

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

**Identifikation neuer Komponenten der Chk1 vermittelten
Signaltransduktion**

vorgelegt von
Diplom-Biologin Vanessa Schadel

aus: Kassel

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung „*Oncology Research*“ der Firma Merck KGaA in Darmstadt unter Anleitung von Dr. Frank Zenke durchgeführt.

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Holstein

Prof Dr. Gabriele Petersen

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig unter Anleitung verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Heidelberg,

Vanessa Schadel

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Thomas Holstein danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit unter seiner Betreuung durchzuführen. Ich danke ihm für die Übernahme der Korrektur, sowie für die wissenschaftliche Unterstützung.

Frau Professor Dr. Gabriele Petersen danke ich für die Übernahme des Koreferates meiner Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Jens-Oliver Funk für die Möglichkeit, die Doktorarbeit bei der Firma Merck KGaA in der Präklinischen Onkologie anfertigen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Frank Zenke, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit mit Freude in einem sehr kollegialen Umfeld anzufertigen. Ich danke ihm für seine Bereitschaft, mir seine Zeit zu widmen und seine hilfreiche wissenschaftliche Unterstützung.

Ein großes „Dankeschön“ geht an meine Laborkollegen Denis Irmer, Friederike Krop, Elena Kilian, Jessica Daecke und Dirk Vocke, die nicht nur immer ein Ohr für meine wissenschaftlichen Probleme hatten, sondern tapfer meine nicht enden wollenden Pferde und Hundegeschichten „genießen durften“. Ihr seid gute Freunde geworden. DANKE, ohne Euch wäre es nicht halb so gut gewesen!

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Praktikanten Arne Bartol, Natalie Baumgart und Tina Faden bedanken, deren Unterstützung ich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch persönlich sehr geschätzt habe.

Für die Unterstützung der anderen Labore der Merck KGaA möchte ich mich bedanken, insbesondere bei Gesine Kühn.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und meinem Mann Daniel. Danke, dass ihr immer an mich glaubt und mich in jeglicher möglichen Form unterstützt. Vielen Dank für Eure aufmunternden Worte und dass ihr immer für mich da seid.

Für Opa Hans

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Identifikation von Substraten und Interaktionspartnern der in die DNA-Schadensantwort eingebundenen Serin/Threonin Kinase Chk1. Chk1 reguliert in eukaryotischen Organismen die Transition der Zelle in verschiedene Zellzyklusphasen durch Phosphorylierung. Auf Grund dessen eignete sich besonders die proteinbiochemische Methode KESTREL zur Substratfindung, bei der Lysate chromatographisch aufgetrennt und in einer anschließenden Kinasereaktion eingesetzt werden. Größtes Problem war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, insbesondere der Signale nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Kinasereaktionen. Auf Grund der in dieser Arbeit ausführlich dargelegten Probleme in der Reproduzierbarkeit, wurde der KESTREL-Assay zur Substratidentifikation eingestellt und ein neuer molekularbiologischer Ansatz (Hefe-2-Hybrid) zur Identifikation von Interaktionspartnern von Chk1 begonnen. Im Rahmen der Diplomarbeit von Friederike Krop konnte mit Hilfe der in dieser Arbeit hergestellten chromatographischen Fraktionen, ein Substrat der Tyrosinkinase Pyk2 identifiziert werden (*MAT2A Methionine Adenosyltransferase II, alpha*; Krop, 2005). Dies deutet auf ein Chk1 spezifisches Problem im KESTREL Assay hin.

Die Suche nach Interaktionspartner mittels des Hefe-2-Hybrid Systems führte zur Identifikation der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase als potentieller Interaktionspartner der Chk1 Kinase. Diese Interaktion konnte biochemisch durch Bindungsexperimente an Glutathionagarose bestätigt werden. Weiterführende Versuche zeigten sowohl eine Co-Elution in chromatographischen Fraktionen, als auch eine Co-Lokalisation des MPG und Chk1 Proteins im Zellkern nach Co-Transfektion in der Immunfluoreszenz. Erste Daten deuteten darauf hin, dass sich die Lokalisation von MPG nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin ändert. Die Interaktion wurde somit mit zwei voneinander unabhängigen Methoden nachgewiesen. Diese Experimente lieferten erste Hinweise auf eine Beteiligung der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase in die Regulation der Chk1 vermittelten DNA-Schadensantwort.

Summary

The present thesis is focused on the identification of substrates and interaction partners of the DNA-damage pathway integrated serine/threonine Chk1 kinase. In eukaryotic organisms Chk1 regulates the transition of the cells in different cell cycle phases via phosphorylation. The biochemical method KESTREL was used to identify new Chk1 substrates. In this procedure lysates are separated by chromatography and used in subsequent kinase assays. The reproducibility of the experiments, especially the identification of radioactive signals after gelelectrophoretic separation of the kinase reactions turned out to be the most significant problem.

Based on this the KESTREL approach has been discontinued and a new approach (Yeast Two Hybrid) to identify interaction partner for Chk1 was started.

However, with the help of the chromatographic fractions produced for KESTREL a new substrate of the tyrosine kinase Pyk2 could be identified (*MAT2A Methionine Adenosyltransferase II, alpha*; Krop, 2005). This pinpoints to a Chk1 specific problem in the KESTREL assay.

A new interaction partner, N-Methylpurine-DNA-Glycosylase, was identified by using the Yeast Two Hybrid system. This interaction was confirmed biochemically using GST-pulldown technology. Furthermore, both proteins coeluted in chromatographic fractions, as well as a colocalized in cells. First data indicated that the localization of MPG changed after treatment with chemotherapeutic cislatin. In summary the interaction was confirmed by two independent methods. These experiments could provide a first indication an involvement of the N-Methylpurine-DNA-Glycosylase in the regulation of Chk1 dependent DNA damage signaling.

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Signaltransduktion.....	2
1.1.1 Sensor-, Signalumwandler- und Effektorproteine.....	2
1.1.1.1 Sensorproteine.....	2
1.1.1.2 Sensorproteine und Mediatoren.....	3
1.1.1.2.1 ATM und ATR Kinasen.....	4
1.1.1.3 Signalumwandlerproteine.....	5
1.1.1.3.1 Chk1.....	6
1.1.1.3.2 Chk1.....	10
1.1.1.4 Effektorproteine.....	11
1.2 Die Rolle der Chk1 Kinase als Zellzykluskontrollpunkt.....	11
1.2.1 Der Zellzyklus.....	12
1.2.1.1 G1/S Kontrollpunkt.....	13
1.2.1.2 Intra-S-Phase Kontrollpunkt.....	16
1.2.1.3 G2/M Kontrollpunkt.....	16
1.3 DNA-Schäden.....	19
1.4 DNA Reparatur.....	20
1.4.1 Damage Reversal.....	20
1.4.2 Basenexzisionsreparatur (<i>Base Excision Repair</i> , BER).....	21
1.4.3 Nukleotidexzisionsreparatur (<i>Nucleotide Excision Repair</i> ,... NER).....	22
1.4.4 <i>Mismatch</i> -Reparatur.....	23
1.4.5 Homologe Rekombination (<i>homologous recombination</i> , HR) und Nicht Homologe Rekombination (<i>non-homologous end-joining</i>).....	23
1.5 Ziel der Arbeit.....	24
2. Material and Methoden.....	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Laborzubehör.....	26
2.1.2 Software.....	27
2.1.3 Laborchemikalien und Reagenzien.....	28
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.5 Enzyme.....	31
2.1.6 Antikörper.....	32
2.1.6.1 Primärantikörper.....	31
2.1.6.2 Sekundärantikörper.....	33
2.1.7 " <i>Kits</i> ".....	33
2.1.8 Vektoren und Oligonukleotide.....	34
2.1.8.1 Oligonukleotide.....	34

Inhaltsverzeichnis

2.1.8.2	Vektoren.....	36
2.1.9	DNA- und Proteinstandards.....	37
2.1.10	Medien und Puffer.....	37
2.1.11	Zellkulturmedien.....	43
2.1.12	Chemotherapeutika.....	44
2.1.13	Bakterien- und Hefestämme.....	44
2.1.14	Mammale Zelllinien.....	44
2.2	Methoden.....	45
2.2.1	Molekularbiologische Methode.....	45
2.2.1.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.2.1.2	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	45
2.2.1.3	Quantifizierung von DNA.....	46
2.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
2.2.1.5	Enzymatische Restriktion.....	48
2.2.1.6	Ligation der DNA mittels T4 Ligase.....	49
2.2.1.7	Klonierung.....	49
2.2.1.7.1	Gateway Klonierung (Invitrogen).....	50
2.2.1.7.2	Site directed Mutagenese.....	50
2.2.1.8	Transformation von Bakterienzellen <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>).....	52
2.2.1.9	Isolation bakterieller Plasmid-DNA.....	52
2.2.2	Eukaryotische Zellkultur.....	53
2.2.2.1	Zelllinien und Kultivierung.....	53
2.2.2.2	Zellzahlbestimmung.....	53
2.2.2.3	Lagerungsprozess Zelllinien.....	54
2.2.2.4	Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen.....	54
2.2.3	Proteinanalyse und Biochemie.....	55
2.2.3.1	Lyse eukaryotischer Zellen.....	55
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	56
2.2.3.3	Immunpräzipitation/Glutathion-Agarose Pulldown.....	56
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	57
2.2.3.5	Coomassiefärbung des SDS-Polyacrylamidgels.....	58
2.2.3.6	Western-Blot.....	58
2.2.3.7	Immunfluoreszenz.....	59
2.2.3.8	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie.....	60
2.2.4	KESTREL - <i>Kinase Substrate Tracking and Elucidation</i>	61
2.2.4.1	Lyse und entsalzen der Rattenleberextrakte.....	61
2.2.4.2	Ionenaustauschchromatographie (ÄKTA, Amersham).....	61
2.2.4.3	Radioaktiver Kinase Assay	62
2.2.5	Hefe-2-Hybrid.....	62
2.2.5.1	Verwendetes Hefe-2-Hybrid System.....	62
2.2.5.2	Kultivierung der Hefen.....	63
2.2.5.3	Herstellung von kompetenten Hefen und Transformation... ..	64
2.2.5.4	Plasmidisolation auf Hefezellen.....	65
2.2.5.5	Amplifikation der cDNA Bibliothek.....	65
2.2.5.6	<i>Colony Filter Lift Assay</i>	66

3.	Ergebnisse.....	67
3.1	KESTREL (<i>Kinase Substrate Tracking and Elucidation</i>).....	67
3.1.1	Anionenaustauschchromatographie.....	68
3.1.2	SDS-Page und Coomassiefärbung der eluierten Fraktionen	69
3.1.3	Generierung der Phosphatase Cdc25C für die Proteinexpression in <i>E.coli</i>	72
3.1.4	Proteinexpression und Aufreinigung von rekombinatem Cdc25C (200-256) in <i>E.coli</i>	72
3.1.5	Proteinaufreinigung von rekombinaten GST-Cdc25C (200-256) Fusionsprotein mittels der <i>Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)</i>	74
3.1.6	Proteinanalytische Charakterisierung des aufgereinigten GST-Cdc25C (200-256) Fusionsprotein.....	76
3.1.7	In vitro Kinase Assay	77
3.1.8	KESTREL Kinase Assay.....	78
3.2	2. KESTREL Assay.....	80
3.2.1	Zweite Anionenaustauschchromatographie.....	80
3.2.2	SDS-Page und Coomassiefärbung der Fraktionen der zweiten Anionenaustauschchromatographie.....	82
3.2.3	2. KESTREL in vitro Kinase Assay.....	84
3.3	Zusammenfassung weiterer KESTREL–Experimente.....	85
3.4	Hefe-2-Hybrid-System.....	87
3.4.1	Klonierungen.....	88
3.4.1.1	Zielgerichtete Mutagenese.....	88
3.4.2	Wachstumsverhalten der Hefen.....	91
3.4.3	2-Hybrid Kontrollvektoren.....	94
3.4.4	Expression des rekombinanten Fusionsprotein Chk1 FL und Chk1 K/A 38 in AH109.....	95
3.4.5	2-Hybrid-Screen einer humanen fötalen Gehirn cDNA-Bank mit humanem Chk1	96
3.4.6	Transformationeffizienz.....	97
3.4.7	Selektion der Klone.....	98
3.4.8	Retransformation der positiven Klone.....	99
3.4.9	Sequenzierung und Identifizierung der positiven Interaktionspartner.....	101
3.4.10	Beschreibung der aus dem Hefe-2-Hybrid Versuch identifizierten Klone	103
3.4.10.1	N-Methylpurine-DNA-Glycosylase MPG.....	103
3.4.10.2	Histone Family, Member V Isoform 2 (H2A).....	103
3.4.10.3	Ankyrin Repeat Domain 7 (ANKRD7).....	103
3.4.10.4	NADH-Dehydrogenase.....	104
3.4.10.5	Cytochrom C OxidaseSubunit VIIA Polypeptide 2.....	104
3.4.11	Klonierung Interaktionspartner in Säugerzellen.....	104

3.5	Verifizierung potentieller Chk1-Interaktionspartner.....	106
3.5.1	Transiente Einzeltransfektion in HEK 293T-Zellen.....	106
3.5.2	Co-Transformation und <i>GST-Pulldown</i>	108
3.5.3	Analyse der Co-Präzipitation der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase und der Chk1 Kinase.....	110
3.5.4	Expression von Chk1 und MPG auf Proteinebene in verschiedenen Zelllinien.....	112
3.5.5	DNA Schädigung durch Chemotherapeutika.....	114
3.5.6	Co-Transformation und <i>GST-Pulldown</i>	116
3.5.7	Phosphorylierung von MPG durch Chk.....	117
3.5.8	Co-Elution der Chk1 Kinase und der N-Methylpurine-DNA Glykosylase (MPG) in der Anionenaustauschchromatographie.....	119
3.5.9	Bestimmung der zellulären Lokalisation von GST-Chk1 und MPG-V5 mittels Immunfluoreszenz	120
3.5.10	Bestimmung der Lokalisation der GST-Chk1 Kinase und des MPG-V5 Proteins in transfizierten HEK-293T Zellen mittels Immunfluoreszenz nach Behandlung mit Cisplatin...	124
4.	Diskussion.....	127
4.1	Substratidentifikationsmethoden.....	127
4.2	Die Suche nach Substraten der Chk1 Kinase mittels KESTREL.....	128
4.2.1	Untersuchung zur Abnahme der Signalstärke der Chk1 Kinase im radioaktiven Kinase Assay.....	129
4.2.2	Untersuchungen zur Desphosphorylierung der Chk1 Kinase im radioaktiven Kinase Assay.....	130
4.2.3	Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des KESTREL Versuchs.....	132
4.2.4	Zusammenfassung und Ausblick der KESTREL Versuche...	133
4.3	Die Suche nach Interaktionspartnern von Chk1 mittels des Hefe-2-Hybrid Systems.....	134
4.3.1	Verifizierung des Hefe-2-Hybrid Systems.....	134
4.3.2	Initialer Hefe-2-Hybrid <i>Screen</i>	135
4.3.3	N-Methylpurine-DNA-Glykosylase, MPG.....	136
4.3.4	Hypothese zur Relevanz der MPG-Chk1 Interaktion.....	138
4.4	Ausblick.....	140
5.	Literaturverzeichnis.....	141

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Eine schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort im Signaltransduktionsweg.....	2
Abb. 2: Eine schematische Darstellung der Wildtyp Chk1 Kinase.....	7
Abb. 3: Abbildung 3 zeigt einen Abgleich von Chk1 Homologen.....	8
Abb. 4 Eine schematische Darstellung der Wildtyp (WT) Chk2 Kinase.....	10
Abb. 5: Der G1/S Kontrollpunkt.....	15
Abb. 6: Der G2/M Kontrollpunkt.....	18
Abb. 7: Gateway Klonierung.....	50
Abb. 8: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie zur Fraktionierung des Rattenleberextraktes.....	68
Abb. 9: SDS-Page und Coomassie-Färbung der Fraktionen der ersten Anionenaustauschchromatographie über eine <i>MonoQ 5/50 GL Säule</i>	71
Abb. 10: Coomassie-Färbung nach IPTG induzierter Proteinexpression in <i>E.coli</i>	73
Abb. 11: Näher aufgelöstes Chromatogramm der Proteinaufreinigung über eine <i>GSTrapTM FF GST-Säule</i>	75
Abb. 12: Coomassie Färbung (A) und Western-Blot Analyse (B) des rekombinanten, aufgereinigten GST-Cdc25C (200-256) aus IPTG induzierten <i>E.coli</i> Bakterienkulturen.....	76
Abb. 13: Kontroll Kinase Assay zur Überprüfung der Aktivität des rekombinanten GST-Chk1 und GST-Cdc25C (200–256) und anschließender Wester-Blot.....	78
Abb. 14: Autoradiogramm der ersten Chromatographie.....	79
Abb. 15: Chromatogramm der zweiten Anionenaustauschchromatographie zur Fraktionierung des Rattenleberextraktes.....	81
Abb. 16: SDS-Page und Coomassie-Färbung der Fraktionen der zweiten Anionenaustauschchromatographie über eine <i>MonoQ 5/50 GL Säule</i>	83
Abb. 17: Autoradiogramm der zweiten Chromatographie.....	84
Abb. 18: Agarosegel nach Restriktionsverdau.....	89
Abb. 19: 1%iges Agarosegel nach Colony-PCR.....	91
Abb. 20: Kontrolltransformation im Hefestamm AH109.....	93
Abb. 21: Western-Blot Analyse der Expression Wildtyp Gal4-Chk1 und Gal4-Chk1 K/A 38 Proteins in <i>S.cervisae</i>	96
Abb. 22: <i>Colony Filter Lift Assay</i> der selektierten Klone.....	98
Abb. 23: Retransformation der ersten positiven Klone und Wachstum auf Selektionsmedium.....	99
Abb. 24: Überprüfung der PCR-Reaktion für die Gateway Klonierung, Reaktion	105

Abbildungsverzeichnis

Abb. 25: Expression der V5 markierten Kandidaten nach Transformation in HEK293T Zellen.....	107
Abb. 26: Detektion des GST-getaggten transient transfizierten GST-Chk1 mittels polyklonalem GST-Mausantikörper.....	107
Abb. 27: Erste Interaktionsanalyse von Chk1 mit MPG, NADH-Dehydrogenase, COX, oder H2A.....	109
Abb. 28: Charakterisierung der Interaktion der Chk1 Kinase mit der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase.....	110
Abb. 29: Western-Blot der transient transfizierten HEK-293T Zelllysate.....	112
Abb. 30: Zelllysate unterschiedlicher Zelllinien.....	113
Abb. 31: Behandlung der Zelllinie HCT116 und HEK-293T mit Methymethansulfonat (MMS), Hydroxyharstoff (HU) und Cisplatin.....	115
Abb. 32: Charakterisierung der Interaktion der Chk1 Kinase mit der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase unter Einfluss des Chemotherapeutikums Methymethansulfonat (MMS).....	116
Abb. 33: Western-Blot der transient transfizierten HEK-293T Zelllysate.....	117
Abb. 34: Radioaktiver Kinase-Assay zur Identifikation des MPG Proteins als potentielles Substrat der Chk1 Kinase.....	118
Abb. 35: Anwesenheit der Chk1 Kinase und des MPG Proteins in unterschiedlichen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie.....	119
Abb. 36: Analyse der Lokalisation von Chk1 in transient transfizierten HEK-293T Zellen mittels Immunfluoreszenz.....	121
Abb. 37: Analyse der Lokalisation von MPG-V5 in transient transfizierten HEK-293T Zellen mittels Immunfluoreszenz	122
Abb. 38: Analyse der Lokalisation von MPG-V5 und GST-Chk1 bei in co-transfizierten HEK-293T-Zellen mittels Immunfluoreszenz.....	123
Abb. 39: Analyse der Lokalisation von MPG-V5 und GST-Chk1 in HEK-293T Zellen nach Behandlung mit Cisplatin mittels Immunfluoreszenz.....	125
Abb. 40: Western-Blot der Inkubation der GST-Chk1 Kinase mit inhibierender Fraktion..	131
Abb. 41: Kinase Assay verschiedener Kinasen mit inhibierender Fraktion.....	131
Abb. 42: Die drei Isoformen der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase.....	137
Abb. 43: mRNA Expressionsprofil der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase in unterschiedlichen Zelllinien.....	138

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	An der DNA-Schadensantwort beteiligte Proteine.....	3
Tab. 2:	Transfektion von HEK293T.....	54
Tab. 3:	Transfektionsansatz bei verschiedenen Zellkulturschalen.....	55
Tab. 4:	Übersicht über die im 2-Hybrid Screen verwendeten Konstrukte.....	92
Tab. 5:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Transformation.....	95
Tab. 6:	Zusammenfassung des Wachstumsverhalten der retransformierten Klone auf unterschiedlichen Selektionsmedien (SD/-Leu/-Trp, SD/-Leu/-Trp/-His, SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade).....	100
Tab. 7:	Tabelle der identifizierten Proteine nach BLAST-Sequenzanalyse.....	102

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
%	Prozent
°C	Grad Celsius
γ	Gamma
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
A	Adenin
AA	Aminosäure (<i>aminoacid</i>)
Abb	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
AP	Apyrimidine
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and RAD 3 Related Protein</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting Protein</i>
bp	Basenpaare
BD	Bindedomäne
BCA	Bicinchoninsäure (<i>Bichinonic Acid</i>)
BER	Basenexzisionsreparatur
β-Gal	β-Galaktosidase
BRCA1/2	<i>Breast Cancer 1/2</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
cdc2	<i>Cell Division Cycle 2 (=cyclin dependent kinase 1 (CDK1))</i>
Cdc25A	<i>Cell Division Cycle Protein 25 A</i>
Cdc25C	<i>Cell Division Cycle Protein 25 C</i>
Cdc25B	<i>Cell Division Cycle Protein 25 B</i>

Abkürzungsverzeichnis

Cdc45	<i>Cell Division Cycle 45</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
CDK1	<i>Cell Division Cycle 2 (cdc2)</i>
ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Chk1	<i>Checkpoint Kinase 1</i>
Chk2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
cm	Zentimeter
Co ₂	Kohlendioxid
d.h.	das heisst
dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribunucleic acid</i>)
DO-Supplement	<i>Drop-out</i> Zusatz
DSB	Doppelstrangbruch
dNTP	2'-Desoxynukleosid 5'-triphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraaceticacid
et al	und andere
FCS	fötale Kälberserum
FHA	<i>forkhead-associated</i>
fwd	<i>forward</i>
g	Gramm
G	Guanin
GGR	Global Genome Repair
GST	Glutathione Sepharose
h	Stunden (<i>hour</i>)
H2A	Histone H2A
His	Histidin
HU	Hydroxyharnstoff
HR	Homologe Rekombination (<i>homologous recombination</i>)

Abkürzungsverzeichnis

HR23	<i>Human Homolog of Yeast RAD23</i>
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
hs	<i>Homo sapiens</i>
Hus1	<i>HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)</i>
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KESTREL	<i>Kinase Substrate Tracking and Elucidation</i>
kV	Kilovolt
l	Liter
Lac-Z	β -Galaktosidase-Gen
LB	Luria-Bertoni
Leu	Leucin
mAU	<i>Milliabsorbance Unit</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA Damage Checkpoint 1</i>
MDM2	<i>Double Minute 2 Protein</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
MMR	<i>Mismatch Repair</i> (MMR) Basenfehlpaarungsreparatur
MnCl	Mangan-Chlorid
MOPS	2-Morpholinopropansulfonsäure
MPG	N-Methylpurin-DNA-Glykosylase
mRNA	Poly-A ⁺ -RNA, Boten-RNA (messenger RNA)
mSi	milli Siemens
NaCl	Natriumchlorid
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
NADH deh	NADH-Dehydrogenase
NBS	Nibrin

Abkürzungsverzeichnis

NER	Nukleotidexzisionsreparatur
ng	Nanogramm
NHEJ	Homologe Rekombination (<i>non-homologous end-joining</i>)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP-40	Nonident P-40
PEG-LiA	Polyethylenglykol-Lithium Acetat
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
OD	Optische Dichte
p	phospho
p53	<i>Tumor Suppressor p53</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphat buffered saline</i>)
PIKK	Phosphoinositol 3-kinase-like Kinase
PK	Protein Kinase
PWO	<i>Pyrococcus woesei</i>
rpm	Umdehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RAD	<i>Ras-Related Protein</i>
RT	Raumtemperatur
RZPD	Ressourcen Zentrum und Primär Datenbank
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sek	Sekunde
Ser	Serin
SD-Medium	<i>Synthetic Defined Medium</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium-dodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
sp	<i>S.pombe</i>
s.pombe	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
T	Thymin
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TE	Tris EDTA

Abkürzungsverzeichnis

TGR	<i>Transcription Coupled Repair</i>
T7	Bakteriophage T7
Thr	Threonin
Tm	DNA Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
Tris	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan
Tris-HCl	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan Salzsäure
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UAS	<i>Upstream Activator Sequenz</i>
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase
UV	Ultraviolett
V	Volt
YPDA	<i>Yeast Pepton Dextrose Adenin</i>
YPD	<i>Yeast Pepton Dextrose</i>
X-Gal	X-Galaktopyranosid (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-galaktosid)
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing 1</i>
z.B.	zum Beispiel
53BP1	<i>Tumor Protein p53 Binding Protein 1</i>

1. Einleitung

Das Überleben eines Organismus hängt von der akkuraten Transmission der genetischen Information von einer Zelle auf die andere ab. Hierzu ist nicht nur extreme Genauigkeit in der DNA Replikation und fehlerfreie Chromosomen Distribution erforderlich, sondern die Zelle muss auch die Fähigkeit besitzen, spontan induzierte DNA Schäden zu reparieren, um die Zahl vererbbarer Mutationen möglichst gering zu halten (Zhou et al. 2000). Andererseits ermöglicht erst das Auftreten von Mutationen eine Dynamik in der Evolution, welche die Entwicklung und Vielfalt der Arten ermöglicht.

Der überwiegende Teil der Mutationen und somit eine Veränderung im Genom, ist allerdings nicht mit einem Vorteil für das Individuum verbunden.

Das Genom der eukaryotischen Zelle ist dem dauerhaften Angriff durch genotoxische Einflüsse (z.B. reaktive Chemikalien, UV-Licht), sowie dem normalen intrazellulären Metabolismus ausgesetzt (z.B. reaktive Sauerstoffradikal). Diese Faktoren und das Unvermögen einer Zelle nicht angemessen auf die Schädigung der DNA zu reagieren, können das Überleben der Zelle bedrohen und z.B. in Metazoen zu mannigfaltigen Störungen wie Organversagen, Immundefizienz, Krebs oder anderen pathologischen Folgeerkrankungen führen, die u.a. in der Entstehung von Tumoren resultieren können (Walworth et al. 2000). Hierdurch wird deutlich, von welcher entscheidenden Bedeutung der Erhalt der genomischen Integrität für den Organismus ist. Werden DNA Schäden nicht repariert, so kann dies schwerwiegende Folgen haben. Über die Anzahl der täglich in menschlichen Zellen vorkommenden DNA-Schäden gibt es in der Literatur unterschiedliche Schätzungen. Die Angaben variieren von 10000 (Seeberg et al. 1995) bis 150000 (Beckmann et al. 1997) DNA-Schäden pro Tag und pro Zelle; dies ist unter anderem vom Zelltyp abhängig.

Modifikationen in der DNA können zu Mutationen führen, welche die kodierenden Sequenzen der DNA schädigen. Diese DNA Schädigungen können mit normalen zellulären Vorgängen, wie DNA Replikation oder Transkription interferieren und somit einen schädlichen Einfluss auf die Zelle ausüben. Zellen haben daher verschiedenste Mechanismen entwickelt, um mit diesen Einflüssen umzugehen.

1.1 Signaltransduktion

1.1.1 Sensor-, Signalumwandler- und Effektorproteine

Der Signaltransduktionsweg der DNA-Schadensantwort kann in Sensor-, Signalumwandler- und Effektorproteine untergliedert werden. (Abbildung 1). Hierbei ist anzumerken, dass es sich nicht um ein in sich geschlossenes System der Signaltransduktion handelt, sondern vielmehr um ein interagierendes Netzwerk verschiedener Signalwege (Abraham et al. 2001).

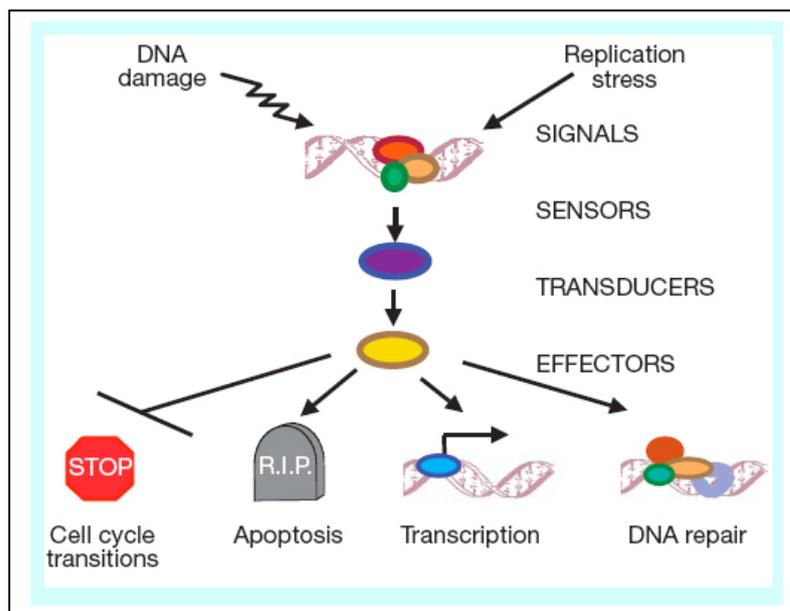


Abb. 1: Eine schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort im Signaltransduktionsweg. Die Abbildung zeigt ein Übersichtsschema der Möglichkeiten einer Zelle auf DNA Schäden oder Replikationsfehler zu reagieren. Zur Vereinfachung wird das Netzwerk, zu dem die Sensor-, Signalumwandler- und Effektorproteine gehören, in linearer Form dargestellt (aus Zhou et al. 2000).

1.1.1.1 Sensorproteine

Sensorproteine sind in der Lage unvollständig replizierte DNA und DNA-Strangbrüche zu erkennen und diese in biochemische Signale, insbesondere in

Proteinphosphorylierung, umzuwandeln. Sensorproteine modulieren durch Phosphorylierung weitere nachgeschaltete Proteine, die auf diese Weise die sich anschließende Signaltransduktionskaskade der DNA-Schadensantwort aktivieren. Die Identität der beteiligten Faktoren und der Mechanismus der Signaltransformation ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch weitgehend unbekannt. Die Mitglieder der Rad Proteinfamilie (Rad17, Rad1, Rad9, Rad26, Hus1), die ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen exprimiert werden, stellen potentielle Kandidaten dar (Green et al. 2000). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine, die sowohl in Säugern, als auch in niederen eukaryotischen Organismen, wie Hefen, konserviert sind.

Protein function	Mammals	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Sensors			
RFC-like	Rad17	Rad17	Rad24
PCNA-like	Rad9	Rad9	Dde1
	Rad1	Rad1	Rad17
	Hus1	Hus1	Mec3
PI3-Kinases (PIKK)	ATM	Tell	Tell
	ATR	Rad3	Mec1
PIKK binding partner	ATRIP	Rad26	Ddc2/Lcd1/Pie1
Mediators			
	MDC1		
	53BP1		
	TopBP1	Cut5	Dpb11
	Claspin	Mre1	Mre1
	BRCA1	Crb2/Rph9	Rad9
Transducers			
Kinase	Chk1	Chk1	Chk1
	Chk2	Cds1	Rad53

Tabelle 1: An der DNA-Schadensantwort beteiligte Proteine. Die Tabelle zeigt die an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine gegliedert nach Proteinfunktion in *Mammalia*, *S.pombe* und *S.cerevisiae* (aus Sançar et al. 2004).

1.1.1.2 Sensorproteine und Mediatoren

In einem fließenden Übergang befinden sich unterhalb der Sensorproteine apikale Kinasen, so genannte Mediatoren, welche simultan mit DNA Sensorproteinen und

Signalumwandlerproteinen während des Zellzyklus assoziiert sind. Diese Mediatoren fungieren sowohl als Sensorproteine, als auch als übergeordnete Signalumwandlerproteine. Es scheint, dass diese Proteine bei mehr als einen Prozess in der Zellzykluskontrolle beteiligt sind (Sancar et al. 2004). In der Literatur gibt es keine distinkte Trennung in der Zuordnung zur Gruppe der Sensor- Mediator- und Signalumwandlerproteinen. Häufig werden diese sowohl der einen, als auch den anderen Proteingruppe zugeordnet. Tabelle 1 zeigt beispielhaft eine mögliche Zuordnung. Als Sensorproteine und am Prozess des Signalweiterleitung beteiligt, wurden zwei Proteine der *Phosphoinositide 3-Kinase related Kinases* (PIKK) Familie identifiziert: Die ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (ATM and Rad 3-related) Kinase (Tibbetts et al. 2000).

1.1.1.2.1 ATM und ATR Kinasen

ATM wird hauptsächlich durch Doppelstrangbrüche, ATR überwiegend durch Einzelstrangbrüchen aktiviert. ATR formt daraufhin Heterodimere mit ATRIP, welches an UV-geschädigte DNA bindet (Kastan et al. 2004).

ATM ist ein 350kDa großes oligomeres Protein, welches Kinaseaktivität besitzt und in vivo durch Agenzien aktiviert wird, welche Doppelstrangbrüche hervorrufen. ATR codiert für ein 303kDa großes Protein, welches in vivo unter anderem durch UV-Licht aktiviert wird. Beide Proteine gehören zu einer Proteinfamilie der Serin/Threonin Kinasen, deren katalytische Domäne klare evolutionäre Verwandtschaft mit den Phosphoinositol 3-Kinasen in Säugern und Hefe zeigt (Hunter et al. 1995).

Die Funktion der ATM/ATR Kinasen wird insbesondere in Experimenten mit *knock-out* Mäusen deutlich. Wird eine ATR *knock-out* Maus generiert, so sind diese Mäuse embryonal letal. Des Weiteren führen Mutationen und partieller Ausfall des ATR Proteins im Menschen zu autosomal rezessiver Funktionsstörung, genannt „Seckel Syndrom“ (Driscoll et al. 2003).

ATM/ATR Proteine teilen sich viele Substrate. Die Konsensussequenz der Phosphorylierung durch ATM [(M/F)-(Q/P)-L-S-Q-(E/Q)] (Abraham et al. 2001) überlappt sich mit der für ATR (Kim et al. 1999). Bei einer computerbasierenden *in silico* Suche nach physiologischen Substraten der ATM/ATR Kinasen konnten viele Proteine der Zellzykluskontrolle, sowie DNA-Reparaturproteine wie z.B. p53, hRAD17, hChk1, hChk2, NBS1, MDM2 und BRCA1/2 identifiziert werden (Kim et al. 1999). Weiterhin gehören Proteine wie BRCA1, Claspin, 53BP1 und MDC1 in die Klasse der Mediatoren (Stucki and Jackson 2004).

1.1.1.3 Signalumwandlerproteine

Unterhalb der Sensorproteine liegen die so genannten Signalumwandler. Diese müssen die Fähigkeit besitzen mit den Sensorproteinen zu interagieren. Diese Interaktion beruht weitgehend auf dem Mechanismus der Proteinphosphorylierung zur Transmission und Amplifikation des Signals. Sensorproteine, die DNA Schäden detektieren, leiten das Signal, durch unbekannte Mechanismen zu Mitgliedern der Signalumwandlerproteinfamilie.

Reversible Phosphorylierung ist ein weit verbreiteter und sehr wichtiger kovalenter Kontrollmechanismus der Zelle. Dieser Regelmechanismus spielt bei vielen zellulären Prozessen wie z.B. Zellwachstum, Zellzyklus Verlauf, Differenzierung etc. eine bedeutende Rolle.

Fast 2% des menschlichen Genoms codiert für Kinasen. Es wird geschätzt, dass circa 1/3 aller exprimierten Proteine durch Phosphorylierung modifiziert werden (Voet & Voet 2002). Durch Phosphorylierung befinden sich Proteine im aktiven oder inaktiven Zustand. Werden Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert oder inaktiviert, so sind sie wiederum in der Lage nachfolgende Proteine im Signalweg zu aktivieren bzw. inaktivieren.

