Gln²² und Lys²⁵ ermittelt werden, welche von Hap46 für die Bindung an Region I von hsc70 benötigt werden.

Kontrollmembranen, welche mit Protein und Zweit-Antikörper inkubiert wurden, zeigten bei Region I keinen Hintergrund an. Bei Region IV war keine Auswertung möglich, da die Kontrollmembran mit Protein und Zweit-Antikörper einen zu hohen Hintergrund aufwies (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 *Außer der C-terminalen Domäne von Hap46 sind noch andere Regionen bei der Bindung an hsc70 von Bedeutung*

Bisher beschränkten sich Bindungsstudien und biochemische Analysen mit Hap46 und hsc70 auf die so genannte BAG-Domäne, die bei allen Hap-Isoformen vorhanden ist. So zeigt sich bei der Co-Kristallisation der BAG-Domäne mit der ATPase-Domäne von hsc70 [96], daß die BAG-Domäne aus drei α -Helices besteht, von denen Helix 2 und 3 an die Subdomäne IIB von hsc70 binden. Aufgrund der oben erwähnten Ergebnisse von Petersen et al., ist jedoch anzunehmen, daß Hap46 zwei Haupt-Kontaktstellen auf hsc70 hat, welche sich auf einer Seite des Moleküls befinden. Da die BAG-Domäne allerdings nur an eine dieser beiden Regionen bindet, ist zu vermuten, daß es außer der BAG-Domäne noch weitere Bereiche auf Hap46 gibt, welche zur Bindung an hsc70 beitragen.

Um mögliche weitere Bindungsstellen von hsc70 und Hap46 zu identifizieren, wurden Peptide (10mere), welche die Aminosäuresequenz von Hap46 überspannen auf eine Cellulosemembran gespottet und zum einen mit der bovine rekombinant hergestellten Hsc70-ATPase-Domäne, zum anderen mit aus Rinderhirnen präpariertem hsc70, welches auch die Substratbindungsdomäne enthält, inkubiert. Die Visualisierung der komplexierten Proteine erfolgte im Falle der hsc70-ATPase-Domäne mit einem monoklonalen Antikörper. Jener erkennt spezifisch die ATPase-Domäne von hsc70. Im Fall des bovinen hsc70 voller Länge, erfolgte die Detektion mittels eines polyclonalen Antiserums.

Wie in Abbildung 4.1.4 dargestellt ist, konnten über Immunfärbung verschiedene Regionen von Peptiden mit unterschiedlichen Intensitäten sichtbar gemacht werden. Spur 2 zeigt die Ergebnisse mit der bovinen hsc70-ATPase-Domäne, und Spur 1 jene mit dem bovinen hsc70, wobei beide Proteine ein ähnliches Interaktionsprofil mit Hap46 aufweisen. Die Versuche wurden mit drei an verschiedenen Tagen synthetisierten Membranen gemacht und zeigten vergleichbare Interaktionsmuster. Kontrollen mit Erst- und Zweit-Antikörper, aber ohne Protein, und Kontrollen mit Protein und Zweit-Antikörper zeigten keine Signale über den Hintergrund hinaus (Daten nicht gezeigt).

Da es bis jetzt noch kein 3-dimensionales Modell des gesamten Hap46 gibt, sind die potentiellen Interaktionsregionen von hsc70 auf Hap46 in einem Balkenmodell von Hap46 dargestellt (Abb. 4.1.5).

Wie zu erwarten war, befindet sich eine der an Intensität stärksten Regionen im C-terminalen Bereich von Hap46 (Abb. 4.1.4, Region VI). Dies entspricht den Aminosäuren 227-250, wohingegen Aminosäuren 251-274 bei der Bindung an hsc70 keine Rolle zu spielen scheinen (Abb. 4.1.5).

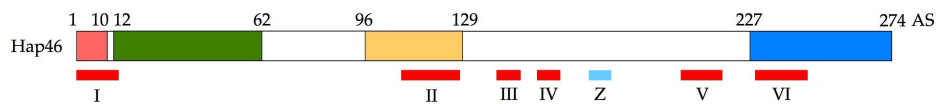


ABBILDUNG 4.1.5. Darstellung der identifizierten Interaktionsregionen von hsc70 auf Hap46. Balkenmodell von Hap46 mit seinen Proteindomänen: DNA-Bindedomäne (lachs), Bereich der sauren Hexapeptid-Wiederholungen (grün), Ubiquitin-ähnliche Domäne (gelb), essentieller Bereich für Bindung an hsc70 (blau). Die Bereiche auf Hap46, welche eine Interaktion mit hsc70 und der ATPase-Domäne von hsc70 aufwiesen, wurden in rot dargestellt. Bereiche mit ausschließlicher Interaktion mit hsc70 voller Länge sind in türkis gekennzeichnet.

Interessanterweise beschränkt sich die Interaktion von hsc70 mit Hap46 nicht nur auf dessen C-Terminus. Bindungsregionen mit starken Intensitäten befinden sich ebenfalls in der Ubiquitin-ähnlichen Domäne (Abb. 4.1.4, Region II) und erstaunlicherweise auch am N-terminalen Bereich von Hap46 (Abb. 4.1.4, Region I).

Die Bindungsregion am N-Terminus erstreckt sich über die ersten 16 Aminosäuren (Abb. 4.1.5), was bedeutet, daß hsc70 Aminosäuren der basischen DNA-Bindungs-Domäne (AS 1-10) und zum Teil der sauren Hexapeptid-Wiederholungen (AS 12-68) von Hap46 für dessen Bindung benötigt. Die Aminosäuresequenzen der Regionen mit starken Intensitäten wurden nochmals in Tabelle 4.1.2 aufgelistet.

Region	Aminosäuren	Sequenz
I	2-15	KKKTRRRRSTRSEELT
II	115-127	SFQKLIFKGKSLK
III	145-150	MLIGKK
IV	161-167	KLKHLEK
V	202-214	KLDRRVKATIEQF
VI	231-247	KDSRLKRKGLVKKVQAF
Z	175-180	QLEELNK

TABELLE 4.1.2. Interaktionsregionen I bis VI von hsc70 auf Hap46: Über Analyse sequenzüberspannender, membrangebundener Peptide von Hap46 konnten mehrere Bindungsregionen mit hsc70 identifiziert werden.

Da die Kontaktstellen von hsc70 auf Hap46, welche über Peptidanalyse gefunden wurden, zum Teil in Protein-Domänen von Hap46 liegen, lag die Überlegung nahe, den Beitrag der einzelnen Domänen bei der Bindung an hsc70 zu klären.

4.1.3 Der N-terminale Bereich von Hap46 ist wichtig für die Bindung an hsc70

Für weitere Versuche die Bindung von hsc70 und Hap46 zu studieren, wurde eine sensitive Methode (ELISA - Enhanced Luminescence Immunosorbent Assay) gewählt, die auch eine quantitative Aussage bezüglich des Beitrages der einzelnen Interaktionsregionen auf Hap46 bei der Bindung an hsc70 zuließ. Dazu wurde bovines hsc70 auf Plastikträgern gebunden und anschließend mit rekombinantem Hap46 voller Länge bzw. Hap46-Mutanten (Abb. 4.1.6), bei welchen jeweils eine der Proteindomänen deletiert wurde, inkubiert.

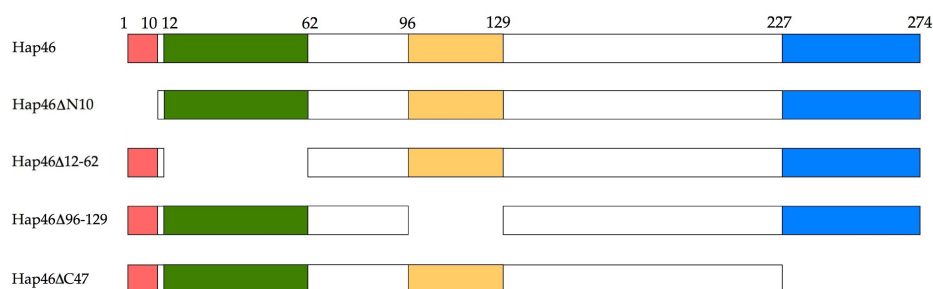


ABBILDUNG 4.1.6. Balkenmodelle von Hap46 und Hap46-Deletionsmutanten: Hap46, Hap46ΔN16, Hap46Δ12-62, Hap46 Δ96-129 und Hap46ΔC47. DNA-Bindedomäne (lachs), Bereich der sauren Hexapeptid-Wiederholungen (grün), Ubiquitin-ähnliche Domäne (gelb), essentieller Bereich für Bindung an hsc70 (blau)

Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Detektion der noch gebundenen Hap-Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers, der alle Hap-Varianten erkennt. Kontrollen ohne Hap46 Protein aber mit Erst- und Zweit-Antikörper und Kontrollen mit Hap46 und nur Zweit-Antikörper resultierten in zu vernachlässigenden Werten. Die mit Hap46 voller Länge erhaltenen Werte wurden auf 100% festgelegt (Abb. 4.1.7, Spalte 1), die Werte der Hap-Varianten wurden in Relation dazu gesetzt (Abb. 4.1.7, Spalten 2-5).

Deutlich ist der Verlust der Bindungsfähigkeit von Hap46 an hsc70, wenn die letzten 47 Aminosäuren deletiert sind (Abb. 4.1.7, Spalte 5). Interessanterweise ist bei einer Deletion der N-terminal gelegenen Aminosäuren 1 bis 10 eine Reduktion der Bindung auf ca. 40% zu beobachten (Abb. 4.1.7, Spalte 2), woraus sich schließen läßt, daß dieser Bereich, welcher eigentlich für die Interaktion mit DNA verantwortlich ist, eine noch zu klärende Rolle bei der Bindung an hsc70 spielt. Auch der Bereich der sauren Hexapeptid-Wiederholungen (Abb. 4.1.7, Spalte 3) und die Ubiquitin-ähnliche Domäne (Abb. 4.1.7, Spalte 4) leisten ihren, wenn auch geringeren Beitrag, bei der Bindung an hsc70.

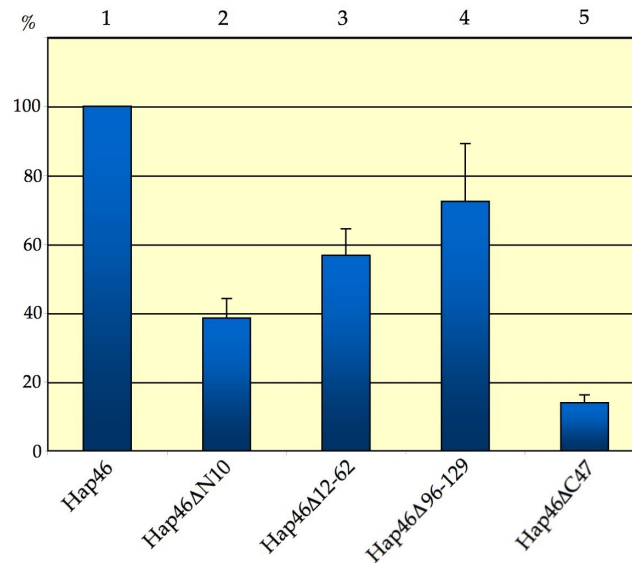


ABBILDUNG 4.1.7. Interaktionsanalyse von hsc70 mit Hap46 und Hap46-Varianten: je $1\mu\text{g}$ an eine Elisa-Platte gebundenes bovines hsc70 wurde mit Hap46 (Spalte 1), Hap46 Δ N16 (Spalte 2), Hap46 Δ 12-62 (Spalte 3), Hap46 Δ 96-129 (Spalte 4) oder Hap46 Δ C47 (Spalte 5) inkubiert. Gebundenes Hap-Protein wurde über einen spezifischen Antikörper detektiert. Die Werte mit den Hap46-Varianten (Spalten 2-5) sind in Relation zu Hap46 (Spalte 1) gesetzt.

Über die vorangegangenen Versuche wurden Interaktionsregionen von hsc70 auf Hap46 mittels Analyse membrangebundener Peptide identifiziert. Dabei wurde festgestellt, daß diese in der Ubiquitin-ähnlichen Domäne, in der Region saurer Hexapeptid-Wiederholungen und überraschender Weise auch in der N-terminalen DNA-Bindungsdomäne von Hap46 liegen. Über Elisa-Analysen mit gekoppeltem hsc70 wurde daraufhin der quantitative Beitrag mittels Deletionsmutanten von Hap46 überprüft. Es zeigte sich, daß außer den für die Bindung an hsc70 essentiellen Bereich (Aminosäuren 227 bis 274) des C-Terminus von Hap46, auch die N-terminalen ersten 10 Aminosäuren einen wesentlichen Beitrag für die Interaktion der beiden Proteine leisten.

4.2 Analysen zur Bindung von Hap46 an DNA

Hap46 ist ein Protein, welches Interaktionen mit vielen verschiedenen Molekülen eingehen kann, so auch mit der DNA. Da Hap46 ein ungewöhnliches DNA-Bindungsmotiv aufweist, sollte diese kurze Sequenz von 10 Aminosäuren genauer untersucht werden. Dabei stand im Vordergrund, die an der Bindung beteiligten Aminosäuren über die Methode der Gel-Retardationsanalyse (EMSA - Electro-Mobility-Shift-Assay) zu identifizieren. Bei der elektrophoretischen Auftrennung weisen Protein-DNA-Komplexe eine verminderte Laufgeschwindigkeit im

Vergleich zu freier DNA auf, da diese größer sind und sich langsamer in nativen Gelen bewegen. Die Bande der an Protein gebundenen DNA ist somit im Vergleich zur nicht komplexierten DNA nach oben verschoben (Shift).

4.2.1 Optimierung der Gel-Retardationsanalysen mit Hap46 und DNA

Zur Bestimmung optimaler Bedingungen, um später auch mutierte Hap46 Proteine im Vergleich zum Wildtyp in Gel-Retardationsanalysen zu untersuchen, waren verschiedene Optimierungen notwendig.

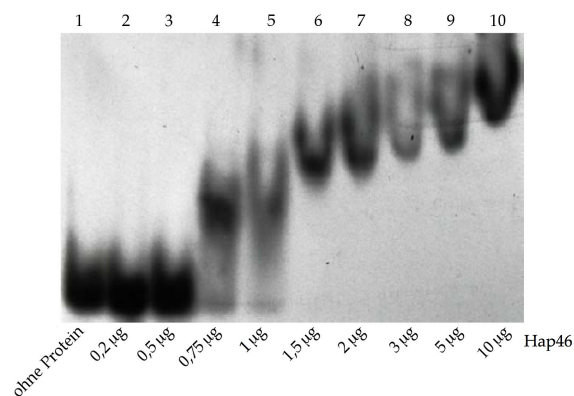


ABBILDUNG 4.2.1. Gel-Retardationsanalyse mit steigenden Mengen Hap46: 3ng eines radioaktiv markierten 235bp langen PCR-Fragmentes des CMV-Promotors wurden mit steigenden Mengen an rekombinanten Hap46 (0,2µg bis 10µg) inkubiert (Spuren 2 bis 10) und auf einem 6% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden über Autoradiographie sichtbar gemacht. Spur 1 zeigt die Kontrolle mit freier DNA.

Für die in Abbildung 4.2.1 gezeigten Gel-shifts, wurden steigende Mengen rekombinanten Hap46 mit je 3ng eines, radioaktiv markierten, PCR generierten DNA-Fragmentes des CMV (Cytomegalie-Virus)-Promotors, mit einer Länge von 235 Basenpaaren, inkubiert. Die DNA wurde auf einem 6% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden über Autoradiographie sichtbar gemacht. Es ist deutlich zu sehen, daß es einer Mindestmenge an Hap46 Protein bedarf, um eine effiziente Komplexbildung mit dem DNA-Fragment zu erhalten, was in diesem Fall bei 0,75µg bis 1µg Protein liegt (Abb. 4.2.1, Spuren 4 und 5). Bei Proteinmengen unter 0,75µg (Spuren 2 und 3) ist Hap46 nicht mehr in der Lage das Fragment zu shiften. Da mit steigender Proteinmenge auch die Höhe des nach oben verschobenen DNA Fragmentes zunimmt, ist zu vermuten, daß mehrere Hap46 Moleküle gleichzeitig an die DNA binden können (Abb. 4.2.1, Spuren 2 bis 10), wie auch schon in früheren Versuchen Y. Niyaz zeigen konnte.

In einem nächsten Versuch, wurden verschiedene Mengen an DNA und Protein miteinander kombiniert. So wurden 3ng radioaktiv markierte DNA mit bis zu 200ng unmarkierter DNA

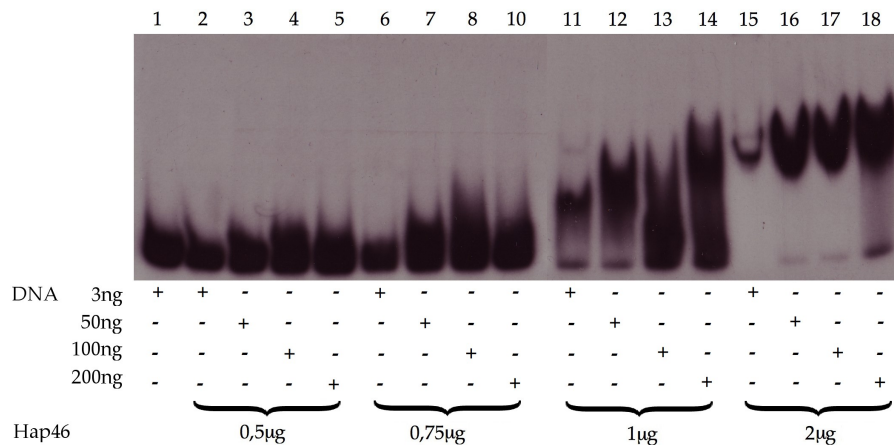


ABBILDUNG 4.2.2. Gel-Retardationsanalyse mit variablen Mengen Hap46 und DNA: 3ng eines radioaktiv markierten 235bp langen PCR-Fragmentes des CMV-Promotors, wurden zusätzlich mit bis zu 200ng kalter DNA versetzt und anschließend mit steigenden Mengen an rekombinanten Hap46 (0,5µg bis 2µg) inkubiert (Spuren 2 bis 17), und auf einem 6% Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden über Autoradiographie sichtbar gemacht. Spur 1 zeigt die Kontrolle mit freier DNA.

aufgefüllt, und diese wurde anschließend mit 0,5 bis 2µg Protein geshiftet. Abbildung 4.2.2, Spuren 2 bis 9 zeigen, daß 0,5 und 0,75µg Protein die DNA nicht shiften können. Bei 1µg Protein wird die DNA nicht vollständig geshiftet, jedoch steigt die Höhe der DNA-Banden in den Ansätzen mit steigender DNA-Konzentration leicht an (Abb. 4.2.2, Spuren 10 bis 13), was darauf beruhen könnte, daß die Affinität von Hap46 bei einer höheren DNA-Konzentration zu derselben zunimmt. Dennoch ist hier darauf hinzuweisen, daß Proteinmengen zwischen 0,75µg und 1µg in einem kritischen Bereich für die Komplexbildung von Hap46 mit DNA-Molekülen liegen. Abweichungen in der Qualität des Proteins könnten so zu falschen Ergebnissen führen. Wie in Abbildung 4.2.2, Spuren 14 bis 17 zu sehen ist, zeigen diese Titrierungsexperimente, daß 2µg Hap46 notwendig und ausreichend sind, um bis zu 200ng DNA fast vollständig zu binden. Daher wurden für die folgenden Versuche 3-6µg Protein und 50-100ng DNA eingesetzt.

Für die zuvor beschriebenen und ebenso für weitere Mobilitäts-Analysen, wurden Fragmente des CMV-Promotors verwendet, in der Annahme, daß Hap46 unabhängig von der DNA-Sequenz bindet. In einer Veröffentlichung von Takahashi et al., wurde jedoch behauptet, das Hap46 spezifisch an eine bestimmte Sequenz des Promotors binden würde, was aber im Gegensatz zu den Ergebnissen von Y. Niyaz stand, welcher gezeigt hatte, daß Hap46 unabhängig von Promotor oder Sequenz an DNA binden kann.