In Säugern übernehmen zwei Kinasen die Rolle der Signalumwandlerproteine in der Regulation der DNA-Schadensantwort: Chk1 (*Checkpoint* Kinase 1) und Chk2 (*Checkpoint* Kinase 2) (Rhind et al. 2000).

1.1.1.3.1 Chk1

Chk1 gehört zur Klasse der Serin/Threonin Kinasen und gehört der Nim1 Unterfamilie an. Chk1 hat ein Molekulargewicht von ~54kDa (476 Aminosäuren) und wurde erstmals als regulierende Kontrollpunkt Kinase des G2/M Übergangs in *Schizosaccharomyces pombe* identifiziert (Chen et al. 2004). Chk1 ist sowohl nukleär lokalisiert (Dunawy et al. 2005), als auch chromatingebunden in den Centrosomen (Jiang et al. 2003). Abbildung 2 zeigt eine schematische Abbildung des humanen Chk1 Proteins. Das Chk1 Protein hat eine konservierte Primärstruktur, welche N-terminal eine Kinasedomäne enthält (~270 Aminosäuren), eine flexible linker Region (~50 Aminosäuren), eine SQ/TQ Domain (~60 Aminosäuren) und eine C-terminale Domäne (~100 Aminosäuren) ohne erkennbare Sequenzmotive (Sanchez et al. 1997).

Die N-terminale Kinase Domain zeigt eine hohe Konservierung durch die unterschiedlichsten Spezies. Die Chk1 Kinasedomäne besteht aus zwei Subdomänen, einer kleineren N-terminalen Domäne aus β -Faltblättern und einer mehr als doppelt so großen helikalen C-terminalen Domäne, die durch eine linker Region miteinander verknüpft sind. Die SQ/TQ Domäne hat verschiedene konservierte Ser-Gln (SQ) oder Thr-Gln (TQ) Motive, gefolgt von jeweils einem Glutamin, bei denen bevorzugt die Serin und Threonin Reste durch ATR (ATM related protein kinase) an Serine 317 und Serin 345 phosphoryliert werden (Zhao et al. 2001). Die ATR abhängige Phosphorylierung der SQ/TQ Motive ist essentiell für die Aktivierung von Chk1. Phosphoryliertes Chk1 besitzt eine deutlich höhere Kinase Aktivität, als unphosphoryliertes Chk1. Die Chk1 Mutanten Ser317A oder Ser345A zeigen eine deutlich verringerte Aktivität nach DNA Schädigung. In vitro zeigt eine C-terminal (~383-476) verkürzte Chk1 Variante eine 20-fach höhere Aktivität als das volllängen Protein. Dies legt nahe, dass eine Region in der C-terminalen Domäne die Aktivität von Chk1 negativ reguliert und somit eine autoinhibitorische Funktion ausüben kann (Chen et al. 2000).

Der Mechanismus des Chk1 Proteins als Zellzykluskontrollpunkt wird detailliert in Punkt 1.4 erläutert.

Neben der Phosphorylierung durch die zur PIKK (Phosphatidylinositol 3-Kinasen) Familie gehörende ATR Kinase, wird Chk1 in vivo durch die PKB (Ser280) (King et al. 2004) und Cdk1 (Ser286, Ser301) (Shiromizo et al. 2006) phosphoryliert. Die physiologische Relevanz dieser Phosphorylierung ist bisher allerdings unbekannt. Neben der Regulation durch Phosphorylierung sind noch zusätzliche Proteine, wie Claspin und BRCA1 notwendig, um Chk1 durch ATR zu aktivieren, deren exakte Funktion ist bisher allerdings unbekannt (Niida et al. 2007).



Abb. 2: Eine schematische Darstellung der Wildtyp (WT) Chk1 Kinase. Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen strukturellen Elemente der Chk1 Kinase. PK bezeichnet die konservierte Primärstruktur, die N-terminal bis circa Aminosäure 270 die Kinasedomäne enthält. Es schließt sich eine circa 50 Aminosäuren lange flexible Region an (AA265-AA317), die als linker bezeichnet wird. Im Anschluss daran folgt eine SQ/TQ reiche Region von circa 60 Aminosäuren (AA317-AA383). C-terminal schließt sich eine circa 100 Aminosäuren lange Domäne ohne erkennbare Sequenzmotive an (aus Chuen-Pei et al. 2004).

Ein Sequenzvergleich (Abbildung 3) von hsChk1 (Hs *Homo sapiens*), dmChk1 (dm *Drosophila melanogaster*), spChk1 (Sp *Schizosaccharomyces pompe*) und ceChk1 (Ce *Caenorhabditis elegans*) weist auf die hohe Konservierung während der Evolution hin. Der Sequenzvergleich zeigt verschiedene stark konservierte Regionen. Die höchste Konservierung ist im Bereich der Kinase Domäne zu erkennen. Des Weiteren sind Konservierungen im Bereich der SQ/TQ Domäne zu sehen, insbesondere die Phosphorylierungsstelle an Ser345 ist innerhalb aller Organismen (hs, sp, ce und dm) konserviert. Ab Aminosäure 455 zeigt sich ebenfalls eine hohe Konservierung im C-terminalen Bereich der Chk1 Kinase. Insgesamt zeigt das hsChk1 Protein ist zu 29% identisch und zu 44% ähnlich dem spChk1 und dmChk1 (Sanchez et al. 1997).

Ha	1	-----KAVPPFED--ADLVQTLGEGANGEVQLAVNRVT--ERAIAVNRVDNR-----RAMDCCP
Dm	1	MAATLTEAGTGPAATREYVIG--ATLQTLGEGANGEVQLAVNRQT--GGGCGNRKVDLR-----KATDAA
Ce	1	MSAASTTSTPAAAANVAPQQP--SLYRVVQTLGEGANGEVQLAVNTEKNEVARAKRSEIN--AN-----KSKQFI
Sp	1	-----AAQKLEHFFPH--GREGGTGAPASVQL--CYDDNA--KRYAVKFWNRKQIATSCMRAQVWA
Ha	50	ENIKKEICIKMLN---NENVVVFYQGRREGNIQVLFLEYCSGGELFDRIEPDQMPPEPAQR--FSDLMAG
Dm	63	NSVRKEKCLQRMNQ---DNEERFFQKRSQSSVYLFLFYLAAGGELFDRIEPDVGMPPQNAQR--YFQQLSSG
Ce	67	ENIKKEIKLQKRVSAVGNRNVIRNIG--RQFP--NYLFLEYADGGELFDKIEPDSGMSPFVAQFYERQLCCG
Sp	54	RRVASEIQKELCN---GNKNIHFYNTAENPQR--VWLEFAVGGGLPDKIEPDSGDEVAQFYFAQLNSG
Ha	118	VYTLH--GIGTNRDIRKPENLLLDENDNLKISDFGLATVFRY--NRERLLNRKCGTLPYVAPPELLKRE--SH
Dm	131	QNYTLH--QKGAHRDIRKPENLLLDENDNLKISDFGLATVFRY--GKERLLDRKCGTLPYVAPPELLQAY--Q
Ce	138	IKKPIH--DNDYHRDIRKPENLLLTGTEVYKISDFGLATVFRY--GKERLLDLSCGTLPYVAPPELLCAG--YR
Sp	125	IQKGMH--SIGTAHRDRKPENLLLDYGNLKISDFGLATVFRY--GKERLLNSPVGSPYVAPPELLTQQYD---
Ha	186	ASPVDVNSCGIIVL--AMLAGELPNDQPSDSCQEYSDWKEXVYLN--DNEKIDGADLALLKILV--NDSAR
Dm	198	QPA--DLWNSCGIIVL--AMLAGELPNDQPSCHCTE--TNRWQNDHWQLQTPWKKIDVIA--SLLRKILATSPQTR
Ce	206	GPVDVNSGIVL--AMLTGELPNDRASDA--QSYGMI--STVGLDER--PNEKIDVRLCLLRKIVT--KTKRRA
Sp	191	GSNVDVNSCGIIL--FALLGNTPWDEAISNGGTYL--LKKK--CERPS--HWNL--SPQAY--STVGLRSD--PKRY
Ha	255	TVDIENRDMYRSP--KKGAKRFRVTSQVSES--SDFSKKIQSMLDVS--PNSA--SE--NRY--YSSQ--PFRQGI
Dm	270	TVEKTLDRK--CYNQFADNERSYDLEDSAA--LEKICSPK--KQRLQSSAN--SNGLD--SIS--NYC--SQP--PHRT
Ce	277	TIEQIQADPMYDH-----NFGQV--EFPNRPLK--RARN-------EN--CTQ--QAC--CAK
Sp	262	SKKSVQRPWLTSSSTFRTE--NFCADPV--LASR--MLK--L--DLD--KPL--SSRA--GND--SG--SCTQ--PA--KEND
Ha	326	SLMDTSP--SIDKLV-----DGLSFSQPTCFDMLLNSQLGTP--SSQNP--QRLV--
Dm	341	DDDFNVRLGSGR--Q-----GGWRRPQTLAQEARLSYSFSQPALD--DLLL--AT--G--NQT--CA--SONY--QRLV--
Ce	335	RR--ELETPEKSSLAER-----QNASFSQPTK--D--LLLT--G--D--MS--QMS--NLLQ--R--VC
Sp	332	QNELDR--EVY--GLSQPV-----QLK--KIDVTEI--K--K--P--S--Q--V--C--E--R--G--H-----MRLK--
Ha	376	R-----NTRFFTR--DDDRK--YQ--CLKETCEK--GY--KK--CK--QV--T--ST--DR--R--K--L--I--F--K--V--N--L--E
Dm	405	R-----NTRFFVTR--ND--TI--K--RLV--GT--I--R--L--G--Y--C--K--F--G--D--G--V--T--V--S--T--V--D--R--Q--K--L--V--P--E--N--I--E
Ce	374	R-----NTRFCVV--T--R--S--Y--Q--V--A--R--A--S--E--N--G--E--G--L--E--D--D--Y--R--L--V--W--E--V--S--M--H--V--S--L--T--G--D--I--P
Sp	371	RAKNEYEICPP--E--R--T--F--Y--S--I-----A--S--R--E--T--I--D--H--L--D--S--L--R--L--A--S--V--M--K--Y--V--E--L--Q--T--L--Y--V--H--E
Ha	433	MDKIL-----VDFRLSKG--DGL--E--F--K--R--F--K--I--G--L--D--I--V--S--K--V--M--L--P--A--T-----476
Dm	463	MDKIL-----VDFRLSKG--DGL--E--F--K--R--F--K--I--G--L--D--I--V--S--K--V--M--L--P--A--T-----513
Ce	431	D--P--R--V--I-----VDFRS--G--D--G--L--E--F--K--R--F--K--I--G--L--D--I--V--S--K--V--M--L--P--A--T-----479
Sp	440	K--K--C--L--L--Q--V--L--E--T--D--E--G--N--L--E--L--E--P--I--K--R--G--D--L--E--R--R--V--F--A--V--V--S--K--P--I--V--L--D--V--S--Q--N-----496

Abb. 3: Abbildung 3 zeigt einen Abgleich von Chk1 Homologen. Übereinstimmungen in den Aminosäuren werden schwarz dargestellt. Änderungen in der Konservierung werden als graue Boxen dargestellt. HS steht für Homo sapiens, Sp steht für *S.pombe*, Ce steht für *C.elegans* und Dm für *D.melanogaster*. Die DNA Sequenz für ceChk1 hat einen *frame-shift* im COOH-Terminus (Abbildung aus Sanchez et al. 1997).

Erst kürzlich wurde ein weiterer regulatorischer Mechanismus für die Chk1 Kinase entdeckt. Circa 20% des in der Zelle befindlichen Chk1 liegt während aller Zellzyklusphasen chromatingebunden vor (Smits et al. 2006). Eine schnelle Dissoziation des Chk1 Proteins vom Chromatin scheint die Zellzyklusantwort zu fördern. Die Dissoziation korreliert direkt mit der Phosphorylierung von Chk1 durch

die PIKK. Die Untersuchungen legen nahe, dass die Phosphorylierung von Chk1 an Ser317, aber nicht an Ser345 die Dissoziation des Chk1 vom Chromatin triggern kann. DNA Schäden, wie z.B. durch UV Licht hervorgerufen, können also die Dissoziation von Chk1 vom Chromatin veranlassen. Es wird angenommen, dass Chk1 nicht stabil mit Chromatin assoziiert ist, sondern durch einen bisher unbekanntem Faktor an das Chromatin gebunden wird. Da die Dissoziation von Chk1 vom Chromatin deutlich mit seiner Phosphorylierung korreliert, wird vermutet, dass die Lokalisation am Chromatin essentiell ist für eine effektive Verteilung von Chk1 im Kern, um nukleäre Zielproteine schnell und effektiv erreichen zu können. Weiterhin könnte die Chromatinbindung dazu dienen, Chk1 in räumlicher Nähe zu ATM und ATR zu positionieren, (ATR ist während der S-Phase ebenfalls chromatinassoziiert) und es somit in die Nähe der DNA Schädigung zu bringen und ATR eine Phosphorylierung von Chk1 zu ermöglichen (Niida et al. 2007).

Chk1 besitzt eine wichtige Funktion in der frühen Embryogenese. Chk1 *Knock-out* Mäuse (Chk1 $-/-$) sind embryonal letal. Chk1 $-/-$ Blastozysten sterben nach kurzer Zeit in Kultur und zeigen einen Phänotyp, ähnlich dem einer mitotischen Katastrophe (Zhou et al. 2003). Die Mitotische Katastrophe bezeichnet den Zelltod durch abberante Mitose. Chk1 erfüllt eine essentielle Rolle bei der Kontrolle der DNA Replikation, was in ursächlichen Zusammenhang zur fehlerhaften Mitose stehen könnte. Des Weiteren verlieren die Zellen die Fähigkeit den Übergang von der G2 zur M Phase zu kontrollieren und das Eintreten in die Mitose bei unvollendeter DNA-Synthese zu verhindern. Dies weist darauf hin, dass Chk1 nicht nur durch genotoxischen Stress aktiviert wird, sondern auch als ein intrinsischer Kontrollpunkt agieren kann. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch Versuche, bei denen herausgefunden wurde, dass Chk1 auch in Abwesenheit von exogener DNA-Schädigung phosphoryliert und aktiviert werden kann. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Chk1, zusätzlich zur Funktion als Regulator des Zellzyklus und der essentiellen Rolle in der Embryogenese (Shimuta et al. 2002), eine wichtige Funktion bei der Replikation der DNA während der S-Phase des Zellzyklus spielt. Chk1 interagiert mit Claspin (Chini et al. 2004,

2006), ein Protein, welches mit der Replikationsgabel assoziiert ist. Es wird angenommen, dass Chk1 bereits in der Replikationsgabel vorhanden ist oder während der Replikation rekrutiert wird, um die diese zu stabilisieren, bevor sie beispielsweise beschädigt oder blockiert wird.

Es ist möglich, dass diese Rolle von Chk1 ein Teil des intrinsischen Kontrollpunkt ist, der fortlaufend während jedes Zellzyklus aktiv ist. Diese Funktion könnte auch die essentielle Rolle von Chk1 während der Embryogenese erklären (Takei et al. 2000).

1.1.1.3.2 Chk2

Trotz der annähernd gleichen Funktion wie Chk1 in der DNA-Schadensantwort, besitzen beide Kinasen eine deutlich unterschiedliche regulatorische Domäne. Die humane Chk2 Kinase gehört ebenfalls zur Klasse der Serin/Threonin Kinasen und hat ein Molekulargewicht von ~62kDa (543 Aminosäuren).



Abb. 4: Eine schematische Darstellung der Wildtyp (WT) Chk2 Kinase. Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen strukturellen Elemente der Chk2 Kinase. SQ/TQ bezeichnet eine Serin/Glutamin reiche Region von Aminosäure 19-68 im N-terminalen Bereich der Kinase. Es folgt die FHA Domäne (AA113-192). Es schließt sich eine circa 266 Aminosäuren lange Kinasedomäne im C-terminalen Bereich (aus Chuen-Pei et al. 2004).

Abbildung 4 zeigt die, ebenfalls wie Chk1, stark konservierte Chk2 Kinase. Im N-terminalen Bereich der Kinase, von Aminosäure 19-68, befindet sich eine regulatorische SQ/TQ reiche Domäne. Das in dieser Domäne liegende Thr68 wird nach Doppelstrangbrüchen durch die PIKK Kinase ATM phosphoryliert. Diese Aktivierung führt zur Aktivierung weiterer nachgeschalteter Proteine wie p53, Cdc25A/C, BRCA1, E2F1 (Bartek and Lukas, 2003). Von Aminosäure 113-192

schließt sich eine FHA (*forkhead-associated*) Domäne an. Diese Domäne vermittelt häufig Proteininteraktionen durch Bindung phosphoproteinspezifischer Regionen (Bartek et al. 2001). Die sich anschließende Kinase Domäne von Aminosäure 220-486 ist stark in allen Organismen konserviert.

1.1.1.4 Effektorproteine

Zu den den Effektorproteinen zählen im Menschen die drei Phosphotyrosinphosphatasen Cdc25A, -B und -C. Sie dephosphorylieren die Cyclin-abhängige Kinase, die einen wichtigen Regulator des Zellzyklus darstellt. Die Phosphorylierung der Cdc25 Proteine durch Kontrollpunkt-Kinasen wie Chk1 und Chk2 kreiert Bindestellen für das 14-3-3 Protein. Durch die Phosphorylierung wird die Cdc25 Phosphatase degradiert oder aus dem Kern ausgeschlossen. Ist das Cdc25 Protein nicht phosphoryliert, so dephosphoryliert die Phosphatase das Cdk2 Protein an Tyr15. Diese inhibitorische Phosphorylierung ist für den Arrest der Zelle am G1/S und G2/M Übergang verantwortlich. Wird das inhibitorische Tyrosin von Cdk2 in der G1/S-Phase entfernt, so kann der Übergang der Zelle von der G1-Phase zur S-Phase weiter voran schreiten. Das gleiche gilt für die dephosphorylierung des Cdc2 Proteins in der G2/M Phase (Bartek et al. 2001).

1.2 Die Rolle der Chk1 Kinase als Zellzykluskontrollpunkt

1.2.1 Der Zellzyklus

Während der Proliferation wächst eine Zelle und verdoppelt ihr Erbgut. Dieser Prozess wiederholt sich mit jedem Zellzyklus. Der Zellzyklus wird in unterschiedliche Phasen eingeteilt. Er setzt sich aus der Interphase (Zwischenphase), sowie der Kern- und Zellteilungsphase (Mitose und Zytokinese) zusammen. Die Interphase wird wiederum in 3 Phasen untergliedert: (1) Die G1-Phase (für engl. „*gap*“, Lücke) bezeichnet die Phase zwischen dem Ende der

Mitose (postmitotisch) bis zum Beginn der S-Phase (Präsynthese-Phase) hier werden u.a. Zellorganelle repliziert. Ausdifferenzierte Zellen treten in die Ruhephase (G₀) ein, andere setzen den Zellzyklus weiter fort. (2) Die S-Phase (Synthese-Phase), in der das genetische Material repliziert wird und die Synthese der Histone stattfindet. (3) Die G₂-Phase bezeichnet den Zeitraum zwischen Ende der S-Phase bis zum Beginn der Mitose (Prämitotische-Phase oder Postsynthesephase), währenddessen mitose-spezifische Proteine synthetisiert werden. Während der Mitose findet sowohl die Chromosomenteilung als auch die Auflösung der Kernmembran und die Teilung des Kerns, sowie auch die Teilung der kompletten Zelle statt.

Wird während einer dieser Phasen das Erbmateriale geschädigt, ist die Zelle in der Lage, im Zellzyklus arretieren. Dies geschieht durch komplexe Prozesse, welche die Schäden in der DNA „*checken*“, den Zellzyklus gegebenenfalls arretieren und über ein Netzwerk verschiedener Signaltransduktionswege die Schädigung auch reparieren. 1988 wurde hierfür der Begriff der „*Checkpoint Kontrolle*“ eingeführt (Hartwell et al. 1988).

Die Funktion der Zellzykluskontrollpunkte geht allerdings weit über den Zellzyklusarrest hinaus. Es wurde gezeigt, dass diese Kontrollpunkte sowohl in die Kontrolle der Aktivierung von DNA Reparaturmechanismen, (Cortez et al. 1999, Lim et al. 2000, Gatei et al. 2000, Zhao et al. 2000, Wu et al. 2000) als auch in die Anordnung des telomeren Chromatins und der Bewegung von DNA Reparaturproteinen zu geschädigten DNA Strängen involviert sind. (Martin et al. 1999, Mills et al. 1999). Des Weiteren wird ihnen eine Funktion bei der Aktivierung der Transkription (Elledge et al. 1996) und der Induktion des Apoptose Signaltransduktionsweges (Xu et al. 1996, Hirao et al. 2000) zugesprochen.

Einige der bedeutendsten Kontrollproteine des Zellzyklus sind die stark konservierten, zu der Familie der Serine/Threonin Kinasen gehörenden, Cyclin-abhängigen Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDK). Zur Aktivierung benötigen sie regulatorisch wirksame und zyklisch exprimierte Cycline, mit denen sie im Komplex aktiv werden. Die Konzentration der verschiedenen Cycline verändert sich im Zellzyklus. Sie steigt z.B. während der Interphase (G₁, S, G₂) und fällt

während der Mitose rapide ab. Die verschiedenen Zellzyklusphasen werden von unterschiedlichen Cyclin/CDK Komplexen reguliert. Die Aktivierung dieser Komplexe wird durch reversible Phosphorylierung reguliert (Connell-Crowley et al. 1993).

1.2.1.1 G1/S Kontrollpunkt

Durch Inhibition der Initiierung der Replikation verhindert der G1/S Phase Zellzykluskontrollpunkt das Eintreten der Zelle in die Synthese Phase bei vorhandener DNA-Schädigung. Der G1/S Kontrollpunkt ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Am Ende der G1 Phase liegt der Restriktionspunkt, welchen proliferierende Zellen überschreiten, um in die S-Phase einzutreten. Ist die DNA geschädigt, so wird der Eintritt in die S-Phase verhindert, unabhängig davon, ob der Restriktionspunkt bereits überschritten ist. Nach bisherigem Wissensstand läuft die G1/S Phasen Kontrolle folgendermaßen ab:

Findet z.B. durch ionisierende Strahlung ein DNA-Doppelstrangbruch statt, so wird ATM aktiviert, dies phosphoryliert wiederum viele nachfolgende Zielproteine, wie z.B. p53 und Chk2. Diese Reaktion resultiert in der Aktivierung von zwei Signaltransduktionswegen: Einer um den G1/S-Phase Arrest zu initiieren, der andere, um ihn aufrecht zu erhalten (Bartek et al. 2001). Die Reaktion, welche die Initiierung des G1/S Arrest steuert, läuft über die Phosphorylierung des Chk2 Proteins. Im weiteren Verlauf fungiert Cdc25A als Regulator des S-Phasen Arrest indem der Cdk2-CyclinE Komplex (S-Phase) targetiert wird. Aktiviertes Chk2 phosphoryliert Cdc25A an unterschiedlichen Aminosäureresten (Ser76, Ser124, Ser178, Ser279 und Ser293), was zur Ubiquitin-vermittelten Degradation führt. In Abwesenheit des Cdc25A Proteins kann die inhibitorische Tyrosinphosphorylierung am Tyr15 des Cdk2/Cyclin E Komplexes nicht mehr entfernt werden. Somit arretiert der Zellzyklus in der G1 Phase, ein Übergang in die S-Phase ist nicht mehr möglich (Xiao et al, 2003). Im Fall einer UV-induzierten DNA-Schädigung wird dieses Signal durch ATR, RAD17/RFC und den 9-1-1 Komplex

detektiert, ATR wird aktiviert und es kommt zur Phosphorylierung von Chk1 an Ser345 und Ser317. Das aktivierte Chk1 phosphoryliert Cdc25A an unterschiedlichen Resten, was wiederum, wie die Phosphorylierung durch Chk2, zum G1 Arrest führt. Unabhängig davon, ob der initiale Arrest mittels des ATM-Chk2-Cdc25A Weges oder des ATR-Chk1-Cdc25A Weges initiiert wurde, folgt dieser initialen Reaktion eine Stabilisierungsphase. Um den Zellzyklusarrest aufrecht zu erhalten, wird p53 direkt von ATM und ATR an Ser15 phosphoryliert. Chk1 und Chk2 phosphorylieren p53 an Ser20. Die proteasomale Degradation von p53 wird verhindert und es kommt zu einem Anstieg von p53. P53 wiederum aktiviert die Expression weitere Zielproteine, insbesondere die des Zellzyklusinhibitors p21, welches verschiedene Cdk2/Cyclin Komplexe inhibieren kann (Bartek et al. 2001).

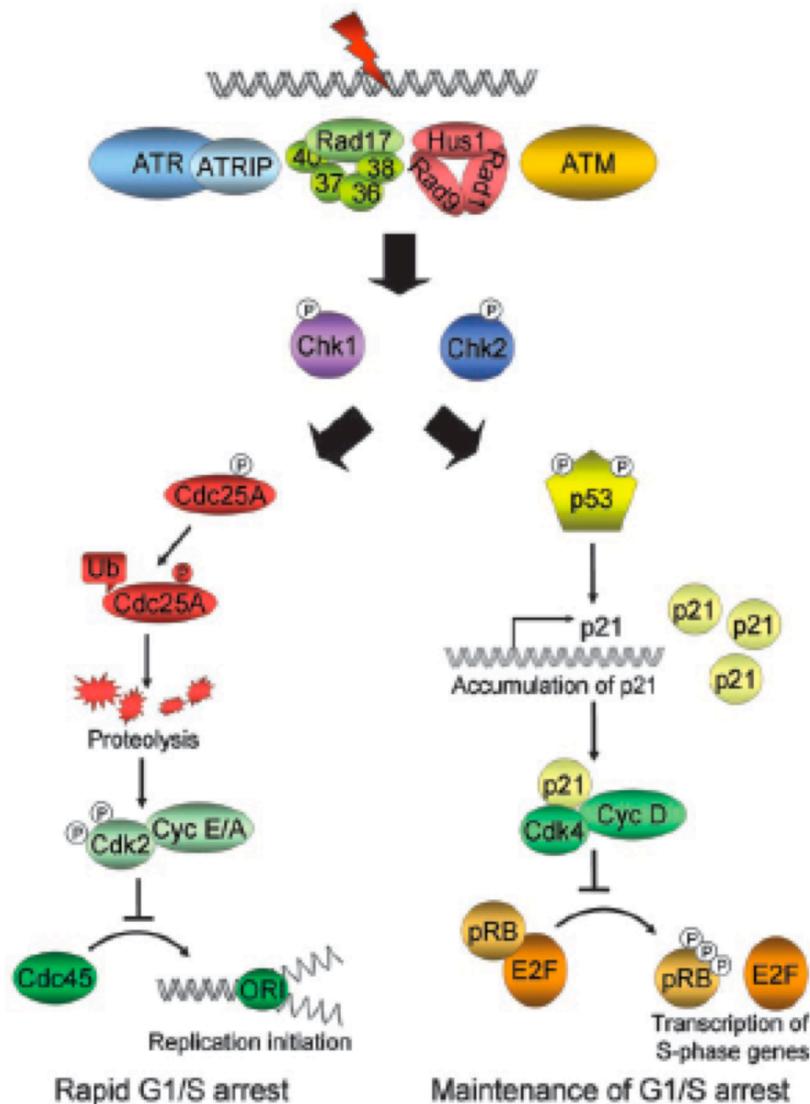


Abb. 5: Der G1/S Kontrollpunkt. Die DNA Schädigung wird durch ATM nach Doppelstrangbrüchen oder durch ATR, Rad17-RFC oder durch den 9-1-1 Komplex nach UV-Schädigung detektiert. ATM/ATR phosphorylieren Chk2/Chk1, die wiederum Cdc25A phosphorylieren. Dies führt zu Ubiquitin vermittelter Degradation des Cdc25A Proteins. Phosphoryliertes und inaktives Cdk2 akkumuliert und kann Cdc45 nicht phosphorylieren, um die Replikation zu starten. Der Erhalt des G1/S Phase Arrests wird durch p53 erreicht, welches durch ATM/ATR an Ser15 und durch Chk1/Chk2 an Ser20 phosphoryliert wird. Die Stabilisierung und Aktivierung von p53 induziert die p21^{WAF-1/Cip1} Transkription, welches wiederum an den Cdk4/CyclinD Komplex bindet und den G1/S Phasen Arrest aufrecht erhält (aus Sançar et al. 2004).

1.2.1.2 Intra-S-Phase Kontrollpunkt

Wird DNA während der S-Phase beschädigt oder tritt beschädigte DNA nach dem G1/S-Phase Kontrollpunkt in die S-Phase ein, so wird der Intra-S-Phase Kontrollpunkt aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einem Block in der Replikation. Der Intra-S-Phase Kontrollpunkt wird bei Doppelstrangbrüchen durch ATM reguliert. ATM triggert zwei parallel laufende Kaskaden, um replikative DNA Synthese zu inhibieren. Die Mediatoren MDC1, H2AX und 53BP1 sind notwendig, damit Chk2 am Thr68 durch ATM phosphoryliert wird (Costanzo et al. 2000). Dies führt wiederum zur ubiquitin-vermittelten Degradation der Cdc25A Phosphatase. Die Abwesenheit der Phosphatase blockiert den S-Phase fördernden Cdk2/Cyclin E Komplex. Replikationsproteasen wie Cdc45 können nicht in lokale Nähe der Replikationsgabel gebracht werden kann, um die Replikation zu starten. Der zweite Weg der Kaskade führt zu einer Phosphorylierung des NBS1 Proteins des Mre11/Rad50/Nbs1 Komplexes, sowie zu Phosphorylierung von SMC1 durch den Komplex und zur Phosphorylierung von BRCA1 und FANCD2 durch ATM (Lee et al 2004).

Die Aktivierung durch ATR findet nach DNA Schädigung durch UV-Strahlung statt. Das ATR-ATRIP Heterodimer wird aktiviert, ATR phosphoryliert Chk1. Das aktivierte Chk1 phosphoryliert Cdc25A und der Cdk2/Cyclin E Komplex wird gehemmt.

1.2.1.3 G2/M Kontrollpunkt

Als finaler *gatekeeper*, der den Eintritt von Zellen mit defekter DNA in die Mitose verhindert, agiert der G2/M Kontrollpunkt. Abhängig von der Art der Schädigung der DNA, wird entweder der ATM-Chk2-Cdc25 oder der ATR-Chk1-Cdc25 Signaltransduktionsweg aktiviert, um die Zelle in der G2-Phase zu arretieren (Zhao et al. 2001). Die schematische Darstellung des G2/M Kontrollpunkts ist in Abbildung 5 dargestellt. Die primäre Aktivierung des ATM-Chk2

Signaltransduktionsweges findet wie bei anderen Kontrollpunkten durch ionisierende Strahlung geschädigte DNA statt, während der ATR-Chk1 Signaltransduktionsweg durch Replikationsschäden aktiviert wird (Uto et al. 2004). Das Aufrechterhalten des G2/M Arrests findet durch den ATM-Chk2 Signalweg statt (Abraham et al. 2001).

Der Eintritt der Zelle in die Mitose wird durch Inaktivierung der Cdc25 Phosphatase und Hochregulation der Wee1 Proteinkinase über die Blockierung des Cdc2/Cyclin B Komplexes verhindert (Yarden et al. 2002). Wee1 ist eine Tyrosinkinase, welche Cdc2 am Tyr15 phosphoryliert, die Kinase so hemmt und das Fortschreiten der Zelle in die Mitose aufhält. Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass nicht, wie anfänglich angenommen, die Cdc25C Isoform der Cdc25 Phosphatase der Effektor des G2/M Kontrollpunktes ist, sondern die Cdc25A Isoform (Abbildung 4). Überraschenderweise war in Cdc25C (-/-) *knock-out* Zellen der Maus der G2/M Kontrollpunkt intakt (Chen et al. 2001). Im Gegensatz dazu führt das Aussetzen des Chk1-Cdc25A Signaltransduktionsweges zur Aufhebung des S- und G2-Kontrollpunktes. Dies führt zu der Annahme, dass nicht nur Cdc25C eine zentrale Phosphatase des G2/M Kontrollpunkt ist, sondern auch die Isoform Cdc25A (Zhao et al. 2002).

Die Phosphorylierung von Cdc25A an Ser75 und Ser123 durch Chk1 kreiert Bindungsstellen für 14-3-3 Proteine, komplexgebundenes Cdc25A kann nicht in den Kern eintreten (Sanchez et al. 1997, Peng et al. 1997). Die Inaktivierung der Phosphatase durch ubiquitin-vermittelte Degradation führt zur Akkumulation des an Tyr15 phosphorylierten Cdc2 und somit zum mitotischen Arrest. Cdc25A hat die Aufgabe den mitotischen Regulator Cdk1 (Cdc2/Cyclin B) am Tyr15 zu dephosphorylieren. Diese inhibitorische Tyrosin Phosphorylierung verhindert das Fortschreiten des Zellzyklus. Der Zellzyklus arretiert in der G2 Phase (Uto et al. 2004). Der identische Mechanismus wurde für die Cdc25C Isoform beschrieben. Chk1 phosphoryliert Cdc25C an Ser216. Die gleiche Signalkaskade, wie bei der Isoform Cdc25A, wird initiiert. Das von Chk1 phosphorylierte Substratmotiv innerhalb der Isoform Cdc25C und Cdc25A ist sehr ähnlich: Cdc25C (RSGLYRSPS²¹⁶MPENL), Cdc25A (CSPLKRS¹²³SHS¹²³DSL¹²³LDH) (Neill et al. 2002).

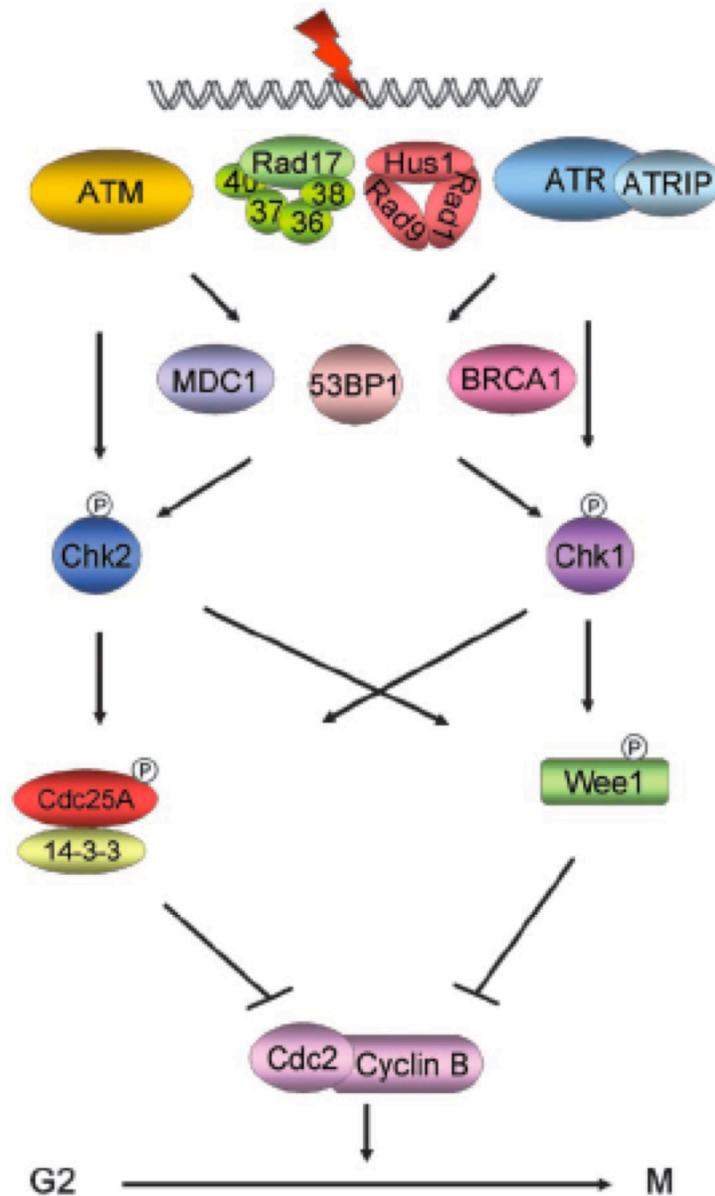


Abb. 6: Der G2/M Kontrollpunkt. Durch DNA Schädigung wird entweder ATM nach Doppelstrangbrüchen oder ATR-ATRIP, Rad17-RCF und 9-1-1 nach Schädigung durch UV-Licht zur geschädigten DNA rekrutiert. Mediator-Proteine wie MDC1, BRCA1 und/oder 53BP1 sind an der Übertragung des Signals zu Chk1 und Chk2 beteiligt. Chk1 und Chk2 phosphorylieren wiederum Wee1 und Cdc25A der Cdc2/Cyclin B Komplex wird gehemmt und somit die Zelle in der G2-Phase arretiert (aus Sancar et al. 2004).

1.3 DNA-Schäden

Wie zuvor beschrieben entwickelte die Evolution eine Serie von möglichen Überlebenswegen in der Zellzyklusmaschinerie, um sicherzustellen, dass Zellen eine exakte fehlerfreie Kopie ihres Genoms an die Tochterzelle weitergeben. Diese Mechanismen überwachen die Struktur der Chromosomen und koordinieren Reparatur der DNA und das Fortschreiten des Zellzyklus.

Die verschiedenen möglichen Arten von DNA-Schäden und die entsprechenden Reparaturmechanismen sollen hier näher beschrieben werden.

Man kann die Art der DNA Schäden in 4 Klassen unterteilen:

1. Oxidation (DNA-Strangbrüche)
2. Alkylierung (Methylierung, Anhängen einer Methylgruppe)
3. Hydrolyse (Desaminierung, Depurinierung)
4. *Mismatch* (falsche Base an falscher Stelle)

1. Der Hauptauslöser für DNA-Schäden durch Oxidation sind freie Hydroxylradikale, die z.B. als Nebenprodukt in der Atmungskette entstehen können. Hierbei können einzelne DNA Basen oder auch das Zucker-Phosphat-Rückgrats geschädigt werden.

2. In Eukaryonten werden durch Methyltransferasen Methylgruppen an Cytosin oder Adenin kovalent gebunden, was eine falsche Kodierung zu Folge hat. In Prokaryonten hingegen ist die Methylierung ein wichtiger Mechanismus im Rahmen der Genexpression. Durch die Methylierung kann die zelleigene DNA von Fremd-DNA unterschieden werden.

3. Die Hydrolyse beschreibt eine spontane chemische Reaktion. Bei der Desaminierung entsteht durch Abspaltung einer Amino-Gruppe eine andere Base,

wohingegen bei der Depurinierung die komplette Base vom Zucker abgespalten wird.

4. Verbleibt eine falsches Nukleotid in der DNA, zu kommt es zu Basenfehlpaarungen, den so genannten „*mismatches*“.

1.4 DNA Reparatur

Die an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine könne in folgende funktionale Hauptgruppen unterteilt werden.

1. *Damage Reversal* (Schadenreversion)
2. *Base Excision Repair* (BER), Basenexzisionsreparatur
3. *Nucleotide Excision Repair* (NER), Nukleotidexzisionsreparatur
4. *Mismatch Repair* (MMR) (Postreplikative Reparatur, Basenfehlpaarungsreparatur)
5. Homologe Rekombination (*homologous recombination*, HR) und Nicht-Homologe Rekombination (*non-homologous end-joining*, NHEJ)

1.4.1 Damage Reversal

Die direkte Entfernung und der Austausch einer falschen Base ist ein einfacher Reparaturmechanismus. Hierbei bleibt das Zucker-Phosphat Rückrad unbeschädigt. Bei dieser Art der Reparatur wird keine Matrize benötigt. Die häufigste spontane Mutation ist die Alkylierung. Diese resultiert in der Addition einer Methylgruppe. Häufig wird hierbei eine Methylgruppe zu einem Cytosin hinzugefügt, woraufhin oft eine Deaminierung zu einem Thymin folgt. Diese Mutationen werden repariert, indem das falsch gepaarte Thymin im Doppelsestrang gegen Cytosin ausgetauscht wird.

Dieser Prozess ist nicht sehr effektiv, worin ein großes Problem des *Damage Reversal* Mechanismus liegt. Für jede Veränderung einer Base muss ein spezieller Reparaturmechanismus vorliegen. Vorteilhafter für die Zelle wäre somit ein generellerer Mechanismus, der imstande ist alle Arten der chemischen Schädigung zu reparieren. Dieser Mechanismus ist der *Base Excision Repair* (Basenexzisionsreparatur, BER).

1.4.2 Basenexzisionsreparatur (*Base Excision Repair*, BER)

Den Hauptreparaturweg für einzelne Basenveränderungen, wie z.B. alkylierte oder deaminierte Basen ist der Basenexzisionsreparaturweg (BER) (Slupphaug et al. 2003). In den BER involvierte Proteine sind Glykosylasen, welche z.B. durch ionisierende Strahlung oxidierte, reduzierte oder fragmentierte Nukleotide herausschneiden und ersetzen. Basenschäden, welche die Basenpaarung in DNA Doppelhelix nicht beeinflussen z.B. 3-Methyladenine (3-meA) werden in einem mehrstufigen Prozess durch eine spezifische Glykosylase repariert (Krokan et al. 2000). Hierbei besteht die Möglichkeit dies, in Abhängigkeit von der Anzahl der geschädigten Basen, auf zwei unterschiedlichen Wegen zu tun. Beim *short-patch-way* wird ein einzelnes Nukleotid ausgetauscht, beim *long-patch-way* hingegen werden 2-8 Nukleotide ausgetauscht (Fortini et al. 1998).

Glykosylasen in Säugerzellen haben im Gegensatz zu den *E. coli* Glykosylasen, N-terminale Verlängerungen, die eine sehr wichtige Funktion bei der Interaktion mit anderen in den BER involvierten Glykosylasen spielen. Glykosylasen sind in der Regel kleine monomere Proteine, die N-Glykosylische Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphat Rückrad hydrolysieren. Sie können mono- oder bifunktionell sein. Zu den Monofunktionellen Glykosylasen zählt z.B. die Uracil-DNA-Glykosylase (UNG) und die N-Methylpurine-DNA-Glykosylase (MPG). Zu den bifunktionalen Glykosylasen gehört u.a. die 8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase, OGG1, die oxidierte Purine entfernt. Bifunktionale Glykosylasen haben neben der Glykosylaseaktivität auch Lyase Aktivität, um das

Phosphodiester Rückgrat 3' zur AP Stelle zu schneiden (Scharer und Jiricny, 2001). AP-Stellen sind apurinische bzw. apyrimidinische Stellen, welche bei der Hydrolyse einer N-glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose entstehen.

1.4.3 Nucleotide Excision Repair (Nukleotidexzisionsreparatur, NER)

Sowohl beim BER als auch beim NER dient der Komplementärstrang als Vorlage für die Reparatur des geschädigten DNA-Strangs. Der NER Weg kommt bei der Entstehung von Pyrimidin-Dimeren und anderen DNA-Addukten zum Einsatz, die z.B. durch UV-Schädigung entstehen können (de Laat et al. 1999). In Eukaryoten ist der NER Weg ein sehr komplexer Reparaturmechanismus, er stellt das primäre Abwehrsystem gegen exogene Mutationen dar. Viele Proteine sind an dem NER beteiligt, davon allein sieben verschiedene *Xeroderma Pigmentosum* Proteine bei deren Mutation es zu Symptomen des Xeroderma Pigmentosa kommt. Des Weiteren sind Proteine wie HR23 (human homolog of yeast RAD23) in den NER Weg involviert.

Es existieren zwei unterschiedliche Wege des Nukleotidexzisionreparaturweges (NER). Die beiden Wege unterscheiden sich in der Schadenserkennung. Der *Global Genome Repair* (GGR) behebt Schäden in transkriptionsinaktiven Bereichen, der *Transcription Coupled Repair* (TGR) behebt Schäden in transkriptionsaktiven Bereichen nach Blockierung der RNA Polymerase II (RNA Pol II). Der NER läuft generell immer nach dem gleichen Prinzip ab: (1) Die DNA Schädigung wird erkannt, (2) Separation der Doppelhelix an der geschädigten Stelle, (3) Schneiden des geschädigten Einzelstrangs beidseitig der Läsion, (4) Ausschneiden des die Läsion enthaltenen Einzelstrangfragments, (5) DNA Synthese um die Lücke zu schließen und (6) Ligation des verbleibenden Einzelstrangbruchs (Wood et al. 1997).

1.4.4 Mismatch-Reparatur

Die Aufgabe der *mismatch*-Reparatur besteht darin, Basensubstitutionen und *frameshift mismatches* postreplikativ zu entfernen. Auch hier existiert ein *long-patch* und ein *short-patch* Mechanismus. Der *long-patch* Weg repariert alle Typen von Fehlpaarungen, primär jedoch replikationsassoziierte Fehler. Über diesen Weg besteht die Möglichkeit einige Kilobasen lange Fragmente herauszuschneiden. Spezifische Schäden von circa 10 Nukleotiden, die das Genom betreffen werden vom *short-patch* Weg repariert (Kolodner und Marsischky, 1999).

In *E.coli* ist dieser Reparaturweg gut charakterisiert. Essentiell hierfür ist die Differenzierung zwischen dem parentalen DNA-Strang und dem neusynthetisierten Tochterstrang. In *E.coli* findet dies durch Basenmethylierung statt. Bestimmte Adeninbasen werden zeitlich verzögert methyliert, wodurch der Tochterstrang durch die fehlende Methylierung eindeutig zu identifizieren ist. Die Basensubstitution oder der *frameshift* wird durch die Proteine MutS, MutH und MutL erkannt und der geschädigte Strang geschnitten. An der weiteren Prozessierung sind die unterschiedlichsten Proteine beteiligt. Menschen mit Mutationen in den zu MutS, MutH und MutL homologen Proteine in Mammalia MSH (MutS) und MLH (MutL) zeigen eine deutliche Prädisposition zu Krebs (Mihaylova et al, 2003).

1.4.5 Homologe Rekombination (*homologous recombination*, HR) und Nicht Homologe Rekombination (*non-homologous end-joining*, NHEJ)

Obwohl die Zelle sich an geringe Mengen irreparabler DNA Schäden adaptieren kann, ist wohl die gefährlichste Art der DNA Schädigung der Doppelstrangbruch (DSB), da es hierbei z.B. zur Deletion chromosomaler Regionen und somit zur Inaktivierung essentieller Gene. Auslöser eines DSB können u.a. exogene

Agencien wie ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika oder freie Radikale aus dem Zellstoffwechsel sein. Physiologisch werden DSBs generiert, um die Rekombination zwischen homologen Chromosomen während der Meiose zu initiieren. Des Weiteren treten sie als Intermediäre während V(D)J Rekombination (somatische Rekombination) bei der T- und B- Zellreifung auf.

Es existieren zwei getrennte und komplementäre Mechanismen zur Reparatur von DSB: „Homologe Rekombination“ (*homologous recombination*, HR) und „Nicht-Homologe Rekombination“ (*non-homologous end-joining*, NHEJ). Während NHEJ hauptsächlich Doppelstrangbrüche während der G1 und frühen S-Phase repariert, ist die HR primär während der S- und späten G2-Phase aktiv (Takata et al. 1998). Darüber hinaus findet die Homologe Rekombination hauptsächlich zwischen Schwesterchromatiden statt, die nur in der späten S/G2-phase präsent sind (Johnson und Jasin, 2000).

Die HR benötigt eine homologe Sequenz zur exakten Reparatur des DSB, wohingegen die NHEJ diese Matrize nicht benötigt und die Enden direkt ligiert. Die Fehlerrate hierbei ist sehr hoch, da es häufig zu Translokationen im Genom kommt, wenn die DNA an mehreren Stellen Doppelstrangbrüche aufweist. Unter anderem können Translokationen zu abberanter Genregulation und in Folge dessen auch zur Krebsentstehung beitragen.

1.5 Ziel der Arbeit

Wie einleitend beschrieben, besitzt die Chk1 Kinase eine Schlüsselrolle in der DNA-Schadensantwort. Ein detailliertes Verständnis dieser Kinase und deren zentrale Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus hilft, das Gesamtbild der Reaktion einer Zelle auf DNA-Schäden, insbesondere der damit verbundenen Signaltransduktion, besser zu verstehen.

Diese Arbeit verfolgte das Ziel, neue Interaktionspartner und auch potentielle Substrate der Chk1 Kinase zu identifizieren. Ein Ansatz, neue Substrate und Interaktionspartner zu identifizieren, bediente sich der biochemischen

Substratidentifikationsmethode KESTREL (*Kinase Substrate Tracking and Elucidation*), bei der mittels radioaktiver Kinase Assays und chromatographisch aufgereinigter und aufgetrennter Proteinfractionen, neue phosphorylierte Substrate identifiziert werden sollten.

Der weitere Ansatz dieser Arbeit nutzte die molekularbiologische Hefe-2-Hybrid Methode, um über Identifikation von Interaktionspartnern neue Signalkomponenten zu identifizieren. Anschließend an diese beiden Strategien sollten die potentiellen Interaktionspartner näher charakterisiert und untersucht werden.

2. Material and Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborzubehör

Agarosegel Kammern	BioRad
Analysewaage	Satorius
Bakterien Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific
Bioanalyzer (3100)	Applied Biosystems
Blockthermostat	Kleinfeld
Blotting-Kammer	BioRad
DNA Sequenzierer (<i>3100 Genetic Analyser</i>)	Applied Biosystems
Elektronische Pipetten (<i>Accujet</i>)	Brand
Elektroporationskammer (<i>E.coli-Pulser</i>)	BioRad
Filmentwickler	Agfa
<i>FrenchPress</i>	BioRad
FPLC (<i>ÄKTAprime™</i>)	Amersham Pharmacia
Gel Lufttrockner	BioRad
Gelelektrophorese <i>XCell SureLock™ Mini-Cell</i>	Invitrogen
Gelelektrophorese <i>XCell4 SureLock™ Midi Cell</i>	Invitrogen
Immunoblot Dokumentationssystem (<i>Versa Doc™</i>)	BioRad
Lichtmikroskop (Axiovert 25, AxioStar Plus)	Zeiss
Magnetrührer (MR3001K)	Heidolph
Mikroskop	Leika
Mikroskop, Fluoreszenz	Zeiss
Mikrowelle	Neff
Multipette	Eppendorf
Nanodrop	Peqlab
Netzgerät, Agarosegele (EPS601)	Amersham Pharmacia
Netzgerät, SDS-PAGE (<i>Power Pac 200</i>)	BioRad

PCR Maschine (<i>Gene Amp PCR System 9700</i>)	Applied Biosystems
pH-Meter (pH211)	HANNA
Pipetten	Eppendorf
Plattenlesespektroskop (Mithras LB940)	Berthold
Reinraumwerkbank	Heraeus
SDS-PAGE Kammer (NuPage)	Invitrogen
Tischzentrifuge	Eppendorf
Trockenbrutschrank	Memmert
Ultraschall Sonifizierer/Homogenisator (HD2070)	Bandelin
Ultrazentrifuge	Beckmann
UV-Dokumentationsystem	Syngene
Vortex Apparatur (VFC)	Janke & Kunkel
Zellkulturinkubator	Heraeus
Zell-Zählkammer (Neubauer Zählkammer)	Zeiss
Zentrifuge, Labor (RC5C)	Sorvall
Zentrifuge Zellkulturlabor (Omnifuge 2.0 RS)	Haereus

2.1.2 Software

Agarose Geldokumentation (<i>GeneSnapTM</i>)	Syngene
Bildbearbeitung (<i>Photoshop</i>)	Adobe
Datenverarbeitung (<i>Excel</i>)	Microsoft Office
DNA-Proteinanalyse	BLAST, FASTA, ClustalW, PFAM
DNA/Protein Sequenzanalyse (<i>EditSeqTM</i> , <i>MegAlignTM</i> , <i>SeqManTM</i>)	DNASTAR
Geldokumentation	Gene Tools
Immunoblot Dokumentation (<i>Quantity One[®]</i>)	BioRad
Oligonukleotiddesign (<i>PrimerSelectTM</i>)	Software Unicorn 3.0 DNASTAR

Primer-Design	Oligo 5.0
Proteinchromatographie FPLC	Amersham FPLC
Textverarbeitung (<i>Word</i>)	Microsoft Office

2.1.3 Laborchemikalien und Reagenzien

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP	Amersham Bioscience
Adenin-Hemisulfat	Sigma
Agar-Agar	Merck
Agarose	Invitrogen
Ampizillin	Applichem
Aprotonin	Sigma-Aldrich
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA), fraction V	Applichem
<i>CompleteTM Mini</i>	Roche
<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	Merck
Dextrose	Merck
DMSO	Applichem
dNTP Mix (10mM dNTP)	New England Biolabs
<i>Drop out Supplement -Leu</i>	Clontech
<i>Drop out Supplement -Leu/-Trp</i>	Clontech
<i>Drop out Supplement -Leu/-Trp/-His</i>	Clontech
<i>Drop out Supplement -Leu/-Trp/-His/-Ade</i>	Clontech
<i>Drop out Supplement -Trp</i>	Clontech
DTT (Dithiothreitol)	Merck
<i>ECL Western Blotting Detection Reagent</i>	Amersam Bioscience
Entwickler G153	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Fixierer G354	Agfa
FCS	PAN

Material und Methoden

<i>FuGene HD</i>	Roche
Glyzerol	Merck
Glyzin	Merck
<i>Herring Testes Carrier DNA</i>	Clontech
Hoechst 33342 (Bisbenzimid)	Merck
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Sigma
Isopropanol	Merck
Kalziumchlorid	Merck
Kanamyzin	Applichem
<i>Loading Dye Solution (6x)</i>	Fermentas
Lithim Acetat	Sigma
<i>LumiLight Western Blotting Substrat</i>	Roche
<i>LumiLight Plus Western Blotting Substrat</i>	Roche
Lysonase	Sigma
Lyticase	Clontech
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
<i>Minimal SD Base</i>	Clontech
<i>Minimal SD Agar Base</i>	Clontech
Natriumazetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Nonidet P40	Roche
<i>Novagen Pop Culture Reagent</i>	Novagen
Nuklease-freies Wasser	Promega
<i>NuPAGE[®] Laufpuffer (20x)</i>	Invitrogen
<i>NuPAGE[®] LDS Probenpuffer (4x)</i>	Invitrogen
<i>NuPAGE[®] Reducing Agent</i>	Invitrogen
<i>NuPAGE[®] MOPS/MES SDS Running Buffer</i>	Invitrogen
Polyethylen Glykol (PEG)	Clontech

Pepton	Merck
<i>Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II</i>	Calbiochem
Ponceau S	Merck
<i>Protease Inhibitor Cocktail Set III</i>	Calbiochem
<i>Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II</i>	Calbiochem
Salzsäure	Merck
S.O.C. Medium	Invitrogen
Sodium Dodecylsulfate (SDS)	Sigma-Aldrich
<i>Starting BlockTM</i> (PBS) Puffer	Pierce
TAE-Puffer (50x)	Invitrogen
Tris	Merck
TritonX-100	Merck
Tween-20	Merck
<i>Vectashield[®] Mounting Medium</i>	Vector Labs
Wasser für die Chromatographie	Merck
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Calbiochem
XT Reduzierungsagensz (20x)	BioRad
YPD-Medium	Clontech
YPD Agar Medium	Clontech

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

A/G Sepharose <i>beads</i> (50 μ l)	Amersham Bioscience
<i>Blotting Sandwiches</i> (Nitrozellulosemembran)	BioRad
Blotting Schwämme	BioRad
cDNA Bibliothek fetales Gehirn	Clontech
<i>ChromaSpin-1000-DEPC-H₂O</i>	Clontech
Elektroporationsküvetten	BioRad
Fotoentwickler und Fixierer	Physia GmbH
<i>Gene Pulser</i> Küvetten	BioRad

Glutathione Sepharose <i>beads</i> (50µl)	Amersham Bioscience
<i>GSTrap™ FF High Trap</i>	Amersham Bioscience
<i>Hering Testes</i> Träger DNA	Clontech
<i>Hyperfilm ECL</i>	Amersham Bioscience
Laborgefäße (15ml/ 50ml)	Becton Dickinson
<i>MonoQ 5/50 GL Säule</i>	Amersham
Multipette CombiTips	Eppendorf
<i>NuPAGE® Tris-Glycin Gele</i>	Invitrogen
Parafilm	Merck
PCR Standardgefäße	Biozyme
PD-10 Entsalzungsgefäße	Amersham Bioscience
Petrischalen für die Mikrobiologie	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf
Plastikpipetten	Costar
Reaktionsgefäße (1,5ml/ 2ml)	Eppendorf
RNAeasy Lösung	Invitrogen
RNAse freie Pipettenspitzen (<i>Safeseal Premium</i>)	Biozyme
Schraubdeckelröhrchen (15ml/50ml)	Falcon
<i>Slide-A-Liza</i>	Pierce
Sterile Filter	Nalgene
Steriflip® Sterile Filter (ExpressPlus Membran)	Milipore
Spritzen für die sterile Filtration	Terumo
Whatman 3MM Papier	Merck
Zellkulturschalen, -Platten, -Flaschen (Nuncleon™)	NUNC

2.1.5 Enzyme

DNA-Polymerase I (Klenow) (5U/µl)	New England Biolabs
<i>BP-Clonase</i>	Invitrogen
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs

<i>DpnI</i>	New England Biolabs
<i>LR-Clonase</i>	Invitrogen
<i>NotI</i>	New England Biolabs
Pwo-Polymerase (1U/μl)	PeqLab
<i>Pfu proof reading</i>	Stratagene
Trypsin-EDTA	Invitrogen
T4-DNA-Ligase (400U/μl)	New England Biolabs
<i>XmnI</i>	New England Biolabs

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primärantikörper

Antikörper	Verdünnungsfaktor	Organismus	Hersteller
Aktin	1:500 in TBST/5% Milchpulver	Hase	Sigma
Phospho-Chk1 (Ser296)	1:1000 in TBST/5% Milchpulver	Hase	Cell Signalling
Phospho-Chk1 (Ser345)	1:1000 in TBST/5% Milchpulver	Hase	Santa Cruz
Chk1 FL-476	1:500 in TBST/5% Milchpulver	Hase	Santa Cruz
MPG (M06)	1:200 in TBST/5% Milchpulver	Ziege	Imgenex
pp53 (Ser15)	1:1000 in TBST/5% Milchpulver	Hase	Cell Signalling
pChk2 (Thr68)	1:200 in TBST/5% Milchpulver	Hase	Santa Cruz
GST (Z-5)	1:1000 in TBST/5% Milchpulver	Hase	Santa Cruz

V5	1:2000 in TBST/5% Milchpulver	Maus	Invitrogen
Gal-4	1:500 in TBST/5% Milchpulver	Maus	Zymed

2.1.6.2 Sekundärantikörper

Mouse-IgG	1:2000	Pferd	Cell Signaling
Hase-IgG	1:2000	Ziege	Cell Signaling
Alexa Fluor 488	1:2000	Maus	Invitrogen
Alexa Fluor 594	1:2000	Hase	Invitrogen

2.1.7 Kits

<i>BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems
<i>HiSpeed Plasmid Maxi Kit</i>	Quiagen
<i>Jetquick Gel Extraction Spin Kit</i>	Genomed
<i>Matchmaker[™] Two-Hybrid System 3</i>	Clontech
<i>BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay Kit</i>	Pierce
<i>Quick Change[®] II XL Site Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene
<i>Sigma Spin[™] Post Reaction Clean Up Columns</i>	Sigma
<i>TaqMan[®] Universal PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems
<i>Wizard MiniPrep Kit</i>	Promega
<i>Yeastmaker[™], Yeast Plasmid Isolation Kit</i>	Clontech
<i>Yeastmaker[™], Yeast Transformation System</i>	Clontech

2.1.8 Vektoren und Oligonukleotide

2.1.8.1 Oligonukleotide

Die Nukleotide wurden alle von Operon Biotechnologies bezogen:

Chk1 (K/A38) fwd:

ACT GAA GAA GCA GTC GCA GTG GCG ATT GTA GAT ATG AAG CGT

Chk1 (K/A38) rev:

ACG CTT CAT ATC TAC AAT CGC CAC TGC GAC TGC TTC TTC AGT

pDEST32 fwd:

AAC CGA AGT GCG CCA AGT GTC TG

PDEST32 rev:

GCA AAG TGT GTA ACG GAA TAG G

T7 Primer

TAA TAC GAC TCA CTA TAG

pcDNA3.1/nV5-Dest rev:

TAG AAG GCA CAG TCG AAG

pDEST27 fwd:

ATA GCA TGG CCT TTG CAG GGC

attB1 + H2A:

aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttc GCT GGA GGC AAA GCT GGA AAG GAC

H2A + attb2:

caa gaa agc tgg gtc cta tta AGA ACA CCT TCT CTT CTC ACC CCC

attB1 + MPG:

aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttc GGG CAA AAG AAG CAG CGA CCA GCT

MPG + attb2:

caa gaa agc tgg gtc cta tta GGC CTG TGT GTC CTG CTC AGC CAC

attB1 + Cyto C oxi:

aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttc CTG CGG AAT CTG CTG GCT CTT

Cyto C oxi + attb2:

caa gaa agc tgg gtc cta tta CTC CTG CTT CTT GGG AAA TGA AGC

attB1 + Nadh dehy:

aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttc CCG GAC AGC TGG GAC AAG GAT GTG

Nadh dehy + attb2:

caa gaa agc tgg gtc cta tta GGA GGT GGC AGC GGC GGC CTC TTT

attB1 + ANKRD7:

aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc ttc AGG ATT GTG CCT ACT ATT CTT

ANKRD7/ + attb2:

caa gaa agc tgg gtc cta tta TTT AGC ATG TTT CTT CTT TCC ATG

AD Insert pACT2 fwd:

CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC CC

AD Insert pACT2 rev:

GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG AT

Chk1 (540bp) fwd:

GGA GAA GTT CAA CTT GCT GT

Chk1 (540bp) rev:

GTC AGA ATA CTC CTG ACA GC

2.1.8.2 Vektoren

pACT2	Clontech
pGADT7	Clontech
pGADT7-T	Clontech
pcDNA3.1/nV5-Dest	Invitrogen
pcDNA3.1/nV5-Dest ANKRD7	Vanessa Jacob
pcDNA3.1/nV5-Dest COX	Vanessa Jacob
pcDNA3.1/nV5-Dest H2A	Vanessa Jacob
pcDNA3.1/nV5-Dest MPG	Vanessa Jacob
pcDNA3.1/nV5-Dest NADH	Vanessa Jacob
pDest27	Invitrogen
pDEST27 Chk1	Invitrogen
pDest32	Invitrogen
pGBKT7	Clontech
pGBKT7 Chk1 FL	Vanessa Jacob
pGBKT7 Chk1 K/A 38	Vanessa Jacob
pGBKT7-53	Clontech
pGBKT7-Lam	Clontech
pGex-3-X	Amersham Bioscience
pGEX-3-X Cdc25C (200-256)	Vanessa Jacob
pGEX-6P-1	Amersham
pGEX-6P-1 Chk1 6His	DSTT, Dundee
pGEX-6P-1-Chk1 6His K/A 38	Vanessa Jacob

Alle Konstrukte wurden mittels DNA Sequenzierung (Primer zur Sequenzierung in Abschnitt 2.1.8.1) validiert.

2.1.9 DNA- und Proteinstandards

GeneRuler™ DNA Ladder	Fermentas
1kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
MagicMark® XP Western Standard	Invitrogen
SeeBlue® Plus2 Prestained Protein Standard	Invitrogen

2.1.10 Medien und Puffer

Blockierlösung (Immunoblot)

BSA	5 % (w/v)
NaN ₃	0,1 % (w/v)
Mit TBS auffüllen + Spatelspitze Phenolrot	
Lagerung bei 4°C	

Blockierlösung für die Immunfluoreszenz

TBS (20x)	5 % (v/v)
Tween-20 (20 %)	0,25 % (v/v)
BSA	2 %

Coomassie Entfärbelösung

Methanol	40 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Coomassie Färbelösung

Methanol	40 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Einfriermedium

Zellkulturmedium	100 ml
Fetal Calf Serum (FCS)	20 %
DMSO	20 %

Ethidiumbromid Lösung

Ethidiumbromid in Wasser	1 %
Anwendung im Agarosegel	1x10 ⁴ % (w/v)

Fixierpuffer für die Immunfluoreszenz

Paraformaldehyd	2 %
in PBS	

Gewebe-Lysepuffer für die Chromatographie

Hepes pH 8,0	50 mM
EDTA	4 mM
NaF	50 mM
β-Mercaptoethanol	0,1 %
Protease Inhibitor Mix (Roche)	1:100
Phosphatase Inhibitor Mix (Roche)	1:100

GSTrap FF Elutionspuffer

Tris-HCl	50 mM
Reduziertes Gluthation, pH 8,0	10 mM

HGNT-Lysepuffer

HEPES, pH 7,4	20 mM
Glycerol	10 % (v/v)
NaCl	150 mM
Triton-X-100	1 % (v/v)
EDTA	2 mM
Lagerung bei 4°C	

Hoechst 33342 (Immunfluoreszenz, DNA-Färbung)

Hoechst 33342 (Bisbenzimid)	2 mM
Lagerung bei 4°C / Verdünnung 1:250	

Immunpräzipitationspuffer

A/G Sepharose beads	50 µl
Zelllysate in Lysepuffer	800 µl
Protease Inhibitor Cocktail III (Calbiochem)	1:100
Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Calbiochem)	1:100

Inkubationspuffer für die Immunfluoreszenz

Glycin	0,1 M
Tris-HCl, pH 7,4	0,1 M
Mit MilliQ Wasser auffüllen	

KESTREL Kinase Puffer

Tris-HCL pH 7,5	30 mM
EDTA	0,1 mM
MnCl	2mM
DTT	10mM
Frisch angesetzt	

LB-Agar

Pepton, tryptisch verdaut	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
Agar-Agar	1,5 % (w/v)

LB-Medium

Peptone, tryptisch verdaut	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

Mono-Q-Anionenaustauschpuffer A

Tris-HCl, pH 8,0	20 mM
------------------	-------

Mono-Q-Anionenaustauschpuffer B

Tris-HCl, pH 8,0	20 mM
NaCl	1000 mM
Steril filtriert	

PEG/LiAc Lösung

PEG 400 (50%)	8ml
TE-Puffer 10x pH7,5	1ml
Li/Ac (1M, 10x))	1ml
Steril filtriert	

Ponceau Färbelösung

Ponceau S	0,25 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Aufgefüllt mit MilliQ Wasser	

TAE-Puffer

Essigsäure	20 mM
Tris, pH 8,3	40 mM
EDTA	1 mM

TBS

NaCl	3M
Tris, pH 7,4	500mM
Mit MilliQ Wasser aufgefüllt und pH Wert auf 7,4 adjustiert	

TBST

TBS (20x)	5 % (v/v)
Tween-20 (20 %)	0,25 % (v/v)
Aufgefüllt mit MilliQ Wasser	

TE-Puffer 10x

Tris-HCl	0,1 M
EDTA	10 mM
Mit MilliQ Wasser aufgefüllt und pH Wert auf 7,4 adjustiert und autoklaviert	

Transfer Puffer, Elektrobloiting

Tris/glycine/SDS Puffer (Bio-Rad)	1x
Methanol	20 % (v/v)
Aufgefüllt mit MilliQ Wasser	

Waschpuffer für die Immunfluoreszenz

Glycin	0,1 %
In PBS	

Zellenpermeabilisationspuffer für die Immunfluoreszenz

Triton-100-X	0,1 %
In PBS	

X-Gal Lösung

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside	20 mg
N,N-dimethylformamide (DMF)	1 ml
Lagerung im Dunkeln bei -20°C	

Z-Puffer/X-Gal Lösung für β -Galctosidase Filter Assay

Z-Puffer	100 ml
β -Mercaptoethanol	0,27 ml
X-Gal Lösung	1,67 ml

Z-Puffer für β -Galctosidase Filter Assay

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	16,1 g/L
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,50 g/L
KCl	0,75 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,246 g/L

Mit MilliQ Wasser aufgefüllt und pH Wert auf 7,0 adjustiert, autoklaviert

2.1.11 Zellkulturmedien

D-PBS (<i>Dulbecco`s Phospate Buffered Saline</i>)	GIBCO
D-MEM-Medium	GIBCO
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH
Trypsin-EDTA (1x)	GIBCO
<i>FuGENE HD</i> Transfektionsreagenz	Roche
EDTA-Trypsine (2,5%)	Invitrogen
Lipofect	Invitrogen
L-Glutamine (200nM)	Gibco
Natrium Pyruvate (200nM)	Gibco
Optimem	Gibco
PlusReagent	Gibco
RPMI Zellkultur Medium	Gibco

2.1.12 Chemotherapeutika

Cisplatin	Sigma
Methylmethansulfonat	Sigma
Huydruxyurea	Sigma

2.1.13 Bakterien- und Hefestämme

<i>DH5α</i> , <i>chemically competent</i> (Transformation)	Invitrogen
<i>E.coli</i> TOP10 chemisch kompetente Zellen	Invitrogen
<i>E.coli</i> TOP10 elektro kompetente Zellen	Invitrogen
<i>XL Blue</i> , <i>chemically competent</i> (<i>Site Directed Mutagenesis</i>)	Stratagene
BL21, <i>chemically competent</i>	Invitrogen
AH109 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Clontech

2.1.14 Mammale Zelllinien

HCT 116 (<i>Colon Carcinom</i>)	ATCC, American Type Culture Collection
HEK-293T-Zellen (<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>)	I. Dikic, Universität Frankfurt/Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Nucleinsäuren mittels Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufzutrennen. Die durch geladene Phosphatgruppen negativ geladenen Nucleinsäuren wandern durch die Gelmatrix von der Kathode zu Anode, wobei kleine DNA-Moleküle sich schneller durch die Agarosematrix bewegen können als Große. Auf Grund dieser unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit ist eine Auftrennung der verschiedengroßen Fragmente möglich. Die mit der DNA interkalierende Substanz Ethidiumbromid färbt die einzelnen DNA Fragmente an, die unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden können.

Diese Methode wurde verwendet, um Restriktionsverdau (Punkt 2.2.1.5) zu kontrollieren und die Probe anschließend aus dem Gel zu eluieren. Diese wurden mit 6x Auftragspuffer (*6x Loading Dye Solution*, Fermentas) versetzt und auf das 1-2%ige Agarosegel aufgetragen. Die Kammer wurde mit 1xTAE Puffer versetzt und anschließend eine Spannung von 90V für 30-60min angelegt. Das zuvor mit 0,003% Ethidiumbromid versetzte Gel wurde unter UV-Licht mit einem UV-Dokumentationsgerät (Syngene, Merck Darmstadt) dokumentiert. Anschließend wurden, nach Abschätzung der Fragmentgröße mittels eines Größenstandards (*GeneRuler™ DNA Ladder*, Fermentas), nach Bedarf, die entsprechenden Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert.

2.2.1.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Bei der Elution werden DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung aus der Agarosematrix herausgelöst. Die durch UV-Licht sichtbar gemachten Fragmente werden vorsichtig mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein

1,5ml Eppendorf Gefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte mittels des *Jetquick Gel Extraction Spin Kit*, Genomed. Das Prinzip der Aufreinigung besteht darin, dass der mit dem Agarosestück versetzte Puffer ein chaotrophisches Salz enthält (NaClO_4), welches die Agarose solubilisiert. Die DNA bindet in Anwesenheit der chaotropischen Salze an die Silikapartikel der Säule. Durch mehrmaliges Waschen werden u.a. Salze, Agarose, Proteine und Ethidiumbromid entfernt. Die so erhaltene aufgereinigte DNA konnte nun für weitere Versuche eingesetzt werden.

2.2.1.3 Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte mittels des Gerätes *Nanodrop*, PeqLab. 1µl der DNA wurde auf den Sensor des Gerätes aufgetragen und photometrisch die Absorption bei den Wellenlängen 260nm und 280nm bestimmt. Die Absorption bei 260nm erlaubt die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration, die Absorption bei 280nm ist ein Maß für die Verunreinigung mit Proteinen. Doppelsträngige DNA hat bei einer OD_{260} von 1 eine Konzentration von 50µg/ml. Der Quotient aus 260nm und 280nm gilt als Indikator für die Reinheit der Probe. Der optimale Bereich liegt zwischen 1,8 und 2,0.