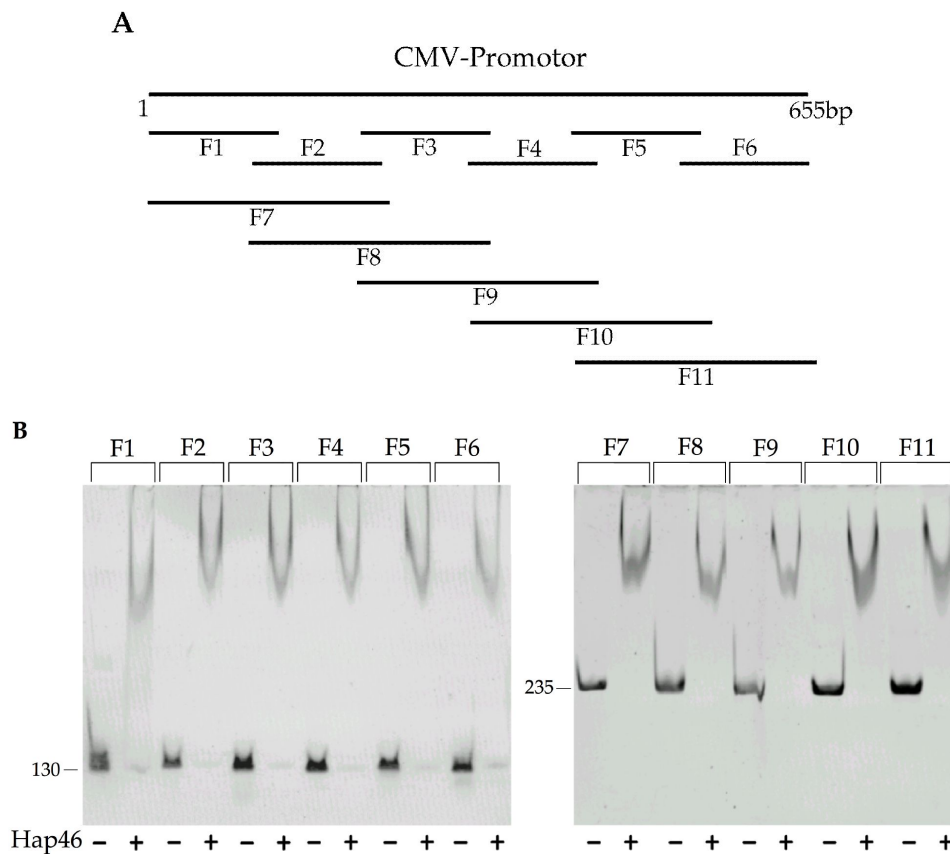


ABBILDUNG 4.2.3. A: Über PCR wurde die Sequenz des CMV-Promotors mit entsprechenden Primern in 5 Fragmente von 235bp und in 6 Fragmente von 130bp zerlegt. B: Gel-Retardationsanalyse mit 130bp und 235bp langen PCR generierten Fragmenten des CMV-Promotors und $3\mu\text{g}$ Hap46. Die Ansätze wurden elektrophoretisch in einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die DNA-Banden über Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Daher wurden vom CMV-Promotor zwei Sets sich überlappender PCR-Fragmente mit einer Länge von 130bp bzw. 235bp generiert (Abb. 4.2.3, A). Diese wurden individuell bezüglich einer Interaktion mit Hap46 in Gel-Retardationsanalysen getestet. Jedes der Fragmente wurde von Hap46 gebunden und auch innerhalb der Fragmente gleicher Länge gab es keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der nach oben verschobenen DNA (Abb. 4.2.3, B).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine Sequenz-spezifische Bindung an den CMV-Promotor ausgeschlossen und die Eigenschaft von Hap46 als unspezifisches DNA-Bindeprotein unterstützt werden.

4.2.2 Hohe Flexibilität der Aminosäuren von Hap46 bei der Bindung an DNA

Um die DNA-Bindungsdomäne von Hap46 detaillierter zu untersuchen, wurden eine Reihe von Mutanten erzeugt, welche den Austausch von Aminosäuren oder Insertionen zusätzlicher

Aminosäuren beinhalten (Abb. 4.2.4). Diese Mutanten wurden schließlich auf ihre Fähigkeit an DNA zu binden unter den zuvor optimierten Verhältnissen getestet.

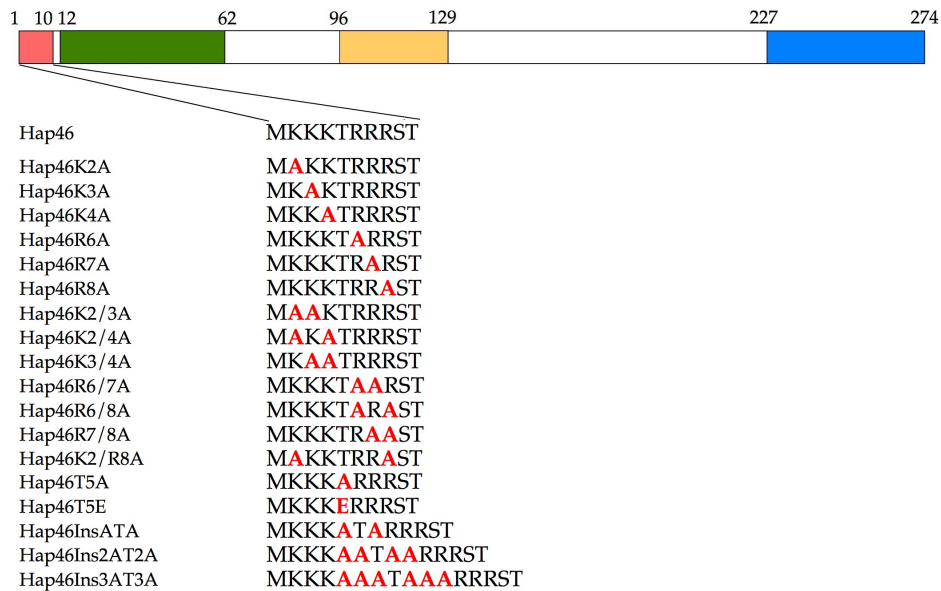


ABBILDUNG 4.2.4. Hap46-Mutanten mit Aminosäureaustausch oder Insertionen innerhalb der ersten 10 Aminosäuren. Die mutierten Bereiche sind mit roten Buchstaben gekennzeichnet. DNA-Bindedomäne (lachs), Bereich der sauren Hexapeptid-Wiederholungen (grün), Ubiutin-ähnliche Domäne (gelb), essentieller Bereich für Bindung an hsc70 (blau)

Wie schon aus vorherigen Analysen bekannt war, kann die Hap46-Mutante mit Deletion der ersten 10 Aminosäuren nicht mehr an DNA binden (Abb. 4.2.5, A: Spur 2 und B: Spur 3), ebenso wie Mutanten mit jeweiligem Austausch einer der beiden basischen Blöcke von Lysin oder Argininen (Daten nicht gezeigt), im Gegensatz zu Hap46, welches eine hohe Affinität zur DNA besitzt (Abb. 4.2.5 A: Spur 1 und B: Spur 2). Ein Ansatz ohne Protein diente als Negativkontrolle (Abb. 4.2.5, A: Spur 3 und B: Spur 1).

Keinen Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit zeigten Hap46 Varianten mit Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb dieser basischen Triplets (Abb.4.2.5 A: Spuren 4 bis 9) und eine Variante mit Austausch eines Lysins (K^3) des einen Blocks und eines Arginins (R^8) des anderen Blocks (Abb. 4.2.5 B: Spur 10). Manche Varianten zeigten jedoch bei gleicher Menge Protein weniger ausgeprägte Shifts als mit Hap46. Beim Austausch zweier benachbarter basischer Aminosäuren gegen Alanin, wurde die Interaktion mit der DNA völlig zerstört (Abb. 4.2.5, B: Spuren 4, 5, 7 und 8). Erstaunlicherweise konnten Hap46-Mutanten, bei welchen jeweils die beiden äußeren Aminosäuren eines basischen Triplets ausgetauscht und die Mittlere erhalten wurde, an DNA binden (Abb.4.2.5, B: Spuren 6 und 9). Dies bedeutet, daß in jedem der beiden basischen Blöcke, die mittlere Aminosäure, das Lysin an Position 3 und das Arginin an Position 7, für die Bindung an DNA besonders wichtig zu sein scheint. Weitere Mutanten mit Insertionen von ein bis

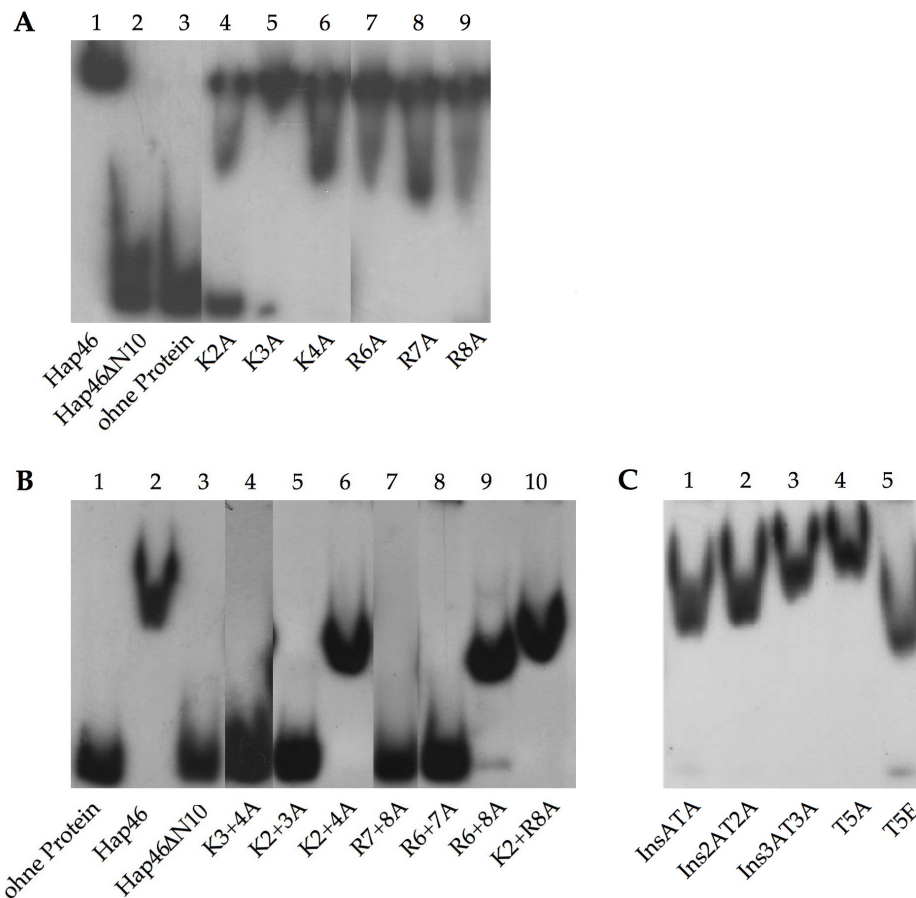


ABBILDUNG 4.2.5. Mutationsanalyse der DNA-Bindungsregion von Hap46: Gel-Retardationsanalysen mit einem radioaktiv markierten 235bp Fragment des CMV-Promotors und Hap46 (A: Spur 1 und B: Spur 2) bzw. Mutanten mit Austausch (A: Spuren 4 bis 9, B: Spuren 4 bis 10, C: Spuren 4 und 5) oder Insertionen (C: Spuren 1 bis 3) einer oder mehrerer Aminosäuren. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit der Variante Hap46ΔN16 (A: Spur 2 und B: Spur 3) und ohne Protein (A: Spur 3 und B: Spur 1).

zu drei zusätzlichen Alaninen auf jeder Seite des mittleren Threonins (T^5) (Abb.4.2.5, C: Spuren 1, 2 und 3) und Austausch des Threonins an Position 5 selbst (Abb.4.2.5, C: Spuren 4 und 5) zeigten keine eingeschränkte DNA-Bindung.

Bei Optimierungsversuchen für Gel-Retardationsanalysen mit Hap46 und Hap46-Mutanten, zur Bestimmung von Aminosäuren, welche an der Interaktion mit DNA beteiligt sind, konnte gezeigt werden, daß 2µg Hap46 ausreichen um bis zu 200ng DNA zu shiften. Die Bedingungen, unter denen die eigentlichen Versuche stattfinden sollten, wurden festgelegt, so daß 3 bis 6µg Hap-Protein und 50ng DNA, davon 3ng radioaktiv markiert, eingesetzt wurden. Aufgrund dieser Gel-Retardationsanalysen mit Hap-Mutanten, konnte den beiden mittleren Aminosäuren (Lys^3 und Arg^7) der beiden basischen Triplets eine wichtige Rolle bei der Bindung an DNA beigemessen werden.

4.3 Hap46 und c-Jun

Als DNA-bindendes Protein wurde Hap46 bald auch in Zusammenhang mit Transkription und Transkriptionsfaktoren gebracht. Bisher war bei der Bindung von Hap46 mit vielen anderen Molekülen hsc70 als Bindeglied bekannt, so daß Komplexe der Form Hap46-hsc70-Molekül entstanden. In Pull-down-Versuchen mit Hap46 spezifischen Matrices und *in vitro* translatierten Transkriptionsfaktoren, konnte c-Jun unabhängig von hsc70 gebunden werden. Dies wurde auch mit rekombinantem c-Jun in Pull-down-Versuchen bestätigt (Y. Niyaz et al.).

4.3.1 Teil I - Interaktions-Analysen von Hap46 und c-Jun

4.3.1.1 Die DNA-Bindungsdomäne von Hap46 ist bei der Bindung an c-Jun von Bedeutung

Um diese Ergebnisse weiter zu stärken, und zur Identifizierung der an der Interaktion beteiligten Bereiche von Hap46, wurden Elisa-Analysen durchgeführt. Rekombinantes c-Jun wurde dazu auf Plastikträgern gebunden und mit Hap46 bzw. Hap46-Varianten (Abb.4.1.6) inkubiert. Die Protein-Protein-Komplexe wurden mit einem Hap-spezifischen Antikörper detektiert. Kontrollen mit GST-Protein, ohne Hap46 oder mit Hap46 und nur Zweit-Antikörper blieben im Bereich des Hintergrundes. Die gemessenen Werte mit Hap46 wurden auf 100% festgelegt und die erhaltenen Werte mit den Hap46-Varianten in Relation dazu gesetzt. Wie in Abbildung 4.3.1, Spur 1) zu sehen ist, kann Hap46 an c-Jun binden, und dies unabhängig von hsc70. Mutante Hap46 Δ 12-62, mit der Deletion des sauren Hexapeptid Bereichs zeigte fast keine Reduktion in der Bindung an c-Jun (Abb.4.3.1, Spur 3), wohingegen Mutante Hap46 Δ C47 bzw. Hap46 Δ 96-129, bei welcher der carboxyterminale Bereich bzw. die Ubiquitin-ähnliche Domäne deletiert wurde, eine verminderte Bindungsfähigkeit zeigten (Abb. 4.3.1, Spuren 4 und 5). Bei Deletion der N-terminalen ersten 16 Aminosäuren, wie in Mutante Hap46 Δ N16, wurde die Bindung an c-Jun drastisch reduziert (Abb. 4.3.1, Spur 2), was darauf schließen läßt, daß dieser Bereich von Hap46 signifikant bei der Bindung involviert ist. Daher bot es sich an, jene Hap46-Varianten, welche eigentlich für die Untersuchung der DNA-Bindung gemacht wurden (Abb. 4.2.4), nun für weitere Studien bezüglich der Hap46 c-Jun Bindung heranzuziehen. Der jeweilige Austausch der beiden basischen Aminosäure-Triplets resultierte in einer verminderten Bindung an c-Jun, jedoch bei weitem nicht so, wie es mit Mutante Hap46 Δ N16 der Fall war (Abb. 4.3.1, Spuren 6 und 7 vs. Spur 2). Insertionen von bis zu drei Alaninen, vor und nach dem mittleren Threonin⁵ (Abb. 4.3.1, Spuren 16 bis 18) und Austausch des Threonin⁵ selbst (Abb. 4.3.1, Spuren 14 und 15), hatten zwar Auswirkungen auf die Bindung, ebenso wie der Austausch jeweils einer der basischen Aminosäuren (Abb. 4.3.1, Spuren 8 bis 13), jedoch waren diese nicht sehr ausgeprägt. Dies läßt darauf schließen, daß mehrere Aminosäuren bei der Interaktion beteiligt sind, so daß der Austausch einiger weniger Aminosäuren kompen-

siert werden kann. Die Versuche wurden mit unterschiedlichen Präparationen der jeweiligen Hap46-Varianten durchgeführt, wobei die gleichen Ergebnisse erhalten wurden.

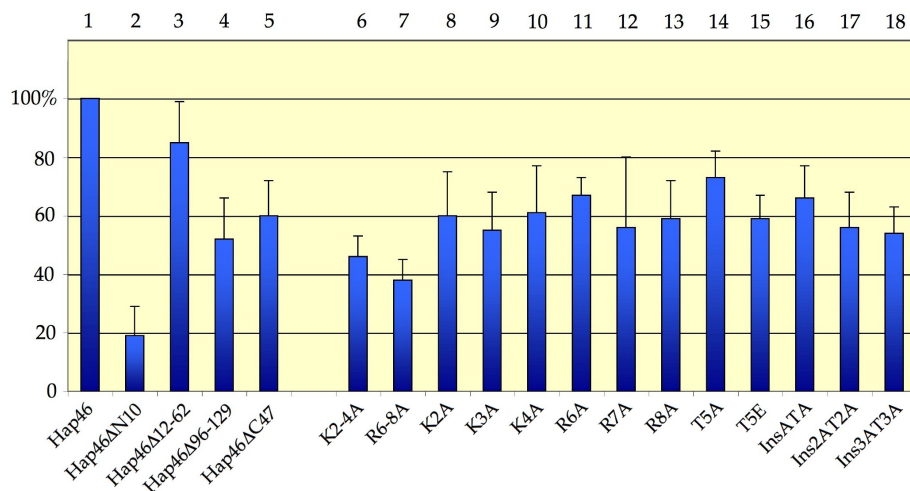


ABBILDUNG 4.3.1. Interaktionsanalyse von c-Jun mit Hap46 und Hap46-Varianten: je $0,5\mu\text{g}$ an eine Elisa-Platte gebundenes rekombinantes c-Jun wurde mit Hap46 (Spur 1) bzw. Hap46 Deletionsmutanten (Spuren 2 bis 5) oder Hap46-Varianten mit Austausch (Spuren 6 bis 15) oder Insertionen (Spuren 16 bis 18) von Aminosäuren inkubiert. Gebundenes Hap-Protein wurde über einen spezifischen Antikörper detektiert. Die Werte mit den Hap46-Varianten (Spuren 2 bis 18) sind in Relation zu Hap46 (Spur 1) gesetzt.

Die oben erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß der aminoternale Bereich von Hap46, der hauptsächlich an der Interaktion mit c-Jun beteiligt ist, mit dem Bereich überlappt, welcher für die Bindung an DNA benötigt wird. Eine Kompetition von c-Jun und DNA um die Bindung an Hap46 konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der hohen Flexibilität der DNA-Bindung von Hap46, war jedoch eine Interaktion der Art DNA/Hap46/c-Jun nicht ausgeschlossen.

4.3.1.2 Hap46 kann gleichzeitig an DNA und c-Jun binden

Um die DNA-Bindung von Hap46 an DNA in Gegenwart von c-Jun zu untersuchen, wurden Gel-Retardationsanalysen durchgeführt. Dabei wurde ein 235bp langes, radioaktiv markiertes DNA-Fragment des CMV-Promotors, mit Hap46 und c-Jun inkubiert. Die Ansätze wurden in einem 6% nativen PAA-Gel analysiert und die Banden über Autoradiographie sichtbar gemacht. Das c-Jun Homodimer selbst konnte nicht an das DNA-Fragment binden (Abb. 4.3.2, Spur 2), da dies keine AP-1 Erkennungssequenz enthält. In Gegenwart von c-Jun und Hap46 ist zu beobachten, daß die Mobilität der DNA geringer ist als mit Hap46 alleine, das heißt, die mit Hap46 und c-Jun komplexierte DNA wandert langsamer im Gel und weist somit eine ausgeprägte Bandenverschiebung nach oben auf. (vgl. Abb. 4.3.2, Spur 3 vs. 4). Diese Daten

unterstützen weiterhin eine direkte Bindung von Hap46 und c-Jun und zeigen eindeutig, daß an DNA gebundenes Hap46 immer noch in der Lage ist mit c-Jun zu interagieren.

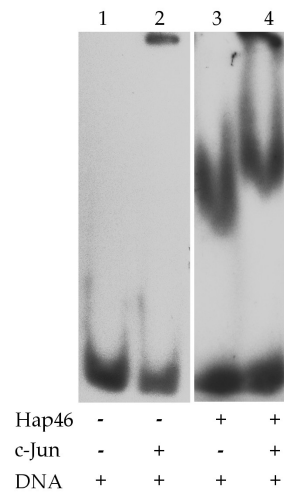


ABBILDUNG 4.3.2. Gel-Retardationsanalyse mit Hap46 und c-Jun: Ein 235bp langen Fragment des CMV-Promotors wurden zusammen mit Hap46 (Spur 3) bzw. c-Jun und Hap46 (Spur 4) inkubiert und die Banden über Autoradiographie sichtbar gemacht. Als Kontrollen dienten Ansätze mit c-Jun und DNA-Fragment (Spur 2) und DNA alleine (Spur 1).