2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA Fragmente aus einer komplexen Nukleinsäuremischungen, wie beispielsweise genomischer DNA oder cDNA. Bei der in dieser Arbeit angewendeten klassischen PCR Technik, wird durch wiederholende Zyklen der DNA-Denaturierung Oligonukleotidhybridisierung und DNA Synthese der gewünschte Nukleinsäurebereich durch spezifische Primer amplifiziert.

Eine hitzestabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* ermöglicht die DNA-Synthese bei 72°C.

Folgender Ansatz wurde bei einer Standard PCR eingesetzt:

1µl Matrizen DNA (10-20ng)
5µl Reaktionspuffer (10x)
1µl dNTP Mix (10nm)
0,5µl Primer 1 (100µM)
0,5µl Primer 2 (100µM)
1µl DNA-Polymerase (1U/µl)
41µl Wasser

Die Wahl der Einstellung im PCR Programm ist abhängig von der Länge des Matrizen-Fragments, den verwendeten Primern und dem Ziel der PCR Reaktion. Als Variablen können die Elongationszeit, sowie die Hybridisierungstemperatur angepasst werden. Die Elongationszeit wird entsprechend dem zu amplifizierenden Fragment angepasst. Unter Verwendung der *Proof Reading* (Pwo) Polymerase, PeqLab berechnet man 1min pro 1kb.

Folgendes Standard Programm mit 35 Zyklen wurde verwendet und entsprechend angepasst:

2min bei 95°C	Initiale Denaturierung
45 sek bei 95°C	Denaturierung
30 sek bei (60°C bis 68°C)	Hybridisierung
30 sek bei 72°C	Elongation
5min bei 72°C	Finale Elongation

2.2.1.5 Enzymatische Restriktion

Um eine DNA enzymatisch zu verdauen wurden spezifische Restriktionsenzyme (New England Biolabs) genutzt. Diese Enzyme schneiden unter optimaler Temperatur und optimalen Pufferbedingungen spezifische Basenabfolgen innerhalb der DNA. Die Dauer der Restriktion variiert von einigen Minuten bis zu einem Verdau über Nacht und ist abhängig von der spezifischen Aktivität.

Unter anderem wurde das Restriktionsenzym *XmnI*, mit spezifischer Schnittstelle innerhalb der DNA bei GAANN/NNTTC, *EcoRI*, mit spezifischer Schnittstelle innerhalb der DNA bei G/AATTC, *NotI*, mit spezifischer Schnittstelle innerhalb der DNA bei GC/GGCCGC verwendet.

Reaktionansatz für einen analytischen Verdau:

- 1µl DNA (50ng-200ng)
- 2µl Reaktionspuffer (10x)
- 0,5µl Restriktionsenzym I (10000 U)
- (0,5µl Restriktionsenzym II – optional)
- 16,5µl (16µl) Nuklease freies Wasser

Reaktionansatz für einen präparativen Verdau:

- 1µl DNA (1µg-2µg)
- 5µl Reaktionspuffer (10x)
- 1,5µl Restriktionsenzym I (10000 U)
- (1,5µl Restriktionsenzym II – optional)
- 41,5µl (40µl) Nuklease freies Wasser

2.2.1.6 Ligation der DNA mittels T4 Ligase

Die T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5' Phosphat and 3' Hydroxyenden in Doppelstrang DNA. Das Enzym kann sowohl glatte (*blunt-end*), als auch kohesive DNA-Enden in der DNA verbinden. Dadurch besteht die Möglichkeit der Integration von DNA Fragmenten in Zielplasmide.

Es wurde die T4 Ligase der Firma New England Biolabs verwendet. Die Ligation wurde mit folgendem Ansatz bei RT (25°C) für 5min durchgeführt:

- 1µl verdauter Ziel-Vektor (5ng-10ng)
- 5µl verdaute und aufgereinigte DNA (25ng)
- 1µl Ligase Puffer (10x)
- 1,5µl T4 Ligase (400U/µl)
- 1,5µl Nuklease freies Wasser

Um die Ligationseffizienz zu überprüfen wurden parallel Kontroll-Ligationen durchgeführt. Um zu erkennen wie hoch der Anteil an re-ligierenden Vektor im einzelnen Ansatz ist, wurde als erste Kontrolle eine Reaktion ohne DNA *Insert* angesetzt. Als weitere Kontrolle dient ein Ansatz ohne T4 Ligase, um den Anteil an nicht geschnittenem Vektor und *Insert* zu überprüfen. Sowohl der Ligationsansatz, als auch die Kontrollen wurden in Bakterien transformiert. Die Anzahl der Kolonien auf den Kontroll-Agarplatten erlaubt eine Abschätzung des Anteils mit korrekt ligierten Vektor mit *Insert*.

2.2.1.7 Klonierung

Die gewünschte Ziel-DNA für die Klonierung wurde beim Deutschen Ressourcen Zentrum für Genomforschung (*German Resource Center for Genome Research, RZPD*) bestellt oder vom DSTT (*Division of Signal Transduction Therapy,*

Dundee, Schottland) zur Verfügung gestellt. Um die DNA in die gewünschten Vektoren zu klonieren wurde einerseits über *Gateway* (Invitrogen) oder mittels klassischer Klonierung kloniert.

2.2.1.7.1 Gateway Klonierung (Invitrogen)

Die Integrationsenzyme des Bakteriophagen *Lambda* besitzen die Fähigkeit einer sequenzspezifischen homologen Rekombination, was die Integration von *Lambda* in das *E.coli* Chromosom ermöglicht. DNA-Fragmente, die von *Lambda*-Rekombinationssequenzen flankiert sind (*attL*-site) werden mit Hilfe der *Lambda* und *E.coli* kodierenden Rekombinationsproteine aus *Gateway Entry*-Vektoren in sogenannte *Gateway Destination*-Vektoren, mit entsprechenden korrespondierenden Rekombinationssequenzen (*attR*-site) transferiert (Abb. 7). Die *attR*-Sequenzen werden seitlich von dem *ccdB*-Gen flankiert. Hierbei handelt es sich um ein „Killergen“, dessen Genprodukt u.a. toxisch für *E.coli* ist. Dies erleichtert die Selektion von positiven Klonen und gewährleistet, dass nach erfolgreicher Rekombination eine Zerstörung des Gens eintritt und nur positive Klone vermehrt werden, die das *ccdB* Gen nicht mehr tragen.

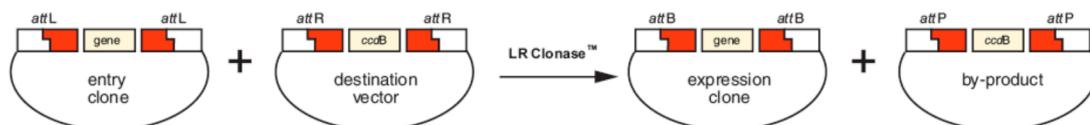


Abb. 7: Gateway Klonierung. Schematische Darstellung der Generierung eines Expressionsvektors mittels der *Gateway* Klonierung (Invitrogen).

2.2.1.7.2 Site-directed Mutagenese

Um zielgerichtet einzelne Basen einer DNA zu mutieren, wurde der *Quick Change® II XL Site Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene verwendet. Hierbei

dienen zwei komplementäre Oligonukleotide, welche die gewünschte Mutation enthalten, als Primer für eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Pfu proof reading*), um die gewünschte Mutation zu generieren. Die parentale Plasmid-DNA wurde mit Oligonukleotidprimern in einer PCR-Reaktion eingesetzt (s.u.). Nach anschließendem Verdau mittels des Restriktionsenzym *DpnI*, welches nur die parentale methylierte DNA schneidet, erhält man das Plasmid mit der gewünschten Modifikation, das durch Transformation in chemisch kompetente *E.coli* Zellen (*XL-Blue*) eingebracht wird. Nach anschließender Antibiotikaselektion können Plasmide mit der Mutation präpariert und mittels Sequenzierung überprüft werden. Die Mutagenese-PCR wurde nach folgendem Pippetierschema durchgeführt:

Reaktionsansatz der PCR:

- 5 μ l Reaktionspuffer (5x)
- 1 μ l DNA Matrize (10ng)
- 1 μ l Primer I (125ng)
- 1 μ l Primer II (125ng)
- 2 μ l dNTP Mix (10nM)
- 1,5 μ l Pfu DNA-Polymerase (2,5U/ μ l)
- 38,5 μ l Nuklease freies Wasser

Folgendes PCR Programm wurde verwendet:

- 30 sek bei 95°C (Initiale Denaturierung)
- 30 sek bei 95°C (Denaturierung)
- 1 min bei 55°C (Hybridisierung)
- 1 min/kb des Plasmids bei 68°C (Elongation)

2.2.1.8 Transformation *Escherichia coli* (*E.coli*)

A) Chemisch kompetente Zellen

25µl chemisch kompetente Zellen der Firma Invitrogen (*E.coli* TOP10) wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,01µg–1,0µg Plasmid-DNA versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde durch einen 60sek Hitzeschock bei 42°C die Plasmid-DNA in die Bakterienzelle eingebracht. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5min auf Eis. Die Zellen wurden nachfolgend mit 250µl SOC Medium versetzt und 1h bei 37°C und 300rpm inkubiert. 100µl dieses Ansatzes wurden auf Antibiotika enthaltene (50µg/ml Ampizillin, 40µg/ml Kanamycin) LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

B) Elektrokompente Zellen

25µl elektrokompente Zellen der Firma Invitrogen (*E.coli* TOP10) wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,01µg–1,0µg Plasmid DNA versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wird das Bakterien-DNA-Gemisch in Elektroporationsküvetten (BioRad, München) überführt. Die Küvetten wurden in eine Halterung der Elektroporationskammer (*E.coli-Pulser* Biorad) gestellt und eine Spannung von 2,5kV angelegt. Anschließend wurden die Zellen mit 250µl SOC Medium versetzt und für 1h bei 37°C und 300rpm inkubiert. 100µl dieses Ansatzes wurden auf die Antibiotika enthaltene LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.9 Isolation bakterieller Plasmid-DNA

Am Vortag der Präparation wurde eine 250ml (Maxipräparation) oder 5ml (Minipräparation) Kultur LB-Medium, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum, bei 37°C für ca. 18h bei 250rpm inkubiert. Das Prinzip der Plasmidreinigung beruht auf der alkalischen Lyse. Nach alkyliischer Denaturierung der DNA wird durch die Absenkung des pH-Wertes, die Plasmid-DNA renaturiert.

Die genomische Bakterien-DNA renaturiert auf Grund ihrer größeren Komplexität und fällt gemeinsam mit bakteriellen Proteinen aus. Das verbleibende Lysat wurde auf eine Anionenaustausch-Säule, an welche die Plasmid-DNA binden kann, aufgetragen. Die Elution erfolgt in H₂O oder TE-Puffer statt.

Die Präparation wurde unter Einhaltung des Protokolls des *Wizard MiniPrep*, Promega bzw. des *Plasmid Purification HiSpeed Maxi Kits* von Qiagen durchgeführt.

2.2.2 Eukaryotische Zellkultur

2.2.2.1 Zelllinien und Kultivierung

Bei den in Kultur gehaltenen adhärenenten, eukaryontische Zelllinien handelt es sich um HEK-293T-Zellen (embryonale Nierenzelllinie) und HCT 116-Zellen (Kolonkarzinomzelllinie) bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert wurden. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium mit 10% FCS.

Zum Passagieren der Zellen, wurden diese einmal mit PBS gewaschen, mit 800µl 1x Trypsin/EDTA versetzt und für 2-3min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit DMEM + 10%FCS und resuspendieren dieser, konnten die Zellen nun weiter verwendet und neu ausplattiert werden.

2.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Nach dem Trypsinieren und Abstoppen der Reaktion wurden 10µl der Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und anschließend unter dem Mikroskop die Anzahl der Zellen, die sich innerhalb des großen Quadrates der Kammer befinden, bestimmt. Die Zellzahl in vier großen Quadraten wurde bestimmt und der Mittelwert wird mit 1×10^4 multipliziert. Entsprechend der erhaltenen Zellzahl erfolgte die Verdünnung und Aussaat.

2.2.2.3 Lagerungsprozess von Zelllinien

Um Zellen längere Zeit stabil zu lagern, wurden diese in flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Nach Trypsinbehandlung der Zellen und erneuter Resuspension in Medium wurden jeweils 500µl Aliquots gemeinsam mit 500µl Einfriermedium (Medium + 20% FCS + 20% DMSO) in Kryoröhrchen überführt, vorsichtig vermischt und schrittweise eingefroren. Die erste Phase des Einfrierens betrug 2h bei -20°C, die zweite Phase folgte für 2 Tage bei -80°C, bevor sie letztendlich in den flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.2.2.4 Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen

Die Transfektion erfolgte durch Liposomen-vermittelte Transfektion mit *FuGene HD* (Roche). *FuGene HD* formt einen Komplex mit der zu transfizierenden DNA. Dieser Lipidkomplex fusioniert mit der Zellmembran und die DNA wird von der Zelle aufgenommen.

Am Vortag der Transfektion werden die Zellen wie folgt ausgesät:

Zellkulturgefäß	Anzahl der Zellen konfluent	Anzahl der Zellen bei Aussaat	Volumen (ml) an Medium
6-well Platte	1,2x10 ⁶	0,3x10 ⁶	3-5
10cm Schale	8,8x10 ⁶	2,2x10 ⁶	10
T-75	8,4x10 ⁶	2,1x10 ⁶	8-15

Tabelle 2: Transfektion von HEK-293T. Tabellarische Auflistung der Zellzahl bei Aussaat und bei konfluentem Zellwachstum in verschiedenen Zellkulturschalen.

Am nächsten Tag fand die Transfektion wie folgt statt: Das Transfektionsreagenz wurde im Verhältnis 3:1 zu transfizierter DNA gemischt. Bei der Transfektion von 10cm Schalen wurde zuerst das *FuGene HD* in 300µl DMEM Medium pipettiert (bei Transfektion einer 6-well Schale und Objektträgern in 100µl) und anschließend gut gemischt und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die

entsprechende Menge an DNA (Tabelle 1) hinzugefügt und erneut gut durchmischt und für 1h inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen gegen frisches Medium (DMEM +10% FCS) ausgetauscht. Der Transfektionsansatz wurde anschließend auf die Zellen gegeben.

Zellkultur-gefäß	Volumen Transfektionsreagenz (μ l)	Menge an DNA bei Einzel-Transfektion (μ g)	Menge an DNA bei Doppel-Transfektion (μ g)	Menge an DNA bei Dreifach-Transfektion (μ g)	Volumen an Medium (ml)
6-well Platte	4,5	1,5	0,75	0,5	2
10cm Schale	21	7	3,5	2,3	8

Tabelle 3: Transfektionsansatz bei verschiedenen Zellkulturschalen. Die Zusammensetzung des Einzel-, Doppel- und Dreifachtransfektionsansatzes ist für eine 6-well Platte und eine 10cm Platte in Tabelle 2 angegeben.

Die Zellen wurden 48h nach der Transfektion lysiert, um sie entweder für ein SDS-Page einzusetzen oder sie weiter für die Immunpräzipitation zu verwenden.

2.2.3 Proteinanalyse und Biochemie

2.2.3.1 Lyse eukaryontischer Zellen

Nach Entnahme der Zellen aus dem Inkubator wurden die Zellen sofort auf Eis transferiert. Die nachfolgende Lyse fand durchgehend unter gekühlten Bedingungen statt. Im ersten Schritt wurden die Zellen vorsichtig mit kalten PBS gewaschen. Die Lyse der 6-wells erfolgte mit 300 μ l des entsprechenden Lysepuffers. Die 10cm Schalen wurden mit 800 μ l HGNT-Lysepuffer auf Eis lysiert. Den Puffern wurde jeweils 1% *Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) hinzugefügt wurde, um einen proteolytischen Abbau der Proteine zu verhindern. Unter zu

Hilfenahme eines Zellschabers wurden die Zellen komplett vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Die mit HGNT-Lysepuffer behandelten Zellen wurden anschließend für 1h bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert, um dann bei 4°C für 30min bei 14000rpm abzentrifugiert zu werden. Das so erhaltene Lysat konnte nun weiter für z.B. Immunpräzipitationen verwendet werden.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Proteinlysaten wurde mit Hilfe des *BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay Kits* bestimmt. Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA von 0-1000µg/ml erstellt. Um die Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen wurden drei unterschiedliche Konzentrationen als Duplikate dieser angesetzt: 1:4, 1:12 und 1:15. Zusammen mit der Standardreihe wurden die Proben auf eine 96-well Platte aufgetragen und bei 550nm im Plattenlesespektrometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und die Probe für die weitere Verwendung entsprechend verdünnt.

2.2.3.3 Immunpräzipitation / Glutathion-Agarose *Pulldown*

Mit Hilfe der Immunpräzipitation und des Glutathion-Agarose *Pulldowns* wurden Tests zur Interaktion von Proteinen durchgeführt. Bei der Immunpräzipitation wurde ein spezifischer Antikörper (5µg/Reaktion) an Protein A/G Sepharose *beads* (50µl, Amersham) gebunden und das entsprechende Protein aus dem Lysat präzipitiert. Beim Glutathion-Agarose *Pulldown* wurde ein GST-Fusionsprotein an Glutathione Sepharose (50µl, Amersham) gebunden. Bindet ein Protein an ein immobilisiertes Antigen oder Glutathion-S-Transferase markiertes Fusionsprotein, so wird dieses co-präzipitiert. Der Nachweis durch Co-Immunpräzipitation erfolgt durch Western Blotting. Zur Immobilisierung von Antigen oder GST-markierten Proteinen wurden Lysate (800µl) zu den entsprechenden *beads* gegeben und

über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Im Anschluss wurden die *beads* mit dem entsprechenden Lysepuffer mehrfach gewaschen und nach jedem Waschschrift 1min bei 3000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die *beads* in 20µl *NuPAGE*[®]*LDS* Probenpuffer (4x) mit *NuPAGE*[®] *Reducing Agent* (10x) aufgenommen und für 4min bei 99°C denaturiert. Der Nachweis des präzipitierten oder co-präzipitierten Proteins erfolgt über ein 4-12%iges *NuPAGE*[®] *Novex Tris-Glycin* Gels und den anschließenden Western-Blot.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennen zu können, nutzt man eine diskontinuierliche, denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli et al. 1970). Durch Zugabe von *NuPAGE*[®]*LDS* Probenpuffer, der die Proteine durch das enthaltene SDS negativ lädt und durch das reduzierende Dithiothreitol (DTT) im *NuPAGE*[®] *Reducing Agent* und die anschließende Denaturierung der Probe für 4min bei 99°C reduzierende und denaturierende Bedingungen schafft, können die Proteine in einem vernetzten Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht und ihrer Größe aufgetrennt werden. Das LDS bindet an entfaltete Proteine und lädt diese negativ. Hierbei wandern kleine Proteine schneller durch die Gelmatrix als Große. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung von 4-12%igen *NuPAGE*[®] *Tris-Glycin* Gradientengelen bei einer Spannung von 200 Volt für 60-90min. Die Gele, der Laufpuffer *NuPAGE*[®] *MOPS/MES SDS Running Buffer*, die Laufkammer *XCell SureLock*[™] *Mini-Cell* für kleine Gele und *XCell4 SureLock*[™] *Midi Cell* für große Gele wurden von der Firma Invitrogen nach Protokoll verwendet. Als Größenstandard wurden der *MagicMark*[™] *XP Western Protein Standard* oder *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard Marker* der Firma Invitrogen verwendet.

2.2.3.5 Coomassiefärbung des SDS-Polyacrylamidgels

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurde das Trenngel für 60 Minuten bei Raumtemperatur in eine Coomassie-Färbelösung gelegt und vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung gelegt über Nacht und entfärbt. Am nächsten Tag wurde die Entfärbelösung gewechselt und solange gewaschen bis der Hintergrund ausreichend transparent erschien. Das Gel wurde dann für 15 min im *GelAir drying System* (BioRad) getrocknet.

2.2.3.6 Western-Blot

Beim Elektroblothing werden Proteine, die zuvor durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, elektrophoretisch mittels der Nassblot-Apparatur (*Criterion Blotter*) von Biorad auf eine 0,2µm Nitrozellulosemembran (BioRad) transferiert. Durch hydrophobe Wechselwirkungen werden die Proteine auf die Membran immobilisiert.

Die Anordnung der Transferschwämme, des Filterpapiers und der Nitrozellulose Membran erfolgten gemäß Anleitung des Herstellers. Alle diese Komponenten wurden vor dem elektrophoretischen Transfer in 1x Tris/Glycine Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte für 45min bei 100 Volt auf einem Magnetrührer. Um eine Überhitzung zu verhindern, wurde der Kammer ein Kühlelement beigefügt.

Um den Transfer der Proteine überprüfen zu können, wurde die Membran mit Ponceau S-Färbelösung gefärbt und anschließend für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in Blockier-Lösung gelegt und inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Die folgende Inkubation mit Primärantikörper erfolgte in der Regel für 4h bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper wird je nach Herstelleranweisung 1:250-1:2000 in Blockierlösung verdünnt. Durch anschließendes Waschen (3x) mit TBST für 10min wurde ungebundener Antikörper entfernt. Nachfolgend wurde die Membran mit

Meerrettich Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (je nach Hersteller 1:1000 – 1:500 in TBST mit 5% Milchpulver verdünnt), für 1h auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 2x 5min in TBS gewaschen.

Für den enzymatischen Nachweis der gebundenen Peroxidase wurde das ECL Reagenz *Lumi Light Western Blotting Substrat* oder *Lumi Light Plus Western Blotting Substrat* von Roche gleichmäßig auf der Membran verteilt. Die Detektion erfolgt mittels Peroxidase katalysierter Chemilumineszenz Reaktion. Anschließend wurde die Membran in ein Gerät *Versa Doc* (BioRad) gelegt, welches das Chemilumineszenz Signal visualisiert und digital aufnimmt. Die Verarbeitung der Bilder erfolgte mit der Software *Quantity One*.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind unter Punkt 2.1.6 aufgeführt.

2.2.3.7 Immunfluoreszenz

Die Oberfläche der Objektträger, die für die Immunfluoreszenz genutzt wurden betrug 400mm². Die HEK-293T-Zellen wurden vor der Aussaat wie in Punkt 2.2.2.2 beschrieben ausgezählt und in einer Dichte von 125000 Zellen, aufgenommen in 8ml DMEM Medium ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie in Punkt 2.2.2.4 beschrieben transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen in PBS gewaschen und für 3min mit eiskaltem Methanol fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen 2x mit TBST rehydriert und mit PBS erneut gewaschen. Nach 10minütiger Inkubation mit Blocking-Puffer (TBST +2% BSA) wurden die Zellen mit dem entsprechenden Primärantikörper (siehe Antikörper Punkt 2.1.6.1) über Nacht inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (siehe Antikörper Punkt 2.1.6.2) für 2h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung der Zellkerne mit Fluoreszenzfarbstoff Höchst 33342 für 15min bei 37°C. Die Zellen wurden mit einem Tropfen speziell für die Fluoreszenz entwickelten Eindeckelmedium (*Vectashield® Mounting Medium*, Vector Labs) betropft und mit

einem Deckgläschen eingedeckelt. Dieses wurde zur Fixierung mit Nagellack umrandet.

Die Aufnahmen Immunfluoreszenz wurden mit einem Lichtmikroskop (Axiovert 25, AxioStar Plus) der Firma Zeiss durchgeführt.

2.2.3.8 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie

Die Expression rekombinanter Proteine ist mit Hilfe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induzierbar. Die Aufreinigung von GST-Cdc25c (200-256) wurde mit Hilfe des *ÄKTAprimeTM FPLC* Gerätes und einer 1ml *GSTrapTM FF High Trap* GST-Säule der Firma Amersham gemäß des Protokolls durchgeführt. Die in den Expressionsvektor pGEX-3X klonierte DNA des Cdc25c (200-256) Proteins wurde in chemisch kompetente Zellen *BL21 (DE3)* der Firma Invitrogen transformiert. Als Startkulturen wurden 30ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttelinkubator bei 250rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 5ml der Kultur in vier Kolben mit 250ml Kulturmedium überführt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 auf dem Inkubator bei 37°C auf dem Schüttelinkubator geschüttelt. Nach dem Erreichen des entsprechenden OD Wertes erfolgte die Induktion der Genexpression mit IPTG in einer Endkonzentration von 1mM. Jede Stunde wurde eine 1ml Probe der Kultur im Verhältnis 1:5 mit PBS gemischt, der OD₆₀₀ Wert gemessen und anschließend mit 100 μ l *Novagen Pop Culture Reagent* mit 2 μ l *Lysonase* (Novagen) für 10min lysiert, abzentrifugiert und das Pellet und der Überstand auf einem 10%igen SDS-Page aufzutragen und anschließend Coomassie gefärbt. Da das Protein in der löslichen Fraktion detektiert wurde, wurde im Anschluss wurde die gesamte Zellsuspension bei 6000g 10min zentrifugiert, das Pellet gewogen und entsprechend in PBS mit Protease Inhibitor aufgenommen und mit einer *FrenchPress* mittels Druck aufgeschlossen. Die Lyse der Bakterienzellen wurde im Lichtmikroskop kontrolliert. Die aufgeschlossene

Zelle wurde bei 20000g für 30min zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen *Loop* auf die FPLC injiziert. Mittels eines Elutionspuffer wurde das Protein von der GST-Säule eluiert und in 1ml Fraktionen aufgefangen. Die Proteinkonzentration wurde durch den BCA-Assay bestimmt und die Proben mit Hilfe der *Slide-A-Liza* von Perkin Elmer in 50mM TrisHCl (7,5) mit 20% Glycerin umgepuffert und bei -80°C eingefroren.

2.2.4 KESTREL - Kinase Substrate Tracking and Elucidation

2.2.4.1 Lyse und Entsalzen der Rattenleberextrakte

Die für die Aufreinigung genutzten Rattenlebern wurden von der Toxikologie der Firma Merck KGaA zur Verfügung gestellt. Die Leber wurde in kleine Stücke geschnitten und in einem Homogenisator in einem Gewebe-Lysepuffer im Verhältnis 1:5 aufgenommen. Nach dem Homogenisieren der Rattenlebern wurden das Lysat zusätzlich viermal für je 4sek bei 50% Leistung des Ultraschall Sonifizierers auf Eis sonifiziert und 30min bei 20000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und über eine Gelfiltrationssäule (*PD-10 Desalting Column*, Amersham) entsalzt und umgepuffert. Nach Äquilibration der Säule mit 25ml 20mM Tris pH8,0 wurde die Säule mit 2,5ml des Rattenleberlysats beladen. Um die gewünschten kleinen Proteine vom Lysat zu trennen, wird die Säule mit 3,5ml Elutionspuffer beladen, der Durchfluss aufgefangen, anschließend steril filtriert und mittels *Slide-A-Liza* in Chromatographiepuffer umgepuffert.

2.2.4.2 Ionenaustauschchromatographie (ÄKTA, Amersham)

Unter Anlegen eines Natriumgradienten (0-1mM NaCl) soll das Filtrat mittels Ionenaustauschchromatographie über eine *MonoQ 5/50 GL* Säule (Amersham) chromatographisch aufgetrennt werden. Die hier verwendete Chromatographie ist eine Anionenaustauschchromatographie, bei der negativ geladene Proteine an

das positiv geladene Säulenmaterial binden. Nach Beladen der Säule mit dem entsalzten und umgepufferten Rattenleberextrakts, wurde die Säule gewaschen und sukzessiv die Ionenstärke durch einen Salzgradienten von 0-1M NaCl (Puffer A: 20mM Tris-HCl pH 8,0 und Puffer B: 20mM Tris-HCl pH 8,0 + 1M NaCl) erhöht. Durch das Anlegen eines linearen Salzgradienten können Proteine auf Grund ihrer Ladungen bei unterschiedlichem Salzgehalt mittels des Elutionspuffer eluiert werden. Die eluierten Fraktionen wurden in einem Volumen von 1,5ml aufgefangen und in weiteren Versuchen auf ein SDS-Page aufgetragen und im Kinase Assay eingesetzt.

2.2.4.3 Radioaktiver Kinase Assay

Für den Kinase Assay wurden die aus der Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen in den entsprechenden Kinase-Puffer (30mM Tris-HCL pH7,5, 01M EDTA, 2mM MnCl, 10mM DTT) mittels *Slide-A-Liza* umgepuffert. Im Kinase Assay wurden jeweils 10µl Fraktion mit 5µl Chk1 (GST-Cdc25C (200-256))Kinase (10mU), 2µl MnCl (2mM) + radioaktives ATP (20nM [γ - 32 P] ATP) und 13µl Puffer bei 30°C für 10min inkubiert. Die Reaktion wurde mit *NuPAGE[®]LDS* Probenpuffer abgestoppt, bei 95°C für 5min aufgeköcht, auf ein SDS-Page aufgetragen und in einigen Versuchen zuvor auf Nitrozellulose transferiert und autoradiographisch sichtbar gemacht.

2.2.5 Hefe-2-Hybrid

2.2.5.1 Verwendetes Hefe-2-Hybrid System

In dieser Arbeit wurde das System der Firma *Clontech MatchmakerTM GAL4 Two-Hybrid System 3* verwendet. Alle genutzten Methoden wurden laut Protokoll durchgeführt.

Für die Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen wurde das Hefe-2-Hybrid

System benutzt (Fields and Song, 1989). Dieses System ist ein auf dem Transkriptionsfaktor Gal4 von *Saccharomyces cerevisiae* basierendes System, bei dem zwei unabhängige und funktionell voneinander getrennte Domänen, die Aktivierungsdomäne (AD) und Bindedomäne (BD), nach dem Zusammenbringen in räumliche Nähe die Expression nachgeschalteter Gene aktivieren können.

Diese beiden Domänen wurden getrennt voneinander in dem Hefestamm *AH109* exprimiert. Bindet nun ein Protein der Aktivierungsdomäne an das Fusionsprotein der Bindedomäne, so werden die beiden Domänen in räumliche Nähe zueinander gebracht und diese Interaktion der Fusionsproteine ermöglichen die Aktivierung der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *MEL1*.

Für den Hefe-2-Hybrid Screen wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae AH109* genutzt. Um die Fusionsproteine mit den entsprechenden Domänen des Transkriptionsfaktors zu generieren, wurde die DNA Sequenz des Chk1 Proteins in den Vektor pGBKT7 (Clontech) kloniert. Die in den Vektor klonierte DNA Sequenz dient als Köder-Protein. Für Chk1, welches als Fusionsprotein mit der DNA-BD des Transkriptionsfaktors assoziiert ist, werden Interaktionspartner gesucht. Die cDNA einer fötalen Gehirnbibliothek (*cDNA library fetal brain*, Clontech) ist in den AD Vektor inseriert worden. Die an die AD fusionierten Proteine dienten somit als Beute Proteine.

2.2.5.2 Herstellung der Hefen

Um die Hefen unter nicht selektiven Bedingungen zu kultivieren, wurde ein Vollmedium (YPDA) genutzt. Für die Selektion transformierter Hefen wurde ein den Auxotrophien entsprechendes Minimalmedium (SD-Medium) verwendet, denen Zusätze wie Aminosäuren oder Basen fehlten.

Die Hefen wurden über Nacht in Vollmedium oder Minimalmedium bei 30°C als Schüttelkultur kultiviert. Zur Verwendung für eine Plasmidisolierung wurden 2ml Medium mit einer frisch, mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommenen Kolonie angeimpft. Wurden die Hefen für die Herstellung kompetenter Hefezellen und sich

anschließendem Hefe-2-Hybrid *Screen* genutzt, so betrug die Ausgangskultur 150ml.

2.2.5.3 Herstellung von kompetenten Hefen und Transformation

Für die Herstellung kompetenter Hefezellen wurde eine 150ml Kultur bis zum Erreichen einer OD_{600} von mindestens 1,5 in YPDA Medium geschüttelt. Für die Herstellung kompetenter Hefezellen wurde eine 50-ml-Übernachtskultur mit einer optischen Dichte von $OD_{600} > 1,5$ benötigt. Mit dieser Übernachtskultur wurde dann 1l YPDA-Medium angeimpft und auf eine initiale optische Dichte von $OD_{600} = 0,2-0,3$ eingestellt. Diese Kultur wurde nun bei 30°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,6 geschüttelt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5min bei 1000g. Das Zellpellet wurde mit 500ml 1xTE-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 8ml 1xTE Puffer resuspendiert.

Für die sich anschließende Transformation der kompetenten Zellen wurden 1mg Plasmid-DNA mit 0,5mg Bibliotheks-DNA und 20mg *Herring Testes Carrier DNA* (Clontech) gemischt. Zu diesem Ansatz wurden 8ml der kompetenten Hefezellen hinzugefügt und gut gemischt. Des Weiteren wurde zu dem Ansatz 60ml PEG/LiAc-Lösung hinzugegeben und gevortext. Die Zellen wurden nun wiederum für 30min bei 30°C auf dem Schüttelinkubator bei 250rpm inkubiert. Anschließend wurden 7ml DMSO hinzugefügt. Die Zellen wurden dann für 15min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und auf Eis abgekühlt. Es folgte ein anschließender Zentrifugationsschritt für 5min bei 1000xg. Die Zellen wurden in 10ml 1xTE-Puffer resuspendiert und je 100µl auf den entsprechenden SD-Platten ausplattiert. Um die Transformationseffizienz zu bestimmen, wurden je 3x100µl einer 1:100 Verdünnung ausplattiert und bei 30°C im Brutschrank bis zum Erscheinen der Kolonien kultiviert.

Die Transformationseffizienz wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{cfu} \times \text{Suspensionsvolumen } (\mu\text{l})}{\text{ausplattiertes Volumen (ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \mu\text{g DNA}} = \text{cfu}/\mu\text{g DNA}$$

Die Menge an herzustellenden kompetenten Hefezellen, sowie die Menge an eingesetzter DNA für die Co-Transformation variiert in Abhängigkeit vom durchzuführenden Transformationsansatz.

2.2.5.4 Plasmidisolierung auf Hefezellen

Die Isolation von Plasmiden aus einer zuvor über Nacht bei 30°C auf dem Schüttelinkubator kultivierten 2ml *AH109* Hefekultur, wurde mit Hilfe des *Yeastmaker, Yeast Plasmid Isolation Kit* nach Protokoll durchgeführt. Hierbei werden die Zellwände der Hefen sehr effizient mittels einer Kombination aus enzymatischer Verdau (*Lyticase*) und chemischer Denaturierung (SDS) lysiert. Die Zellextrakte wurden über *ChromaSpin-1000-DEPC-H₂O* Säulen (Clontech) aufgereinigt und die so erhaltene DNA anschließend, wie in Punkt 2.2.1.8 beschrieben, in *E.coli* transformiert.

2.2.5.5 Amplifikation der cDNA Bibliothek

Der Titer der cDNA Bibliothek wurde nach Protokoll von Clontech bestimmt. Anschließend wurde die cDNA Bibliothek nahezu konfluent (20000-40000 Kolonien auf einer 150mm Platte) auf LB-Ampizillin Platten ausgesät. Die Menge der Klone, die ausgesät wurden, wurde so gewählt, dass jeder Klon der cDNA Bibliothek 2-3 mal unabhängig voneinander vorhanden ist. Die Platten wurden für 18-20h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils circa 5ml LB/Glycerol auf jede Platte gegeben und vorsichtig abgeschabt und vereinigt. Die Präparation der

amplifizierten DNA Bibliothek wurde wie in Abschnitt 2.2.5.4 beschrieben durchgeführt.

2.2.5.6 Colony Filter Lift Assay

Nach Selektion der Klone auf -Leu/-Trp/-His/-Ade, konnte mittels des *Colony Filter Lift Assays* die Interaktion zweier Proteine nachgewiesen werden. Nach einer Interaktion kommt es durch Anwesenheit des Enzyms β -Galaktosidase, welches in der Lage ist X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indol- β -D-Galactosid) in die blaue Verbindung 3-Brom-4-Chlor-Indigo zu spalten, zu einer deutlichen Blaufärbung bei positiven Klonen. Hierzu wurde ein Whatman Papier mit einer Lösung aus Z-Puffer und X-Gal befeuchtet. Ein trockener Nitrozellulosefilter wurde auf die Agarplatten mit den zu testenden Klonen gelegt, vorsichtig abgehoben und für 10sek in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach dem Auftauen des Nitrozellulosefilters bei RT wurde der Filter auf das Whatman Papier gelegt. Nach 0,5-8 Stunden zeigte sich die Blaufärbung der positiven Klone.