Eine Frage, die dabei aufkam, war, wie sich die beiden Proteine verhalten, wenn ein DNA-Fragment mit einer Bindestelle für c-Jun angeboten wird. Um zu gewährleisten, daß nur c-Jun und nicht Hap46 an das DNA-Fragment binden kann, wurde ein Oligonukleotid mit einer Länge von 20bp und einer AP-1 Erkennungssequenz verwendet. Da Hap46 nur an DNA-Stücke ab einer Länge von ca. 60bp binden kann, und für c-Jun ein AP-1 Bindungsmotiv vorhanden ist, könnte so festgestellt werden, ob an DNA gebundenes c-Jun auch noch in der Lage wäre mit Hap46 zu interagieren, was sich dann in einem Supershift äußern würde. Dazu wurden Hap46 und c-Jun miteinander präinkubiert. Danach wurde ein radioaktiv markiertes AP-1 Oligonukleotid zugefügt. Nach einer weiteren Inkubationsphase, wurde der Ansatz auf ein natives 6% PAA-Gel aufgetragen und die Banden über Autoradiographie sichtbar gemacht.

So wurde das AP-1 Fragment einmal mit 150ng c-Jun (= 0,25 footprint-units) und 1µg c-Jun (= 1,5 footprint-units) inkubiert. Abbildung 4.3.3, Spur 2 zeigt, daß 150ng c-Jun nicht ausreichen, um das AP-1 Oligonukleotid zu shiften. Dies ist erst bei 1,2µg, das heißt bei 1,5 footprint-units der Fall (Abb. 4.3.3, Spur 3). Der Ansatz mit Hap46 und 1µg zeigt das gleiche Bild wie der Ansatz mit c-Jun alleine (vgl. Abb. 4.3.3, Spuren 6 vs. 3). Da die entstandenen Komplexe so groß sind, daß sie nicht in das Gel einlaufen können, ist hier keine Aussage möglich, ob es eine Interaktion der Art DNA-c-Jun-Hap46 gibt. Sicher ist, daß Hap46 nicht an das AP-1 Fragment binden kann, wie die Kontrollen in Abbildung 4.3.3, Spur 5 und 7 eindeutig zeigen. Erstaunlicherweise kann bei 150ng c-Jun in Gegenwart von Hap46 ein Teil des AP-1 Fragmentes geshif-

tet werden (Abb. 4.3.3, Spur 4). Was für eine Aufgabe Hap46 hierbei erfüllt ist noch unklar. Eine Möglichkeit wäre, daß Hap46 eine unterstützende Funktion bei der Dimerisierung von c-Jun ausübt, und so auch geringere Mengen c-Jun schließlich an DNA binden können. Dies bleibt jedoch noch abzuklären.

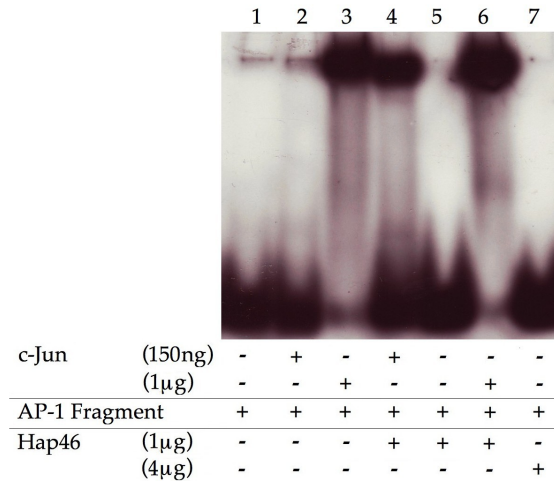


ABBILDUNG 4.3.3. Gel-Retardationsanalyse mit AP-1 Fragment und c-Jun in Gegenwart von Hap46: Hap46 und c-Jun wurden, bevor ein radioaktiv markiertes AP-1 Oligonukleotid zugefügt wurde, miteinander präinkubiert. Der Ansatz wurde auf ein natives 6% PAA-Gel aufgetragen und die Banden über Autoradiographie sichtbar gemacht. Spur 1 zeigt das AP-1 Fragment alleine. Kontrollen mit AP-1 Fragment und Hap46 sind in Spuren 5 und 7. Verschiedene Mengen c-Jun wurden einmal mit dem AP-1 Fragment alleine (Spuren 2 und 3) und zusammen mit Hap46 (Spuren 4 und 6) inkubiert.

In weiteren Versuchen wurden Kompletions-Oligonukleotide zu den Ansätzen gegeben, hierbei wurde die Bindung von c-Jun an das AP-1 Fragment zwar leicht verringert, jedoch konnte der oben beschriebene Effekt von Hap46 weiterhin beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung, ob es einer Mindestmenge von Hap46 bedarf, um einen Effekt bei geringen c-Jun Mengen zu sehen, wurden steigende Mengen Hap46 (0,6 bis 4µg) zusammen mit 300ng c-Jun inkubiert (Abb. 4.3.4, Spuren 3 bis 5). Hierbei wurde in gleicher Weise auch die Hap46ΔN16 Mutante getestet (Abb. 4.3.4, Spuren 6 bis 8). Deutlich ist zu erkennen, daß bei 0,6µg Hap46 keine DNA geschiftet wurde (Abb. 4.3.4, Spur 3). Vergleicht man jedoch Spur 1 der Abbildung 4.3.4, in welcher nur 300ng c-Jun und DNA vorliegen, mit Spur 4 und 5, welche noch zusätzlich 1µg bzw. 4µg Hap46 enthalten, so ist festzustellen, daß hier c-Jun in der Lage war die DNA zu shiften. Auch mit der Variante Hap46ΔN16 konnte dieser Effekt erzielt werden, allerdings scheint die benötigte Proteinmenge hier größer zu sein, da sich dieser erst bei 4µg Hap46ΔN16-Protein zeigt (Abb. 4.3.4, Spur 8) Kontrollen mit Hap46 und dem AP-1 Fragment bzw. einem 235bp Fragment des CMV-Promotors und eine Kontrolle mit 1,2µg c-Jun und dem AP-1 Fragment sind in Abbildung 4.3.4, Spuren 9 bzw. 10 und Spur 2 gezeigt.

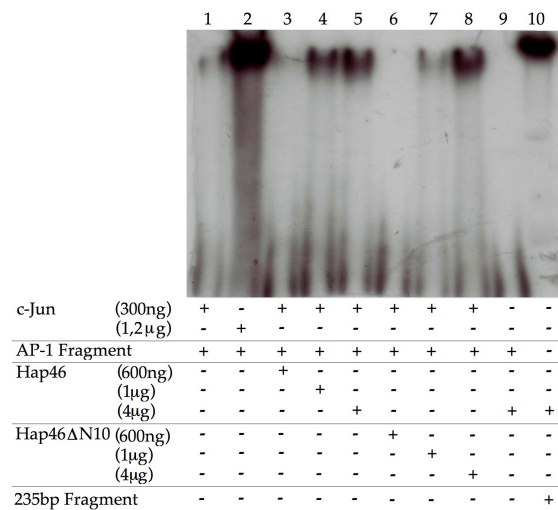


ABBILDUNG 4.3.4. Gel-Retardationsanalyse mit AP-1 Fragment und c-Jun in Gegenwart von Hap46 und Hap46ΔN16: Hap46 bzw. Hap46ΔN16 wurden bevor ein radioaktiv markiertes AP-1 Oligonukleotid zugefügt wurde, miteinander präinkubiert. Die Ansätze wurden auf ein natives 6% PAA-Gel aufgetragen und die Banden über Autoradiographie sichtbar gemacht. Spuren 1 und 2 zeigen 300ng bzw. 1,2μg c-Jun mit AP-1 Fragment. Spuren 3 bis 5 bzw. 6 bis 8 zeigen 300ng c-Jun mit steigenden Mengen Hap46 bzw. Hap46ΔN16 und AP-1 Fragment. Kontrollen mit Hap46 und AP-1 Fragment oder Hap46 und ein 235bp Fragment sind in Spuren 9 und 10.

Teil I der Interaktionsanalysen bezüglich c-Jun und Hap46 zeigt, daß sich in Elisa-Analysen mit Mutante Hap46ΔN16 die Bindungsaffinität zu c-Jun um 60% verringert. In Gel-Retardationsanalysen, konnte nachgewiesen werden, daß an DNA gebundenes Hap46 immer noch mit c-Jun interagieren kann. Der Fall, daß DNA-gebundenes c-Jun immer noch mit Hap46 interagiert, konnte nicht gezeigt werden. Hier tauchte jedoch ein noch ungeklärter Effekt auf: geringe Mengen c-Jun, welche nicht in der Lage sind DNA zu binden, binden in Gegenwart von Hap46 an DNA.

4.3.2 Teil II - Interaktions-Analysen von Hap46 und c-Jun

4.3.2.1 Hap46 bindet an die δ -Domäne von c-Jun

Um ein besseres Verständnis der Bindung von Hap46 mit c-Jun zu erlangen wurden membran-gebundene 10 Aminosäuren lange Peptide, welche die Sequenz von c-Jun überspannen, mit rekombinantem Hap46 und Hap46ΔN16 inkubiert. Gebundenes Protein wurde anschließend mittels eines Hap46-spezifischen Antikörpers detektiert. Dabei sollten Bindungsregionen von Hap46 auf c-Jun identifiziert werden. Variante Hap46ΔN16 wies in Elisa-Analysen eine enorm reduzierte Bindung an c-Jun auf. Um diese Beobachtung weiter zu stärken, sollte auch diese Hap46 Variante mit membrangebundenen Peptiden von c-Jun getestet werden.

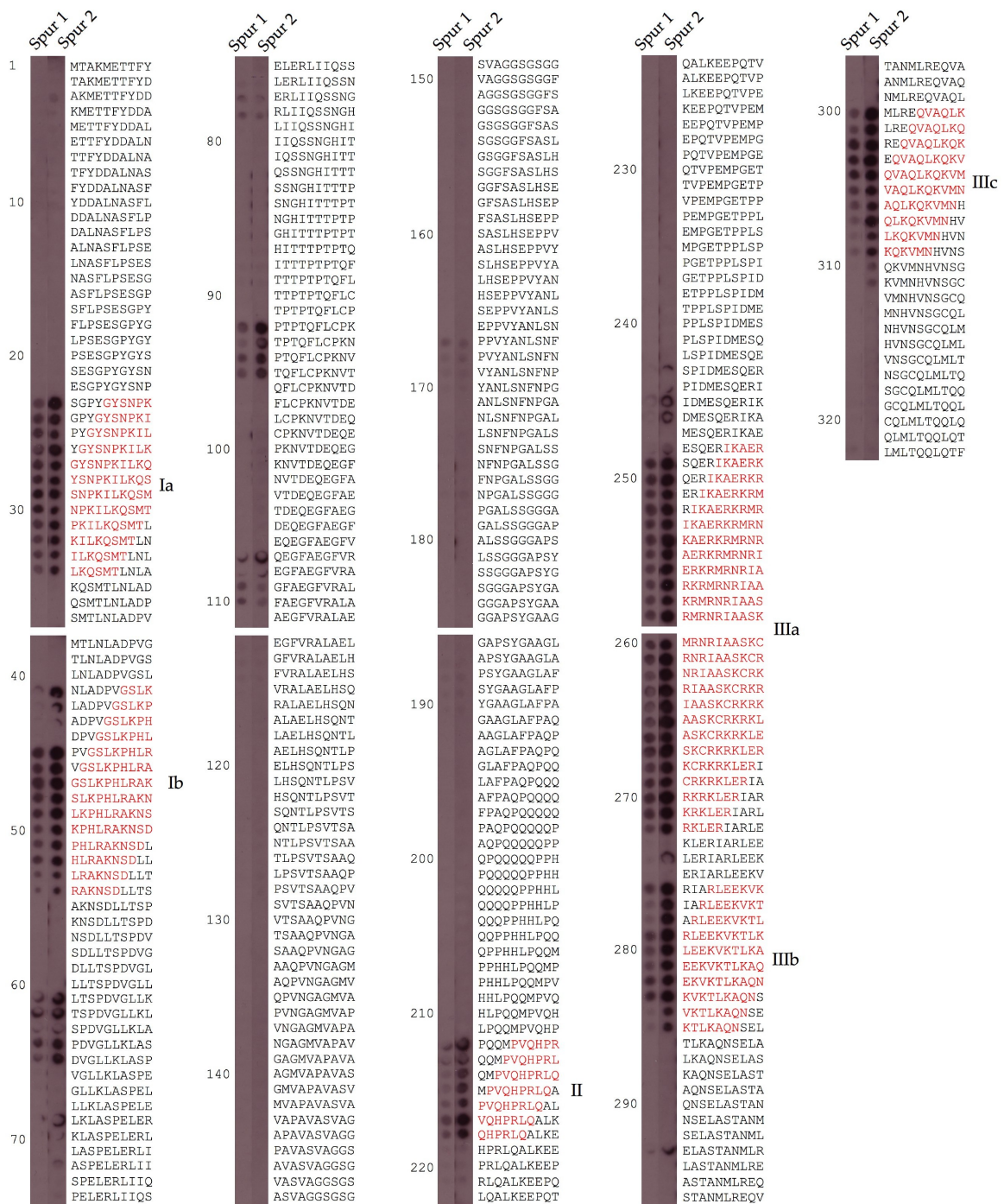


ABBILDUNG 4.3.5. Bindungsregionen von Hap46 auf c-Jun: Über Analyse membrangebundener Peptide, welche die Aminosäuresequenz von c-Jun überspannen, mit Hap46 (Spur 2) und Hap46ΔN16 (Spur 1) konnten Regionen im aminoterminalen (Regionen Ia und Ib) als auch im carboxyterminalen Bereich (Regionen II, IIIa, IIIb, IIIc) von c-Jun identifiziert werden. Die Nummern an der Seite geben die Anzahl der Peptide wieder.

Mit Hap46 konnten mehrere Regionen auf c-Jun identifiziert werden (Abb. 4.3.5, Spur 2), die bei einer Interaktion der beiden Proteine von Bedeutung sein könnten. In Abbildung 4.3.5 wurden die Membran-Spots ihrer jeweiligen Peptidsequenz gegenübergestellt und die Bindungsregionen in hellblau gekennzeichnet, diese befinden sich im amino- und carboxyterminalen Bereich von c-Jun. Interessanterweise bindet Hap46 an wichtige Bereiche auf c-Jun, welche die DNA-Bindungsregion, den Leuzin-Zipper für die Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der AP-1 Familie und die Bindestelle für die Jun N-terminale Kinase (JNK), die sogenannte δ -Domäne, beinhalten. Membranen, welche nur mit Protein und Zweit-Antikörper oder mit Erst- und Zwei-Antikörper aber ohne Protein inkubiert wurden, zeigten keinen Hintergrund.

In Spur 1 der Abbildung 4.3.5 sind die Ergebnisse mit Hap46 Δ N16 dargestellt. Zwar ist kein Bindungsverlust in einer der identifizierten Bindungsregionen von Hap46 erkennbar, jedoch ist die Intensität der Spots bei gleicher Proteinmenge wesentlich geringer als mit Hap46, was auf eine deutliche Reduktion in der Bindungseffizienz dieser Mutante schließen läßt und die Ergebnisse der vorherigen Versuche unterstützt. Auch Y. Niyaz konnte in Co-Immunpräzipitationen nachweisen, daß die Variante Hap46 Δ N16 nicht mehr an gekoppeltes c-Jun binden kann.

In Abb. 4.3.6 sind die Bindungsregionen von Hap46 nochmals in einem Balkenmodell von c-Jun dargestellt.

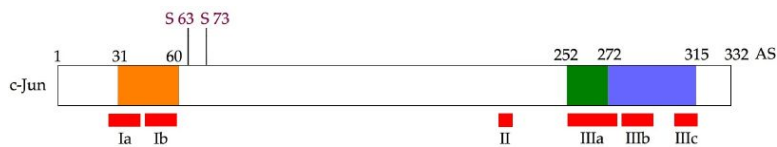


ABBILDUNG 4.3.6. Bindungsregionen von Hap46 auf c-Jun, welche über Peptidanalyse gefunden wurden. Region I liegt in der δ -Domäne von c-Jun (orange) wohingegen Regionen II und III am C-terminalen Ende liegen. Region IIIa liegt in der DNA-Bindungsregion (grün) und Regionen IIIb und IIIc befinden sich im Leuzin-Zipper (blau).

In Pull-down-Versuchen sollte überprüft werden, ob Hap46 auch an rekombinant hergestellte Proteinfragmente von Jun binden kann. Für diese Versuche wurden Varianten c-Jun1-166, c-Jun Δ N223 und v-Jun1-119 (Abb. 4.3.7) als GST-Fusionsproteine an eine Matrix gekoppelt und anschließend mit rekombinantem Hap46 inkubiert. Die Ansätze wurden nach mehreren Waschschritten in SDS-Probenpuffer aufgekocht und die Proteine auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran, wurde diese mit einem Hap-spezifischen Antikörper inkubiert, um so gebundenes Protein nachzuweisen. Als Positivkontrolle wurde 1 μ g rekombinantes Hap46 auf das SDS-Gel aufgetragen.

An Jun-Variante c-Jun Δ N223, die, nach Deletion der Aminosäuren 1 bis 223, noch die DNA-Bindungsregion und den Leuzin-Zipper enthält, kann Hap46 binden (Abb. 4.3.8, Spur 5). Etwas geringer dagegen scheint die Interaktionsfähigkeit von Hap46 mit Variante c-Jun1-166 (4.3.8,

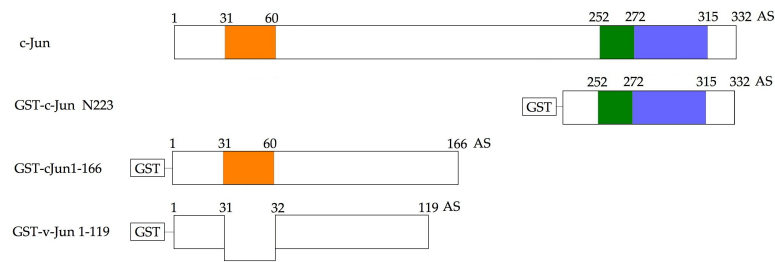


ABBILDUNG 4.3.7. Balkenmodelle von c-Jun und GST-Fusionsproteinen von Jun-Varianten: GST-c-Jun Δ N223, GST-c-Jun1-166 und v-Jun1-119, mit einer natürlich vorkommenden Deletion der δ -Domäne. Die δ -Domäne ist in orange, die DNA-Bindungsregion von c-Jun in grün und der Leuzin-Zipper in blau dargestellt.

Spur 4) zu sein. Diese Variante von c-Jun enthält die Delta-Domäne, welche jedoch in v-Jun1-119 fehlt. Wie in Abbildung 4.3.8, Spur 2, im Vergleich zur Kontrolle mit an Matrix gekoppeltem GST zu sehen ist, kann Hap46 nicht mehr an Variante v-Jun1-119 binden, was darauf schließen läßt, daß im aminoterminalen Bereich von c-Jun die δ -Domäne für die Interaktion mit Hap46 erforderlich ist.

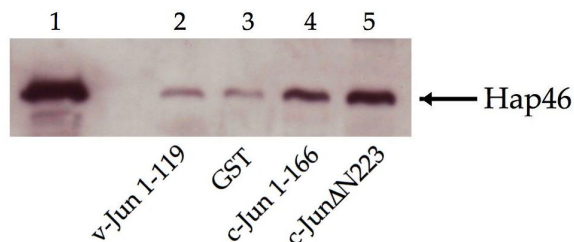


ABBILDUNG 4.3.8. Interaktionsanalyse von Jun-Varianten mit Hap46: An eine GSH-Matrix gekoppeltes GST-Fusionsprotein von v-Jun1-119 (Spur 2), c-Jun1-166 (Spur 4) und c-Jun Δ N223 (Spur 3), wurden mit rekombinantem Hap46 inkubiert. Die Ansätze wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und gebundenes Hap46 (siehe Pfeil) über einen spezifischen Antikörper sichtbar gemacht. Als Negativkontrolle diente eine Matrix an die GST gekoppelt wurde (Spur 3) und als Positivkontrolle wurden 1 μ g Hap46 auf das SDS-Gel aufgetragen (Spur 1).

Die Jun-Varianten sollten ebenfalls in Elisa Versuchen bezüglich einer Interaktion mit Hap46 getestet werden. Dazu wurde Protein der Varianten c-Jun Δ N223, c-Jun1-166 und v-Jun1-119 auf Plastikträgern gebunden und mit Hap46 inkubiert, welches schließlich nach mehreren Waschschritten mit einem spezifischen Antikörper gegen Hap46 detektiert wurde.

Wie auch in den Pull-down-Versuchen konnte Hap46 c-Jun Δ N223 binden (Abb. 4.3.9, Spur 4), wohingegen keine Interaktion mit c-Jun1-166 (4.3.9, Spur 3) festzustellen war, welches die gleichen Werte wie v-Jun1-119 (Abb. 4.3.9, Spur 1) und die der GST-Kontrolle (Abb. 4.3.9, Spur 2) aufwies. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, daß c-Jun1-166 so an die Elisa-Platte bindet, daß die Interaktionsregion für Hap46 schwer zugänglich ist. Auch bei dem vorherigen Ex-

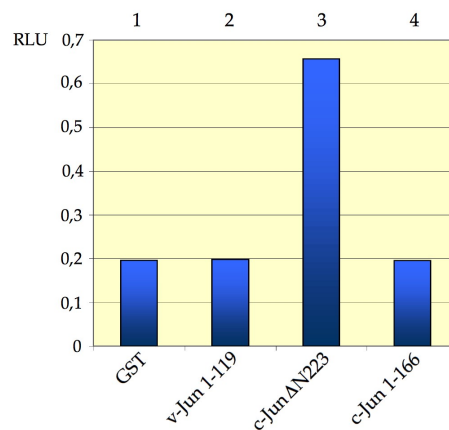


ABBILDUNG 4.3.9. Bindungsanalyse von Hap46 mit Jun-Varianten: An einen Plastikträger gebundenes GST-Fusionsprotein von v-Jun1-119 (Spur 2), c-Jun1-166 (Spur 4) und c-JunΔN223 (Spur 3), wurden mit rekombinantem Hap46 inkubiert. Gebundenes Hap-Protein wurde mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert. Die gemessenen Werte sind in RLU angegeben. Ein Ansatz mit GST (Spur 1) diente als Kontrolle.

periment mit Matrix-gebundenem c-Jun1-166 konnte eine verminderte Interaktion mit Hap46 im Vergleich zur Interaktion mit c-JunΔN223 festgestellt werden, was eine Erklärung dafür sein könnte, daß Hap46 den carboxyterminalen Bereich für eine effiziente Bindung mit c-Jun benötigt.

4.3.2.2 Hap46 verwendet zum Teil die gleichen Aminosäuren wie JNK für die Bindung an die δ -Domäne von c-Jun

In einer anderen Arbeitsgruppe wurden über Mutationsanalysen Aminosäuren in der δ -Domäne von c-Jun gefunden, welche für die Bindung an JNK und Phosphorylierung der Serine an Position 63 und 73 benötigt werden [100]. Um nun zu überprüfen welche Aminosäuren Hap46 für die Interaktion mit der δ -Domäne verwendet, wurden ausgewählte Aminosäuren einzeln oder in Kombination gegen Alanin ausgetauscht. Peptide (10mere), welche die Aminosäuresequenz der δ -Domäne überspannen und die jeweiligen Mutationen, ebenso wie eine nicht mutierte Sequenz, wurden hierzu auf eine Cellulosemembran gespottet. Diese wurde mit rekombinantem Hap46 inkubiert. Jenes konnte dann über einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Mutierte Peptide, welche keine Bindung mehr mit Hap46 im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, sind in grün gekennzeichnet (Abb. 4.3.10).

Abbildung 4.3.10, Spur 1 zeigt das Interaktionsmuster von Hap46 mit der nicht mutierten Sequenz der δ -Domäne. Bei Austausch des Lysins³² oder des Lysins³⁵ gegen Alanin ist im Vergleich mit der nicht mutierten Sequenz festzustellen, daß Peptide 2 bis 4 bzw. Peptide 8 bis 13 nicht mehr mit Hap46 interagieren (vgl. Abb. 4.3.10, Spuren 2 bzw. 3 vs. 1).

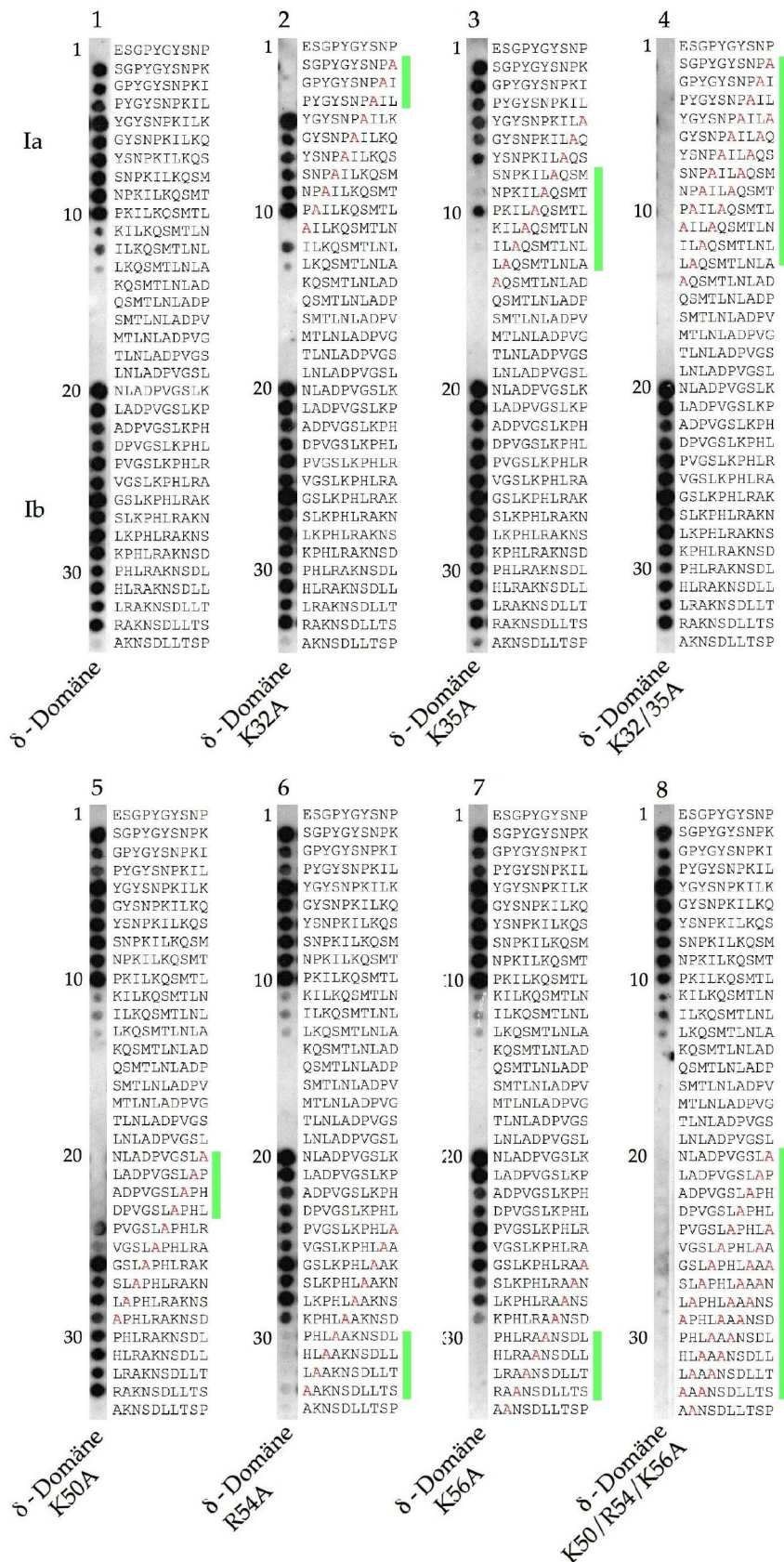


ABBILDUNG 4.3.10. Mutationsanalyse der δ -Domäne von c-Jun: Membrangebundene Peptide, welche die Aminosäuresequenz der δ -Domäne von c-Jun überspannen, wurden mit Hap46 inkubiert. Gebundenes Hap-Protein wurde über einen spezifischen Antikörper detektiert. Spur 1 zeigt die Bindung von Hap46 an die nicht mutierte Aminosäuresequenz der δ -Domäne. Die Bindungsregionen sind als Ia und Ib benannt. In Spuren 2 bis 8 ist die Bindung von Hap46 an mutierte Aminosäuresequenzen der δ -Domäne dargestellt. Die in grün markierten Bereiche zeigen den jeweiligen Bindungsverlust von Hap46 bei Mutation der entsprechenden Aminosäure.

Jedoch tragen andere Aminosäuren auch zur Bindung bei, denn zum Teil konnte eine Interaktion mit Hap46 und Peptiden, in denen eine der beiden Mutationen vorhanden ist, detektiert werden (Abb. 4.3.10, Spur 2, Peptide 5 bis 10 und Spur 3, Peptide 2 bis 7) Bei Mutation beider Lysine liegt sogar ein kompletter Bindungsverlust der Region Ia mit Hap46 vor (Abb. 4.3.10, Spur 4). Desweiteren wurden in Region Ib die Aminosäuren Lysin⁵⁰, Arginin⁵⁴ und Lysins⁵⁶ einzeln oder zusammen gegen Alanin mutiert.

So zeigen Peptide 20-23 keine Interaktion mehr mit Hap46 bei Mutation des Lysins⁵⁰ (Abb. 4.3.10, Spur 5 grüner Balken), taucht jedoch das Arginin⁵⁴ ab Peptid 24 und das Lysin⁵⁶ ab Peptid 26 auf, so kann das Fehlen des Lysins⁵⁰ kompensiert werden (Abb. 4.3.10, Spur 5).

In Abbildung 4.3.10, Spuren 6 und 7 sind die Mutanten R54A bzw. K56A dargestellt. Wie zu erkennen ist, kann Hap46 noch an Peptide 20 bis 29 binden, da hier noch das Lysin⁵⁰ vorhanden ist und somit die Mutation des Arginins⁵⁴ oder des Lysins⁵⁶ kompensiert werden kann. Ab Peptid 30 jedoch, ist das Lysin⁵⁰ nicht mehr präsent, und somit können nachfolgende Peptide nicht mehr mit Hap46 interagieren (Abb. 4.3.10, Spuren 5 und 6, grüne Balken). Bei Austausch aller drei Aminosäuren zusammen, kann keine der nicht mutierten anderen Aminosäuren die Bindung an Hap46 aufrecht erhalten und somit ist ein fehlendes Interaktionsvermögen der Region Ib mit Hap46 zu beobachten (Abb. 4.3.10, Spur 8 grüner Balken).

4.3.2.3 Hap46 hat keinen Einfluß auf die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK

Die transkriptionelle Regulation von c-Jun wird über Mitglieder der JNK-Familie vermittelt. Durch die Bindung von JNK an die δ -Domäne von c-Jun werden die beiden Serine an Position 63 und 73 phosphoryliert, woraufhin die c-Jun abhängige Transkription aktiviert wird. Da Hap46 ebenfalls an die δ -Domäne bindet und somit einen Konkurrenten zu JNK darstellen könnte, sollte hier der Einfluß von Hap46 auf die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK überprüft werden.

Dazu wurde rekombinantes Protein von JNK (0,33 μ g), c-Jun(1-169)-GST (0,33 μ g) und Hap46 (3,5 μ g) mit radioaktiv markiertem γ -³²P-ATP (Endkonzentration 0,3 μ Ci/ μ l) inkubiert, wobei Hap46 im Vergleich mit c-Jun in einem 10-fach molaren Überschuß vorlag. Die Ansätze wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und phosphoryliertes c-Jun über Autoradiographie sichtbar gemacht. Man bemerke, daß JNK sich an Tyrosin selbst phosphoryliert und in der Autoradiographie als Bande bei 80 kDa zu sehen ist (Abb. 4.3.11 und 4.3.12 siehe Pfeil). In einem ersten Experimente-Set wurde ein verkürztes c-Jun Fragment benutzt, welches die δ -Domäne und einen GST-Tag beinhaltet und ebenso wie die verwendete Jun-Kinase Bestandteil eines Phosphorylierungs-Kits war. Wie in Abbildung 4.3.11 zu sehen ist, weisen die Ansätze mit und ohne Hap46 (Spuren 3 und 4) keine Unterschiede im Grad der Phosphorylierung von c-jun auf, obwohl Hap46 in einem 10-fachen molaren Überschuß

eingesetzt wurde. Ansätze mit c-Jun und Hap46 (Abb. 4.3.11, Spur 1), JNK und Hap46 (Abb. 4.3.11, Spur 2), JNK und c-Jun alleine (Abb. 4.3.11, Spuren 5 und 6) dienten als Kontrollen.

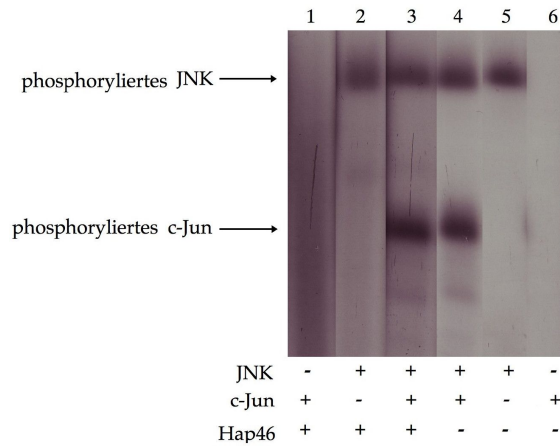


ABBILDUNG 4.3.11. Einfluß von Hap46 auf die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK: c-Jun wurde mit JNK (Spur 5) oder mit JNK und Hap46 (Spur 4) inkubiert. Ansätze mit c-Jun und Hap46 (Spur 1), JNK und Hap46 (Spur 2), JNK und c-Jun alleine (Spuren 5 und 6) dienten als Kontrollen. Phosphoryliertes c-Jun und autophosphoryliertes JNK sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Um auszuschließen, daß dies Ergebnis aufgrund des verkürzten c-Jun Proteins erhalten wurde, wurden die Phosphorylierungs-Versuche mit c-Jun Protein voller Länge wiederholt. Allerdings mußte hierzu erstmals getestet werden, ob sich die Phosphorylierungsversuche mit besagtem c-Jun durchführen ließen, da dessen Lagerungspuffer 500mM Guanidinium Hydrochlorid enthält. Abbildung 4.3.12 A, zeigt die Autoradiographie mit einer konstanten Menge an JNK und steigenden Mengen c-Jun (0,1µg bis 1µg). Bei Verwendung von 1µg JNK kann man ab einer Menge von 0,3µg c-jun eine schwache Bande erkennen (Abb. 4.3.12 A, Spur 2). Je mehr c-jun in den Ansätzen vorhanden ist, desto intensiver wird die Bande, da mehr c-jun für die Phosphorylierung durch JNK vorliegt (Abb. 4.3.12 A, Spuren 1 bis 5). Ansätze mit JNK und c-Jun alleine dienten als Kontrollen (Abb. 4.3.12 A, Spuren 6 und 7).

Für das nächste Experiment wurden nun 0,5µg JNK, 0,25µg c-Jun und 2,5µg Hap46 mit radioaktiv markiertem γ -³²P-ATP (Endkonzentration 0,3 µCi/µl) inkubiert. Hap46 hatte hierbei im Vergleich zu c-Jun einen 10-fachen molaren Überschuß. Doch auch hier waren keine signifikanten Unterschiede im Grad der Phosphorylierung von c-jun bei Ansätzen mit Hap46 und ohne Hap46 (Abb. 4.3.12 B, Spur 4 vs. 5) zu bemerken, was darauf schließen läßt, daß eine Beteiligung von Hap46 bei der Phosphorylierung von c-Jun durch JNK ausgeschlossen werden kann. Bei den Experimenten dienten Ansätze mit c-Jun und Hap46 (Abb. 4.3.12 B, Spur 1), JNK und Hap46 (Abb. 4.3.12 B, Spur 2), JNK und c-Jun alleine (Abb. 4.3.12 B, Spuren 5 und 6) als Kontrollen.

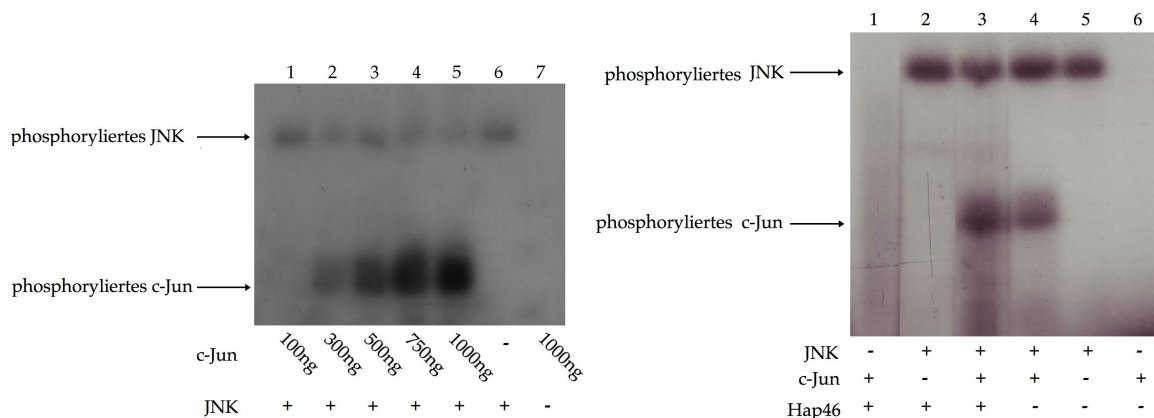


ABBILDUNG 4.3.12. Einfluß von Hap46 auf die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK: A: Testphosphorylierung von in Guanidinium-Hydrochlorid gelagertem c-Jun. Steigende Mengen an c-Jun wurden mit 1µg JNK inkubiert (Spuren 1 bis 5). Ansätze mit JNK und c-Jun alleine dienten als Kontrollen. B: c-Jun wurde mit JNK (Spur 5) oder mit JNK und Hap46 (Spur 4) inkubiert. Ansätze mit c-Jun und Hap46 (Spur 1), JNK und Hap46 (Spur 2), JNK und c-Jun alleine (Spuren 5 und 6) dienten als Kontrollen. Phosphoryliertes c-Jun und autophosphoryliertes JNK sind durch Pfeile gekennzeichnet.

4.3.3 Einfluß von Hap46 auf die c-Jun abhängige Transkription-Ausblicke

Wie oben gezeigt wurde, beeinflusst Hap46 nicht die JNK-abhängige Phosphorylierung von c-Jun. Jedoch ist eine Beteiligung von Hap46 bei der Regulation der c-Jun vermittelten Transkription nicht ausgeschlossen. Aus diesem Grund wurde ein *in vivo* System gewählt, mit welchem, mittels eines Reportergens (Luciferase) unter der Kontrolle des Kollagenase-Promotors, eine mögliche Beteiligung von Hap46 bei der Regulation der Transkription nachgewiesen werden konnte. Die Überlegung lag nahe F9 Zellen, welche in nicht differenziertem Zustand kein c-Jun aufweisen, mit Expressionsplasmiden für c-Jun (pRSV-c-Jun), Hap46 (pRSV-Hap46), Hap46-Varianten (pRSVHap46ΔN10, pRSVHap46ΔC47) und als Reportergen Luciferase (pcoll-Luci) zu transfizieren. Um für die Expression von c-Jun und Hap gleiche Bedingungen zu gewährleisten, mußten zuvor die Hap-Varianten in den pRSV-Vektor umkloniert werden (siehe Material und Methoden). Das Prinzip dieses Experimentes beruht darauf, daß Mitglieder der AP-1 Familie, somit auch c-Jun Homodimere, spezifisch an den Kollagenase-Promotor binden können und Transkription der Luciferase forcieren. Über Luciferase-Aktivitätsmessungen von Zelllysaten transfizierter Zellen, kann so die Menge des exprimierten Reportergens festgestellt werden. Ist nun eine Beteiligung seitens Hap46 bei der c-Jun abhängigen Transkription vorhanden, so müßte diese über Veränderungen der Luciferaseaktivität nachweisbar sein.

Für die Transfektionen wurde Transfektin (Biorad) verwendet, wobei 5×10^5 F9 Zellen mit 2,5µg Gesamt-DNA transfiziert wurden. Dabei fielen 0,5µg auf pcoll-Luci und je 1µg auf die Plasmide pRSV-c-Jun und pRSV-Hap46 bzw. pRSV-Hap46ΔN10 oder pRSVΔC47. Als Referenz dienten Ansätze mit 0,5µg pcoll-Luci, 1 µ pRSV-c-Jun und 1µg pRSV. Ansätze mit 0,5µg

pcoll-Luci und 2 μ g pRSV bzw. 0,5 μ g pcoll-Luci, 1 μ g pRSV und 1 μ g pRSV-Hap46 bzw. pRSV-Hap46 Δ N10 oder pRSV Δ C47, dienten als Kontrollen. Alle Ansätze wurden in vierfacher Ausführung gemacht. Nach 32h wurde die Hälfte der Ansätze für 2h bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen die andere Hälfte verblieb bei 37°C. Nach weiteren 3h bzw. 16h wurden die Zellen für den Luciferase-Assay aufgearbeitet und für die Messung gleiche Proteinmengen eingesetzt.