3. Ergebnisse

3.1 KESTREL

Die Identifikation von Kinase Substraten ist essentiell, um das gesamte Repertoire zellulären Funktionen und deren molekularen Mechanismen verstehen zu können. KESTREL (*Kinase Substrate Tracking and Elucidation*) erlaubt die Identifikation von Substraten einer Kinase, indem klassische Substratidentifikationsmethoden mit einigen simplen, aber nachhaltigen Veränderungen kombiniert werden. In der sich anschließenden Massenspektrometrie werden diese potentiellen Substrate identifiziert und näher charakterisiert.

Bei klassischen Substratidentifikationsmethoden wird ein Zellextrakt mit einer aktiven Proteinkinase in Anwesenheit von radioaktiv markierten Mg^{2+} [γ - ^{32}P] ATP inkubiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im Autoradiogramm überprüft, welche Proteine γ - ^{32}P gelabelt erscheinen. Diese Proteine werden chromatographisch aufgereinigt und mittels Massenspektrometrie identifiziert. Ein Nachteil dieser Methode stellt die Anwesenheit vieler Kinasen und deren Substrate im Zellextrakt dar, diese können phosphoryliert werden und man erhält somit eine sehr hohe Hintergrundphosphorylierung.

Die in dieser Arbeit angewendete KESTREL Methode macht sich zu nutze, dass die Hintergrundphosphorylierung durch Inkubation des Ansatzes mit Mn^{2+} [γ - ^{32}P] ATP reduziert werden kann. Aus dem gleichen Grund wurde die Aktivität der Kinase im Überschuss eingesetzt. Zelluläres ATP wurde durch eine Gruppentrennung mittels Gelfiltration zuvor aus den Zellextrakten abgetrennt. Insbesondere eine hochauflösende säulenchromatographische Auftrennung des Gesamtextrakts ist wichtig für die Auflösung und Trennung des komplexen Zellysates in einzelne Fraktionen, die als Substratfraktionen in den Kinasereaktionen eingesetzt werden.

3.1.1 Anionenaustauschchromatographie

Als Ausgangsmaterial diente in diesem KESTREL Ansatz ein Rattenleberextrakt aus der Leber einer adulten Ratte. Die 500g schwere Leber wurde in der entsprechenden Menge eines speziellen für die Chromatographie geeigneten Lysepuffer mechanisch homogenisiert und anschließend über eine Gelfiltrationssäule entsalzt. Nach steriler Filtration des Überstandes wurde dieser chromatographisch über eine Anionenaustauschchromatographie mit Hilfe einer *MonoQ 5/50 GL* Säule (Amersham Bioscience) mittels eines linearen Natriumchloridgradienten aufgetrennt. Proteine eluieren auf Grund ihrer unterschiedlichen Ladung bei unterschiedlichem Salzgehalt und werden so separiert.

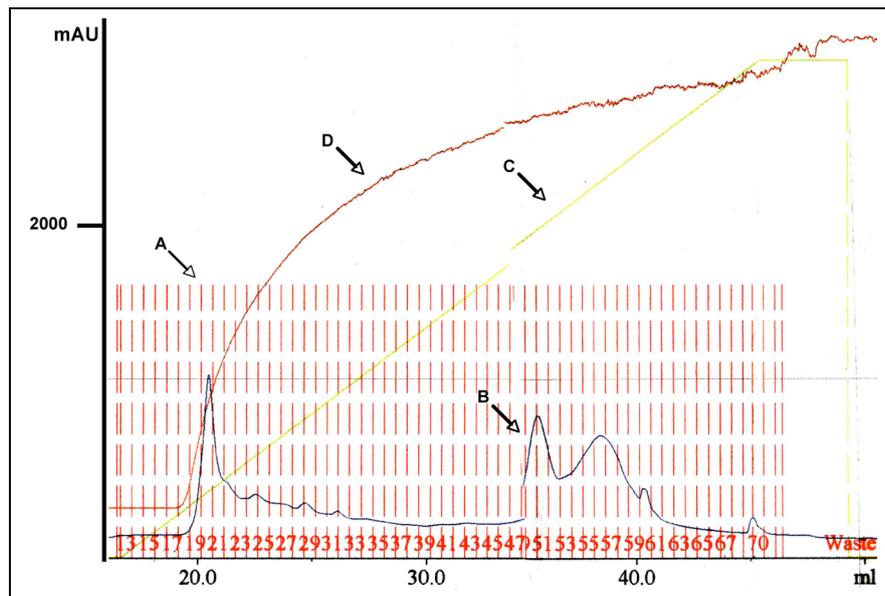


Abb. 8: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie zur Fraktionierung des Rattenleberextraktes. Die *MonoQ 5/50 GL* Säule wurde mit dem zuvor präparierten Rattenleberextrakt beladen und mittels folgendem Puffersystem aufgetrennt: Puffer A: 20mM Tris-HCl pH 8,0 und Puffer B: 20mM Tris-HCl pH 8,0 + 1M NaCl. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels eines Natrium/Chlorid Gradienten von 0%-100% (0-1M NaCl). Die roten, senkrechten Linien (A) geben die Fraktionen an, in denen die eluierten Proteine aufgefangen wurden. Die blaue Kurve (B) zeigt die UV-Absorption des eluierten Proteins in mAU (milli Absorbance Units, Angabe y-Achsenskalierung). Die grüne Linie (C) gibt die Konzentration des Natriumchlorid Gradienten in Prozent an. Die braune Linie (D) gibt zeigt die Leitfähigkeit in mSi (milli Siemens) an.

Im Chromatogramm in Abbildung 8 ist das Elutionsprofil der säulengebundenen Proteine des Rattenleberextraktes zu sehen. Nach kompetitiver Bindung der Proteine an die Matrix wurden die Proteine durch ihre unterschiedliche Ladung mittels des linearen Salzgradienten von der Matrix gelöst und eluiert. Ein erster deutlicher Anstieg in der UV-Absorption ist ab Fraktion 19 zu erkennen (Abb. 8), was vermuten lässt, dass hier die ersten fraktionierten Proteine eluieren. Die weitere Elution der Proteine erfolgte über die sich anschließenden Fraktionen bis Fraktion 67 mit unterschiedlichen *peaks* in der UV-Absorption. Ab Fraktion 35 wurde die UV-Absorption deutlich schwächer. Ab Fraktion 47 ist erneut ein *peak* in der UV-Absorption erkennbar, der sich bis Fraktion 65 erstreckt. Ab Fraktion 65 liess sich nur noch eine geringe Schwankung in der UV-Absorption detektieren. Die Qualität dieser Proteinfractionierung wurde im folgenden proteinanalytischen Experiment dargestellt. Die Fraktionen wurden elektrophoretisch im SDS-Page aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

3.1.2 SDS-Page und Coomassiefärbung der eluierten Fraktionen

Um die Elution der Proteine in den jeweiligen Fraktionen zu überprüfen, wurden je 10µl der Fraktion auf ein SDS-Page aufgetragen und anschließend Coomassie gefärbt (Abb. 9). FT (*Flowthrough*) bezeichnet den Durchfluss, d.h. ungebundenes Protein, welches nicht unter den gegebenen Pufferbedingungen (20mM Tris-HCl pH 8,0) an die Matrix der MonoQ Säule gebunden hat. Dieser Durchfluss wurde in mehreren Fraktionen aufgefangen. Die 1. Fraktion, die 5. und 6. Fraktion und die 10. Fraktion, nach Beginn der Waschphase, wurden auf das SDS-Page aufgetragen (Abb. 9). Die Fraktionen der Waschphase sind im Chromatogramm in Abbildung 8 nicht dargestellt. In Fraktion 1 und Fraktion 10 des Durchflusses, ließ sich in der Coomassie Färbung kein oder nur sehr geringe Mengen Protein detektieren (Abb. 9, FT1, FT10). In Fraktion 5 und 6 des Durchflusses ist der Großteil an ungebundenem Protein vorhanden (Abb. 9, FT5, FT6). Die Detektion der eluierten Proteine beginnt mit geringen Mengen an Protein in Fraktion 18 und

steigert sich langsam. Das Elutionsmuster der Coomassie gefärbten Fraktionen in Abbildung 9 deckt sich mit dem Elutionsmuster im Chromatogramms aus Abbildung 8. Der erste *peak* in der UV-Absorption im Chromatogramm ist bei Fraktion 19 zu erkennen. Im Vergleich zum Chromatogramm sieht man im Coomassie-Gel eine deutliche Färbung der Proteine bei Fraktion 19. Mit zunehmender Salzkonzentration steigt die Gesamtproteinmenge im Eluat weiter an (Fraktion 19-23). Deutlich ist die Elution von Proteinen unterschiedlicher Größen über distinkte Fraktionen, wie z.B. in Fraktion 28-31 bei circa 50kDa oder in Fraktion 39-42 bei circa 75kDa, zu sehen. Der *peak* in der UV-Absorption im Chromatogramm bei Fraktion 47 deckt sich nicht mit einem Anstieg der Proteinmenge im Coomassie-Gel. Die Menge an Protein im Coomassie-Gel ist indes ab Fraktion 47 relativ gering. Eine mögliche Erklärung ist, dass Nukleinsäuren, die ein Absorptionsmaximum bei 260nm haben und die UV-Absorption deutlich beeinflussen, für den erhöhten *peak* in der UV-Absorption verantwortlich sind.

Ergebnisse

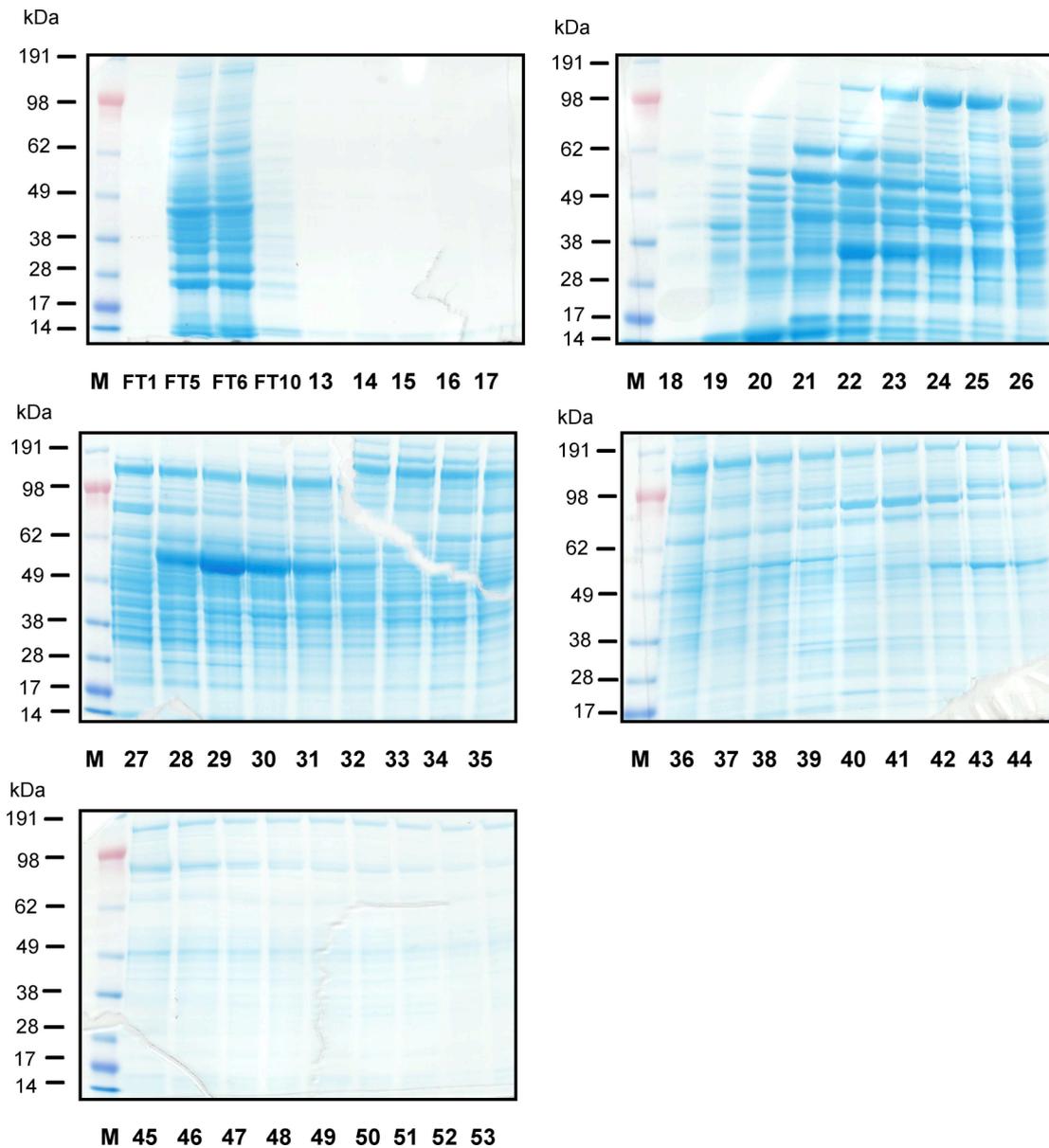


Abb. 9: SDS-Page und Coomassie-Färbung der Fraktionen der ersten Anionenaustauschchromatographie über eine *MonoQ 5/50 GL Säule*. Die einzelnen Fraktionen wurden auf einem 4%-12%iges NuPage Tris-Glycin Gel aufgetrennt und eine Coomassiefärbung durchgeführt. Die Proteingröße ist in Kilodalton am jeweils linken Rand mittels des *SeaBluePlus2* Standardmarkers von Invitrogen dargestellt. Die Beschriftung am unteren Rand der Gele gibt die Numerierung der Fraktionen an. Diese sind identisch mit den Fraktionen des Chromatogramms aus Abb. 7. FT (*Flowthrough*) bezeichnet den Durchfluss, d.h. ungebundenes Protein, welches nicht an die MonoQ-Säule gebunden hat und heraus gewaschen wird. Die Auftrennung des Gesamtlysats auf dem Gel fehlt.

Aus den erhaltenen Fraktionen wurden diese für den radioaktiven Kinase Assay (3.1.9) ausgewählt, die nach SDS-Page und Coomassiefärbung signifikante Proteinmengen enthielten (Abb. 9).

3.1.3 Generierung der Phosphatase Cdc25C für die Proteinexpression in *E.coli*

Wie in der Einleitung aufgeführt, ist Cdc25C als Chk1 Substrat bekannt. Chk1 phosphoryliert die Phosphatase Cdc25C an Aminosäurerest Ser216, was zur Retention der Phosphatase im Zytoplasma und präferiertem Binden des 14-3-3 Proteins führt. Die zytoplasmatische Lokalisation der Cdc25C Phosphatase verhindert somit den Zugang zum nukleären Substrat, der Cdc2 Kinase, die somit nicht am Tyr15 Rest dephosphoryliert werden kann. Der Zellzyklus kommt am G2/M Übergang zum Erliegen (Neill et al. 2002). Ein Fragment Cdc25C Phosphatase (Aminosäure 200-256) wurde für die als Positivkontrolle für Kinase Assays verwendet, um ein bekanntes von Chk1 phosphoryliertes Substrat, zur Verfügung zu haben. Die DNA der dualspezifischen Phosphatase Cdc25C) wurde beim *German Resource Center for Genome Research (RZPD*, Bezeichnung des Klon: IRALp962H2439) bestellt. Die Generierung eines Cdc25C Expressionsvektors wurde, wie bereits publiziert (Ogg et al. 1994) durchgeführt.

3.1.4 Proteinexpression und Aufreinigung von rekombinantem Cdc25C (200-256) in *E.coli*

Die Cdc25C (200-256) wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pGEX-3X (Amersham Bioscience) kloniert, welcher N-terminal für die Glutathione-S-Transferase (GST) codiert. GST ist ein 26kDa großes Protein aus *Schistosoma japonicum*, das an das natürliche Substrat Glutathione bindet. Die Fusion eines Proteins an GST erlaubt die affinitätschromatographische Aufreinigung an

matrixgebundenen Glutathion. Die Kopplung an GST führt zu einer erhöhten Löslichkeit des Proteins, was bei der Proteinexpression von großem Vorteil ist. Ein weiterer Vorteil der Expression eines Proteins mit einem GST-*tag* als Fusion, ist die Detektion des Proteins im Western-Blot. Hierfür kann ein gegen den GST-Epitop-*tag* gerichteter Antikörper eingesetzt werden. Das Vorhandensein eines Antikörpers gegen das Protein an sich entfällt.

Im Folgenden wird die Expression von rekombinantem Cdc25C (200-256) in *E.coli* und die anschließende Aufreinigung beschrieben. Nach der Transformation des GST-Cdc25C (200-256) Klons in *E.coli* BL21 Zellen (Invitrogen), anschließender Übernachtskulturen und IPTG Induktion, wurden die Zellen mit *Novagen Pop Culture Reagent + Lysonase* (Novagen) lysiert und eine Probe des erhaltenen Pellets und Überstandes auf ein 4%-12%iges Tris-Glycin Gel mit 10 Taschen aufgetragen und anschließend Coomassie gefärbt.

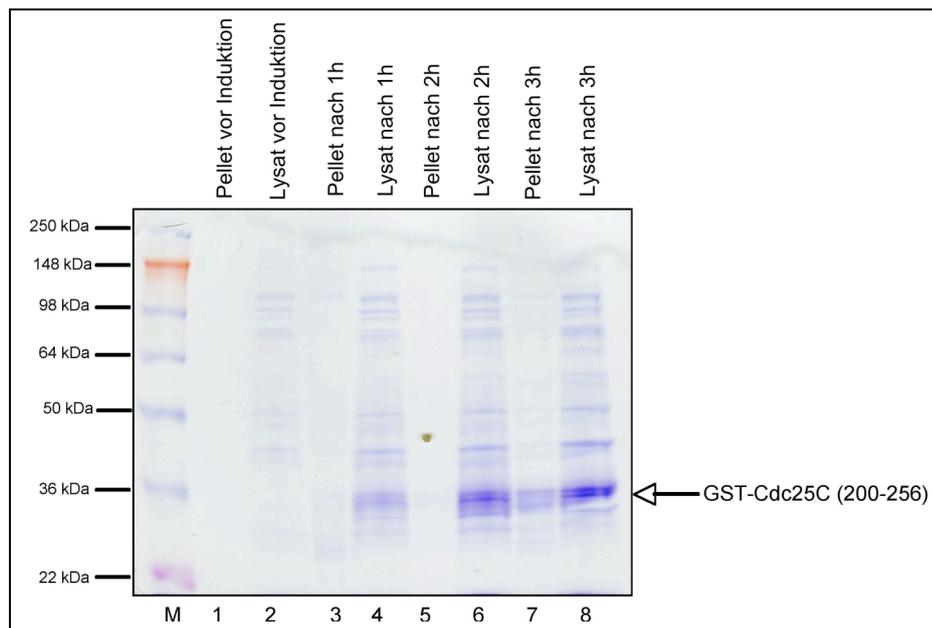


Abb. 10: Coomassie-Färbung nach IPTG induzierter Proteinexpression in *E.coli*. Die Abbildung zeigt den Überstände (Lysat) und Pelletfraktionen der Proteinexpression in *E.coli* vor Induktion und 1h, 2h und 3h nach IPTG Induktion. Die Proben auf einem 4%-12%iges Tris-Glycin Gel (Invitrogen) aufgetragen eine Coomassiefärbung durchgeführt. Die Proteingröße ist in Kilodalton (kDa) am linken Rand aufgetragen (*SeaBluePlus2* Standardmarker, Invitrogen). Der Pfeil rechts des Gels zeigt das GST-Cdc25C (200-256) Protein. Das berechnete Molekulargewicht des Fusionsproteins stimmt mit dem apparenten Molekulargewicht überein.

Wie aus der Gesamtproteinfärbung (Abb. 10) ersichtlich ist, wird im Lysat eine Bande etwas unterhalb von 36kDa (Spur 4) detektierbar, welche sich nach 2h im Lysat verstärkt (Spur 6) und 3h nach der Induktion deutlich sichtbar wird (Spur 8). Im Pellet, 2h nach IPTG Induktion, ist wenig bis gar kein Gesamtprotein zu erkennen (Spur 5), wohingegen, 3h nach IPTG Induktion, deutlich eine Bande bei circa 27kDa zu detektieren ist (Spur 7). Diese ist jedoch schwächer, als im aufgetragenen Lysat in Spur 6 und 8. Das exprimierte Fusionsprotein hat eine Größe von 32kDa, was mit dem beobachteten Laufverhalten gut übereinstimmt. Da ein Großteil des Fusionsprotein in den löslichen Fraktionen vorlag, wurde mit der weiteren Aufreinigung fortgefahren.

3.1.5 Proteinaufreinigung von rekombinaten GTS-Cdc25C (200-256)-Fusionsprotein mittels der *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC)

Die Bakterienzellen der *batch* Kultur wurde abzentrifugiert, nach 3h IPTG Induktion im Lysepuffer resuspendiert und mittels Druck (*FrenchPress*) aufgeschlossen. Der Aufschluss der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Das Lysat wurde dann mittels der *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC) aufgereinigt. An das FPLC Gerät wurde eine 1ml *GSTrapTM FF* GST-Säule gekoppelt. Nach Bindung des Proteins aus dem Lysat an die GST-Säule wurde die Säule durch Auftragen des Glutathion enthaltenen Puffers (50 mM Tris-HCl, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 8.0) eluiert.

Wie dem Chromatogramm in Abbildung 11 zu entnehmen ist, kommt es nach Zugabe des Elutionspuffers zu einer kompetitiven Verdrängung des Proteins von der Säulenmatrix. Der Puffer eluiert die gebundene Proteinfraction ab Fraktion 9. Fraktion 9, 10 und 11 wurden vereinigt und als Eluat 1 aufgefangen. Fraktion 11-19 wurden als Eluat 2 vereinigt, Fraktion 19-23 als Eluat 3 (Abb. 11). Die deutlich erhöhte UV-Absorption in den letzten Fraktionen ist u.a. auf die Anwesenheit von Glutathion zurückzuführen.

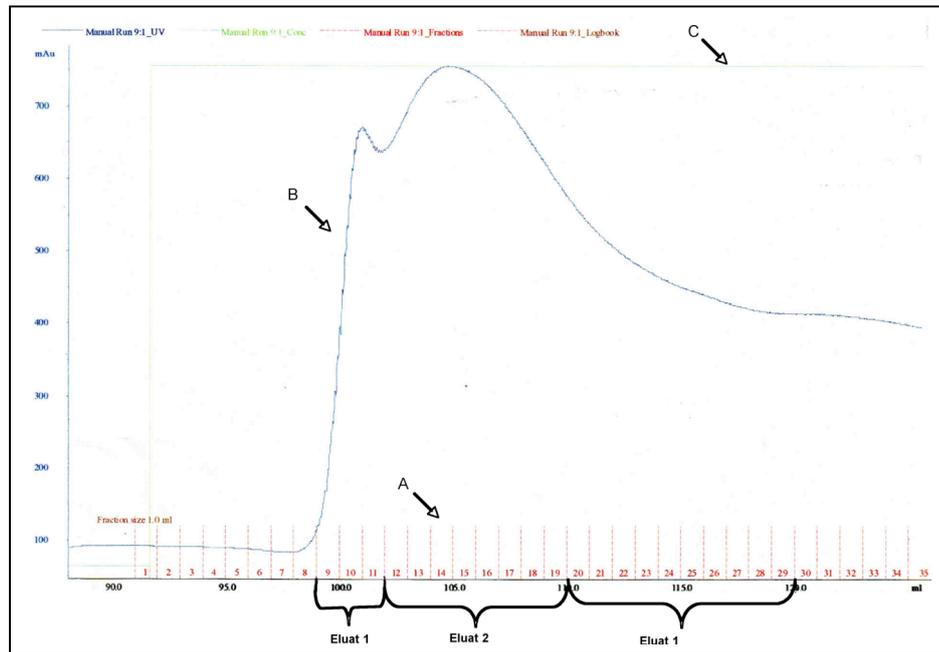


Abb. 11: Näher aufgelöstes Chromatogramm der Proteinaufreinigung über eine *GSTrapTM FF* GST-Säule. Die *GSTrapTM FF* GST-Säule wurde mit dem zuvor aufgeschlossenem Proteinlysat beladen und mittels des Elutionspuffers (50 mM Tris-HCl, 10 mM reduziertes Gluthation, pH 8.0) aufgetrennt. Die roten, senkrechten Linien (A) geben die Fraktionen an, in denen das Eluat aufgefangen wird. Die blaue Kurve (B) zeigt die UV-Absorption des eluierten Proteins in mAU (milli Absorbance Units, linke Achsenskalierung). Die grüne Linie (C) gibt die Konzentration des Elutionspuffers in Prozent an. Fraktion 9, 10, 11 werden zusammengefasst und als Eluat 1 bezeichnet. Fraktion 12-19 werden als Eluat 2, Fraktion 19-29 als Eluat 3 bezeichnet.

Der Durchbruch und Proben der einzelnen Eluate wurden anschließend auf ein SDS-Page aufgetragen und mittels Coomassiefärbung und Western-Blot proteinanalytisch charakterisiert (Abb. 12).

3.1.6 Proteinanalytische Charakterisierung des aufgereinigten GST-Cdc25C (200-256) Fusionsprotein

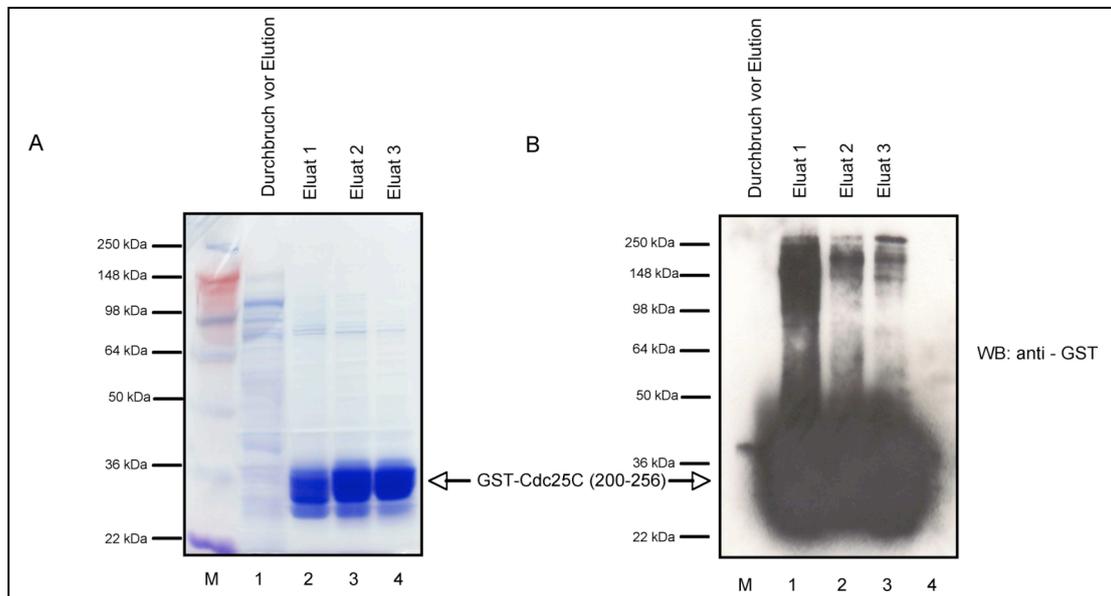


Abb. 12: Coomassie Färbung (A) und Western-Blot Analyse (B) des rekombinanten, aufgereinigten GST-Cdc25C (200-256) aus IPTG induzierten *E.coli* Bakterienkulturen. Die vereinigten Fraktionen der Proteinaufreinigung (Eluat 1, 2 und 3), sowie der Durchbruch wurden auf einem 4%-12%iges Tris-Glycin Gel aufgetrennt und mittels Coomassie gefärbt (A). Die Proteingröße wird in Kilodalton (kDa) am linken Rand mittels des *SeaBluePlus2* Markers (Invitrogen) dargestellt. Die Bezeichnung am oberen Rand des Gels gibt die Anordnung des Eluats und des Durchbruchs auf dem Gel an. Abbildung (B) zeigt die Western-Blot Analyse mittels eines GST-spezifischen Antikörpers.

Abbildung 12 A zeigt die Gesamtproteinfärbung der durch IPTG induzierten Proteinexpression. Wie in der Coomassie-Färbung (A) deutlich zu erkennen ist, wird in der Spur des Eluats 1, 2 und 3 eine große Menge Protein bei circa 32kDa. Diese Proteingröße entspricht in etwa der Größe des zu erwartenden exprimierten rekombinanten GST-Cdc25C (200-256) Fusionsproteins. Im Durchbruch (Spur 1) ist dieses Proteins nicht zu erkennen. Wie die Western-Blot Analyse (B) belegt, detektiert der anti-GST Antikörper das in Spur 1, 2 und 3 aufgereinigte Protein bei circa 32kDa. Auf Grund der hohen Beladung, ist selbst bei kurzer Filmexposition keine scharf definierte Bande detektierbar. Das Proteinlysate wurde mittels eines

Slide-A-Liza (Pierce) umgepuffert und die Proteinkonzentration mit Hilfe des *BCA-Assay* (Pierce) bestimmt, um es im entsprechenden Kinase-Puffer im Kinase Assay einsetzen zu können.

3.1.7 In vitro Kinase Assay

In einem radioaktiven in vitro Kinase Assay wurde das zuvor exprimierte und mittels *FPLC* aufgereinigte Protein Cdc25C (200-256) (Punkt 3.1.5) als Substrat für die Chk1 Kinase eingesetzt. Als Kinase wurde GST-Chk1 des DSTT *Units der University of Scotland* eingesetzt. Ist die Kinase aktiv, so kann sie Cdc25C in Position Ser216 phosphorylieren. GST-Chk1 wurde sowohl alleine nur mit [γ - 32 P] ATP (Abb. 13, Spur 2), als auch mit dem bekannten Substrat GST-Cdc25C (200-256) Protein und [γ - 32 P] ATP (Spur 1) im Kinase Assay eingesetzt (Abb. 13 A). Spur 1 des Autoradiogramms (A) zeigt zwei Signale bei circa 80kDa und bei circa 32kDa. Die Größe der Banden entspricht dem Molekulargewicht von GST-Chk1 (80kDa) und GST-Cdc25C (200-256) (32kDa). Auch ist in Spur 2, in Abwesenheit des Substrats (GST-Cdc25C (200-256)), eine deutliche Bande bei 80kDa zu detektieren. Dies deutet darauf hin, dass Chk1 sich selbst phosphorylieren kann. In diesem Fall spricht man auch von einer Autophosphorylierung, was die Aktivität der Kinase bestätigt.

Ein Nachweis der eingesetzten Proteine in der Kinasereaktion erfolgte mittels Westen-Blot. Beide Proteine konnten mittels eines GST-Antikörpers nachgewiesen (Abb. 13 B) werden. Die Überprüfung der Aktivität von GST-Chk1 war eine notwendige Voraussetzung für die Verwendung im Kestrel Assay.

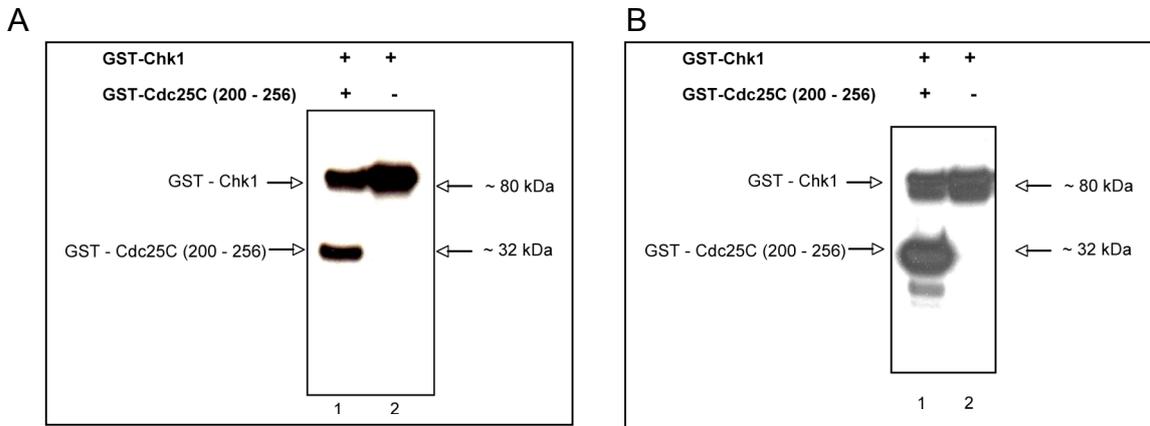


Abb.13: Kontroll Kinase Assay zur Überprüfung der Aktivität des rekombinanten GST-Chk1 und GST-Cdc25C (200-256) und anschließender Wester-Blot. Abbildung A zeigt einen Kinase Assay bei 30°C für 10min mit dem zuvor aufgereinigtem GST-Cdc25C (200–256) (10mU) und GST-Chk1 (10mU) zur Überprüfung der Aktivität des rekombinanten GST-Chk1 mit GST-Cdc25C (200–256) als Substrat. Spur 1 der Abbildung A zeigt die Inkubation von GST-Chk1 mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP und dem bekannten Substrat GST-Cdc25C (200-256) in Kinase Puffer (30mM Tris-HCL pH7,5, 01M EDTA, 2mM MnCl, 10mM DTT). Spur 2 zeigt GST-Chk1 mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP allein in Kinase Puffer. Abbildung B zeigt den dazugehörigen Western-Blot .Die Membran wurde mit einem Anti-GST Antikörper der Firma Santa Cruz geblottet, um die Proteine im Kinase Assay nachzuweisen.

3.1.8 KESTREL Kinase Assay

Mit jeder 2. Fraktion des chromatographisch aufgetrennten Rattenleberextrakts erfolgte ein in vitro Kinase Assay in An- und Abwesenheit des aufgereinigtem GST-Chk1. Als Kontrolle im KESTREL Kinase Assay wurde die Autophosphorylierung von GST-Chk1 überprüft, indem die Kinase allein mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP inkubiert wurde. Unspezifische Phosphorylierung durch andere, z.B. in den Fraktionen enthaltene Kinasen wurde durch Inkubation der Proteinfraction in Abwesenheit von GST-Chk1 überprüft. Nach Durchführung der radioaktiven Kinasereaktion, wurden diese durch SDS-Page aufgetrennt und eine Autoradiographie durchgeführt (Abb. 14).