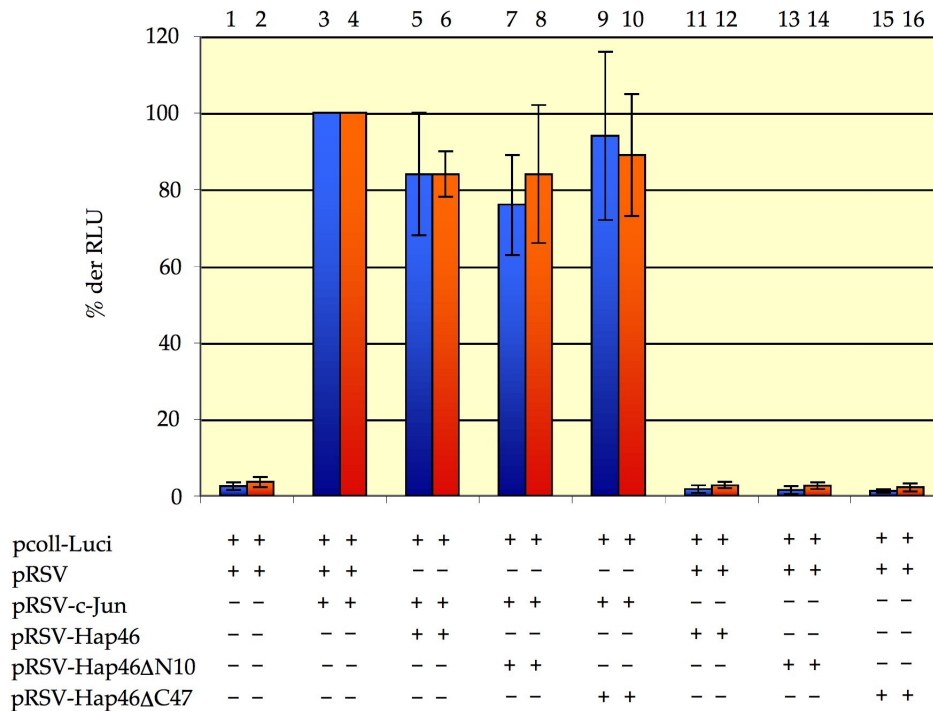


ABBILDUNG 4.3.13. Einfluß von Hap46 auf die c-Jun abhängige Transkription: F9 Zellen wurden mit pcoll-Luci, pRSV-c-Jun und pRSV-Hap46 (Spuren 5 und 6) bzw. pRSV-Hap46 Δ N10 (Spuren 7 und 8) oder pRSV-Hap46 Δ C47 (Spuren 9 und 10) transfiziert. Nach 24h erfolgte mit der einen Hälfte der Ansätze ein Hitzeschock bei 42°C (rote Balken) für 2 h, Werte von nicht hitzegeschockten Zellen sind mit blauen Balken dargestellt. Nach weiteren 3 bis 16h wurden die Zellen für den Luciferase-Assay aufgearbeitet und von den Zell-Lysaten für die Messung gleiche Proteinmengen eingesetzt. Der Referenzwert mit pRSV, pRSV-c-Jun und pcoll-Luci ist in Spuren 3 und 4 zu sehen. Als Kontrollen dienten Ansätze mit pcoll-Luci und pRSV (Spuren 1 und 2), pcoll-Luci, pRSV und pRSV-Hap46 (Spuren 11 und 12) bzw. pRSV-Hap46 Δ N10 (Spuren 13 und 14) oder pRSV-Hap46 Δ C47 (Spuren 15 und 16).

Die In Abbildung 4.3.13 gezeigten Luciferase-Assays zeigen die bisherigen Ergebnisse. Die Daten ohne Hitzeschock werden von den blauen Balken, die Daten mit Hitzeschock von den roten Balken repräsentiert. Die Werte der Referenzen (Abb. 4.3.13, Spuren 3 und 4), daß heißt c-Jun vermittelte Expression der Luciferase, wurden auf 100% gesetzt und die anderen Werte in Relation dazu. Kontrollen sind in Spuren 1, 2, 11, 12, 13, 14, 15 und 16 zu sehen. Die Werte, welche mit Hap46, Hap46 Δ N10 oder Hap46 Δ C47 (Abb. 4.3.13, Spuren 5, 6, 7, 8, 9 und 10) erhalten wurden, zeigen im Vergleich zur Referenz eine leichte Reduktion der Luciferaseaktivität, was

für eine Beteiligung von Hap46 bei der c-jun abhängigen Transkription sprechen würde, wobei es keine nennenswerten Unterschiede zwischen hitzegeschockten und nicht hitzegeschockten Zellen gibt (Abb. 4.3.13, blaue Balken vs. rote Balken). Allerdings unterliegen die gemessenen Werte größeren Schwankungen, wie die Fehlerindikatoren anzeigen. Dies könnte darauf beruhen, daß sich die F9 Zellen schlecht transfizieren lassen. Als bestes Transfektionsreagenz erwies sich Transfektin (Biorad) und Ca-Phosphat mit einer Effizienz von 5% bis 10%, allerdings benötigte man mit Transfektin nur 2,5µg DNA je Vertiefung einer 6-well Platte im Vergleich zu Ca-Phosphat mit 15µg (Daten nicht gezeigt). Ein Teil der Proben wurde auch für den immunologischen Nachweis von c-Jun bzw. Hap46 verwendet, wobei jedoch nur eine Überexpression von c-Jun nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Weitere Tests in Hela Zellen zeigten allerdings, daß nach Transfektion des Plasmides pRSV-Hap46, das Protein Hap46 nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der erwähnten Probleme können die oben gezeigten Ergebnisse erstmal nur als Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Hap46 bei der c-Jun abhängigen Transkription dienen. Weitere Optimierungen, eventuell auch in anderen Zell-Linien, sind notwendig um gesicherte Daten zu erlangen.

Im zweiten Teil der Interaktionsanalysen von Hap46 mit c-Jun wurde gezeigt, daß Hap46 mit der DNA-Bindungsdomäne von c-Jun, dem Leuzin-Zipper und der Delta-Domäne interagiert. Die JNK-Bindungsregion wurde hierbei näher untersucht, wobei über Mutationsanalysen die Aminosäuren Lysin³², Lysin³⁵, Lysin⁵⁰, Arginin⁵⁴ und Lysin⁵⁶ identifiziert wurden, welche für die Bindung an Hap46 notwendig sind. Obwohl die Bindungsregion von Hap46 und JNK auf c-Jun identisch ist, konnte *in vitro* eine Beteiligung von Hap46 bei der JNK abhängigen Phosphorylierung von c-Jun nicht nachgewiesen werden. Reporteragen-Analysen in F9 Zellen lieferten jedoch vorläufige Daten, die auf einen Einfluß von Hap46 auf die c-Jun abhängige Transkription hinweisen .

5

Diskussion

5.1 Interaktion von Hap46 und hsc70

Hsc70 ist die konstitutiv exprimierte Form des Hitzeschockproteins hsp70 und besteht aus einer ATPase-Domäne und einer Substratbindungsdomäne, welche jeweils in zwei Subdomänen unterteilt werden. Bei der Charakterisierung der Interaktion von Hap46 und hsc70 mit der Methode des Phage-Displays und über Analyse membrangebundener Peptide, welche die Aminosäuresequenz der ATPase-Domäne von hsc70 überspannen, konnten Petersen et al., [76], mehrere Bindungsregionen identifizieren (siehe Abb. 1.3.4). Eine der Hauptkontaktstellen, die Region V, befindet sich auf der Subdomäne IIB. Interessanterweise ergeben die Bindungsregionen I und IV auf Subdomäne IB eine hervorstehende Protuberanz (siehe Abb. 4.1.1), welche sich für Wechselwirkungen mit anderen Proteinen anbietet; so auch für die Interaktion von Hap46 und hsc70. Mutationsanalysen in Region I (CVGVFQHGK) mittels membrangebundener Peptide, wobei jede Aminosäure gegen jede der 20 proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht wurde, und anschließende Inkubation mit rekombinantem Hap46 zeigten, daß bei Austausch der Aminosäuren Cystein¹⁷, Glycin¹⁹, Glutamin²² und Lysin²⁵ die Bindung mit Hap46 reduziert oder sogar ganz zerstört wird (siehe Abb. 4.1.2). Bei Betrachtung des dreidimensionalen Modells von hsc70 ist jedoch festzustellen, daß sich die Aminosäuren Cystein¹⁷ und Glycin¹⁹ innerhalb des Moleküls befinden und somit zur direkten Interaktion mit Hap46 nicht beitragen. Möglicherweise werden sie aber zur Stabilisierung der Bindung von hsc70 und Hap46 benötigt. Die beiden anderen Aminosäuren, Glutamin²² und Lysin²⁵, liegen im äußeren Bereich der Protuberanz und sind so für Interaktionen mit Proteinen gut zugänglich (siehe Abb. 4.1.3). Vor allem das Lysin an Position 25 scheint für die Interaktion mit Hap46 wichtig zu sein, da dessen Austausch nur durch die ihr verwandte Aminosäure Arginin kompensiert werden kann (siehe Abb. 4.1.2).

Durch Co-Kristallisation von hsc70 mit der BAG-Domäne von Hap/BAG-1 und Mutations-Analysen im Hefe-Zwei-Hybrid-System, konnten Briknarova et al. und Sondermann et al. [9, 96] Aminosäuren auf den Subdomänen IIB und IB von hsc70 identifizieren, die für die Bindung von Hap/BAG-1 wichtig sind, wobei Subdomäne IB nur wenige Kontaktstellen aufwies. Die Studien von Briknarova et al. und Sondermann et al. wurden allerdings nicht mit Hap46 voller Länge, sondern nur mit der aus drei α -Helices bestehenden BAG-Domäne (Aminosäuren 151-274 von Hap46) durchgeführt. Zudem zeigen die vorangegangenen Ergebnisse von Petersen et al., daß es zwei Hauptkontaktstellen von Hap46 auf der ATPase-Domäne von hsc70 gibt. Daher war anzunehmen, daß außer der BAG-Domäne noch weitere Bereiche von Hap/BAG-1 an der Interaktion mit hsc70 teilnehmen. Über Analyse von membrangebundenen Peptiden, welche die Aminosäuresequenz von Hap46 überspannen, mit bovinem hsc70 ATPase-Fragment oder bovinem hsc70 voller Länge, konnten sechs Interaktionsregionen von hsc70 auf Hap46 identifiziert werden (siehe Abb. 4.1.5). Deren quantitativer Beitrag bei der Bindung an hsc70 wurde anschließend in Elisa-Analysen bestimmt (siehe Abb. 4.1.7). Zur Durchführung dieses Experiments wurde bovines hsc70 voller Länge auf Plastikträger gebunden und mit rekombinantem Protein von Hap46 bzw. Hap46-Mutanten inkubiert. Gebundenes Protein konnte mittels eines Hap-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Wie erwartet zeigte eine Hap46-Mutante mit Deletion der letzten 47 carboxyterminalen Aminosäuren (Helix 3 der BAG-Domäne) in Elisa-Analysen eine um 90% verminderte Bindung an hsc70. Auch über Peptidanalyse identifizierte Interaktionsregionen von Hap46 mit hsc70 befinden sich in Helix 1, 2 und 3 der BAG-Domäne (siehe Abb. 5.1.1, Spur 3, dunkelblau markierte Aminosäuren). Vergleicht man die von anderen Arbeitsgruppen identifizierten Aminosäuren innerhalb der BAG-Domäne, die bei der Bindung an hsc70 eine Rolle spielen, mit den hier gefundenen Interaktionsregionen ergeben sich einige Übereinstimmungen innerhalb dieser Regionen [9, 96, 95] (siehe Abb. 5.1.1, Spuren 1 und 2). So liegt auch das Arginin an Position 237, dessen Mutation eine 10-fach geringere Affinität der BAG-Domäne zu hsc70 zur Folge hat, in Helix 3 [95]. Aufgrund der hohen positionellen Konservierung dieser Aminosäure konnten einige BAG-Domänen Proteine, wie Snl1p aus *Saccharomyces cerevisiae*, identifiziert werden. Das aus 159 Aminosäuren bestehende Snl1p hat eine Transmembrandomäne am N-Terminus und befindet sich an den Membranen des Nukleus und des endoplasmatischen Retikulums. Der C-Terminus und der mittlere Teil des Proteins befinden sich im Cytosol. Die in Snl1p homologe Region zur BAG-Domäne liegt im cytosolisch gelegenen carboxyterminalen Abschnitt, in Übereinstimmung mit der Interaktion mit cytosolischem hsc70 [95]

Es steht außer Frage, daß der C-terminale Bereich von Hap46 eine zentrale Rolle bei der Interaktion mit hsc70 spielt, was auch die in dieser Arbeit durchgeführten Peptid- und Elisa-

BAG-Domäne von Hap46

	----- Helix 1 -----	
Spur 1	MLIGKKNSPQEEVELKKLKHLEKSVEKIADQLEELNKELTGIQ	AS 187
Spur 2	MLIGKKNSPQEEVELKKLKHLEKSVEKIADQLEELNKELTGIQ	AS 187
Spur 3	MLIGKKNSPQEEVELKKLKHLEKSVEKIADQLEELNKELTGIQ	AS 187
	----- Helix 2 -----	
Spur 1	QGFLPKDLQAEALCKLDRRVKATIEQFMKILEEIDTLILPENF	AS 230
Spur 2	QGFLPKDLQAEALCKLDRRVKATIEQFMKILEEIDTLILPENF	AS 230
Spur 3	QGFLPKDLQAEALCKLDRRVKATIEQFMKILEEIDTLILPENF	AS 230
	----- Helix 3 -----	
Spur 1	KDSRLKRKGLVKKVQAFLAECDTVEQNICQETERLQSTNFALAE	AS 274
Spur 2	KDSRLKRKGLVKKVQAFLAECDTVEQNICQETERLQSTNFALAE	AS 274
Spur 3	KDSRLKRKGLVKKVQAFLAECDTVEQNICQETERLQSTNFALAE	AS 274

ABBILDUNG 5.1.1. Darstellung von Aminosäuren (rot, grün und gelb) und Regionen (blau) in der BAG-Domäne von Hap, die an der Bindung der hsc70 ATPase-Domäne beteiligt sind. Die verschiedenen Spuren zeigen die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen. Spur 1: die rot markierten Aminosäuren zeigten bei Mutation eine verminderte oder keine Bindung mehr an hsc70, die gelb markierten Aminosäuren gehen hydrophobe Wechselwirkungen mit Subdomäne IB der hsc70 ATPase-Domäne ein [96, 95]. Spur 2: die grün gekennzeichneten Aminosäuren zeigten bei Mutation im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine reduzierte Bindung an die hsc70 ATPase-Domäne [9]. Spur 3: Blau sind die in dieser Arbeit über Analyse membrangebundener Peptide identifizierte Interaktionsregionen mit der hsc70 ATPase-Domäne dargestellt. Die hellblau markierte Region konnte mit hsc70 voller Länge zusätzlich zu den anderen Regionen identifiziert werden.

Analysen belegen. Darüberhinaus konnten über Peptidanalyse zudem noch die Ubiquitin-ähnliche Domäne, die Region der sauren Hexapeptid Wiederholungen und erstaunlicherweise die N-terminale DNA-Bindungsdomäne als Bindungsregionen mit hsc70 identifiziert werden. Auch die in Elisa-Analysen verwendeten Mutanten von Hap46, welche jeweils Deletionen der Ubiquitin-ähnlichen Domäne, der Region der sauren Hexapeptid-Wiederholungen oder der DNA-Bindungsregion aufwiesen, zeigten eine reduzierte Affinität zu hsc70 (siehe Abb. 4.1.7). Diese Ergebnisse belegen, daß in der Tat nicht nur Aminosäuren der BAG-Domäne, sondern noch weitere Bereiche von Hap46 an der Interaktion mit hsc70 beteiligt sind.

Sondermann et al. [96] untersuchten die Wirkung der BAG-Domäne bzw. des Hap46 voller Länge auf die ATPase Aktivität von hsc70 und die Freisetzung von Substrat-gebundenem hsc70. Dabei stellte sich heraus, daß mit der BAG-Domäne im Vergleich zum gesamten Protein eine leichte Steigerung der ATPase Aktivität erzielt werden konnte. Auch stimulierte die BAG-Domäne die Freisetzung von Substrat-gebundenem hsc70 um 20% mehr als Hap46 voller Länge. Dies bedeutet, daß die BAG-Domäne alleine zum einen den Austausch von ADP zu ATP forciert und zum anderen die Affinität von Substratmolekülen zu hsc70 noch mehr herabsetzt

als Hap46 voller Länge. Demnach hätten die Aminosäuren der anderen Regionen von Hap46 einen negativ-regulatorischen Effekt auf die ATPase-Aktivität und die Substratfreisetzung von hsc70. Dies konnte auch von Gässler et al. [29] beobachtet werden. So zeigte die BAG-Domäne im Gegensatz zu Hap46 eine gesteigerte ADP-Austauschrate. Aufgrund des negativen Einflusses der N-terminalen Sequenzen von Hap46, wäre es möglich, daß die kleineren Isoformen von Hap (Hap33 und Hap29) andere Affinitäten bei der Bindung an hsc70 aufweisen.

Ein weiterer interessanter Aspekt der hsc70 Regulation liegt in der Frage, wie die Substrat-Bindungsdomäne und die ATPase-Domäne von hsc70 miteinander in Kontakt treten, damit hsc70 seine Funktion als Chaperon ausüben kann. Es ist anzunehmen, daß dies aufgrund der Interaktion mit Co-Chaperonen reguliert wird. Bei der Analyse membrangebundener Peptide von Hap46 mit bovinem hsc70, konnten Peptide identifiziert werden, welche nur mit bovinem hsc70 voller Länge, nicht aber mit der ATPase-Domäne von hsc70 interagierten (siehe Abb. 4.1.5). Dies würde bedeuten, daß auch Aminosäuren der Substratbindungsdomäne von hsc70 mit Hap46 interagieren können. Diese Interaktionsregion der Substratbindungsdomäne von hsc70 befindet sich in der Helix 1 der BAG-Domäne (siehe Abb. 5.1.1, Spur 3). Es wäre möglich, daß Hap46 über diese Kontaktstellen mit der Substratbindungsdomäne von hsc70 eine Verbindung zur ATPase-Domäne herstellt und somit eine Konformationsänderung bewirkt, welche einen regulatorischen Effekt auf die Funktion von hsc70 ausübt.

Entsprechende Studien von Bimston et al. [7] lassen vermuten, daß Hap46 in der Tat eine Konformationsänderung der hsc70 Substratbindungsdomäne erzeugt, so daß das Substrat in einem ternären Komplex mit Hap/BAG-1 und hsc70 gehalten wird, das heißt Hap46 entkoppelt die Nukleotid-Hydrolyse von der Substratfreisetzung. Die Bindung und Freisetzung von Substrat-Proteinen durch hsc70 ist strikt abhängig vom ATPase-Zyklus des Chaperons. Die von Bimston et al. dargestellte Funktionsweise von Hap46 widerspricht allerdings der von Sondermann et al. und Gässler et al. [29, 96] favorisierten. Diese gehen davon aus, daß Hap46 als Nukleotidaustauschfaktor für ADP dient und die Freisetzung des Substrat-Proteins von hsc70 erhöht wird. Hap46 wird hier die gleiche Funktion wie dem bakteriellen GrpE zugeschrieben. GrpE stimuliert den Nukleotidaustausch und die Öffnung des ATP-Bindungsspalt bei DnaK, dem bakteriellen hsc70 Homolog. Bei der Kristallisation der ATPase-Domäne von DnaK mit seinem Co-Faktor GrpE konnten zwei Kontaktregionen auf beiden Subdomänen der ATPase-Domäne identifiziert werden. Innerhalb einer Kontaktregion spielt die Asparaginsäure an Position 19 eine große Rolle bei der Bindung an GrpE [37, 58]. Stellt man die beiden Sequenzen von hsc70 und DnaK gegenüber, so wird deutlich, daß die Asparaginsäure¹⁹ in DnaK dem Glutamin²² innerhalb Region I in hsc70 entspricht. Das auf Subdomäne IB der hsc70 ATPase-Domäne gelegene Glutamin an Position 22 spielt zusammen mit dem Lysin an Position 25 eine große Rolle bei der Bindung an Hap46. Da Hap46 ebenfalls zwei Hauptkontaktstellen auf hsc70 besitzt, wäre es möglich, daß es wie GrpE die Öffnung des ATP-Bindungsspalt bewirkt, um so Ein-

fluß auf die Aktivität von hsc70 zu nehmen. Zwar interagieren die BAG-Domäne und GrpE mit den Subdomänen I und II ihrer jeweiligen ATPase-Domäne, dennoch sind die beiden Proteine strukturell nicht miteinander verwandt. Im Gegensatz zu Hap46 formt GrpE ein Dimer. Dieses verwendet zusätzlich zu den Kontakten seiner α -helikalen Region eine Subdomäne mit einer β -Faltblattstruktur, um mit der ATPase-Domäne von DnaK zu interagieren [96].