Ergebnisse

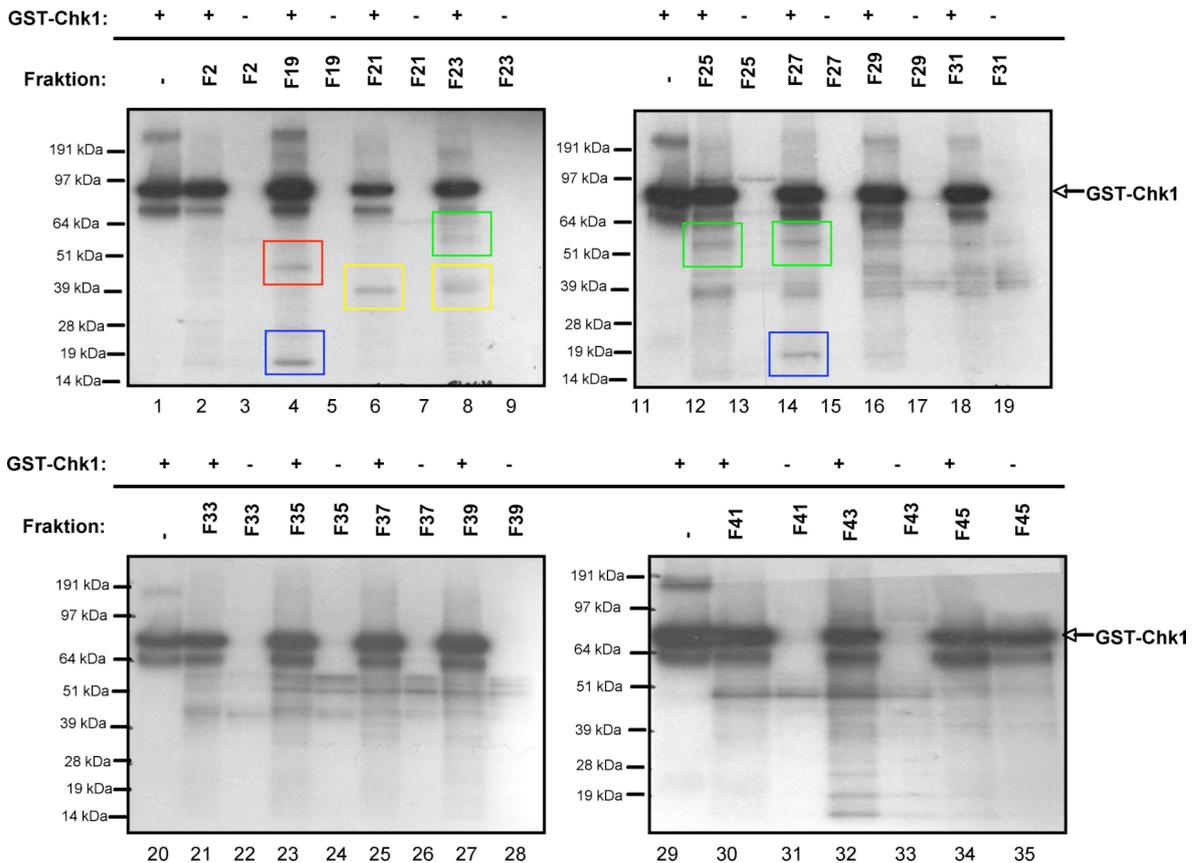


Abb. 14: Autoradiogramm der ersten Chromatographie. Autoradiogramm des KESTREL Assays mit den Fraktionen 2 und 19-45 (jede zweite Fraktion). Im Kinase Assay wurden jeweils der 10µl Fraktion mit 5µl Chk1 Kinase (10mU), 2µl MnCl (2mM) + radioaktives ATP (20nM [γ - 32 P] ATP) und 13µl KESTREL-Puffer bei 30°C für 10min inkubiert und auf ein 4%-12%iges NuPAGE Tris-Glycin Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurde rekombinantes GST-Chk1 in Kombination mit [γ - 32 P] ATP und Puffer allein, ohne Fraktion eingesetzt (Spur 1). Als weitere Kontrollen wurden die Proteinfractionen in Abwesenheit von GST-Chk1 eingesetzt. Die farbliche Markierungen zeigen die im Autoradiogramm auftretenden potentiellen Kinase Substrate. Bei den phosphorylierten Banden bei circa 80kDa und 70kDa handelt es sich um GST-Chk1 und vermutlich ein Degradationsprodukt.

In den Kinasereaktionen mit aufgereinigten rekombinanten GST-Chk1 und den Rattenleberfraktionen konnten zusätzliche phosphorylierte Banden im Autoradiogramm identifiziert werden (Abb. 14). Die unterschiedlichen Farben der Kästchen zeigen die Signale in den einzelnen Fraktionen. In Spur 1 ist die Reaktion der rekombinanten GST-Chk1 Kinase ohne Fraktion aufgetragen. Die GST-Chk1 Kinase zeigt, wie vorher (Abb. 13A) eine deutliche Autophosphorylierung bei 80kDa. Weiterhin ist circa 10kDa unter der eigentlich

autophosphorylierten Kinase eine weitere Bande zu detektieren. Da in dieser Fraktion die rekombinante GST-Chk1 Kinase allein mit [γ - 32 P] ATP inkubiert wurde, handelt es sich hierbei vermutlich um ein Degradationsprodukt. In den Fraktionen 19-27 sind mindestens 4 unterschiedliche Signale eindeutig zu identifizieren. In Spur 4, bei Inkubation von Fraktion 19 mit GST-Chk1 und [γ - 32 P] ATP sind Signale bei circa 47kDa bei circa 16kDa zu erkennen (rote und blaue Markierung). Eine Bande mit dem gleichen Molekulargewicht taucht abermals im Phosphorylierungsansatz mit Fraktion 27 (blaue Markierung, Spur 14) auf. In Fraktion 21 und 23 ist jeweils ein phosphoryliertes Signal mit der Größe von circa 41kDa zu erkennen (gelbe Markierung, Spur 6 und 7). In den Kinasereaktionen mit Fraktion 23, 25 und 27 (Spur 14) ist ein phosphoryliertes Signal mit einem Molekulargewicht von circa 60kDa zu detektieren (grüne Markierung). Diese Banden werden nach Exposition des Autoradiogramms über Nacht verstärkt sichtbar (Autoradiogramm nicht gezeigt). Die detektierten, hier beschriebenen Signale im Autoradiogramm, sind explizit in den Reaktionen zu detektieren, in welche GST-Chk1 hinzugefügt wurde. In den entsprechenden Kontrollreaktionen in Abwesenheit von GST-Chk1 sind diese Banden nicht zu detektieren.

Ab Fraktion 29 (Spur 16) werden verstärkt Signale erkennbar, welche in An- und Abwesenheit von GST-Chk1 auftauchen. Dies deutet darauf hin, dass eine Phosphorylierung durch in den Fraktionen vorhandene Phosphotransferasen verursacht wird.

Um die erhaltenen potentiellen Substrate zu verifizieren und zu identifizieren, wurde der Versuch ein weiteres Mal unter den gleichen Bedingungen wiederholt.

3.2 2. KESTREL Assay

3.2.1 Zweite Anionenaustauschchromatographie

Als Ausgangslysat diente, wie beim der ersten Ionenaustauschchromatographie, ein Extrakt aus der Leber einer adulten Ratte. Nach Homogenisation und

entsalzender Gelfiltration wurde das Rattenleberextrakt erneut chromatographisch über eine MonoQ 5/50 GL Säule (Anionenaustauschchromatographie, Amersham Bioscience) mittels eines Natriumchloridgradienten aufgetrennt.

Nach Bindung des Rattenleberextrakts an die Matrix, erfolgte die Elution mittels des linearen Salzgradienten. Das erste Signal in der UV-Absorption ist in den Fraktionen 1-3 zu detektieren und zeigt die Fraktion der nicht an die Säule bindenden Proteine an. Ungebundenes nicht immobilisiertes Protein wird von der Säulenmatrix gewaschen. Ein weiteres Maximum in der UV-Absorption ist bei Fraktion 11 zu erkennen, gefolgt von einigen niedrigeren *peaks*. Ein zweiter deutlicher *peak* liegt in Fraktion 45. Ab Fraktion 60 ist keine signifikante UV-Absorption zu erkennen.

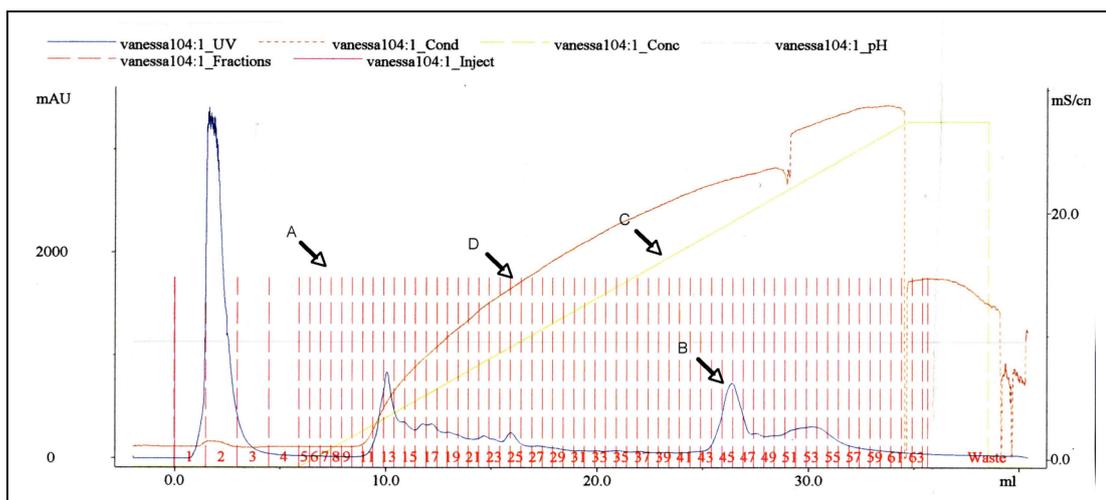


Abb. 15: Chromatogramm der zweiten Anionenaustauschchromatographie zur Fraktionierung des Rattenleberextraktes. Die MonoQ 5/50 GL Säule wurde mit dem zuvor präparierten Rattenleberextrakt beladen und mittels folgendem Puffersystem aufgetrennt: Puffer A: 20mM Tris-HCl pH 8,0 und Puffer B: 20mM Tris-HCl pH 8,0 + 1M NaCl. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels eines Natriumchlorid Gradienten von 0%-100% Die roten, senkrechten Linien (A) geben die Fraktionen an, in denen die eluierten Proteine aufgefangen werden. Die blaue Kurve (B) zeigt die UV-Absorption des eluierten Proteins in mAU (milli Absorbance Units, Angabe y-Achsenskalierung). Die grüne Linie (C) gibt die Konzentration des Natrium/Chlorid Gradienten in Prozent an. Die braune Linie (D) gibt zeigt die Leitfähigkeit in mSi (milli Siemens) an.

Vergleicht man die erste Anionenaustauschchromatographie (Abb. 8) mit der zweiten Chromatographie (Abb. 15), so zeigt sich ein sehr ähnliches UV-Absorptionsprofil. In beiden Chromatographien fallen zwei relativ scharfe Maxima in der UV-Absorption auf, eines am Beginn, das andere in der zweiten Hälfte des Salzgradienten. Der Abstand zwischen diesen Absorptionsmaxima ist in beiden Chromatographien nahezu identisch.

Bei der zweiten Anionenaustauschchromatographie wurden 60 Fraktionen gesammelt. 10 μ l der jeweiligen Fraktion wurden anschließend, wie bereits bei der ersten Anionenaustauschchromatographie, proteanalytisch charakterisiert auf einem 4%-12%iges NuPage Tris-Glycin Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassie gefärbt.

3.2.2 SDS-Page und Coomassiefärbung der Fraktionen der zweiten Anionenaustauschchromatographie

Wie bereits in Punkt 3.1.2 beschrieben und bei der ersten Chromatographie bereits durchgeführt, wurden auch hier je 10 μ l des Eluats elektrophoretisch aufgetrennt und Coomassie gefärbt. (Abb. 16).

In der 2. und 3. Fraktion des Durchflusses ist eine deutliche Menge an Protein vorhanden. Ab Fraktion 11 beginnt die Elution von Proteinen durch den Salzgradienten. Die Färbung der Proteine im Coomassiegel deckt sich auch hier mit dem Anstieg in der UV-Absorption des 2. Chromatogramms (Abb. 15). Besonders deutlich wird hier, dass das Elutionsprofil verschiedener Proteine sehr ähnlich dem der ersten Anionenaustauschchromatographie ist. In den frühen Fraktionen wurde in beiden Chromatographien ein relativ großes Protein bei circa 150kDa eluiert. In folgenden Fraktionen, jeweils bei Chromatographie 1 in Fraktion 28-31 und in Chromatographie 2 in Fraktion 20-24, eluiert ein Protein bei einer Größe von circa 55kDa.

Weitere Beispiele finden sich auch in den späteren Fraktionen, in denen noch Proteine nachweisbar sind. Wie bereits im vorherigen Experiment, deckt sich auch

Ergebnisse

hier die UV-Absorption in den Fraktionen 43-57 nicht mit einem Anstieg an Proteinen, was wiederum darauf schließen lässt, dass in diesen Fraktionen ein hoher Nukleinsäureanteil vorhanden ist.

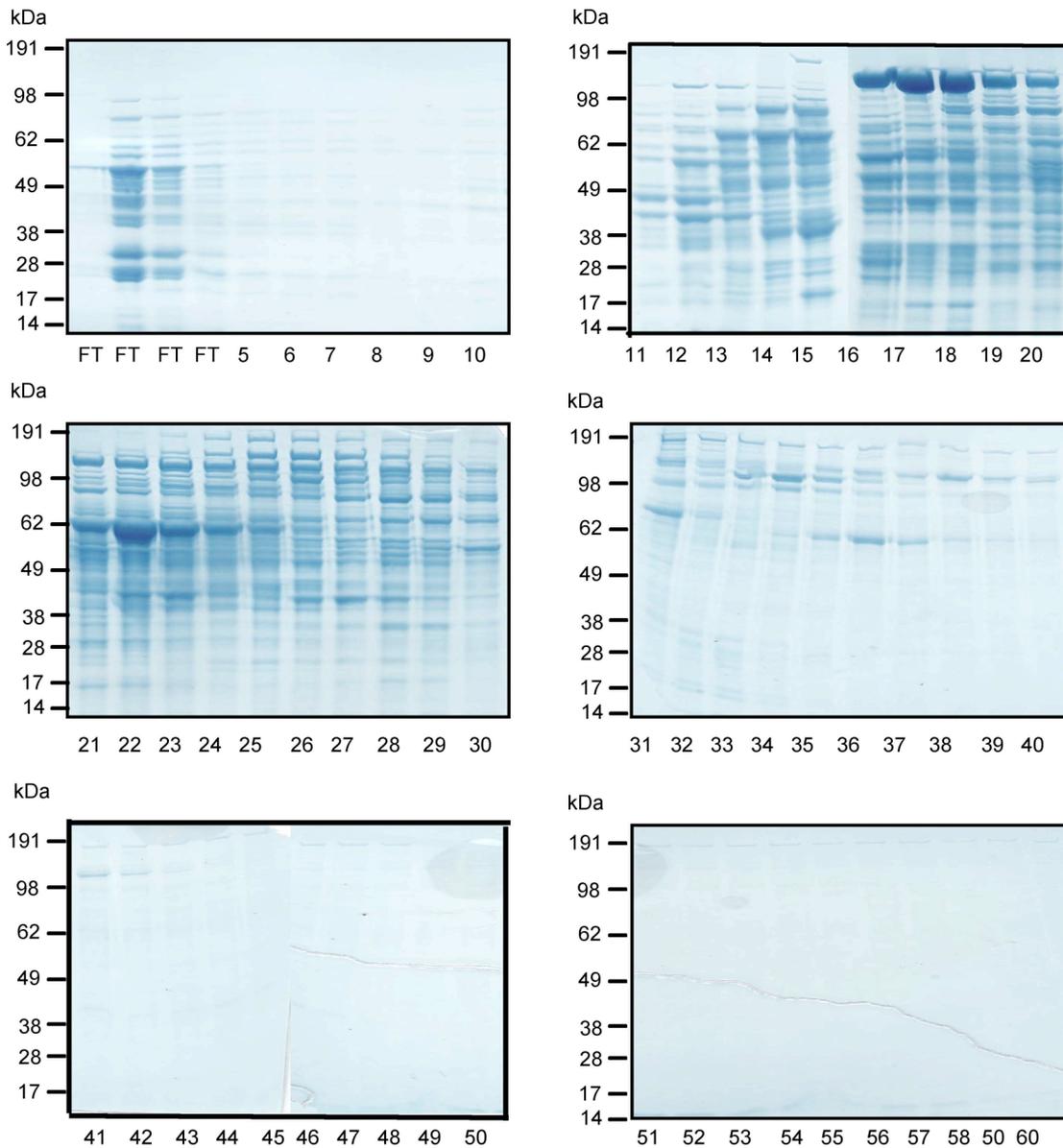


Abb. 16: SDS-Page und Coomassie-Färbung der Fraktionen der zweiten Anionenaustauschchromatographie über eine *MonoQ 5/50 GL Säule*. Die einzelnen Fraktionen wurden auf einem 4%-12%iges NuPage Tris-Glycin Gel aufgetrennt und mittels Coomassie gefärbt. Die Proteingröße ist in Kilodalton am linken Rand dargestellt. Die Beschriftung am unteren Rand der Gele gibt die Numerierung der Fraktionen an. FT (*Flowthrough*) bezeichnet den Durchfluss, d.h. ungebundenes Protein, welches nicht an die MonoQ-Säule gebunden hat. Die Auftrennung des Gesamtlysats auf dem Gel fehlt.

3.2.3 2. KESTREL in vitro Kinase Assay

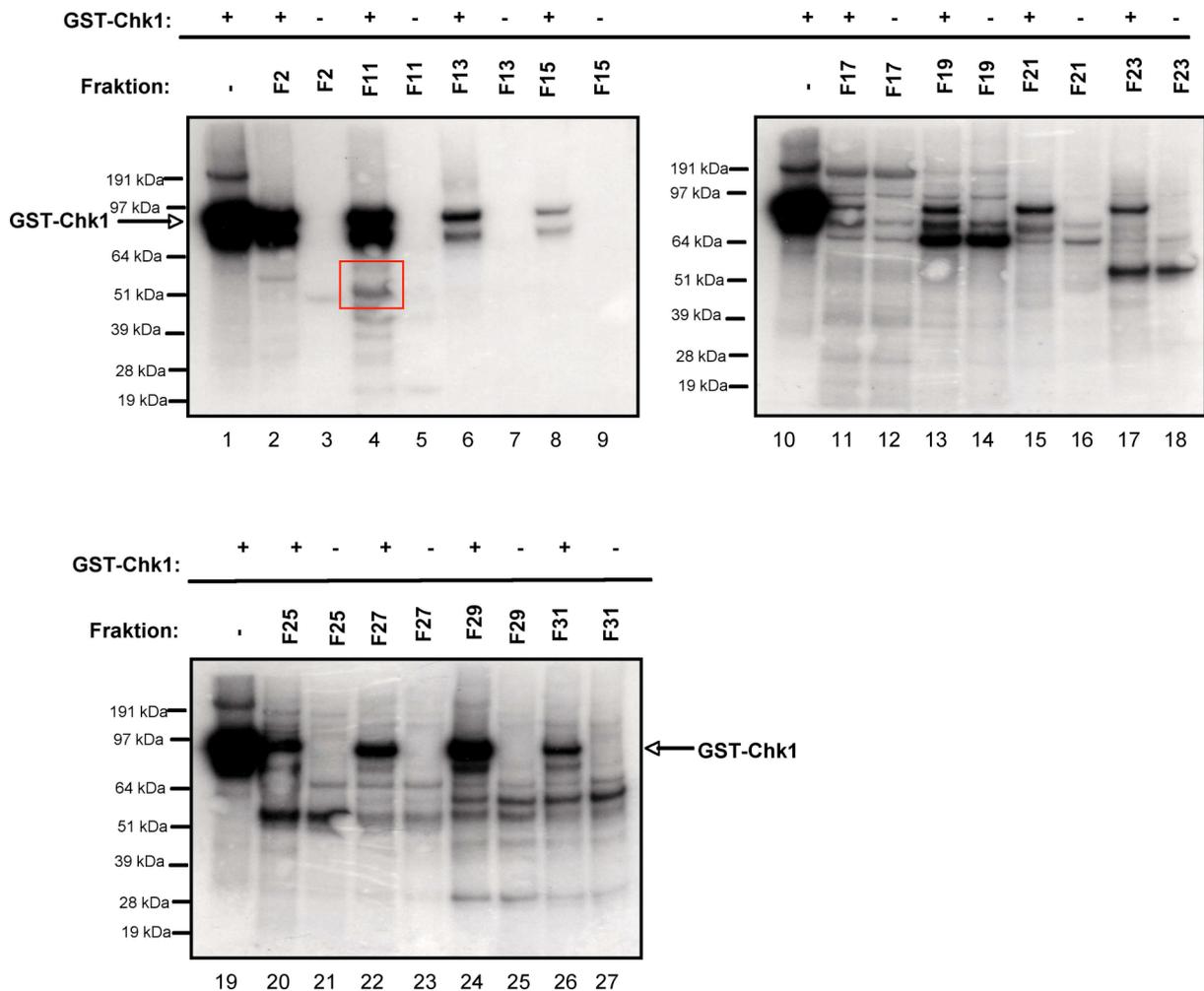


Abb. 17: Autoradiogramm der zweiten Chromatographie. Autoradiogramm des KESTREL Assays mit den Fraktionen 2 und 19-45 (jede zweite Fraktion). Im Kinase Assay wurden jeweils der 10µl Fraktion mit 5µl Chk1 Kinase (10mU), 2µl MnCl (2mM) + radioaktives ATP (20nM [γ - 32 P] ATP) und 13µl KESTREL-Puffer bei 30°C für 10min inkubiert und auf ein 4%-12%iges NuPAGE Tris-Glycin Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurde rekombinantes GST-Chk1 in Kombination mit [γ - 32 P] ATP und Puffer allein, ohne Fraktion eingesetzt (Spur 1). Als weitere Kontrollen wurden die Proteinfractionen in Abwesenheit von GST-Chk1 eingesetzt. Die farbliche Markierungen zeigen die im Autoradiogramm auftretenden potentiellen Kinase Substrate. Bei den phosphorylierten Banden bei circa 80kDa und 70kDa handelt es sich um GST-Chk1 und vermutlich ein Degradationsprodukt.

Betrachtet man nun das Autoradiogramm der zweiten Anionenaustauschchromatographie, so zeigt sich ein deutlich anderes Bild als in der ersten Anionenaustauschchromatographie (Abb. 14 + 17). Im Fall des zweiten

KESTREL-Experiments sind insbesondere in den frühen Elutionsfraktionen weniger phosphorylierte Banden, als im ersten Experiment erkennbar. Die Detektion von autophosphorylierten GST-Chk1 bei 80kDa ist in den Fraktionen mit GST-Chk1 Kinase zu detektieren (Spur 1, 2, 4, 6 usw.). In Spur 4 zeigt die Inkubation der rekombinanten GST-Chk1 Kinase mit [γ - 32 P] ATP und Fraktion 11 eine phosphorylierte Bande bei circa 50kDa. Ein Signal mit dem Molekulargewicht von circa 47kDa findet sich auch in der ersten Ionenaustauschchromatographie wieder, hier analog in der Fraktion 19 (Spur 4, Abb. 14). Das Signal bei circa 16kDa ist in der Fraktion 11 des zweiten KESTREL-Experiments ebenfalls nicht zu detektieren (Abb. 14, Spur 4 + Abb. 17, Spur 4). Entsprechend sind die weiteren Banden aus dem ersten KESTREL-Experiment (Abb. 14, gelb, grün, blaube Markierung) nicht im zweiten Experiment wiederzufinden. Auffällig in dem Autoradiogramm der zweiten Chromatographie (Abb. 17) Abnahme der Signalintensität der Autophosphorylierung der GST-Chk1 Kinase über mehrere Fraktionen. Diese Abnahme beginnt in Fraktion 13 (Spur 6) und ist sehr deutlich in Fraktion 15 mit GST-Chk1 und [γ - 32 P] ATP zu erkennen. In den Fraktionen 15 und 17 (Spur 8 +11) ist die Autophosphorylierung nur noch sehr schwach zu erkennen. Ab Fraktion 19 (Spur 13) nimmt das Signal der Autophosphorylierung wieder zu, bis diese schließlich in Fraktion 27 mit GST-Chk1 und [γ - 32 P] ATP (Spur 22) wieder nahezu vollständig zu sehen ist. Dieses Phänomen trat bei mehreren Wiederholungen der KESTREL-Experimente auf.

3.3 Zusammenfassung weiterer KESTREL-Experimente

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Abnahme des Signals der Autophosphorylierung der GST-Chk1 Kinase um ein Rattenleberlysat spezifisches Phänomen handelt, wurden als Ausgangslysate Extrakte aus Hela-Zellen chromatographisch nach dem gleichen Prinzip mittels der *MonoQ 5/50 GL* Säule aufgetrennt. Eine Abnahme der Autophosphorylierung war interessanterweise auch hier in mehreren Versuchen zu detektieren. Somit konnte ausgeschlossen

werden, dass dies Phänomen spezifisch auf das Lysat der Rattenlebern zurück zu führen war.

Weitere Parameter des KESTREL Versuchs wurden variiert, um die Abnahme des Signals der Autophosphorylierung der GST-Chk1 Kinase zu vermeiden und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen (z.B. Auftrennung über eine andere Säule, weiterer Austausch des Extraktes, Einsatz von Phosphatase Inhibitoren). Um zu untersuchen, ob es sich eventuell um eine spezifische dephosphorylierende Aktivität handeln könnte, wurden Experimente mit Phosphatase Inhibitoren durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten keine spezifische Inhibition der Phosphorylierung der Chk1 Kinase.

Ein Hinweis darauf, dass es sich bei der Abnahme der Autophosphorylierung um ein Chk1 spezifisches Problem handelt, gab die Diplom-Arbeit von Krop, 2005. Die aus der zweite Ionenaustauschromatographie erhalten Fraktionen wurden nach dem KESTREL Prinzip mit der Tyrosinkinase GST-Pyk2 inkubiert. Im anschließenden *in vitro* Kinase Assay wurden mehrere unterschiedliche phosphorylierte Banden detektiert, die auch durch massenspektrometrische Methoden identifiziert und durch weitere Versuche als Pyk2 Substrate bestätigt werden konnten.

Abschließend ist zu sagen, dass die Reproduzierbarkeit in der Detektion von Signalen im KESTREL Assay im Fall von Chk1 nicht gegeben war und dieser experimentelle Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

3.4 Hefe-2-Hybrid-System

Für die Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen wurde das Hefe-2-Hybrid System benutzt (Fields and Song, 1989). Dieses System ist ein auf dem Transkriptionsfaktor Gal4 der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* basierendes System, bei dem zwei unabhängige und funktionell voneinander getrennte Domänen, die Aktivierungsdomäne (AD), eine transkriptionsstimulierende Aktivität besitzt und die DNA-Bindedomäne (BD), welche spezifische DNA Sequenzen bindet, durch Interaktion zweier Proteine oder Proteindomänen in räumliche Nähe gebracht und so die Expression nachgeschalteter Gene aktivieren können. Das Prinzip beruht auf zwei Hefe Expressionsvektoren. Der Expressionsvektor des Köderproteins (*bait*) trägt die DNA-Bindedomänenfusion mit dem Protein, für das Interaktionspartner gesucht werden. Das zweite Plasmid, das Beuteprotein (*prey*), setzt sich aus der Gal4 Aktivierungsdomäne und einen potentiellen fusionierten Bindepartner des Köderproteins zusammen. Wie auch in dieser Arbeit verwendet, kann eine genomweite Bibliothek, integriert in einen 2-Hybridvektor, genutzt werden, um nach Interaktionspartnern für ein Zielprotein zu suchen. Sowohl das Köderprotein, als auch das Beuteprotein replizieren in Hefe autonom. Werden diese beiden Vektoren gemeinsam in die Hefe eingebracht und kommt es dann zu einer Interaktion, so werden die DNA-Binde- und Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe zueinander gebracht und nachgeschaltete Reportergene wie z.B. *HIS3*, *ADE2* oder *MEL1* aktiviert.

Das Hefe-2-Hybrid-System ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, dennoch hat dieses System auch gewisse Nachteile. Da die Transkription der Reportergene im Zellkern der Hefe stattfindet, muss die Interaktion der Proteine ebenfalls im Zellkern lokalisiert sein. Membranständige Proteine lassen sich nicht in den Zellkern transportieren. Ein weiteres großes Problem stellt die Expression, die Faltung und Reifung oder posttranslationale Modifikation von Proteinen in einem heterologen Organismus dar, wenn wie im Rahmen dieser Arbeit, die Interaktion humaner Proteine untersucht wird.

Somit ist es ein Muss im Hefe-2-Hybrid Versuch identifizierte Proteine durch

weitere Untersuchungen zu verifizieren. Auch die Identifikation von Interaktionspartnern von Kinasen bedeutet nicht zwangsläufig, dass diese durch die Kinase phosphoryliert werden.

Zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen wurde das Hefe-2-Hybrid-System unter Verwendung der Plasmide des „MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3“ (Clontech) und des Hefestamms AH109 angewendet.

Als vorbereitende Arbeit für den Hefe-2-Hybrid *Screen* wurden unterschiedliche Konstrukte generiert:

3.4.1 Klonierungen

3.4.1.1 Zielgerichtete Mutagenese

Ziel der Mutagenese war es, eine Kinase-inaktive Variante von Chk1 zu generieren, da angenommen wurde, dass diese ihre Interaktionspartner oft stabiler binden, als aktive Kinasen.

Wie in Abbildung 4 zu erkennen ist, ist das erste konservierte Lysin an Position 38 der Kinasedomäne. Dies führt zu einer Inaktivierung der Kinase, da der Lysinrest essentiell für die Bindung von ATP ist.

Eine Mutation von Lysin (AAG) zu der Aminosäure Alanin (GCG) wurde eingeführt. Als parentales Plasmid für die Mutagenese diente das bakterielle Expressionskonstrukt pGEX-6P-1 Chk1 6His (DSTT, Dundee).

Die Mutagenese wurde mit dem *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach Protokoll (2.2.1.7.2) durchgeführt. Nach Transformation des Mutageneseansatzes in XL 10-Gold Zellen und anschließender Minipräparation der DNA wurde eine Auswahl präparierter Plasmide durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Einführung der Punktmutation wurde durch Sequenzierung besätigt. Anschließend wurde ein positiver Klon ausgewählt und für weitere Klonierungen in den Two-Hybrid Köder Vektor pGBKT7 verwendet.

Für die Klonierung der Wildtyp Chk1 Kinase und deren inaktiven Variante Chk1 K/A 38 in den Köder Zielvektor pGBKT7 des Two-Hybrid Assays, wurde die für Chk1 und Chk1 K/A 38 codierende DNA des Vektors pGEX-6P-1 Chk1 6His bzw. pGEX-6P-1 Chk1 6His K/A 38 Vektors mittels der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI* herausgeschnitten und in den Zielvektor pGBKT7 umkloniert.

Den Subklon pGEX-6P-1 Chk1 6His und pGEX-6P-1 Chk1 6His K/A 38 wird am 5' Ende von der für das Restriktionsenzym *EcoR I* spezifische Sequenz G/AATTC flankiert. Diese Sequenz wird von dem Restriktionsenzym *EcoRI* erkannt und spezifisch geschnitten. Das 3' Ende des Subklons wird von einer Sequenz flankiert GC/GGCCGC die spezifisch von der Restriktionsendonuklease *NotI* erkannt und geschnitten wird.

Der 2-Hybrid Köder-Vektor pGBKT7 besitzt ebenfalls diese Schnittstellen und wurde in einem Doppelverdau mittels *EcoRI* und *NotI* in dem entsprechenden *EcoRI* Puffer geschnitten und auf einem 1%igen präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. (Abb. 18, Spur 2 und 3).

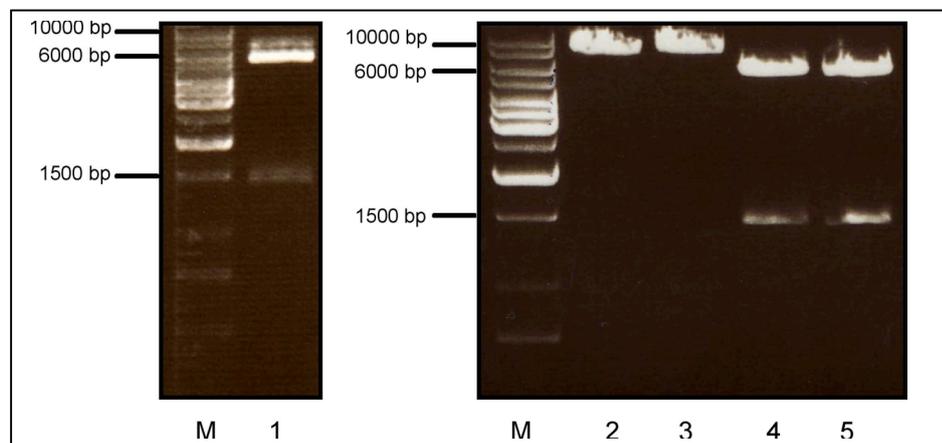


Abb. 18: Agarosegel nach Restriktionsverdau. 1%iges Agarosegel des Restriktionsverdaus des pGEX-6P-1 Chk1 6His und pGEX-6P-1 Chk1 6His K/A 38 Vektors mittels der Restriktionendonukleasen *EcoRI* und *NotI*. Die Größe der DNA Fragmente ist durch den Größenstandard am linken Rand des Geles angegeben (*GeneRuler*, Fermentas). Spur 1 zeigt den Subklon pGEX-6P-1 Chk1 6His nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *NotI*. Spur 2 und 3 zeigt den linearisierten Vektor pGBKT7, Spur 4 und 5 zeigen den pGEX-6P-1 Chk1 6His K/A 38 verdaut mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI*.

Spur 1 zeigt den Subklon pGEX-6P-1 Chk1 6His nach *EcoRI/NotI* Restriktionsverdau. Die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *NotI* schneiden ein circa 1500bp großes Fragment. Diese Größe entspricht in etwa dem erwarteten Chk1 Fragment. Der pGEX-6P-1 Vektor hat eine Größe von circa 4900bp zeigt jedoch im Agarosegel eine apparente Größe von circa 6kbp. Spur 4 und 5 zeigen den pGEX-6P-1 Chk1 6His K/A 38, welcher auf die gleiche Art verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Auch hier ließ sich ein Fragment von der Größe von circa 1500bp und ein Vektorfragment bei circa 6kbp detektieren. Spur 2 und 3 zeigen den linearisierten pGBKT7 Vektor bei circa 8500bp. Der Vektor hat eine Größe von 7,3kbp. Der linearisierte pGBKT7 Vektor und die erhaltenen circa 1500bp großen Fragment wurden mittels des *Jetsorb Kits (Genomed)* eluiert und anschließend über eine T4 Ligase der Vektor pGBKT7 mit jeweils dem Fragment Chk1 und Chk1 K/A 38 ligiert.

Nach elektrochemischer Transformation des Ligationsansatzes in *E.coli* TOP10 Zellen (Invitrogen) erfolgte eine *Colony-PCR*, bei der mittels Chk1 spezifischer Primer, ein 540bp Fragment der Chk1 Kinase amplifiziert wurde (Abb. 19). In allen Spuren ist die Detektion des Fragments bei 540bp möglich. Spur 3, 7, 14, 19 und 20 zeigen eine starke amplifikation des Fragments. Klone, die ein positives Signal unter UV Bestrahlung im Agarosegel zeigen, wurden kultiviert, eine Plasmidpräparation durchgeführt und die DNA sequenziert.

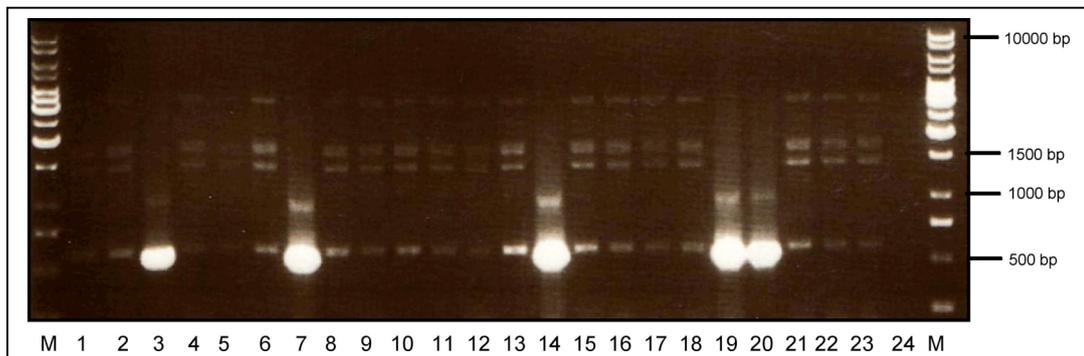


Abb.19: 1%iges Agarosegel nach Colony-PCR. 1%iges Agarosegel der Colony-PCR nach Ligation des linearisierten Vektors pGBKT7 mit Chk1 oder Chk1 K/A 38 und anschließender Transformation in *E.coli* TOP10 Zellen. Der Marker (M, GeneRuler, Fermentas, rechte Skalierung) gibt die Größe der DNA Fragmente in Basenpaaren an. Spur 1-12 zeigt die Ergebnisse der PCR der Ligation des pGBKT7 Vektors mit dem Wildtyp Chk1 Fragment, Spur 13-24 zeigt die Ergebnisse der PCR Fragmente nach Ligation des pGBKT7 Vektors mit dem mutierten Chk1 K/A 38 Fragment.

Durch Sequenzierung konnte die Richtigkeit der Klonierungen mit Wildtyp Chk1 DNA (Klon 3 + 7) und Chk1 K/A 38 (Klon 14, 19 und 20) bestätigt werden. Jeweils ein positive sequenzierter Klon wurde ausgewählt und für den 2-Hybrid Assay eingesetzt. Die neuen Konstrukte wurden wie folgt bezeichnet: pGBKT7 Chk1 FL und pGBKT7 Chk1 K/A 38.

3.4.2 Wachstumsverhalten der Hefen

Beide Reporterhefen wurden vor Beginn der eigentlichen Transformations-experimente phänotypisch charakterisiert, indem ihr Wachstumsverhalten auf verschiedenen SD-Selektionsmedien untersucht wurde.

Die Zugabe des Inhibitors 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT), der die basale *HIS3*-Reporter-gen-Expression auf SD/-His/-Trp Platten unterdrückt, war im Fall des Hefestamms *AH109* nicht notwendig.

Das Matchmaker 2-Hybrid System arbeitet mit Hefe-Expressionsvektoren, die jeweils für eine der beiden Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors kodieren. In

diesem 2-Hybrid Screen wurde der Vektoren pGBKT7, der die GAL4-DNA-Bindedomänen (DNA-BD-Vektor) trägt, eingesetzt. Die GAL4-Aktivierungsdomäne befindet sich in dem Vektor pACT2; dieser Vektor trägt die cDNA Bibliothek, isoliert aus fötalem Gehirn.

Beide Vektoren einen der beiden trophischen Marker *TRP1* (pGBKT7) oder *LEU2* (pACT2), der es transformierten Reporterhefen erlaubt, auf Tryptophan- bzw. Leucin- freiem Selektionsmedium zu wachsen.

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die einzelnen in dem 2-Hybrid-Sceen verwendeten Vektoren:

Name des Vektors	Fusion	Hefe Selektions marker	Bakterien Selektionmarker
pGBKT7 Chk1 FL	DNA-BD/Köder (Chk1 FL)	TRP1	Kanamycin
pGBKT7 Chk1 K/A 38	DNA-BD/Köder (Chk1 FL)	TRP1	Kanamycin
pACT2	DNA-AD/cDNA Bibliothek	LEU2	Ampicillin
pGBKT7-53	DNA-BD/p53 Kontrolle	TRP1	Kanamycin
pGADT7-T	DNA-AD/ T-antigen Kontrolle	LEU2	Ampicillin
pGBKT7-Lam	DNA-BD/Lamin C Kontrolle	TRP1	Kanamycin

Tabelle 4: Übersicht über die im 2-Hybrid Screen verwendeten Konstrukte. Neben der jeweiligen Bezeichnung des Vektors werden die Komponenten des Fusionsprotein der Hefe- und Bakterienselektionsmarker angegeben.

Die in Tabelle 4 aufgeführten 2-Hybrid-Vektoren wurden vor ihrer Verwendung im 2-Hybrid Screen getestet. Die Vektoren und die cDNA Bibliothek wurden zur Überprüfung der Auxotrophiemarker *LEU2* und *TRP1* in dem Hefestamm AH109 transformiert und auf SD/-Leu-, SD/-Trp- und SD/-Leu/-Trp Selektionsmedium ausplattiert und bei 30°C für 2-4 Tage im Brutschrank inkubiert. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmide pGBKT7 Chk1 FL und pGBKT7 Chk1 K/A 38 wurden auf mögliche Toxizität im Hefestamm AH109 untersucht.

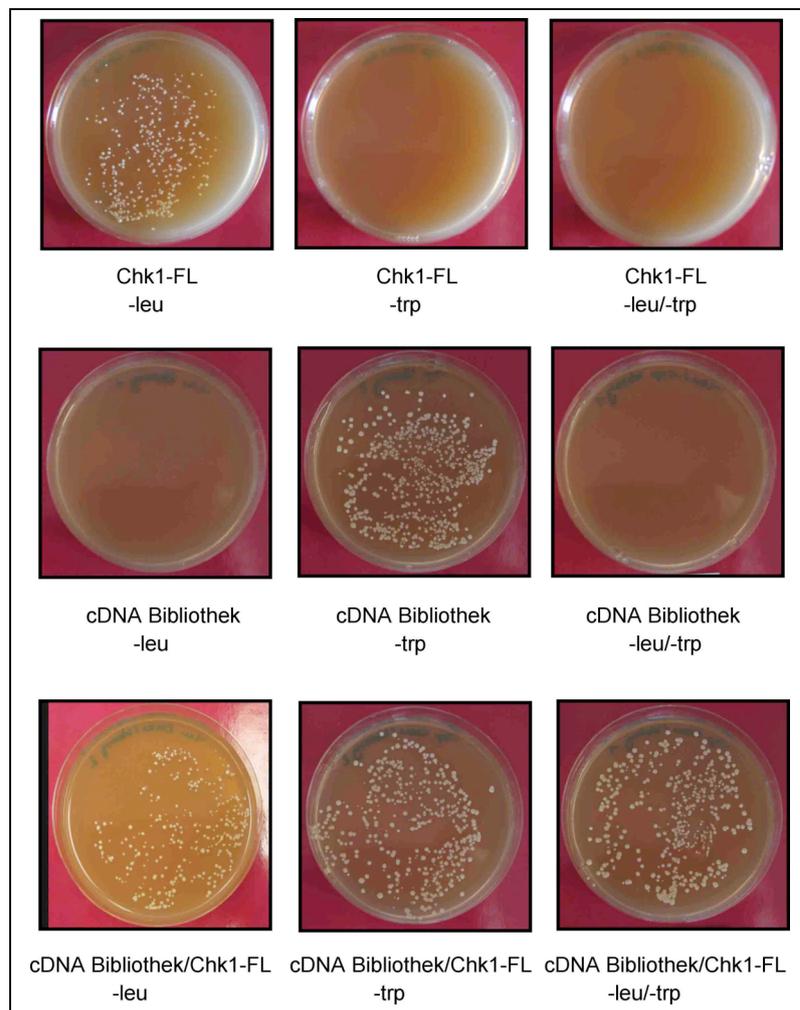


Abb. 20: Kontrolltransformationen im Hefestamm AH109. Die Transformation des Plasmids pGBKT7 Chk1 FL und die Transformation der cDNA Bibliothek in AH109 Hefezellen und deren Aussaat auf entsprechenden Platten mit Selektionsmarkern zeigt ein selektives Wachstum.

Abbildung 20 zeigt AH109, transformiert mit dem DNA-BD Vektor pGBKT7 Chk1 FL, wie erwartet auf SD/-Trp wuchs, jedoch nicht auf Minimalmedium ohne Leucin. Die mit der cDNA-Bibliothek transformierten AH109 Hefezellen wuchsen nur auf Minimalmedium ohne Leucin und nicht in Abwesenheit von Tryptophan. Bei Co-Transformation beider Plasmide (cDNA Bibliothek und pGBKT7 Chk1 FL) in die AH109 Zellen, war ein auch Wachstum auf den SD/-Leu/-Trp zu erkennen. Identische Ergebnisse zeigte die Transformation von pGBKT7 K/A 38 (Daten nicht gezeigt). Somit wurde gezeigt, dass die trophischen Marker der 2-Hybrid Vektoren die gewünschte Selektion ermöglichen.

3.4.3 2-Hybrid Kontrollvektoren

Um weiterhin die Funktionalität der Reportergene des Hefe2-Hybridsystems zu verifizieren, wurden Vektoren mit unterschiedlichen Fusionsproteinen, sowie Leervektoren und Kontrollvektoren (Tab. 4) transformiert bzw co-transformiert und auf entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert. Unter anderen wurden die Kontrollvektoren pGBKT7-53 und pGADT7-T co-transformiert. Die Kontrollplasmide codieren für die Fusion der GAL4 DNA-BD mit dem murinen p53 der Aktivierungsdomäne mit dem *SV40 large T-antigen*. P53 und das *SV40 large T-antigen* interagieren im 2-Hybrid Assay miteinander und dienen somit als Positiv-Kontrolle (Li und Fields, 1993) für eine Protein-Protein Interaktion im 2-Hybrid System. Die Plasmide wurden co-transformiert und der Transformationsansatz auf SD/-Leu/-Trp/-His ausplattiert. Nach 2-4 tägiger Inkubation bei 30°C wurde ein *Colony Filter Lift Assay* durchgeführt und die Hefekolonien auf ihre β -Galaktosidase Aktivität überprüft. Es wurde eine deutliche blaufärbung sichtbar. Die Ergebnisse der Funktionalitätsprüfung sind in Tabelle 5 dargestellt. Als Negativ Kontrolle dienten die Plasmide pGBKT7-*Lam*, welches für humanes Laminin C codiert und keinerlei Wechselwirkung mit anderen Proteinen zeigt. Nach Co-Transformation von pGBKT7-*Lam* und pGADT7-*T* wurde nach dem *Colony Filter Lift Assay* keine Blaufärbung sichtbar (Tabelle 5). Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, zeigten sowohl die Kontrollplasmide, als auch die selbst generierten Plasmide das gewünschte Wachstumsverhalten auf den entsprechenden Selektionsmedien.

Um eine mögliche Selbstaktivierung auszuschließen wurden die Plasmide pGBKT7 Chk1 FL und pGBKT7 Chk1 K/A 38 mit dem Leervektor pGADT7 (AD) transformiert, auf SD/-Trp/-Leu ausgesät und für 2-4 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde ein *Colony Filter Lift Assay* durchgeführt.

Weder pGBKT7 Chk1 FL noch pGBKT7 Chk1 K/A 38 zeigten selbstaktivierende Eigenschaften in AH109 und im *Colony Filter Lift Assay*.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der durchgeführten Transformationen werden in folgender Tabelle zusammengefasst:

Funktion	GAL4-DNA-BD Vektor	GAL4-DNA-AD Vektor	Hefeselektion	Hefewachstum	Colony Filter Lift Assay
Köderprotein	pGBKT7 Chk1 FL	-	SD/-Trp	positiv	-
			SD/-Leu	negativ	-
Köderprotein/cDNA Bibliothek	pGBKT7 Chk1 FL	cDNA Bibliothek in pACT2	SD/-Trp/-Leu	positiv	-
Köderprotein	pGBKT7 Chk1 K/A 38	-	SD/-Trp	positiv	-
			SD/-Leu	negativ	-
Köderprotein/-cDNA Bibliothek	pGBKT7 Chk1 K/A 38	cDNA Bibliothek in pACT2	SD/-Trp/-Leu	positiv	-
cDNA Bibliothek	-	cDNA Bibliothek in pACT2	SD/-Trp	negativ	-
			SD/-Leu	positiv	-
cDNA Bibliothek	pGBKT7 Chk1 FL	cDNA Bibliothek in pACT2	SD/-Trp/-Leu	positiv	-
cDNA Bibliothek	pGBKT7 Chk1 K/A 38	cDNA Bibliothek in pACT2	SD/-Trp/-Leu	positiv	-
Positiv -Kontrolle	pGBKT7-53 (p53)	pGADT7-T (T-Antigen)	SD/-Trp/-Leu	positiv	positiv
Negativ -Kontrolle	pGBKT7-Lam (Lamin C)	pGADT7-T (T-Antigen)	SD/-Trp/-Leu	positiv	negativ
Kontrolle zur Selbstaktivierung	pGBKT7 Chk1 FL	pGADT7	SD/-Trp/-Leu	positiv	negativ
Kontrolle zur Selbstaktivierung	pGBKT7 Chk1 K/A 38	pGADT7	SD/-Trp/-Leu	positiv	negativ

Tab. 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Transformation .

3.4.4 Expression des rekombinanten Fusionsprotein Chk1 FL und Chk1 K/A 38 in AH109

Um die Expression der Fusionsproteine zu bestätigen wurden mittels des *Yeastmaker*, *Yeast Plasmid Isolation Kits* Proteinlysate der transformierter Hefen

hergestellt und 20µg auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde ein Western-Blot durchgeführt. Für den immunologischen Nachweis der exprimierten Hefeproteine wurde ein monoklonaler anti-Chk1 Antikörper (Chk1 FL-476, Santa Cruz) genutzt. Die Gal4 Bindedomäne hat eine Größe von circa 22kDa, der fusionierte Anteil von Chk1 hat eine Größe von 54kDa. Somit ergibt sich eine Gesamtgröße von 76kDa. Als Sekundärantikörper diente ein HRP-gekoppelter Anti-Maus Antikörper, der die Detektion durch Fluoreszenz nach Zugabe von LumiLight Plus (Roche) ermöglichte. In Abbildung 21, Spur 1 und 2 sieht man zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 76kDa. In 1 ist Lysat der GAL4-Chk1 FL Transformante, in Spur 2 das Lysat der GAL4-Chk1 K/A 38 Transformante aufgetragen.

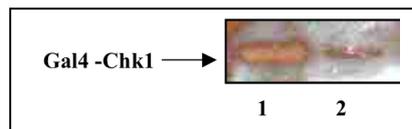


Abb. 21: Western-Blot Analyse der Expression des Wildtyp Gal4-Chk1 und Gal4-Chk1 K/A 38 Proteins in *S.cerevisiae*. Die Proben wurden auf ein 4%-12%iges NuPAGE Tris-Glycin Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Western-Blot Analyse zeigt die Expression von GAL4-Chk1 (Spur 1) und GAL4-Chk1 K/A 38 (Spur 2) bei 76kDa in *S.cerevisiae*. Der Nachweis erfolgte mittels des GAL-4 spezifischen Antikörpers.

Die Western-Blot Analyse zeigt eine Expression der GAL4 Fusionsproteine bei dem zu erwarteten Molekulargewicht. Die Plasmide waren somit überpüft und konnten somit für den 2-Hybrid Screen eingesetzt werden.

3.4.5 2-Hybrid-Screen einer humanen fötalen Gehirn cDNA-Bank mit humanen Chk1

Die cDNA Bibliothek hergestellt aus fötalem Gehirngewebe des Menschen wurde von der Firma *Clontech* bezogen. Die Bibliothek befindet sich in dem Vektor pACT2 und wurde entsprechend den Herstellerangaben amplifiziert.

Um Interaktionspartner für die Chk1 Kinase zu finden wurde mittels des 2-Hybrid Assays die humane fötale cDNA-Bibliothek gescreent. Als Köderprotein diente humanes Wildtyp Chk1, welches in den GAL4 DNA Bindedomänvektor pGBKT7 kloniert wurde. Die Bibliothek und das Köderplasmid pGBKT7 Chk1 FL wurde in *AH109* Hefezellen transformiert. Der initiale Screen wurde mit der Wildtyp Variante des Chk1 Proteins durchgeführt. Die Hefen wurden auf SD/-Leu/-Trp/-His Platten ausgesät und für 5-10 Tage bei 30°C inkubiert. In Abwesenheit der Aminosäure Histidin konnte eine erste Selektion von Transformanten vorgenommen werden. In Abwesenheit von Histidin können nur Hefen wachsen, die das Reportergen His3 exprimieren. Die ersten Kolonien auf SD/-Leu/-Trp/-His Platten traten nach 5 Tagen auf.

3.4.6 Transformationseffizienz

Um die Transformationseffizienz im Bibliotheken-Screen zu bestimmen, wurden dreimal je 100µl eines 1:100 verdünnten Co-Transformationsansatzes auf SD/-Leu/-Trp Selektionsplatten ausgesät und bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Kolonien auf den Platten gezählt, der Mittelwert der drei Ansätze berechnet und die Transformationseffizienz des Transformationsansatzes berechnet. Die Co-Transformationseffizienz lag bei $3,08 \times 10^4$ cfu/µg DNA und die Anzahl der insgesamt getesteten Klone lag somit bei $3,08 \times 10^6$. Die Angaben laut Hersteller für eine effektive Transformation lagen bei $1 \times 10^3 - 10^5$ cfu/µg DNA und die Anzahl der unabhängigen gescreenten Klone bei $1 \times 10^5 - 10^6$. Der durchgeführte 2-Hybrid Screen lag also im Rahmen der Angaben des Herstellers, so dass eine vollständige Abdeckung der gesamten Bibliothek gewährleistet ist.

3.4.7 Selektion der Klone

Die erste Selektion der Klone erfolgte auf Selektionsplatten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin. Unter diesen Selektionsbedingungen konnten nur Transformanten wachsen, die das Gal4 regulierte His3 Genprodukt exprimieren, was als Hinweis auf eine Wechselwirkung des Köderproteins mit einem Protein der Bibliothek zu deuten ist. Nach der ersten Selektion auf SD/-Leu/-Trp/-His wurden 184 Klone gefunden und weiter charakterisiert. Die Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 50 μ l sterilen H₂O gelöst. Anschließend wurden 2 μ l dieser Lösung auf SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade Selektionsplatten ausplattiert und erneut für 2-5 Tage bei 30°C inkubiert. Nach dieser zweiten Selektion auf Adenin-Prototrophie verblieben 14 Klone, die ein deutliches Wachstum aufwiesen. Diese Klone wurden auf SD/-Leu/-Trp ausgesät, um diese für einen β -Galaktosidase Test zu nutzen. 7 Klone zeigten eine deutliche Blaufärbung (Abb. 22). Die Klone, welche eine deutliche Blaufärbung zeigten, trugen die Bezeichnung. 9, 40, XXXX, XXXII, XIX, XXXVII und Klon XXXV (Abbxx). Im weiteren zur Vereinfachung 1 (9), 2 (XXXX), 3 (XXXII), 4 (XIX), 5 (XXXVII) und 6 (XXXV) genannt. In einer Wiederholung konnten diese Testergebnisse bestätigt werden.

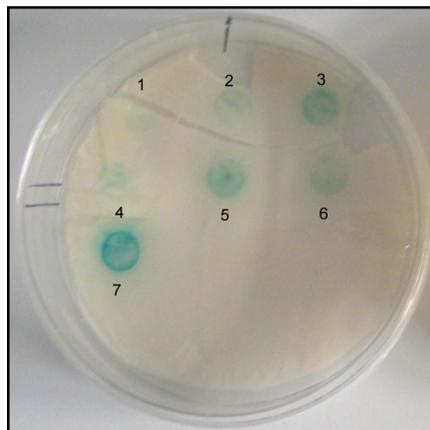


Abb. 22: Colony Filter Lift Assay der selektierten Klone. Die zuvor selektierten Hefekolonien wurden auf ihre β -Galaktosidase Aktivität überprüft. Klone, welche nach dem ersten LacZ Test positive Ergebnisse zeigten, wurden erneut ausgestrichen und einem weiteren *Colony Filter Lift* Assay unterzogen. Die Klone 1-7 zeigten zum wiederholten Mal eine deutliche Blaufärbung.

3.4.8 Retransformation der positiven Klone

Zum Bestätigen der Ergebnisse wurden die im *Colony Filter Lift Assay* positiven Klone retransformiert. Hierzu wurden die entsprechenden Klone mit pGBKT7 Chk1 FL co-transformiert, auf verschiedenen Selektionsmedien ausgesät (SD/-Leu/-Trp, SD/-Leu/-Trp/-His, SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) und das Wachstum analysiert. Abbildung 23 zeigt das Wachstum der Klone auf den drei Selektivmedien. Als Kontrolle wurde der Bindedomän-Leervektor pGBKT7 mit den Klonen co-transformiert und ebenfalls auf Selektionsmedium ausgesät, so dass eine Selbstaktivierung ersichtlich werden konnte.

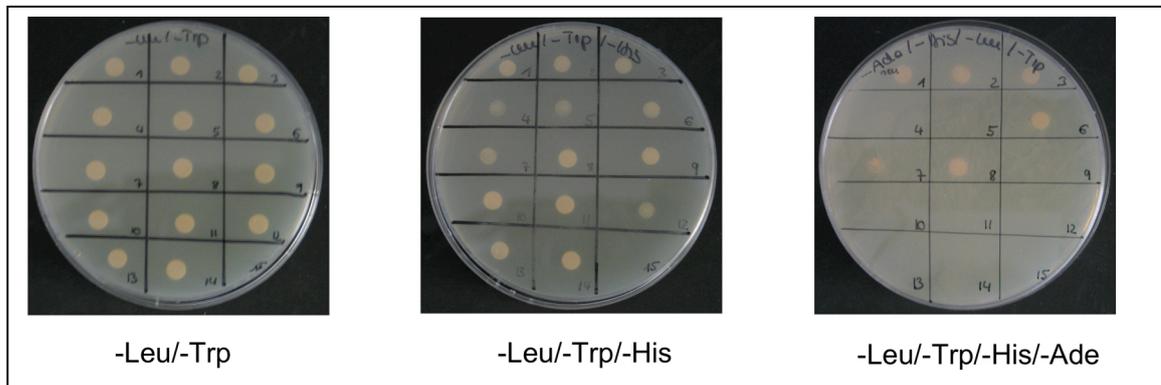


Abb. 23: Retransformation der ersten positiven Klone und Wachstum auf Selektionsmedien.

Die Klone wurden jeweils mit pGBKT7 in An- und Abwesenheit von Chk1 co-transformiert. Die Klone 1-7 wurden auf die Selektionsmedien SD/-Leu/-Trp, SD/-Leu/-Trp/-His, SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade ausgesät und das Wachstum untersucht. Als Kontrolle diente die Co-Transformation des Leervektors pGBKT7 mit den jeweiligen Klonen (8-14).

Ergebnisse

Tabelle 6 fasst die Ergebnisse der verschiedenen Transformationsansätze zusammen und beschreibt das Wachstum der Klone auf den unterschiedlichen Selektionsmedien:

Klon	pGBKT7	pGBKT7 Chk1 FL	Wachstum auf SD/-Leu/-Trp	Wachstum auf SD/-Leu/-Trp/-His	Wachstum auf SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade	Selbst-aktivierung
1		pGBKT7 Chk1 FL	+++	+++	+++	/
2		pGBKT7 Chk1 FL	+++	+++	+++	/
3		pGBKT7 Chk1 FL	+++	+++	+++	/
4		pGBKT7 Chk1 FL	+++	++	+	/
5		pGBKT7 Chk1 FL	+++	++	+	/
6		pGBKT7 Chk1 FL	+++	+++	+++	/
7		pGBKT7 Chk1 FL	+++	++	+++	/
1	pGBKT7		+++	+++	++	√
2	pGBKT7		+++	+++	-	-
3	pGBKT7		+++	+++	-	-
4	pGBKT7		+++	+++	-	-
5	pGBKT7		+++	++	-	-
6	pGBKT7		+++	++	-	-
7	pGBKT7		+++	+++	-	-

Tabelle 6: Zusammenfassung des Wachstumsverhaltens der retransformierten Klone auf unterschiedlichen Selektionsmedien (SD/-Leu/-Trp, SD/-Leu/-Trp/-His, SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade). Die + Zeichen geben die Stärke des Wachstums der Klone auf den Selektionsmedien an. Das + Zeichen steht für mässiges Wachstum, das ++ Zeichen für verstärktes Wachstum, das +++ Zeichen für sehr starkes Wachstum. Das – Zeichen steht für kein Wachstum, das √ steht für positive Selbstaktivierung. Das / Zeichen zeigt an, dass nicht auf Selbstaktivierung getestet werden konnte.

Alle Klone in Co-Transformation mit Chk1 zeigten Wachstum auf den Selektionsmedien, jedoch in unterschiedlicher Intensität. Das Wachstum aller Klone was auf SD/-Leu/-Trp und SD/-Leu/-Trp/-His sehr stark ausgeprägt (+++) und vergleichbar (Tabelle 6). Klon 1, 2, 3, 6 und 7 zeigten auf SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade Selektionsmedium ein sehr starkes Wachstum (+++). Deutlich abgeschwächt

war das Wachstum bei Klon 4 und 5. Die Retransformation des Köderprotein-Leervektors mit den entsprechenden Klonen zeigte auf SD/-Leu/-Trp ebenfalls ein stark ausgeprägtes Wachstum (+++), das Wachstum blieb auf SD/-Leu/-Trp/-His annähernd konstant. Das Wachstum der Kontrolltransformation (8-14) auf SD/-Leu/-Trp/-His kann dadurch erklärt werden, dass bei Aussaat des Ansatzes auf die Selektionsplatten, eine besonders große Menge an Transformanten ausgeät wurde. Eine Ausnahme bildeten hierbei Klon 5 und 6, bei denen das Wachstum der Hefen abnahm. Auf SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade Selektionsmedium war bei den Klonen 2-7 kein Wachstum zu detektieren. Klon 1 hingegen zeigte ein deutliches Wachstum (++) und somit eindeutig selbstaktivierende Eigenschaften. Dieser Klon wurde somit nicht weiter verifiziert untersucht.

3.4.9 Sequenzierung und Identifizierung der positiven Interaktionspartner

Die potentiellen Interaktionspartner von Chk1, die durch den 2-Hybrid Versuch identifiziert wurden, sollten nun weiter identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde die Plasmid DNA aus den Hefezellen isoliert, in *E.coli* transformiert und aufgereinigt. Als Primer für die Sequenzierung diente der *AD Insert pACT2 fwd* (5122–5091) /*rev* (4943–4974) *Sequencing Primer*, mittels derer circa 700bp jedes Plasmids sequenziert werden konnten.

Die durch die Sequenzierung erhaltenen Sequenzen wurden durch einen Sequenzvergleich mit der BLASTN (NCBI, Nukleotiddatenbank) Datenbank identifiziert. Die sequenzierten Bereiche zeigten nahezu 100%ige Basenidentität mit den ermittelten Genen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

KLON	MOLEKULAR-GEWICHT, kDa	DEFINITION	ACCESSION	VERSION
2	31 kDa	N-METHYLPURINE-DNA GLYCOSYLASE ISOFORM C [HOMO SAPIENS]	NP_001015054	NP_001015054.1 GI:62632771
3	28 kDa	ANKYRIN REPEAT DOMAIN 7 (ANKRD7) [HOMO SAPIENS]	NP_062618	NP_062618.1 GI:9790007
4	12 kDa	H2A HISTONE FAMILY, MEMBER V ISOFORM 2 [HOMO SAPIENS]	NP_619541	NP_619541.1 GI:20357599
5	22 kDa	NADH DEHYDROGENASE (UBIQUINONE) 1 BETA SUBCOMPLEX, 10, 22KDA [HOMO SAPIENS]	NP_004539	NP_004539.1 GI:4758774
6	10 kDa	CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT VIIA POLYPEPTIDE 2 (LIVER) PRECURSOR [HOMO SAPIENS]	NP_001856	NP_001856.1 GI:4502989
7	28 kDa	ANKYRIN REPEAT DOMAIN 7 (ANKRD7) [HOMO SAPIENS]	NP_062618	NP_062618.1 GI:9790007

Tabelle 7: Tabelle der identifizierten Proteine nach BLAST-Sequenzanalyse. Die Tabelle zeigt die nach BLAST Analyse identifizierten positiven Klone des Hefe-2-Hybrid Assays.

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, wurden insgesamt fünf verschiedene Gene identifiziert. Die Klone 3 und 7 kodieren für das gleiche Protein: *Testis-Specific Ankyrin Motif Containing Protein (ANKRD7)*. Im folgenden wird die Funktion der Proteine kurz erläutert (3.4.10).

3.4.10 Beschreibung der aus dem Hefe-2-Hybrid Versuch identifizierten Klone

3.4.10.1 N-Methylpurine-DNA-Glycosylase (MPG)

Die humane N-Methylpurine-DNA-Glycosylase (MPG) besteht aus 281 Aminosäuren und codiert für ein 31kDa großes Protein, welches in die Reparatur von kleinen DNA Basenmodifikationen im Basenexzisionreparaturweg (BER) involviert ist. Das humane MPG entfernt geschädigte Basen wie z.B alkylierte Purinaddukte aus der DNA, und initiiert den Basenexzisionsreparaturweg (Punkt 1.4.2) durch Erkennung der DNA Addukte.

3.4.10.2 Histone Family, Member V Isoform 2 (H2A)

H2A besteht aus 114 Aminosäuren und codiert für ein 12kDa großes Protein. Histone sind Kernproteine, welche u.a. für die Nukleosomenstruktur der chromosomalen Fasern in Eukaryoten verantwortlich sind. Nukleosomen bestehen aus acht Histonproteinen, je zwei Untereinheiten der Histone H2A, H2B, H3 und H4, die um das Histon H1 organisiert sind. Die identifizierte Isoform 2 von H2A codiert für ein kürzeres Protein (Isoform 2) verglichen mit dem für das Transkriptvariante 1 codiert.

3.4.10.3 Ankyrin Repeat Domain 7 (ANKRD7)

Das Ankyrin Repeat Domain 7 Protein besteht aus 254 Aminosäuren und codiert für ein 28kDa großes Protein. Ankyrin repeats sind ein häufig vorkommendes Strukturmotiv in Proteinen, die an Signaltransduktions-Prozessen beteiligt sind. Bekannte Beispiele für Ankyrindomänen enthaltene Proteine sind der Transmembran-Rezeptor Notch oder 53BP2. Ankyrin-Repeats sind Domänen, welche Protein-Protein vermitteln können. Die Anzahl der Ankyrin Repeats kann innerhalb eines Proteins von 2 bis 20 variieren.

3.4.10.4 NADH-Dehydrogenase

Die NADH-Dehydrogenase besteht aus 172 Aminosäuren und codiert für ein 22kDa großes Protein, welches zur Klasse der Oxidoreduktasen gehört. Die NADH Dehydrogenase wird auch Komplex I der mitochondrialen Atmungskette genannt. Das Enzym katalysiert in einer gekoppelten Reaktion die Oxidation von NADH mit der Reduktion von Coenzym Q und dem Transport von Protonen über die mitochondriale Membran. Der Enzymkomplex der Oxidativen Phosphorylierung besteht aus mindestens 46 verschiedenen Proteinuntereinheiten.

3.4.10.5 Cytochrom C OxidaseSubunit VIIA Polypeptide 2

Die Cytochrom C Oxidase besteht aus 83 Aminosäuren und codiert für ein circa 10kDa großes Protein. Cytochrom c Oxidase, der Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette ist eine Oxidoreduktase. Das Enzym katalysiert in einer gekoppelten Reaktion die Oxidation von Cytochrom c mit der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und dem Transport von Protonen über eine biologische Membran.

3.4.11 Klonierung der Interaktionspartner in Säugerzell-Expressionsvektoren

Nachdem mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems potentielle Interaktionspartner identifiziert wurden, sollten diese durch einen weiteren, biochemischen Ansatz, bestätigt werden. Diese biochemische Verifizierung sollte unter Verwendung eines GST-Chk1 Fusionsprotein erfolgen. Das Prinzip des GST-*pulldowns* beruht auf der Bindung des GST-*getaggt*en Köderproteins an eine Glutathione-Sepharose Matrix. Interagiert das gewünschte Beuteprotein aus dem Lysat, so kann dies mittels Westen-Blot nachgewiesen werden.

Das Chk1 Gen wurde mittels des *Gateway* Systems (Invitrogen) in den eukaryotischen Expressionsvektor pDest27 (Invitrogen) kloniert, der GST als N-terminales Fusionsprotein trägt. Die Expression der Chk1 Kinase mit N-terminalen

GST-Tag ermöglicht die spezifische Bindung des GST an Glutathione Sepharose, was die Möglichkeit eröffnet, GST-Chk1 für den Pulldown zu verwenden. Die cDNA der identifizierten Klone wurden beim RZPD (*German Resource Center for Genome Research*, Heidelberg) bestellt, mittels spezifischer Primer (Abschnitt 2.1.6.1) des Gateway Systems amplifiziert und in den Vektor pcDNA3.1/V5-DEST (Invitrogen) kloniert, welcher einen V5-Tag als N-terminale Fusion trägt. Die Detektion der exprimierten Proteine konnte über den immunologischen Nachweis des N-terminalen Fusionsprotein des Antigenepitops erfolgen.

Eine Klonierung mit Hilfe des *Gateway Systems* (Invitrogen) soll hier exemplarisch dargestellt werden.

Mit Hilfe von *Gateway*-spezifischen Primer, die für die homologe Rekombination flankierende attB Sequenzen tragen, wurde das zu klonierende DNA Fragment mittels zweier Spezifischer PCR Läufe amplifiziert. Die Überprüfung der PCR Reaktion fand elektrophoretisch über ein Agarose Gel statt (Abb. 24).

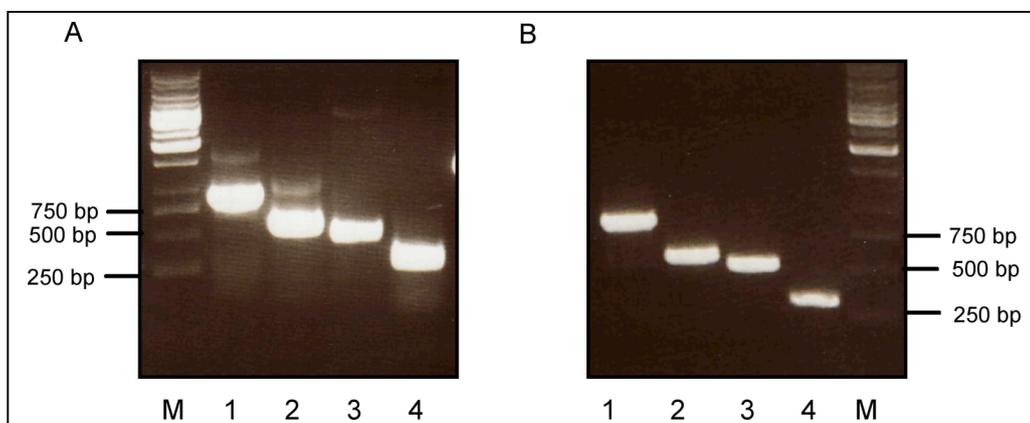


Abb. 24: Überprüfung der PCR-Reaktion für die Gateway Klonierung. Nach Amplifikation der gewünschten DNA Fragmente durch Gateway spezifische Primer, wurden 15µl des PCR-Ansatzes plus 3µl 6x Auftragspuffer auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung A zeigt die Produkte der Gateway PCR-Reaktion 1. Die linke Spur zeigt den DNA-Größenstandard GeneRuler (M, Fermentas). Spur 1 zeigt das amplifizierte DNA Fragment der DNA des MPG Proteins (846 bp), Spur 2 das amplifizierte DNA Fragment der DNA der NADH-Dehydrogenase (519 bp), Spur 3 das amplifizierte DNA Fragment der DNA des ANKRD7 Proteins (456 bp), Spur 4 das amplifizierte DNA Fragment der DNA der Cytochrom C Oxidase (252 bp). Abbildung B zeigt die Produkte der Gateway Reaktion 2.

Bei der darauf folgenden BP Reaktion wurde das attB-Substrat, das PCR-Produkt, mit dem attP-Substrat, dem Donorvektor (pDonr221), rekombiniert, um einen attL-Seiten flankierenden Eingangsvektor zu erhalten. Diese Reaktion wurde durch die BP Clonase vermittelt. Der nächste Schritt, die durch die LR Clonase vermittelte Reaktion, ermöglicht die Rekombination des attL-Substrats (Eingangsvektor) mit dem attR-Substrat, dem Destination Vektor. Als Ergebnis erhält man einen attB enthaltenen Expressions Vektor, der nun für die entsprechende Expression, hier in Säugerzellen, eingesetzt werden kann. In die mutiple Klonierungsstelle des Zielvektors ist ein ccBD-Gen integriert. Dessen Genprodukt interferiert mit der *E.coli* DNA-Gyrase. Durch erfolgreiche Klonierung wird dieses Gen substituiert, die Bakterienzellen sind auf Selektionsmedium nun lebensfähig. Die Klonierung der H2A DNA in den pcDNA3.1/V5-DEST erfolgte separat nach identischer Vorgehensweise. Die Verifikation der erfolgreichen Klonierung wurde durch Sequenzierung und anschließenden Sequenzvergleich bestätigt. Die hier generierten Konstrukte tragen die Bezeichnung: MPG-V5, NADH-V5, ANKRD-V5, COX-V5, H2A-V5 und GST-Chk1 (Abbildung nicht gezeigt).

3.5 Verifizierung potentieller Chk1-Interaktionspartner

3.5.1 Transiente Einzeltransfektion in HEK 293T-Zellen

Um die in der Hefe nachgewiesene Interaktion zwischen Chk1 und Kandidatenproteinen zu verifizieren, wurden die Expressionskonstrukte für GST-Chk1 und den jeweiligen Kandidaten in Säugerzellen transfiziert und über die Bindung an Glutathionsepharose eine Interaktionsanalyse durchgeführt.