Hsc70 wird nicht nur durch Hap46 reguliert. Außer dem Co-Chaperon hsp40, dem Homolog zum bakteriellen DnaJ, wurden das hsc70 interagierende Protein Hip (p48), das hsp70/hsp90-organisierende Protein Hop/p60 und als letztes das hsp70 interagierende Protein HspBP1 als Co-Chaperone von hsp70/hsc70 identifiziert. Hip inhibiert normalerweise den Austausch von Nukleotiden [40, 72]. Es bindet genau wie Hap46 an die ATPase-Domäne von hsc70, wobei Hap46 und Hip um die Bindung an hsc70 kompetieren [30]. HspBP1 und Hop/p60 wirken inhibierend auf die Faltungsaktivität von hsc70. Für Hop/p60 konnte gezeigt werden, daß es am carboxyterminalen Ende von hsc70 bindet und durch Hap46 nicht beeinflusst wird, ebenso wie das Co-Chaperon hsp40, welches die Hydrolyse von ATP stimuliert [31, 79]. Neuere Versuche von Shomura et al. zeigten, daß HspBP1 an die ATPase-Domäne von hsc70 bindet. Mit seiner konkaven Form legt es sich über die Subdomäne II und ragt so in den ATP-Bindungsspalt, so daß ATP nicht mehr binden kann – im Gegensatz zu Hap46, welches eine konformationelle Veränderung innerhalb der ATPase-Domäne bewirkt [92]. Interessant wäre es zu wissen, ob Hap46 und HspBP1 ein Wettbewerbsverhalten bei der Bindung an hsc70 zeigen, da sie wie Hip an die ATPase-Domäne binden.

Hap46 ist ein Co-Chaperon von hsc70, welches Kontaktstellen auf der ATPase-Domäne und auch auf der Substratbindungsdomäne besitzt. Es konnte gezeigt werden, daß auf der ATPase-Domäne von hsc70 in der Hap46 Bindungs-Region I vor allem die Aminosäuren Glutamin²² und Lysin²⁵ für die Interaktion von Bedeutung sind. Außerdem konnten Bindungsstellen von Hap46 auch in der Ubiquitin-ähnlichen Domäne, in der Region von sauren Hexapeptid-Wiederholungen und in der aminoterminalen DNA-Bindungsregion identifiziert werden. Damit beschränkt sich die Interaktion von Hap46 mit hsc70 nicht nur auf die BAG-Domäne.

5.2 Interaktion von Hap46 und DNA

Hap46 ist ein Protein, welches mit zahlreichen Proteinen Interaktionen eingehen kann. Zeiner et al. konnten 1999 erstmals auch eine Bindung an Desoxyribonukleinsäure nachweisen. Hap46 bindet Sequenz-unspezifisch ringförmige, verdrehte und lineare DNA-Moleküle, allerdings kann Hap46 erst ab einer Länge von ca. 60bp an DNA-Fragmente binden [69, 68, 27]. Eine Sequenz-unspezifische DNA-Bindung wurde für Histon-Proteine [117] und auch für das High Mobility Group Protein (HMG1) beschrieben. HMG1 enthält eine HMG1/2-Box, ein generelles

DNA-Bindungsmotiv mit 75 Aminosäuren, welche drei α -Helices formen. Für die Sequenz-unspezifische Bindung interkaliert das Phenylalanin an Position 102, unterstützt durch das Phenylalanin an Position 101, in Basenpaare der DNA [81]. Sequenz-spezifisch binden Transkriptionsfaktoren an DNA über bestimmte Motive wie Leuzin-Zipper oder Helix-turn-Helix und stimulieren die Transkription von Genen. Auch Hap46 zeigte einen transkriptionsstimulierenden Effekt, welcher mit einer Mutante, deren aminoterminalen ersten 16 Aminosäuren deletiert waren, nicht erzielt werden konnte [126]. Diese Deletionsmutante ist nicht mehr in der Lage an DNA zu binden. So weist Hap46 kein gewöhnliches DNA-Bindungsmotiv auf, sondern verwendet Aminosäuren dieser kurzen basischen Sequenz (MKKKTRRRST....) am N-Terminus von Hap46 für die Bindung an DNA. Innerhalb dieser Sequenz befinden sich zwei basische Blöcke von jeweils drei Lysinen und drei Argininen, welche durch ein Threonin voneinander getrennt sind [126]. Im Vordergrund dieser Arbeit, in Bezug auf die DNA Bindungseigenschaften von Hap46, stand die detaillierte Charakterisierung des ungewöhnlichen DNA-Bindungsmotivs. Zur Identifizierung der Aminosäuren innerhalb dieses kurzen Sequenzabschnittes, die bei der Interaktion mit DNA beteiligt sind, wurden Gel-Retardationsanalysen mit Hap46-Mutanten durchgeführt. Um für die Analysen mit mutierten Hap-Proteinen geeignete Voraussetzungen zu schaffen, waren einige Optimierungen erforderlich.

Um die Mindestmenge an Wildtyp-Protein zu bestimmen, die für eine Komplexbildung mit DNA nötig ist, wurde eine konstante Menge an DNA - 3ng eines 235bp Fragmentes (20fmol) - mit steigenden Mengen von Hap46 inkubiert. Hierbei wurde festgestellt, daß ab einer Menge von $0,75\mu\text{g}$ (22pmol) (siehe Abb. 4.2.1) die Affinität zur DNA hoch genug ist, um an diese binden zu können. Wie schon zuvor von Y. Niyaz und Ph. Henrich beobachtet werden konnte [68, 38], stieg mit der Konzentration an Protein auch die Höhe der im Gel wandernden DNA-Protein Komplexe an, was darauf schließen läßt, daß mehrere Hap46-Moleküle gleichzeitig an ein DNA-Fragment binden können. Je länger also ein DNA-Molekül ist, desto mehr Protein kann an dieses binden [68]. Weitere Bindungsstudien mit steigenden Mengen an DNA, die jeweils mit Mengen von $0,5\mu\text{g}$ bis $2\mu\text{g}$ an Protein inkubiert wurden, zeigten, daß $2\mu\text{g}$ Hap46 ausreichend sind, um 200ng DNA fast vollständig zu komplexieren (siehe Abb. 4.2.2), was einem Verhältnis von 60pmol Protein zu 1,3pmol DNA entspricht. Aus vorherigen und den hier beschriebenen Titrierungsexperimenten wird deutlich, daß Proteinmengen von $0,75\mu\text{g}$ bis $1\mu\text{g}$ in einem kritischen Bereich für die Komplexbildung mit DNA liegen, wobei in diesem Grenzbereich höhere Mengen an DNA die Affinität vom Protein zur DNA zu erhöhen scheinen, was sich im Gel in einer gesteigerten Verschiebung der DNA-Protein-Komplexe nach oben äußert (siehe Abb. 4.2.2). Die DNA-Menge für Gel-Retardationsanalysen mit Hap46-DNA-Bindungsmutanten wurde daher auf 50ng festgelegt und Proteinmengen lagen deutlich über $2\mu\text{g}$, um so Qualitätsschwankungen der verschiedenen Proteinpräparationen auszugleichen. Frühere sowie die hier vorgestellten Daten deuten auf die Sequenz-unspezifische Bindung von

Hap46 an DNA hin. Die von Takahashi et al. gemachte Beobachtung einer spezifischen Bindung von Hap46 an einen Sequenzabschnitt des CMV-Promotors stand dazu jedoch im Widerspruch [102]. In Gel-Retardationsanalysen mit zwei Sets sich überlappender DNA-Fragmente des CMV-Promotors, konnte diese Behauptung widerlegt werden, vielmehr unterstützt das Ergebnis dieses Experimentes die Sequenz-Unabhängigkeit von Hap46 bei seiner Bindung an DNA, da alle Fragmente gleichermaßen von Hap46 gebunden wurden und im Gel die gleiche Höhe aufwiesen (siehe Abb. 4.2.3).

In vorherigen Analysen der DNA-Bindungsregion von Hap46 wurden die Aminosäuren des basischen Triplets von Lysinen (Aminosäuren 2 bis 4) oder Argininen (Aminosäuren 6 bis 8) gegen Alanin ausgetauscht. In beiden Fällen wurde die Fähigkeit von Hap46, an DNA zu binden, zerstört [126, 69, 68], was vermuten ließ, daß Aminosäuren innerhalb dieser beiden Triplets wesentlich zur DNA-Bindung beitragen. Keinen Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit zeigten Hap46 Varianten mit Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb dieser basischen Triplets und eine Variante mit Austausch eines Lysins (K³) des einen Blocks und eines Arginins (R⁸) des anderen Blocks. Beim Austausch zweier benachbarter basischer Aminosäuren gegen Alanin wurde die Interaktion mit der DNA völlig zerstört. Erstaunlicherweise konnten Hap46-Mutanten, bei welchen jeweils die beiden äußeren Aminosäuren eines basischen Triplets ausgetauscht und die mittlere erhalten wurde, an DNA binden (siehe Abb. 4.2.5). Für die Bindung an DNA sind also nicht alle drei Aminosäuren eines Triplets erforderlich, es genügt wenn eine Aminosäure innerhalb eines Triplets vorhanden ist. Dies muß dann aber die mittlere Aminosäure sein: das Lysin³ bzw. das Arginin⁷. Die Fähigkeit an DNA zu binden geht also nur verloren, wenn die mittlere Aminosäure eines Triplets zusammen mit einer oder beiden benachbarten Aminosäuren ausgetauscht wird. Die Bindung von Hap46 an DNA erweist sich somit als sehr flexibel. Diese Flexibilität kann dann zum Tragen kommen, wenn Hap46 außer mit DNA zusätzlich mit Proteinen interagiert, wie zum Beispiel bei der Hap46-vermittelten Transkriptionsstimulation. Hierbei kann das an DNA gebundene Hap46, mit hsc70 als Brückenprotein, Transkriptionsfaktoren und weitere Komponenten des Transkriptionsapparates in funktionelle Komplexe rekrutieren [32]. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die N-terminalen Aminosäuren von Hap46 für die Bindung an den Transkriptionsfaktor c-Jun wichtig sind und daß an DNA gebundenes Hap46 immer noch mit c-Jun interagieren kann (siehe Abb. 4.1.7 und 4.3.1). Manche der hier untersuchten Mutanten zeigten allerdings eine geringere Bandenverschiebung der DNA-Protein-Komplexe (siehe Abb. 4.2.5). Dies ist am ehesten damit zu erklären, daß weniger Protein an das DNA-Fragment gebunden hat, was aufgrund einer verminderten Affinität des mutierten Proteins zur DNA zustande kommen könnte. Die Mutation des mittleren Threonin⁵, wobei Threonin sowohl gegen Alanin als auch gegen Glutaminsäure ausgewechselt werden kann, zeigte keinen Verlust der DNA-Bindung. Somit wird hier die Interaktion mit der DNA durch eine Änderung der La-

dung nicht gestört. Die Interaktion von Hap46 wird auch durch die Insertion von einem bis zu drei Alaninen auf jeder Seite des Threonin⁵ nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 4.2.5). Schmidt et al. konnten ebenfalls die Beobachtung machen, daß der Abstand der beiden basischen Blöcke nicht von Bedeutung für die DNA-Bindung ist. Sie zeigten, daß zum einen Mutanten mit Insertion von einem Alanin bzw. zwei Alaninen zu einer Seite des Threonin⁵ oder mit Deletion des mittleren Threonins nicht zu einem Bindungsverlust von Hap46 und DNA führten [86].

Wie neuere Versuche zeigen, kann auch Hap50 mit DNA interagieren, was nicht überraschend ist, da diese Isoform die Sequenz der DNA-Bindungsdomäne von Hap46 beinhaltet. Den beiden kleineren Isoformen Hap33 und Hap29 fehlt diese Region, so daß sie daher nicht in der Lage sind mit DNA eine Bindung einzugehen. Bei Analysen mit auf Plastikträgern gebundenem Hap46 bzw. Hap50 Protein und anschließender Inkubation mit radioaktiv markierter DNA, konnte Ph. Henrich nachweisen, daß Hap50 48% der angebotenen DNA binden kann, Hap46 hingegen nur 15%. Dies entspricht einem Verhältnis von 32pmol Hap46 zu 3fmol DNA bzw. 26pmol Hap50 zu 9,7fmol DNA. In Übereinstimmung damit zeigten Retardations-Analysen in Agarosegelen mit Hap46 eine wesentlich geringere Retardierung der DNA als mit Hap50 [38]. Zudem konnte wie für Hap46 beobachtet werden, daß steigende Mengen an Hap50 eine höhere Retardierung einer konstanten Menge an DNA zur Folge haben [84]. Von Ph. Henrich und D. Scherer wurden die in Hap46 für die DNA-Bindung verantwortlichen basischen Triplets in Hap50 sowohl einzeln als auch zusammen gegen Alanin ausgetauscht. Anschließende Inkubation mit DNA zeigte, daß im Gegensatz zu Hap46, Hap50 immer noch in der Lage war, mit DNA zu interagieren [38, 84]. Somit muß es im aminoterminalen Bereich von Hap50 weitere Bereiche geben, die für eine Wechselwirkung mit DNA verantwortlich sind. Dies könnte auch eine Erklärung für die intensivere Bindung von Hap50 an DNA darstellen.

5.3 Interaktion von Hap46 und c-Jun

Da Hap46 ein DNA-bindendes Protein ist, wurde es schon früh mit der Transkription in Verbindung gebracht. Sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Versuchen konnte gezeigt werden, daß Hap46 Transkription stimulieren kann. Um zu überprüfen, ob die Transkriptionssteigerung von Hap46 über die Interaktion mit hsc70 vermittelt wird, wurde die Mutante Hap46 Δ C47, deren carboxyterminales Ende deletiert ist, eingesetzt. Diese Mutante kann nicht mehr mit hsc70 interagieren. Der stimulierende Effekt auf die Transkription war in der Tat minimiert, jedoch nicht ganz verschwunden, was vermuten ließ, daß Hap46 möglicherweise auch direkt mit Transkriptionsfaktoren interagieren kann. In Bindeexperimenten mit *in vitro* translatierten Transkriptionsfaktoren konnten das Homöobox-Protein Gax (Growth arrest homeobox protein) und c-Jun, aus der Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren, als direkte Bindungspartner

von Hap46 identifiziert werden [69]. Das Proto-Onkogen c-Jun kann als Homodimer oder als Heterodimer mit anderen Mitgliedern der AP-1 Familie, unter anderem c-fos, an spezifische Sequenzen der DNA binden, und so die Expression verschiedener Proteingene, wie zum Beispiel Kollagenase oder Cyclin D1, bewirken. Außerdem ist c-Jun bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Immunantwort, Apoptose, Streß oder Antwort auf genotoxische Reagenzien beteiligt [3]. Zur Klärung der Frage, inwieweit Hap46 aufgrund seiner Interaktion mit c-Jun regulierend in diese Prozesse eingreift, sollten im Rahmen dieser Arbeit die wichtigen Bindungsregionen beider Proteine identifiziert werden, um so einen besseren Einblick in mögliche funktionelle Eigenschaften der Hap46/c-Jun Interaktion zu erlangen.

In Elisa-Analysen mit gebundenem Hap46 bzw. Hap46-Mutanten und anschließender Inkubation mit c-Jun, konnte gezeigt werden, daß Aminosäuren des N-Terminus von Hap46 eine wichtige Rolle bei der Bindung an c-Jun spielen. Interessanterweise überlappt diese Region zum Teil mit der DNA-Bindungsregion von Hap46. Der Einzelaustausch von Aminosäuren innerhalb der ersten 10 Aminosäuren von Hap46, zeigte eine reduzierte Bindung der beiden Proteine. Der jeweilige Austausch der basischen Triplets, das heißt der Lysine an Position 2 bis 4 oder der Arginine an Position 6 bis 8, verminderte die Bindung nochmals. Bei Deletion der DNA-Bindungsregion (Aminosäuren 1 bis 10) wurde die Interaktion von Hap46 und c-Jun fast vollständig zerstört. Veränderung des Abstands der beiden basischen Triplets durch Insertion von Alaninen oder Austausch des mittleren Threonin⁵ zeigten, wie die Einzelaustausche von Aminosäuren innerhalb der basischen Triplets, nur eine leichte Reduktion der Bindung (siehe Abb. 4.3.1). Die Region der sauren Hexapeptid-Wiederholungen von Hap46 scheint für die Wechselwirkung mit c-Jun nicht von großer Bedeutung zu sein, da nach deren Deletion nur eine geringfügige Verminderung der Bindung festzustellen war (siehe Abb. 4.3.1). Die Ubiquitin-ähnliche Domäne oder die für die Bindung an hsc70 wichtigen C-terminal gelegenen Aminosäuren tragen ebenfalls zur Bindung an c-Jun bei, wenn auch nicht so stark wie Aminosäuren der DNA-Bindungsregion (siehe Abb. 4.3.1). Diese Daten deuten auf mehrere Kontaktstellen von c-Jun auf Hap46 hin. In Übereinstimmung damit konnte in Gel-Retardationsanalysen gezeigt werden, daß an DNA gebundenes Hap46 immer noch in der Lage ist, mit c-Jun zu interagieren. Diese Daten lassen vermuten, daß die N-terminalen Aminosäuren von Hap46 außer für die DNA-Bindung auch noch für Interaktionen mit anderen Molekülen von Bedeutung sind. Die Fähigkeit von Hap46, gleichzeitig mit DNA und c-Jun zu interagieren, könnte unter anderem auch auf der hohen Flexibilität der an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäuren von Hap46 beruhen (siehe Abschnitt 5.2.).

Da auch c-Jun ein DNA-bindendes Protein ist, stellte sich die Frage, ob Hap46 auch mit c-Jun interagieren kann, wenn c-Jun an DNA gebunden vorliegt. Um zu gewährleisten, daß Hap46 nicht selbst an das DNA-Fragment binden kann, wurde ein Oligonukleotid mit einer Länge von 20bp und einer AP-1 Erkennungssequenz verwendet. Eine solche Interaktion konnte unter die-

sen Versuchsbedingungen allerdings nicht nachgewiesen werden, da sich keine Unterschiede in der Höhe der komplexierten DNA in Ansätzen mit c-Jun alleine und in Ansätzen mit c-Jun und Hap46 ergaben. Ein interessanter Aspekt war jedoch, daß geringe Mengen an c-Jun, welche nicht in der Lage waren, das Oligonukleotid zu binden, in Gegenwart von Hap46 eine deutliche Interaktion mit diesem zeigten (siehe Abb. 4.3.3 und 4.3.4). Dieser noch ungeklärte Effekt, könnte aufgrund einer Stabilisierung von c-Jun Homodimeren durch Hap46 erfolgen, die dann effektiver an die DNA binden könnten. Im Hinblick darauf ist interessant, daß in manchen Brustkrebszell-Linien der AP-1 Komplex eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität, aber eine geringe Transaktivierungsaktivität aufweist. Das würde bedeuten, daß in diesen Brustkrebszell-Linien AP-1 Komplexe existieren, die an DNA binden aber keine Transkription aktivieren können [15].

Die für die Funktionalität wichtigen Bereiche von c-Jun teilen sich in zwei Abschnitte. Im aminoterminalen Abschnitt befindet sich die Transaktivierungsdomäne mit der Bindungsstelle für die Jun-N-terminale Kinase (JNK), die sogenannte δ -Domäne, und mit den beiden Serinen an Position 63 und 73, welche durch JNK phosphoryliert werden. Im carboxyterminalen Teil liegt die DNA-Bindungsregion und der Leuzin-Zipper, welcher für die Dimerisierung mit weiteren Mitgliedern der AP-1 Familie verantwortlich ist. Bei Phosphorylierung des Serins⁶³ und Serins⁷³ durch JNK wird die Transaktivierungsaktivität von c-Jun stimuliert. Das zu c-Jun virale Homolog, v-Jun, besitzt keine δ -Domäne. Somit kann JNK nicht binden und v-Jun nicht phosphorylieren. Dennoch ist v-Jun konstitutiv aktiv. Die Bindung von inaktivem JNK an die δ -Domäne von c-Jun stellt einen Mechanismus dar, die Funktion von c-Jun als Transkriptionsfaktor zu hemmen. Sobald JNK aktiviert wird, phosphoryliert es c-Jun und dissoziiert. Da in v-Jun die δ -Domäne deletiert ist, kann inaktives JNK nicht binden. So umgeht v-Jun die Regulation durch JNK, das heißt v-Jun wird nicht phosphoryliert, ist aber dauerhaft transkriptionell aktiv [8, 93, 22, 115]. Die in dieser Arbeit identifizierten Kontaktstellen von Hap46 auf c-Jun umfassen die δ -Domäne, die DNA-Bindungsregion und den Leuzin-Zipper (siehe Abb. 4.3.6). Mit rekombinanten GST-Fusionsproteinen von Jun-Varianten konnte gezeigt werden, daß Hap46 in der Lage war, mit einem C-terminal verkürzten c-Jun Protein, welches die δ -Domäne beinhaltet, zu interagieren. Wohingegen ein C-terminal verkürztes v-Jun Protein nicht mehr gebunden werden konnte (siehe Abb. 4.3.8). So scheint diese Region zumindest im aminoterminalen Bereich von c-Jun eine große Rolle bei der Bindung an Hap46 zu spielen. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen konnte Hap46 sowohl in Pull-down als auch in Elisa-Analysen an eine Jun-Variante binden, die die DNA-Bindungsregion und den Leuzin-Zipper enthielt, jedoch aminoterminal verkürzt war. Jun-Variante c-Jun 1-166 konnte auf einem Plastikträger immobilisiert allerdings nicht mit Hap46 interagieren (siehe Abb. 4.3.9). Wie jedoch in den Pull-down-Versuchen zu sehen war, konnte hier die Jun-Variante c-Jun 1-166 im Vergleich zu c-Jun Δ N223 ebenfalls schlechter von Hap46 gebunden werden (siehe Abb. 4.3.8). Das läßt

vermuten, daß Hap46 für eine effiziente Bindung an c-Jun Aminosäuren des carboxyterminalen Bereichs von c-Jun benötigt. Im Falle von hTAFII55, einem Koaktivator der Transkription, welcher mit Transkriptionsfaktoren der unterschiedlichsten Klassen interagiert, konnte gezeigt werden, daß für die Bindung an die DNA-Bindungsdomäne von c-Jun dessen Leuzin-Zipper notwendig ist. Die Deletion dieses Bereichs des c-Jun Proteins führt zu einem Verlust der Interaktion [65]. Unter anderem konnte auch für das Adenovirus Typ 12 E1A 52R Protein eine Interaktion mit dem Leuzin Zipper von c-Jun belegt werden. Dabei inhibiert es dessen Transaktivierungsfunktion, indem es die Phosphorylierung durch JNK verhindert [12].

Um die Bindung von Hap46 an die δ -Domäne von c-Jun näher zu beleuchten, wurden einzelne Aminosäuren innerhalb der JNK-Bindestelle für Mutationsanalysen ausgewählt. Dazu wurden membrangebundene Peptide der δ -Domäne, welche die jeweiligen Mutationen enthielten, mit rekombinantem Hap46 inkubiert (siehe Abb. 4.3.10). Die in Abbildung 5.3.1 in Spur 1 rot markierten Aminosäuren der δ -Domäne von c-Jun sind für die Interaktion mit Hap46 notwendig. Wird jeweils nur eines der im aminoterminalen Bereich gelegenen Lysine (Lys³² und Lys³⁵) ausgetauscht, so kann jeweils das andere noch mit Hap46 interagieren. Ähnlich verhält es sich mit Lysin⁵⁰, Arginin⁵⁴ und Lysin⁵⁶, die im carboxyterminalen Bereich der δ -Domäne liegen. So kann das Lysin an Position 50 sowohl die Mutation des Arginin⁵⁴ als auch des Lysin⁵⁶ kompensieren. Ebenso können das Arginin⁵⁴ und das Lysin⁵⁶ die Mutation des Lysin⁵⁰ kompensieren. Werden alle diese fünf Aminosäuren mutiert, kann Hap46 nicht mehr binden (siehe Abb. 4.3.10). Daraus läßt sich schließen, daß diese Aminosäuren der δ -Domäne von c-Jun für die Bindung an Hap46 von großer Bedeutung sind. Vergleicht man diese mit den Aminosäuren, welche bei der Interaktion mit der Jun-N-terminalen Kinase eine Rolle spielen, so läßt sich feststellen, daß Hap46 und JNK zum Teil die selben Aminosäuren für die Interaktion mit der δ -Domäne von c-Jun verwenden, wie in Abbildung 5.3.1 dargestellt ist. So sind innerhalb der δ -Domäne die Lysine an Position 32, 35 und 50 sowohl bei der Interaktion mit JNK als auch mit Hap46 beteiligt.

Da die Bindungsregionen von Hap46 und JNK sich überschneiden, lag es nahe zu überprüfen, ob Hap46 einen Einfluß auf die JNK-abhängige Phosphorylierung von c-Jun hat. Für eine effiziente Phosphorylierung der Serine an den Positionen 63 und 73 durch die aktivierte Jun-N-terminale Kinase, ist dessen Bindung an die δ -Domäne ausschlaggebend, daher sollte überprüft werden, ob Hap46 hierbei interveniert. In *in vitro* Versuchen zur JNK-abhängigen Phosphorylierung von c-Jun konnte allerdings kein Einfluß von Hap46 auf die Phosphorylierung von c-Jun festgestellt werden, weder mit einem C-terminal verkürzten c-Jun Protein (GST-c-Jun 1-166) noch mit c-Jun voller Länge (siehe Abb. 4.3.11 und 4.3.12), woraus sich schließen läßt, daß Hap46 unter *in vitro* Bedingungen nicht mit JNK um die Bindung an die δ -Domäne von c-Jun in

δ -Domäne von c-Jun

	31	41	51	60 AS
Spur 1	PKILKQSM	TLNLADPVGSL	KPHLR	AKNSDL
Spur 2	PKILKQSM	TLNLADPVGSL	KPHLR	AKNSDL
Spur 3	PKILKQSM	TLNLADPVGSL	KPHLR	AKNSDL

ABBILDUNG 5.3.1. Aminosäuresequenz der δ -Domäne von c-Jun: Spur 1 zeigt die in dieser Arbeit identifizierten Aminosäuren (rot), die für die Bindung mit Hap46 essentiell sind. Spuren 2 und 3 zeigen Ergebnisse von Sprowles et al. In Spur 2 sind die Aminosäuren (grün), die bei der Bindung der Jun-N-terminalen Kinase beteiligt sind dargestellt. Bei Mutation der in Spur 3 lila markierten Aminosäuren, konnte eine reduzierte Bindung mit JNK gezeigt werden, aber kein erhöhtes Transformationspotential von c-Jun. Wurden die gelb markierten Aminosäuren mutiert, so zeigte sich ein leichter bis kein Effekt auf die JNK Bindung, jedoch zeigten diese Mutanten ein erhöhtes Transformationspotential. [100]

Kompetition tritt und dessen Funktion als Kinase inhibiert oder stimuliert. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß Hap46 in der lebenden Zelle die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK beeinflussen kann, da möglicherweise weitere zelluläre Faktoren notwendig sind, um über die Hap-Bindung eine Stimulierung oder Inhibierung der JNK-abhängigen Phosphorylierung von c-Jun zu bewirken. Wie eben erwähnt, ist die Bindung von JNK an die δ -Domäne von c-Jun wichtig für dessen Phosphorylierung und somit für dessen transkriptionelle Aktivität. V-Jun umgeht die Regulation durch JNK, das heißt es wird nicht phosphoryliert ist aber dauerhaft transkriptionell aktiv. So könnte der onkogene Effekt der δ -Domäne auf der Entkopplung des v-Jun von der JNK-abhängigen Phosphorylierung beruhen. Daher führen Mutationen innerhalb der δ -Domäne des c-Jun, die die Bindung von JNK maßgeblich beeinflussen, zu einer Entkopplung der Regulation von c-Jun durch JNK. Dies könnte, wie bisher vermutet, zu einer erhöhten Onkogenität (Transformationspotential) von c-Jun führen [115, 100]. Sprowles et al. konnten allerdings zeigen, daß zum einen Mutanten, die mit einem Verlust der JNK Bindung einhergingen, trotzdem kein erhöhtes Transformationspotential aufwiesen, und zum anderen Mutanten mit leichtem oder keinem Bindungsverlust von JNK, eine gesteigerte Transformationsaktivität zeigten (siehe Abb. 5.3.1). Interessant sind hierbei c-Jun Mutanten mit Austausch der Aminosäure Arginin⁵⁴ oder Lysin⁵⁶. Diese Mutanten zeigten eine normale Bindung von JNK und Phosphorylierung, aber eine gesteigerte Transformationsaktivität [100]. Im Hinblick darauf, daß die beiden Aminosäuren Arginin⁵⁴ und Lysin⁵⁶ jedoch für die Bindung von Hap46 notwendig sind, ist interessant, daß Sprowles et al. davon ausgehen, daß die Entkopplung der c-Jun Regulation durch JNK nicht den onkogenen Effekt der δ -Domäne erklärt, sondern vielmehr ein noch nicht identifizierter Regulator der Transformations-Aktivität von c-Jun existiert [100]. Möglicherweise spielt hierbei Hap46 als Regulator der Transformations-Aktivität eine Rolle. Interessant wäre auch zu wissen ob Hap46 an die aminoternale Transaktivierungs-

domäne des BRCA2 Proteins binden kann. Diese besitzt Ähnlichkeiten mit der Sequenz der δ -Domäne von c-Jun. Diese Domäne weist in vielen Brustkrebs-Familien Deletionen im Leseraster und eine Neigung zu Mutationen auf. Das Protein BRCA2 ist beteiligt bei der DNA-Reperatur und bei der Regulation der Transkription [61].

Da Hap46 in *in vitro* Phosphorylierungsversuchen keinen Einfluß auf die JNK-abhängige Phosphorylierung von c-Jun zeigte, stellte sich die Frage, ob Hap46 *in vivo* einen Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität des Proto-Onkogens c-Jun besitzt. Reporter-Gen-Analysen in F9 embryonalen Carcinomazellen, die mit Expressionskonstrukten für die Firely-Luciferase unter der Kontrolle des Kollagenase Promotors, c-Jun und Hap46, beide unter der Kontrolle des Rous-Sarcoma-Virus (RSV) Promotors, transfiziert wurden, ergaben erste Hinweise eine mögliche Kontrolle der c-Jun abhängigen Transkription durch Hap46 (siehe Abb. 4.3.13). Dennoch sind diese Daten als vorläufig anzusehen, da große Schwankungen der Werte auftraten. Zudem gab es Probleme Hap46 in den Lysaten transfizierter Zellen nachzuweisen. In aktuellen Versuchen von M. Engelhardt in HeK-Zellen, einer Nierentumorzell-Linie, die ebenfalls kaum c-Jun bzw. Hap46 exprimiert, ist es gelungen, nach Transfektion von Expressionskonstrukten sowohl c-Jun als auch Hap46 immunologisch nachzuweisen. Außerdem deutet eine Reduktion der transkriptionellen Aktivität von c-Jun um circa 50%, nach Überexpression von Hap46, auf dessen inhibitorische Funktion hin (persönl. Kommunikation M. Engelhardt). Hap46 verbleibt unter normalen Bedingungen im Cytoplasma und wird erst nach Hitzeschock in den Kern transloziert. Da die Aktivität von c-Jun unter Bedingungen ohne Hitzeschock durch Hap46 inhibiert wurde, würde das bedeuten, daß dies im Cytoplasma stattfindet. Es wäre denkbar, daß Hap46 cytosolisches c-Jun daran hindert in den Kern zu gelangen um dort transkriptionell aktiv zu werden. Da die transkriptionsaktivierende Phosphorylierung von c-Jun durch JNK im Kern stattfindet [23], ist es nicht wahrscheinlich, daß cytoplasmatisches Hap46 direkt auf die Phosphorylierung einwirkt. Dies würde in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Phosphorylierungsversuchen stehen, bei denen keine Beteiligung von Hap46 bei der JNK-abhängigen Phosphorylierung von c-Jun festgestellt werden konnte. In der Brustkrebszell-Linie MCF-7 konnte eine verminderte Aktivität von c-Jun nachgewiesen werden [94]. Hap46 ist in vielen Tumoren der Brust überexprimiert [19], daher wäre es denkbar, daß cytoplasmatisches Hap46 daran beteiligt ist die transkriptionelle Aktivität von c-Jun zu inhibieren. Eine Überexpression von Jun in diesen MCF-7 Zellen führte zu Veränderungen, die das typische klinische Bild von Brustkrebszellen zeigten [94]. Dies ist interessant im Hinblick darauf, daß für manche Patienten mit Brusttumoren mit einer hohen cytoplasmatischen Hap-Konzentration ein längeres Langzeitüberleben berichtet wurde [113]. Eine Frage die sich stellt ist, ob cytoplasmatisches und nukleäres Hap46 unterschiedliche Funktionen in Bezug auf c-Jun haben. So könnte cytoplasmatisches Hap46 die c-Jun abhängige Transkription beeinflus-

sen wohingegen nukleäres Hap46 bei der Regulation des Transformationspotentials von c-Jun beteiligt sein könnte.

A

Abkürzungsliste

APS	Amoniumpersulfat	M	molar
ATP	Adenosin-Triphosphat	Min	Minute
bp	Basenpaare	mg	Milligramm
°C	Grad Celsius	$MgCl_2$	Magensiumchlorid
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure	$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat	ml	Milliliter
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat	mM	millimolar
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat	Mol	Mol (Mengenangabe)
DMF	Dimethyl-Formamid	mmol	Millimol
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid	μg	Mikrogramm
DNA	Desoxyribonukleinsäure	μl	Mikroliter
dNTP	2'-Desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat	NaCl	Natriumchlorid
DTT	Dithiothreitol	ng	Nanogramm
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat	NMP	1-Methyl-2-Pyrrolidon
ECL	Enhanced Chemoluminescence	pmol	Pikomol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	OD	optische Dichte
EtOH	Ethanol	PBS	Phosphate buffered Saline
g	Gramm	pg	Pikogramm
GST	Gluthation-S-Transferase	RT	Raumtemperatur
h	Stunde	TFA	Tri-Fluor-Essigsäure
HCl	Salzsäure	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
HepBS	Hepes buffered Saline		
H_2O_2	Wasserstoffperoxid		
H_2SO_4	Schwefelsäure		
IPTG	Inosyl-Pyrano-Galaktosid		
kb	Kilo-Basen		
kD	Kilo-Dalton		
KCl	Kaliumchlorid		
l	Liter		

B

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in *Nucleic Acid Research* veröffentlicht.

Y. Niyaz, I. Frenz, G. Petersen und U. Gehring (2003) Transcriptional stimulation by the DNA binding protein Hap46/BAG-1M involves hsp70/hsc70 molecular chaperones. *Nuc. Acid Res.* 31, 2209-2216

C

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Gabriele Petersen für die herzliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe. Sie war eine hervorragende Betreuerin, die mich in jeder Phase meiner Promotion sowohl fachlich als auch menschlich unermüdlich unterstützt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Angel möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Darüberhinaus danke ich Ihm für seine Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung von c-Jun Expressionskonstrukten und von F9-Zellen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Gehring möchte ich danken, daß er trotz seiner Pensionierung Zeit gefunden hat unsere Diskussionsrunden mit konstruktiven Vorschlägen und mit seinem Witz zu bereichern.

Meinen ehemaligen Kollegen und jetzigen Freunden Rabea, Phillip und Dominique möchte ich für die schöne Zeit im Labor danken.

Herrn Dr. Yilmaz Niyaz möchte ich danken, daß er mir in den ersten beiden Jahren meiner Doktorarbeit mit seiner Hilfsbereitschaft stets zur Seite stand.

Frau Dr. Pamela Okun möchte ich danken, daß sie immer Zeit gefunden hat Fragen zu beantworten und im Labor hilfreich zur Seite zu stehen.

Der gesamten Arbeitsgruppe Molekulare Evolution und Genomik möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft danken. Ich habe mich sehr wohl gefühlt.

Alan Pater möchte für die Bereitstellung des Antikörpers CC9E8 danken.

Literatur

- [1] S. Alberti, C. Esser, and J. Höhfeld. Bag-1 - a nucleotide exchange factor of hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress & Chaperones*, 8:225–231, 2003.
- [2] P. Angel, I. Baumann, B. Stein, H. Delius, H. Rahmsdorf, and P. Herrlich. 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the flanking region. *Mol. Cell. Biol.*, 7:2256–2266, 1987.
- [3] P. Angel and M. Karin. The role of jun, fos and the ap-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem. Biophys.*, 1072:129–157, 1991.
- [4] N. Arhel, G. Packham, P. Townsend, T. Collard, A. H-Zadeh, A. Sharp, R. Cutress, K. Malik, A. Hague, C. Paraskeva, and C. Williams. The retinoblastoma protein interacts with bag-1 in human colonic adenoma and carcinoma derived cell lines. *Int. J. Cancer*, 106:364–371, 2002.
- [5] A. Bardelli, P. Longati, D. Albero, S. Goruppi, C. Schneider, C. Ponzetto, and P. Comoglio. Hgf receptor associates with the anti-apoptotic protein bag-1 and prevents cell death. *EMBO Journal*, 15:6205–6212, 1996.
- [6] H. Beere and D. Green. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 11:6–10, 2001.
- [7] D. Bimston, J. Song, D. Winchester, S. Takayama, J. Reed, and R. Morimoto. Bag-1, a negative regulator of hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. *The EMBO Journal*, 17:6871–6878, 1998.
- [8] B. Binetruy, T. Smeal, and M. Karin. Ha-ras augments c-jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain. *Nature*, 351:122–127, 1991.
- [9] K. Briknarova, S. Takayama, L. Brive, M. L. Havert, D. Knee, J. Velasco, S. Homma, E. Cabezas, J. Stuart, D. Hoyt, A. Satterthwait, M. Llinas, J. Reed, and K. Ely. Structural analysis of bag1 cochaperone and its interactions with hsc70 heat shock protein. *Nature structural biology*, 8(4):349–352, 2001.
- [10] M. Brimmell, J. Burns, P. Munson, L. McDonald, M. O'Hare, S. Lakhani, and G. Packham. High level expression of differently localized bag-1 isoforms in some oestrogen receptor-positive human breast cancers. *British Journal of Cancer*, 81(5):1042–1051, 1999.
- [11] L. Brive, S. Takayama, K. Briknarova, S. Homma, S. Ishida, J. reed, and K. Ely. The carboxyl-terminal lobe of hsc70 atpase domain is sufficient for binding to bag1. *BBRC*, 289:1099–1105, 2001.
- [12] D. Brockmann, C. Bury, G. Kröner, H.-C. Kirch, and H. Esche. Repression of the c-jun trans-activation function by the adenovirus type 12 e1a 52r protein correlates with the inhibition of phosphorylation of the c-jun activation domain. *J. Biol. Chem.*, 270:10754–10763, 1995.
- [13] B. Bukau and A. Horwich. The hsp70 and hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92:351–366, 1998.
- [14] A. Cato and S. Mink. Bag-1 family of cochaperones in the modulation of nuclear receptor action. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 78:379–388, 2001.
- [15] T. Chen, L. Smith, D. Gebhardt, M. Birrer, and P. Brown. Activation and inhibition of the ap-1 complex in human breast cancer cells. *Mol. Carcinog.*, 15:215–226, 1996.
- [16] C. Clevenger, K. Thickman, W. Ngo, W. Chang, S. Takayama, and J. Reed. Role of bag-1 in the survival and proliferation of the cytokine-dependent lymphocyte lines, ba/f3 and nb2. *Mol. Endocrinol.*, 11:608 – 618, 1997.
- [17] M. Coldwell, M. deSchoolmeester, G. Fraser, B.M., G. Packham, and A. Willis. The p36 isoform of bag-1 is translated by internal ribosome entry following heat shock. *Oncogene*, 20(30):4095–100, 2001.
- [18] A. Crocoll, M. Blum, and A. Cato. Isoform-specific expression of BAG-1 in mouse development. *Mech. Dev.*, 91:355 – 359, 2000.

- [19] R. Cutress, P. Townsend, M. Brimmell, A. Bateman, A. Hague, and G. Packham. Bag-1 expression and function in human cancer. *British Journal of Cancer*, 87:834–839, 2002.
- [20] R. Cutress, P. Townsend, A. Sharp, A. Maison, L. Wood, R. Lee, M. Brimmell, M. Mullee, P. Johnson, G. Royle, A. Bateman, and G. Packham. The nuclear bag-1 isoform, bag-1l, enhances oestrogen-dependent transcription. *Oncogene*, 7:4973–4982, 2003.
- [21] J. Demand, S. Alberti, C. Patterson, and J. Höhfeld. Cooperation of ubiquitin domain protein and e3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr. Biol.*, 11:1569 – 1577, 2001.
- [22] B. Derijard, M. Hibi, I. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin, and R. Davis. Jnk1: a protein kinase stimulated by uv-light and ha-ras that binds and phosphorylates the c-jun activation domain. *Cell*, 76:1025–1037, 1994.
- [23] M. Dickens, J. Rogers, J. Cavanagh, A. Raitano, Z. Xia, J. Halpern, M. Greenberg, C. Sawyers, and R. Davis. A cytoplasmic inhibitor of the jnk signal transduction pathway. *Science*, 277:693–696, 1997.
- [24] S. Duguez, M.-C. L. Bihan, D. Gouttefangeas, L. Feasson, and D. Freyssenet. Myogenic and nonmyogenic cells differentially express proteinases, hsc/hsp70, and bag-1 during skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 285:206–215, 2003.
- [25] R. Ellis and F. Hartl. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9:102–110, 1999.
- [26] K. Flatherty, C. DeLuca-Flatherty, and D. McKay. Three-dimensional structure of the atpase fragment of a 70 kda heat-shock cognate protein. *Nature*, 346:623–628, 1990.
- [27] I. Frenz. *Das hsc70/hsp70 assoziierende Protein Hap46 - ein vielseitiges Protein*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2005.
- [28] B. Froesch, S. Takayama, and J. Reed. Bag-1l protein enhances androgen receptor function. *J. Biol. Chem.*, 273:11660–11666, 1998.
- [29] C. Gaessler, T. Wiederkehr, D. Brehmer, B. Bukau, and M. Mayer. Bag-1m accelerates nucleotide release for human hsc70 and hsp70 and can act concentration dependent as positive or negative cofactor. *J. Biol. Chem.*, 276:32538–32544, 2001.
- [30] M. Gebauer, M. Zeiner, and U. Gehring. Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. *FEBS Lett.*, 417:109–113, 1997.
- [31] M. Gebauer, M. Zeiner, and U. Gehring. Interference between proteins hap46 and hop-p60, which bind to different domains of the molecular chaperone hsp70/hsc70. *Mol. Cell Biol.*, 18:6238–6244, 1998.
- [32] U. Gehring. Biological activities of hap46/bag-1. *EMBO reports*, 5:148–153, 2004.
- [33] M. Guzey, S. Takayama, and J. Reed. Bag1l enhances trans-activation function of the vitamin d receptor. *J. Biol. Chem.*, 275:40749–40756, 2000.
- [34] A. Hague, G. Packham, S. Huntley, K. Shefford, and J. Eveson. Deregulated bag-1 proteinexpression in human oral squamous cell carcinoma and lymph node metastases. *J. Pathol.*, 197:60–71, 2002.
- [35] T. Hai and T. Curran. Cross-family dimerization of transcription factors fos/jun and atf/creb alters dna binding specificity. *PNAS USA*, 88:3720–3724, 1991.
- [36] B. Han and J. Zhang. Regulation of gene expression by internal ribosome entry sites or cryptic promoters: the eif4g story. *MCB*, 22:7372–7384, 2002.
- [37] C. J. Harrison, M. Hayer-Hartl, M. di Liberto, F.-U. Hartl, and J. Kuriyan. Crystal structure of the nucleotide exchange factor grpe bound to the atpase domain of the molecular chaperone dnak. *Science*, 276:431–435, 1997.
- [38] P. Henrich. Herstellung und funktionelle charakterisierung des hsc/hsp70 assoziierenden proteins hap50. Master's thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2004.
- [39] J. Höhfeld and S. Jentsch. Grpe-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein bag-1. *EMBO J.*, 16:6209–6216, 1997.
- [40] J. Höhfeld, Y. Minami, and F.-U. Hartl. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic hsc70/hsp40 reaction cycle. *Cell*, 83:589–598, 1995.

- [41] J. Hung, R. Roberson, J. Taft, and D. Wu. Human bag-1 proteins bind to the cellular stress response protein gadd34 and interfere with gadd34 functions. *Mol. Cell. Biol.*, 23:3477–3486, 2003.
- [42] M. Jäättelä, D. Wissing, K. Kokholm, T. Kallunki, and M. Egeblad. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.*, 17:6124–6134, 1998.
- [43] S. Jeay, G. Sonenshain, M. Postel-Vinay, and E. Baixeras. Growth hormone prevents apoptosis through activation of nuclear factor-kappaB in interleukin-3-dependent ba/f3 cell line. *Mol. Endocrinol.*, 14:650 – 661, 2000.
- [44] C. Jolly and R. Morimoto. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. National Cancer Inst.*, 92:1564–1572, 2000.
- [45] K. Kanelakis, Y. Morishima, K. Dittmar, M. Galigniana, S. Takayama, J. Reed, and W. Pratt. Differential effects of the hsp70-binding protein bag-1 on glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery. *J. Biol. Chem.*, 274:34134–34140, 1999.
- [46] P. Kermer, M. Krajewska, J. Zapata, S. Takayama, J. Mai, S. Krajewski, and J. Reed. Bag-1 is a regulator and marker of neuronal differentiation. *Cell Death Differ.*, 9:405–413, 2002.
- [47] R. Kikuchi, T. Noguchi, S. Takeno, Y. Funada, H. Moriyama, and Y. Uchida. Nuclear bag-1 expression reflects malignant potential in colorectal carcinomas. *Br. J. Cancer*, 87:1136–1139, 2002.
- [48] F. King, A. Wawrzynow, J. Höhfeld, and M. Zylicz. Co-chaperones bag-1, hop and hsp40 regulate hsc70 and hsp90 interactions with wild-type. *The EMBO Journal*, 20(22):6297–6305, 2001.
- [49] S. Kitada, J. Zapata, M. Andreeff, and J. Reed. Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in b-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 96:393–397, 2000.
- [50] D. Knee, B. Froesch, U. Nuber, S. Takayama, and J. Reed. Structure-function analysis of bag1 proteins: Effects on androgen receptor transcriptional activity. *J. Biol. Chem.*, 276:12718–12724, 2001.
- [51] M. Kullmann, J. Schneikert, J. Moll, S. Heck, M. Zeiner, U. Gehring, and A. Cato. Rap46 is a negative regulator of glucocorticoid receptor action and hormone-induced apoptosis. *JBC*, 273:14620 – 14625, 1998.
- [52] W. Lee, P. Mitchell, and R. Tijan. Purified transcription factor ap-1 interacts with tpa-inducible enhancer elements. *Cell*, 49:368–372, 1987.
- [53] J. Lin, L. Hutchinson, S. Gaston, G. Raab, and M. Freeman. Bag-1 is a novel cytoplasmic binding partner of the membrane form of heparin-binding egf-like growth factor: unique role for prohb-egf in cell survival regulation. *J. Biol. Chem.*, 276:30127–30132, 2001.
- [54] R. Liu, S. Takayama, Y. Zheng, B. Froesch, G. Chen, X. Zhang, J. Reed, and X. Zhang. Interaction of bag-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(27):16985–16992, 1998.
- [55] J. Lüders, J. Demand, and J. Höhfeld. The ubiquitin-related bag-1 provides a link between the molecular chaperones hsc70/hsp70 and the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7):4613–4617, 2000.
- [56] Y. Maki, T. Bos, C. Davis, M. Starbuck, and P. Bogt. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *PNAS USA*, 84:2848–2852, 1987.
- [57] M. Matsuzawa, S. Takayama, B. Froesch, J. Zapata, and J. Reed. p53-inducible human homologue of drosophila seven in absentia (siah) inhibits cell growth: suppression by bag-1. *EMBO J.*, 17:2736–2747, 1998.
- [58] M. Mayer, D. Brehmer, C. Gässler, and B. Bukau. Hsp70 chaperone machines. *Adv. Protein Chem.*, 59:1–44, 2001.
- [59] M. Mayer and B. Bukau. hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol. Chem.*, 379:261–268, 1998.
- [60] J. McCarty, A. Buchberger, J. Reinstein, and B. Bukau. The role of atp in the functional cycle of the dnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.*, 249:126–137, 1995.
- [61] J. Milner, F. Fuks, L. Hughes-Davies, and T. Kouzarides. The brca2 activation domain associates with and is phosphorylated by cellular protein kinase. *Oncogene*, 19:4441–4445, 2000.

- [62] Y. Minami, J. Höhfeld, K. Ohtsuka, and F. Hartl. Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian dnaJ homolog, hsp40. *The Journal of biological Chemistry*, 271(32):19617–19624, 1996.
- [63] T. Moriyama, R. Littell, R. Debernardo, E. Oliva, M. Lynch, B. Rueda, and L. Duska. Bag-1 expression in normal and neoplastic endometrium. *Gynecol Oncol.*, 94(2):289–95, 2004.
- [64] D. Mosser, A. Caron, L. Bourget, A. Meriin, M. Sherman, R. Mori, and B. Massie. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 20:7146–7159, 2000.
- [65] C.-L. Munz. *Molekulare Mechanismen der Transkriptionellen Aktivierung durch die Transkriptionsfaktoren c-Jun und v-Jun*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2000.
- [66] P. Murphy, M. Limoges, F. Dodd, R. Boudreau, and C. Too. Fibroblast growth factor-2 stimulates endothelial nitric oxide synthase expression and inhibits apoptosis by a nitric oxide-dependent pathway in nb2 lymphoma cells. *Endocrinology*, 142:81–88, 2001.
- [67] Y. Naishiro, M. Adachi, H. Okuda, A. Yawata, T. Mitaka, S. Takayama, J. Reed, Y. Hinoda, and K. Imai. Bag-1 accelerates cell motility of human gastric cancer cells. *Oncogene*, 18:3244–3251, 1999.
- [68] Y. Niyaz. *Funktionelle Charakterisierung des humanen Hsc70/Hsp70-assoziiierenden Protein Hap46 und seiner Isoform Hap50*. PhD thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2003.
- [69] Y. Niyaz, I. Frenz, G. Petersen, and U. Gehring. Transcriptional stimulation by the dna binding protein hap46/bag-1m involves hsp70/hsc70 molecular chaperones. *Nucleic Acids Research*, 31(8):1–8, 2003.
- [70] Y. Niyaz, M. Zeiner, and U. Gehring. Transcriptional activation by the human hsp70-associating protein hap50. *J. Cell Sci.*, 114:1839–1845, 2001.
- [71] T. Noguchi, S. Takeno, T. Shibata, S. Fumoto, Y. Uchida, S. Yokoyama, H. Gabbert, and W. Muller. Nuclear bag-1 expression is a biomarker of poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis. Esophagus.*, 16:107–111, 2003.
- [72] E. Nollen, J. Brunsting, J. Song, H. Kampinga, and R. Morimoto. Bag1 functions in vivo as a negative regulator of hsp70 chaperone activity. *Molecular and Cellular Biology*, 20:1083–1088, 2000.
- [73] J. Osipiuk, M. Walsh, B. Freeman, R. Morimoto, and A. Joachimiak. Structure of a new crystal form of human hsp70 atpase domain. *Biological Crystallography*, D55:1105–1107, 1999.
- [74] G. Packham, M. Brimmell, J. Cleveland, and J. Zapata. Mammalian cells express two differently localized bag-1 isoforms-generated by alternative translation initiation. *Biochem. J.*, 328:807–813, 1997.
- [75] T. Peng, T. Sadusky, Y. Li, G. Coulton, H. Zhang, and L. Archard. Altered expression of bag-1 in coxsackivirus b3 infected mouse heart. *Cardiovasc.Res.*, 50:46–55, 2001.
- [76] G. Petersen, C. Hahn, and U. Gehring. Dissection of the atp-binding domain of the chaperone hsc70 for interaction with the cofactor hap46. *Journal of Biological Chemistry*, 276:10178–10184, 2001.
- [77] B. Pickering, S. Mitchell, J. Evans, and A. Willis. Polypyrimidine tract binding protein and poly r(c) binding protein 1 interact with the bag-1 ires and stimulate its activity in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Research*, 31(2):639–646, 2003.
- [78] B. Pulverer, J. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J. Woodgett. Phosphorylation of c-jun mediated by map kinases. *Nature*, 353:670–674, 1991.
- [79] D. Rayens and J. V. Guerriero. Inhibition of hsp70 atpase activity and protein renaturation by a novel hsp70-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 273:32883–32888, 1998.
- [80] S. Rorke, S. Murphy, M. Khalifa, G. Chernenko, and S. Tang. Prognostic significance of bag-1 expression in nonsmall cell lung cancer. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*, 95:317–322, 2001.
- [81] K. Saito, T. Kikuchi, and M. Yoshida. The mechanism of sequence non-specific dna binding of hmg1/2-box b in hmg1 with dna. *Protein Engeneering*, 12:235–242, 1999.
- [82] B. Sawitzki, M. Lehmann, K. Vogt, K. Risch, J. Brock, J. Kupiec-Weglinski, and H. Volk. Bag-1 up-regulation in anti-cd4 mab treated allo-activated t cells confers resistance to apoptosis. *European Journal of immunology*, 32:800–809, 2002.
- [83] G. Schatz and B. Dobberstein. Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 271:1519–1526, 1996.

- [84] D. Scherer. Hsp50. Master's thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2005.
- [85] D. Schmid, A. Baici, H. Gehring, and P. Christen. Kinetics of molecular chaperone action. *Science*, 263:971–973, 1994.
- [86] U. Schmidt, G. Wochnik, M. Rosenhagen, J. Young, F. Hartl, F. Holsboer, and T. Rein. Essential role of the unusual binding motif of bag-1 for inhibition of the glucocorticoid receptor. *JBC*, 2002.
- [87] J. Schneikert, S. Hubner, G. Langer, T. Petri, M. Jäättelä, J. Reed, and A. Cato. Hsp70-rap46 interaction in downregulation of dna binding by glucocorticoid receptor. *EMBO J.*, 146:924 – 940, 2000.
- [88] J. Schneikert, S. Hubner, E. Martin, and A. Cato. A nuclear action of the eukaryotic cochaperone rap46 in downregulation of the glucocorticoid receptor activity. *J. Cell Biol.*, 146:929–940, 1999.
- [89] K. Schorr, M. Li, and S. Krajewski. The bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 4:153–164, 1999.
- [90] M. Sekiya, M. Adachi, S. Takayama, J. Reed, and K. Imai. Ifn- γ upregulates anti-apoptotic gene expression and inhibits apoptosis in il-3-dependent haematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239:401 – 406, 1997.
- [91] M. Shindo, M. Adachi, F. Higashino, M. Yasuda, K. Hida, T. Nishioka, M. Ono, S. Takayama, J. Reed, K. Imai, Y. Totsuka, and T. Kohgo. Bag-1 expression correlates highly with the malignant potential in early lesions (t1 and t2) of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, 36:444–449, 2000.
- [92] Y. Shomura, Z. Dragovic, H. Chang, N. Tzvetkov, J. Young, J. Brodsky, V. Guerriero, F. Hartl, and A. Bracher. Regulation of hsp70 function by hspb1: structural analysis reveals an alternate mechanism for hsp70 nucleotide exchange. *Mol. Cell*, 17:367–379, 2005.
- [93] T. Smeal, D. Mercola, M. Birrer, and M. Karin. Oncogenic and transcriptional cooperation with ha-ras requires phosphorylation of c-jun on serines 63 and 73. *Nature*, 354:494–496, 1991.
- [94] L. Smith, S. Wise, D. Hendricks, A. Sabichi, T. Bos, P. Reddy, P. Brown, and M. Birrer. cjun overexpression in mcf-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene*, 18:6063–6070, 1999.
- [95] H. Sondermann, A. Ho, L. Listenberger, K. Siegers, I. Moarefi, S. Wente, F. Hartl, and J. Young. Prediction of novel bag-1 homologs based on structure/function analysis identifies sn1p as an hsp70 co.chaperone in *saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:33220–33227, 2002.
- [96] H. Sondermann, C. Scheufler, C. Schneider, J. Höhfeld, F. Hartl, and I. Moarefi. Structure of a bag/hsc70 complex: Convergent functional evolution of hsp70 nucleotide exchange factors. *Science*, 291, 2001.
- [97] J. Song, M. Takeda, and R. Morimoto. Bag1-hsp70 mediates a physiological stress signaling pathway that regulates raf-1/erk and cell growth. *Nat. Cell Biol.*, 3:276–282, 2001.
- [98] T. Sourisseau, C. Desbois, L. Debure, D. Bowtell, A. Cato, J. Schneikert, E. Moyse, and D. Michel. Alteration of the stability of bag-1 protein in the control of olfactory neuronal apoptosis. *J. Cell Sci.*, 114:1409 – 1416, 2001.
- [99] M. Sousa and D. McKay. The hydroxyl of threonine 13 of the bovine 70-kda heat shock cognate protein is essential for transducing the atp-induced conformational change. *Biochemistry*, 37:15392–15399, 1998.
- [100] A. Sprowles and R. Wisdom. Oncogenic effect of deletion in v-jun does not result from uncoupling jun from jnk signaling. *Oncogene*, 22:498–506, 2003.
- [101] T. Strachan and A. Read. *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1996.
- [102] N. Takahashi, R. Sasaki, J. Takahashi, S. Takayama, J. Reed, and T. Andoh. Bag-1m, an isoform of bcl-2-interacting protein bag-1, enhances gene expression driven by cmv promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286:807–814, 2001.
- [103] S. Takayama, D. Bimston, S. Matsuzawa, B. Freeman, C. Aime-Sempe, Z. Xie, R. Morimoto, and J. Reed. Bag-1 modulates the chaperone activity of hsp70/hsc70. *EMBO J.*, 16:4887–4896, 1997.
- [104] S. Takayama, K. Kochel, S. Irie, J. Inazawa, T. Abe, T. Sato, T. Druck, K. Huebner, and J. Reed. Cloning of cDNA's encoding the human bag1 protein and localization of the human bag1 gene to chromosome 9p12. *Genomics*, 35:494–498, 1996.
- [105] S. Takayama, S. Krajewski, M. Krajewski, S. Kitada, J. Zapata, K. Kochel, D. Knee, D. Scudiero, G. Tudor, G. Miller, T. Miyashita, M. Yamada, and J. Reed. Expression and location of hsp70/hsc-binding anti-apoptotic protein bag-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res.*, 58:3116–3131, 1998.

- [106] S. Takayama and J. Reed. Molecular chaperone targeting and regulation by bag family proteins. *Nature Cell Biology*, 3:E237–E241, 2001.
- [107] S. Takayama, T. Sato, S. Krajewski, K. Kochel, S. Irie, J. Millan, and J. Reed. Cloning and functional analysis of bag-1: A novel bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, 80:279–284, 1995.
- [108] S. Tang, J. Beck, S. Murphy, G. Chernenko, D. Robb, P. Watson, and M. Khalifa. Bag-1 expression correlates with bcl-2, p53, differentiation, estrogen and progesterone receptors in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, 84:203–213, 2004.
- [109] H. Theyssen, H.-P. Schuster, B. Bukau, and J. Reinstein. The second step of atp binding to dnak induces peptide release. *J. Mol. Biol.*, 263:657–670, 1996.
- [110] P. Townsend, R. Cutress, C. Carroll, K. Lawrence, T. Scarabelli, G. Packham, A. Stephanou, and D. Latchman. Bag-1 proteins protect cardiac myocytes from simulated ischemia/reperfusion-induced apoptosis via an alternate mechanism of cell survival independent of the proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(20):20723–20728, 2004.
- [111] P. Townsend, R. Cutress, A. Sharp, M. Brimmell, and G. Packham. Bag-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival. *BBA*, 1603:83–98, 2003.
- [112] P. Townsend, R. Cutress, A. Sharp, M. Brimmell, and G. Packham. Bag-1 prevents stress-induced long-term growth inhibition in breast cancer cells via a chaperone-dependent pathway. *Cancer Res.*, 63(14):4150–7, 2003.
- [113] B. Turner, S. Krajewski, M. Krajewski, S. Takayama, A. Gumbs, D. Carter, T. Rebbeck, B. Haffty, and J. Reed. Bag-1: a novel biomarker predicting long-term survival in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 19:992–1000, 2001.
- [114] A. van der Welden and A. Thomas. The role of the 5' untranslated region of an mrna in translation regulation during development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31:87–106, 1999.
- [115] P. Vogt. Jun, the oncoprotein. *Oncogene*, 20:2365–2377, 2001.
- [116] H. Wang, S. Takayama, U. Rapp, and J. Reed. Bcl-2 interacting protein, bag-1, binds to and activates the kinase raf-1. *PNAS USA*, 93:7063–7068, 1996.
- [117] F. Watanabe. Cooperative interaction of histone h1 with dna. *Nuc. Acid Res.*, 14:3573–3585, 1986.
- [118] M. Witcher, X. Yang, A. Pater, and S. Tang. Bag-1 p50 isoform interacts with the vitamin d receptor and its cellular overexpression inhibits the vitamin d pathway. *Exp. Cell Res.*, 265:167–173, 2001.
- [119] H. Yamauchi, M. Adachi, K. Sakata, M. Hareyama, M. Satoh, T. Himi, S. Takayama, J. Reed, and K. Imai. Nuclear bag-1 localization and the risk of recurrence after radiation therapy in laryngeal carcinomas. *Cancer Lett.*, 165:103–110, 2001.
- [120] X. Yang, G. Chernenko, Y. Hao, Z. Ding, M. Pater, A. Pater, and S. Tang. Human bag-1/rap46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells. *Oncogene*, 17:981–989, 1998.
- [121] X. Yang, Y. Hao, Z. Ding, A. Pater, and S. Tang. Differential expression of antiapoptotic gene bag-1 in human breast normal and cancer cell lines and tissues. *Clinical Cancer Research*, 5:1816–1822, 1999.
- [122] X. Yang, A. Pater, and S. C. Tang. Cloning and characterization of the human bag-1 gene promoter: upregulation by tumor-derived p53 mutants. *Oncogene*, 18:4546–4553, 1999.
- [123] Y. Yang, D. Kim, and C. Fathman. Regulation of programmed cell death following t cell activation in vivo. *International Immunology*, 10:175–183, 1998.
- [124] M. Zeiner, M. Gebauer, and U. Gehring. Mammalian protein rap46: an interaction partner and modulator of 70 kda heat shock proteins. *EMBO J.*, 16:5483–90, 1997.
- [125] M. Zeiner and U. Gehring. A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. *PNAS USA*, 92:11465–11469, 1995.
- [126] M. Zeiner, Y. Niyaz, and U. Gehring. The hsp70-associating protein hap46 binds to dna and stimulates transcription. *PNAS USA*, 96:10194–10199, 1999.