Zunächst wurden die unter 3.5.11 beschriebenen Expressionskonstrukte in HEK 293T-Zellen transfiziert. Die transiente Expression der rekombinanten Proteine und des GST-Chk1 Konstruktes wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot gegen den entsprechenden Epitop-*tag* gerichteten Antikörper untersucht. (Abb. 25, Abb. 26).

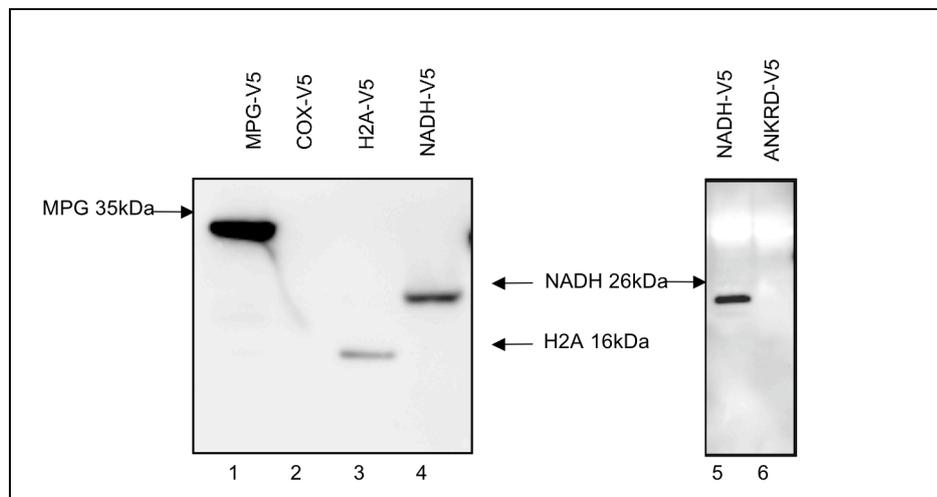


Abb. 25: Expression der V5 markierten Kandidaten nach Transformation in HEK-293 Zellen. Western-Blot Analyse der Lysate transienten Transfektion von MPG-V5 (Spur 1), COX-V5 (Spur 2), H2A-V5 (Spur 3), NADH-V5 (Spur 4 und 5), ANKRD7-V5 (Spur 6) in HEK 293T-Zellen. Die molekularen Größen der Proteine sind in Kilodalton angegeben. Die Expression des COX-V5 und ANKRD7 Proteins konnten nicht nachgewiesen werden. Der V5-*tag* spezifische Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:2000 eingesetzt und nach Kopplung des 2. Antikörpers (HRP gekoppelter polyklonaer anti-Maus-Ziege) mit ECL-detektiert. Die Auftrennung erfolgte über ein 4%-12%iges NuPAGE Tris-Glycine Gel.

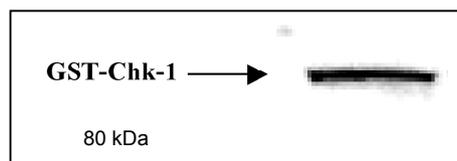


Abb. 26: Detektion des GST-getaggten transient transfizierten GST-Chk1 mittels polyklonalem GST-Mausantikörper. Western-Blot Analyse der transienten Transfektion der GST-Chk1 Kinase in HEK 293T-Zellen. Die molekularen Größen der Proteine sind in kDa angegeben. Der GST-*Tag* spezifische Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:2000 eingesetzt und nach Kopplung des 2. Antikörpers (HRP gekoppelter polyklonaer anti-Hase-Ziege) ECL detektiert. Die Auftrennung erfolgte über ein 4%-12% iges NuPAGE Tris-Glycine Gel.

Abbildung 25 zeigt die Expression nach transient Transfektion in HEK-293T-Zellen. Im Western-Blot konnte ein Signal bei den mit pcDNA3.1/V5-DEST MPG transfizierten HEK-293T-Zellen mittels des V5-*Tag* spezifischen Antikörper bei 31kDa detektiert werden (Spur 1). Dies entspricht dem Molekulargewicht des MPG

Proteins. Weiterhin war es möglich im Western-Blot ein Signal bei den mit pcDNA3.1/V5-DEST H2A transfizierten HEK-293T-Zellen bei 12kDa und bei den mit pcDNA3.1/V5-DEST NADH dehydrogenase transfizierten HEK-293T-Zellen bei einem Molekulargewicht von 22kDa zu detektieren. Auch diese Größen entsprechen dem Molekulargewicht der exprimierten Proteine.

Eine Expression der Cytochrom C Oxidase und des ANKRD7 Proteins in HEK-293T-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Die Fragmente der cDNA Bibliothek der Cytochrom C Oxidase und des ANKRD7 Proteins wurden zusätzlich zur *Gateway* Klonierung direkt mittels der Restriktionsendonukleasen *NotI* und *EcoRI* aus dem pACT2 Vektor herausgeschnitten in den Expressionsvektor pCMV-HA Vektor kloniert. Nach Transfektion der Expressionsplasmide in HEK-293T-Zellen, anschliessender Lyse, SDS-Page und Western-Blot waren erneut keine Signale zu detektieren. Die Cytochrom C Oxidase und das ANKRD7 Protein konnten auch nach Wechsel des Transformationsreagenzes (*Lipofectamin Plus* (Invitrogen) an Stelle von *FugeneHD* (Roche)) nicht in HEK-293T-Zellen nachgewiesen werden.

3.5.2 Co-Transformation und GST-Pulldown

In Versuchen mit dem 2-Hybrid System konnte eine Interaktion der Chk1 Kinase mit fünf verschiedenen Kandidaten identifiziert werden. Über die Co-Expression der GST-Chk1 Kinase und der *V5-getaggten* Proteine in HEK-293T-Zellen und anschliessender *GST-Pulldown* Analyse, sollte die Interaktion mit Hilfe einer weiteren Technik bestätigt werden. Zuerst wurden die jeweiligen Expressionskonstrukte der Kandidaten gemeinsam mit dem Chk1 Expressionskonstrukt in HEK-293T-Zellen co-transfiziert. Im Transfektionsansatz wurde die gleiche DNA Mengen beider Konstrukte verwendet.

Anschließend wurden jeweils 50µl der Glutathion-Sepharose (Amersham) mit jeweils 800µl Lysat der co-transformierten HEK-293T-Zellen über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit HGNT Lysepuffer wurden die

Ansätze auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

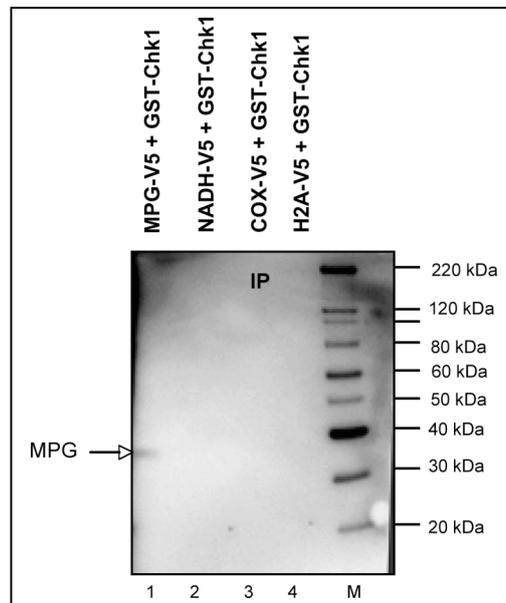


Abb. 27: Erste Interaktionsanalyse von Chk1 mit MPG, NADH dehydrogenase, COX oder H2A. Western-Blot der Gluthatione Sepharose Bindungsansätze. Der immunologische Nachweis der co-präzipitierten Proteine erfolgte mit dem V5-Epitop-*tag* spezifischen Antikörper. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:2000 eingesetzt und mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper detektiert. Die Auftrennung erfolgte über ein 4%-12% iges NuPAGE Tris-Glycine Gel. In Spur 1 sieht man ein schwaches Signal bei circa 35kDa. Dies entspricht in etwa dem Molekulargewicht des MPG Proteins. In Spur 2, 3, und 4 ist kein Signal zu detektieren. Der MagicMark (M, Invitrogen) an der rechten Seite gibt die Proteingrößen in Kilodalton an.

Wie aus Abbildung 27 ersichtlich ist, kommt es unter nach Co-Expression in HEK-293T-Zellen zu einer Co-Präzipitation von GST-Chk1 und der V5 markierten N-Methylpurine-DNA Glykosylase (MPG, Abb. 27, Spur 1). Im Western-Blot detektiert der polyklonale anti-V5 Antikörper eine Bande bei circa 35kDa. Die detektierte Größe dieser Bande entspricht der Größe der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase in Verbindung mit dem V5-*tag*. Im Vergleich zu Spur 1 ist in Spur 2, Co-Präzipitation mit NADH Dehydrogenase, Spur 3, Co-Präzipitation mit Cytochrom C Oxidase, Spur 4, Co-Präzipitation mit H2A Proteins keine Präzipitation nachweisbar.

Um unspezifische Bindung auszuschließen und die Interaktion der N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) und der Chk1 Kinase zu verifizieren, wurde ein weiterer *GST-Pulldown* mit entsprechenden Kontrollen durchgeführt.

3.5.3 Analyse der Co-Präzipitation der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase und der Chk1 Kinase

Neben der Co-Transfektion von pDest27-Chk1 mit pcDNA3.1/nV5Dest MPG, wurden weitere Kontrollen durchgeführt, um eine unspezifische Bindung an die Glutathionagarosematrix auszuschließen.

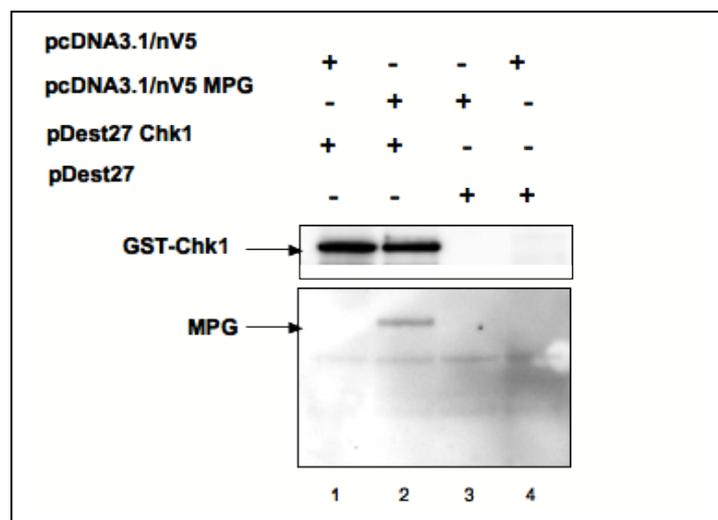


Abb. 28: Charakterisierung der Interaktion der Chk1 Kinase mit der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase. Co-Präzipitationsanalyse der Chk1 Kinase mit der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase. Das Lysat der co-transfizierten HEK-293-T-Zellen wurde elektrophoretisch über ein 4%-12% iges NuPAGE Tris-Glycine Gel aufgetrennt. In Spur 2 ist das Lysat der co-transfizierten HEK-293T-Zellen mit pDest27 Chk1 und pcDNA3.1/nV5Dest MPG nach GST-pulldown dargestellt. Die obere Spur zeigt das präzipitierte GST-Chk1 bei einer Größe von 80 kDa. Im unteren Gel ist eine Bande bei circa 35kDa zu detektieren. Dies entspricht der Größe des MPG Proteins mit V5-tag. In den Kontrollen ist keine unspezifische Bindung zu detektieren.

Nach erfolgten GST Pulldown, anschließenden SDS-Page und Western-Blot wurde die Membran mit gegen den V5 Epitop-tag gerichteten Antikörper geblottet.

Die obere Bande in Spur 1 und 2 zeigt die Anreicherung der Chk1 Kinase nach *GST-Pulldown* bei einer Größe von 80kDa (Abb. 28). Der Co-Präzipitationsblot (Abb. 28) zeigt in Spur 2 eine spezifische Anreicherung des MPG Proteines bei Co-Transfektion des MPG Proteins mit der Chk1 Kinase. Der spezifisch gegen den V5-Epitop-*tag* gerichtete Antikörper detektiert eine 35kDa große Bande, die der Größe der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase mit V5-*tag* als Fusion entspricht. In den entsprechenden durchgeführten Kontrollreaktionen mit pDest27 Chk1 und dem Leervektor pcDNA3.1/nV5Dest (Spur 1), pDest27 mit pcDNA3.1/nV5Dest MPG (Spur 3) und pDest27 mit pcDNA3.1/nV5Dest (Spur 4) sind keine unspezifische Banden zu detektieren.

Das dargestellte Experiment belegt die Interaktion des MPG Proteins mit der Chk1 Kinase und schliesst unspezifische Bindung von MPG an GST an die Agarosematrix aus.

Um die Expression der transient transfizierten Klone im Lysat nachzuweisen, wurden jeweils 15 μ l des Gesamtlisats auf ein SDS-Page aufgetragen und im anschließenden Western-Blot mittels spezifischer Antikörper gegen den GST- bzw. V5-Epitop-*Tag* im Lysat nachgewiesen (Abb. 29). Deutlich ist die Expression der GST-Chk1 Kinase in Spur 1 und Spur 2 bei 80kDa zu detektieren. Mittels des gegen den V5-Epitop-*tag* gerichteten Antikörper konnte in Spur 2 und Spur 3 die Expression der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase bei 35kDa nachgewiesen werden.

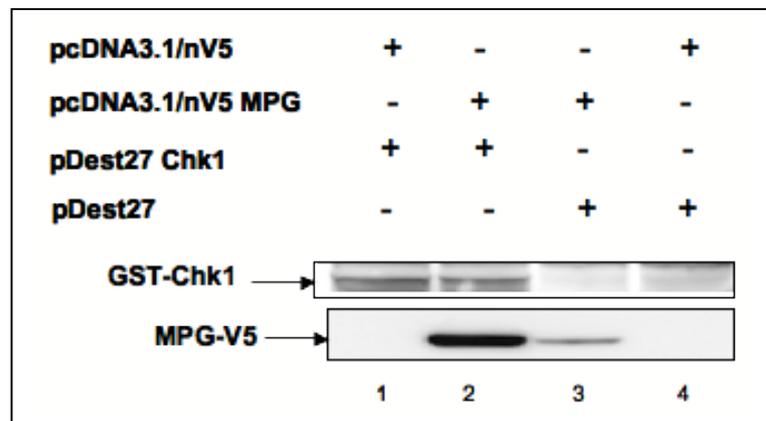


Abb. 29: Western-Blot der transient transfizierten HEK-293T-Zelllysate. Die Lysate der co-transfizierten HEK-293-T-Zellen wurden elektrophoretisch über ein 4%-12% iges NuPAGE Tris-Glycine Gel aufgetrennt. Das obere Bild zeigt den anti-GST Western-Blot. Der Antikörper detektierte das exprimierte Chk1 Kinase bei einer Größe von 80kDa. Im unteren Bild ist der gleiche Blot mit anti-V5 zu sehen. Der gegen den V5-Epitop-*tag* gerichtete Antikörper detektiert ein Signal bei circa 35kDa, was der Größe des MPG Proteins mit V5-*tag* entspricht.

Auffällig in Abbildung 29 ist, dass trotz gleicher Menge an eingesetzter DNA für die Co-Transfektion die Expression des MPG Proteins bei Co-Transfektion mit GST-Chk1 (Spur2) deutlich stärker ist, als im Fall der Co-Transfektion mit dem Leervektor (Spur 3). Um zu untersuchen, ob das co-transfizierte Plasmid einen Einfluss auf die Expression des MPG Proteins hat, wurden Einzel- und Co-Transfektionen im Western-Blot miteinander verglichen. Es konnte jedoch keine eindeutige Aussage bezüglich der Expression des MPG Protein bei Co- und Einzeltransfektion von pDest27 Chk1 und pcDNA3.1/nV5 Dest MPG treffen (Daten nicht gezeigt). Im Western-Blot zeigte sich keine konstant stärkere Expression bei Co-Transfektion im Vergleich zur Einzeltransfektion.

3.5.4 Expression von Chk1 und MPG auf Proteinebene in verschiedenen Zelllinien

Um das Expressionsprofil der Chk1 Kinase und des MPG Proteins in unterschiedlichen Zelllinien zu bestimmen, wurden die diese (Zelllinien siehe Text

Abbildung 30) kultiviert und entsprechende Lysate hergestellt. Die Kultivierung der Zelllinien wurde von Frau Silvia Jezek (Merck KGaA) vorgenommen. Die Lysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und ein Western-Blot mit MPG und Chk1 spezifischen monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

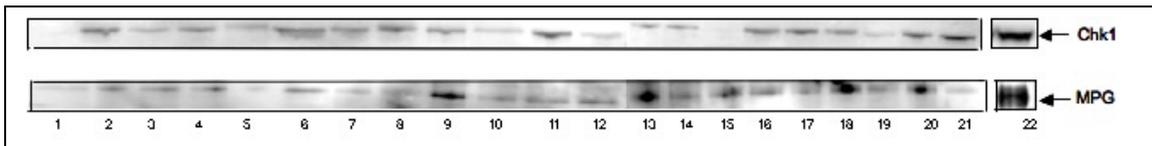


Abb. 30: Zelllysate unterschiedlicher Zelllinien. Die Auftrennung von jeweils 30µg der verschiedenen Zelllysate (1) A2780, (2) A2780ADR, (3) A431, (4) A549, (5) Calu-6, (6) Colo201, (7) Colo205, (8) DU145, (9) H460, (10) HCT 116, (11) HCT 116 p53^{-/-}, (12) HeLa, (13) HT29, (14) M24met, (15) MCF-7, (16) MDA-MB-231, (17) MDA-MB-468, (18) Mes-Sa/Dx5, (19) OVCAR-3, (20) Suit7, (21) SW707, (22) HEK-293T (separates Gel) erfolgte elektrophoretisch über ein 4%-12%igen NuPAGE Tris-Glycin Gel. Die Detektion von Chk1 und MPG erfolgte mittels spezifischer monoklonaler Anti-Chk1 und Anti-MPG Antikörper.

Das Expressionsprofil der Chk1 Kinase zeigt in den unterschiedlichen Zelllinien ein differenziertes Expressionsmuster. In den Zelllinien (1) A2780 und (15) MCF-7 ist kein Signal mittels des Chk1 spezifischen Antikörper zu detektieren. In Spur 22 (HEK-293T) ist die Signalstärke von Chk1 deutlich höher. In allen anderen Zelllinien schwankt die Signalstärke leicht, ist jedoch in allen übrigen Fällen nachweisbar.

Die Expression des MPG Proteins ist in allen Zelllinien zu detektieren. In Spur 1 (A2780) ist nur ein schwaches Signal vorhanden. Eine deutlich stärkeres Signal ist in Spur 9 (H460), Spur 13 (HT29), Spur 18 (Mes-Sa/Dx5) und Spur 22 (HEK-293T) zu detektieren. Es ist anzumerken, dass die Detektion der Expression der Chk1 Kinase und des MPG Proteins in HEK-293T Zellen (Spur 22) auf einem separaten Gel mit der gleichen Menge an Gesamtlysat (30µg) erfolgte. Durch die relativ gleichmäßige Expression der Chk1 Kinase und des MPG Proteins in den unterschiedlichen Zelllinien, eignen sich prinzipiell viele Zelllinien für weitere funktionelle Studien. HEK-293T-Zellen wurden bereits in vorangegangenen Versuchen genutzt verwendet und weisen zudem eine hohe Expression von Chk1 und MPG auf (Spur 22): daher wurde die Zelllinie für weitere Versuche

ausgewählt. Als Vergleichszelllinie wurde die HCT116 Kolonkarzinom-Zelllinie ausgewählt.

3.5.5 DNA Schädigung durch Chemotherapeutika

Nach Schädigung der DNA durch exogene Stimuli (Chemotherapeutika, Bestrahlung) wird im Verlauf der DNA Schadensantwort die Aktivierung der Chk1 Kinase initiiert. Zu den DNA schädigenden Chemotherapeutika zählen Substanzen wie Methylmethansulfonat (MMS), Hydroxyharnstoff (HU) und Cisplatin. MMS zählt zu der Gruppe der Alkylalkansulfonate, dessen pharmakologische Wirkung hauptsächlich auf Alkylierung des Guanosins zurückgeführt wird. Die Wirksamkeit des Hydroxyharstoffs beruht im wesentlichen auf der Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase, die des Cisplatins auf der Alkylierung der DNA an Guanin- und Adeninresten. Werden in Kultur gehaltene Säugerzellen mit diesen Wirkstoffen behandelt, so wird eine Phosphorylierung und damit verbundenen Aktivierung der Chk1 Kinase erzielt. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die Aktivierung der Chk1 Kinase im Zusammenhang mit einer Modulation des MPG Proteins steht. Hierzu wurden HCT 116 Kolonkarzinomzellen und HEK-293T-Zellen für 6h und 24h mit unterschiedlichen Chemotherapeutika behandelt.

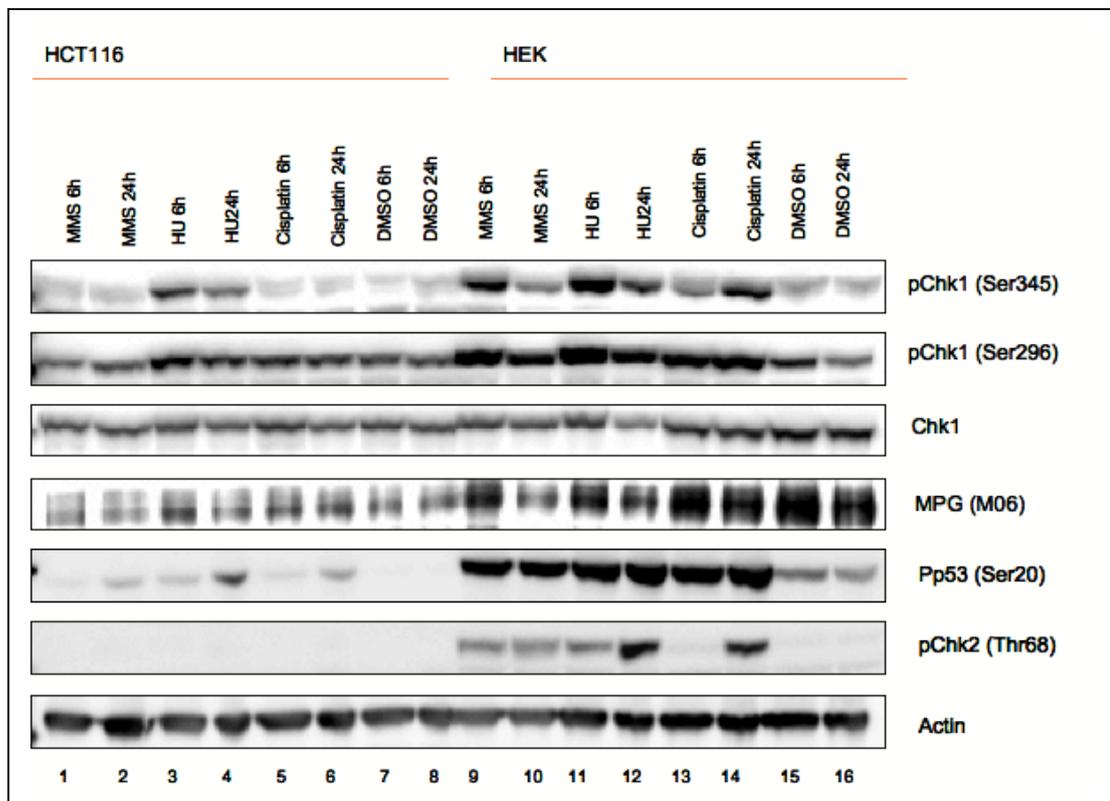


Abb. 31: Behandlung von HCT116 und HEK-293T Zellen mit Methymethansulfonat (MMS), Hydroxyharstoff (HU 10mM), und Cisplatin. Die Zellen wurden jeweils für 6h und für 24h mit verschiedenen Chemotherapeutika behandelt. Als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO 30µg. Lysat der behandelten HEK-293T und HCT Zellen wurde elektrophoretisch über ein 4%-12%iges NuPAGE Tris-Glycine Gel aufgetrennt und im Western-Blot mittels spezifischer Antikörper geblottet.

Vergleicht man den Grad der Phosphorylierung der einzelnen Proteine zwischen den HCT 116 Zellen und den HEK-293T-Zellen, so wird deutlich, dass die Aktivierung der DNA-Schadensantwort in HEK-293T-Zellen effektiver erfolgte. In den HEK-293T-Zellen war ein deutlicher Anstieg der Chk1 Phosphorylierung an Ser345 nach Behandlung mit den Chemotherapeutika erkennbar. Besonders deutlich ist die Aktivierung der Chk1 Phosphorylierung bei Behandlung der Zellen für 6h mit MMS (Spur 9), 6h HU (Spur 11) und 24h Cisplatin (Spur 14) im Vergleich zur unbehandelten (Spur 15, 16) zu detektieren. Die Gesamtmenge der Chk1 Kinase verändert sich nicht signifikant, jedoch sind elektrophoretische Unterschiede in Abhängigkeit von der Behandlung erkennbar. Als Ladekontrolle

wurde die Expression des Aktin Proteins herangezogen. Die Expression des MPG Proteins zeigt leichte Unterschiede unter bestimmten Behandlungsbedingungen. Im Fall der HEK293-Zellen war eine leichte Signalabnahme bei 24 stündiger Behandlung mit MMS und HU zu sehen.

Die Phosphorylierung der Chk1 Kinase an Ser296 ist tendentiell ähnlich wie die Phosphorylierung an Ser345. Die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 an Ser20 findet deutlich durch alle Chemotherapeutika statt. Die Phosphorylierung der Chk2 Kinase an Thr68 ist in HCT Zellen, im Gegensatz zu den HEK293 Zellen, nicht zu erkennen. Zusammenfassend wird durch diesen Versuch deutlich, dass alle drei Chemotherapeutika Chk1 und Chk2 in ähnlicher Weise aktivieren. Weiterhin könnte eine Expressionsänderung von MPG in Abhängigkeit von DNA-Schäden auf einen Zusammenhang zwischen Chk1 Aktivierung und MPG Regulation hindeuten.

3.5.6 Co-Transformation und GST-Pulldown

In diesem Experiment wurden die co-transfizierten HEK293-Zellen über Nacht mit MMS behandelt und anschließend ein GST-Pulldown wie in Punkt 3.5.3 durchgeführt.

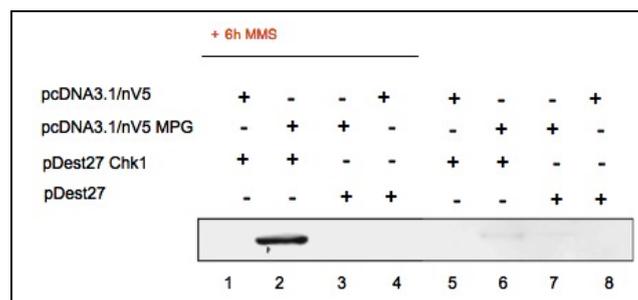


Abb. 32: Charakterisierung der Interaktion der Chk1 Kinase mit der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase unter Einfluss des Chemotherapeutikums Methylmethansulfonat (MMS). Co-Präzipitationsanalyse der Chk1 Kinase mit der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase nach Behandlung der HEK-293T-Zellen mit Methylmethansulfonat (MMS). Das Lysat der co-transfizierten HEK-293-T-Zellen wurde elektrophoretisch über ein 4%-12%iges NuPAGE Tris-Glycine Gel aufgetrennt. Spur 1 bis 4 zeigt das Lysat der mit MMS behandelten Zellen. Spur 5 bis 8 zeigt die Co-Präzipitationsanalyse der unbehandelten Zellen. Schon nach sehr kurzer Exposition des Western-

Ergebnisse

Blots ein Signal bei den mit MMS behandelten Zellen (Spur 2) und anschliessendem Pulldown zu detektieren. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Spur 6 ist nur ein schwaches Signal zu erkennen.

Wie in Abbildung 32 ersichtlich, detektierte der anti-V5 Antikörper ein Signal bei den mit MMS behandelten Zellen (Spur 2). Zu diesem Zeitpunkt ist in den unbehandelten Zellen nur ein schwaches Signal im Western-Blot zu erkennen (Spur 6). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Induktion von Doppelstrangbrüchen und somit die Phosphorylierung von Chk1 die Interaktion verstärkt. Nach langer Exposition des Western-Blots ist auch in Spur 3 und 4 ein Signal durch den V5-Epitop-*tag* spezifischen Antikörper zu erkennen, wobei es sich wahrscheinlich um ein unspezifisches Signal handelt. Diese Signale sind jedoch um ein Vielfaches schwächer, als die Banden in Spur 2 und 6.

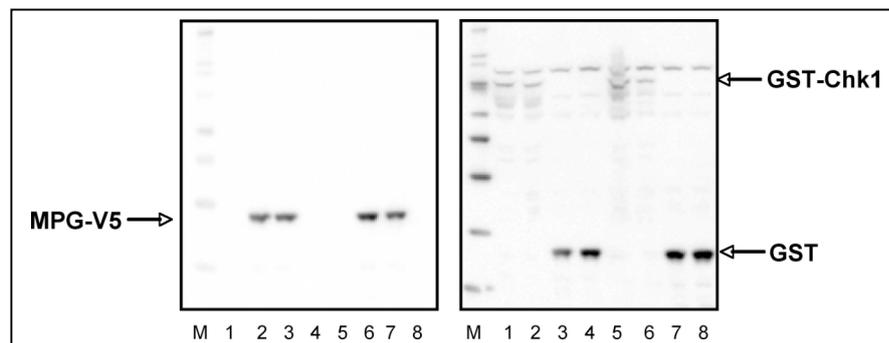


Abb. 33: Western-Blot der transient transfizierten HEK-293T-Zellysate. Das Lysate der co-transfizierten HEK-293-T-Zellen wurde elektrophoretische über ein 4%-12%iges NuPAGE Tris-Glycine Gel aufgetrennt. Die obere Spur zeigt das durch den anti-GST Antikörper detektierte, exprimierte Chk1 Kinase bei einer Größe von 80kDa. Im unteren Gel detektiert der spezifisch gegen den V5-Epitop-*tag* gerichtete Antikörper ein Signal bei circa 35kDa, was der Größe des MPG Proteins mit V5-*tag* entspricht.

3.5.7 Phosphorylierung von MPG durch Chk1

Um zu untersuchen, ob die N-Methylpurine-DNA-Glykosylase nicht nur Interaktionspartner, sondern ebenso Substrat für die Chk1 Kinase ist, wurde mit

aktivem GST-Chk1 und aufgereinigtem MPG ein Kinase Assay durchgeführt. Die Proteine H2A und NADH, die ebenfalls vorlagen, wurden im Kinase-Assay eingesetzt. Als Kontrolle diente eine Kinasereaktion mit Chk1-Kinase ohne zugesetzte Substrate, sowie eine Reaktion mit GST-Cdc25C (200-256), einen bekanntem Chk1 Substrat.

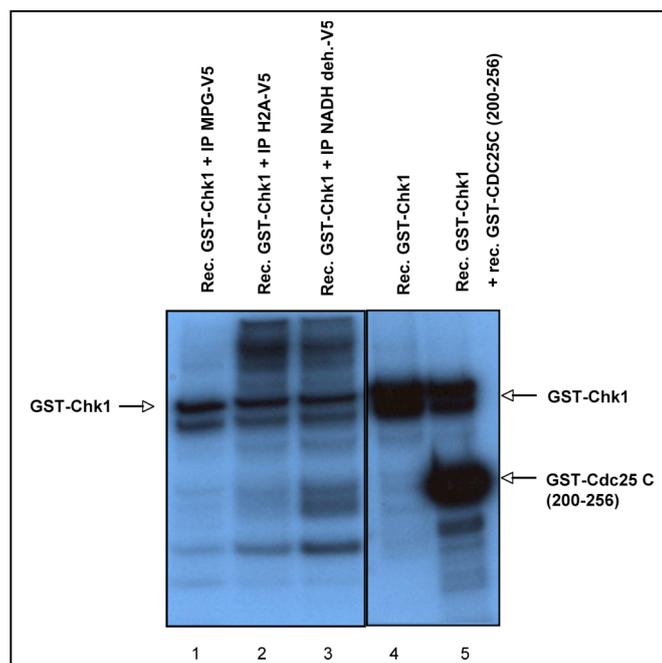


Abb. 34: Radioaktiver Kinase-Assay zur Identifikation des MPG Proteins als potentielles Substrat der Chk1 Kinase. Mit den zuvor durch Immunpräzipitation aufgereinigten Proteinen MPG (Spur 1), H2A (Spur 2), NADH-Dehydrogenase (Spur 3) wurde ein Kinase Assay mit GST-Chk1 für 10min bei 30°C durchgeführt (Gel1). Als Kontrolle eine Reaktion mit GST-Cdc25C (200-256) und eine Reaktion ohne Substrat (Spur 5) zur Überprüfung der Funktionalität des Kinase Assays, andererseits das rekombinante GST-Chk1 allein (Spur 4) (Gel2).

In Anwesenheit von GST-Chk1 und MPG (Spur 1) ist lediglich autophosphorylierte Chk1 Kinase sichtbar und als Doppelbande im Autoradiogramm erkennbar. Weitere spezifische Signale sind nicht zu erkennen. Im Vergleich mit Spur 2 (Substrat H2A) und Spur 3 (Substrat NADH-Dehydrogenase) sind unspezifische zusätzliche Signale erkennbar, die in allen drei Spuren (Spur 1-3) zu detektieren sind und sich nur in ihrer Intensität unterscheiden. In Spur 4 (kein Substrat) zeigt sich eine deutliche Autophosphorylierung der GST-Chk1 Kinase, in Spur 5

(Substrat GST-Cdc25C (200-256)) ein Signal des bekannten Substrats im Autoradiogramm.

Es konnte keine Phosphorylierung des MPG Proteins, H2A oder NADH-Dehydrogenase im radioaktiven Kinase Assay festgestellt werden. Die fehlende Detektion der Phosphorylierung des MPG Proteins ist, wie durch die Kontrollen bestätigt, nicht auf einen Fehler in der Durchführung des Assays zurückzuführen, da beide Kontrollen spezifisch phosphoryliert wurden. Der Western-Blot zur Überprüfung der Immunpräzipitation von MPG, H2A und NADH-Dehydrogenase fehlt, so dass die Möglichkeit besteht, dass nicht genügend Substrat im Kinase Assay vorhanden war.

3.5.8 Co-Elution der Chk1 Kinase und der N-Methylpurine-DNA Glykosylase (MPG) in der Anionenaustauschchromatographie

Wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, wurde ein Rattenleberextrakt chromatographisch über eine MonoQ Säule (Anionenaustauschchromatographie) mittels eines Natriumchloridgradienten (0%-100%) aufgetrennt. Da Proteinkomplexe bei gleicher Salzkonzentration eluieren sollten, wurden die Fraktionen der ersten Anionenaustauschchromatographie im Western-Blot auf MPG und Chk1 Gehalt überprüft.

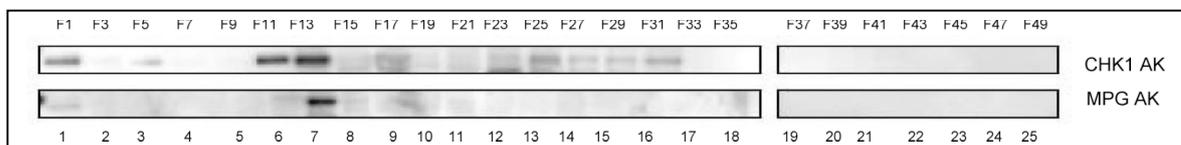


Abb. 35: Anwesenheit der Chk1 Kinase und des MPG Proteins in den Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie. Von den Fraktionen 1-49 (F1-F49) wurde jede zweite Fraktion elektrophoretisch über ein 4%-12%iges NuPage Tris Glycin Gel aufgetrennt und im Western-Blot mittels der monoklonalen MPG und Chk1 Antikörper nachgewiesen. Die Bezeichnung Chk1 AK und MPG AK gibt an, welcher Antikörper verwendet wurde.

Wie in Abbildung 35 deutlich wird, kann Chk1 gut in den den Fraktionen 1, 11 und 13 und schwächer in späteren Fraktionen 15-31 nachgewiesen werden. Die N-Methylpurine-DNA Glykosylase (unteres Gel) ist nur in den Fraktionen 1 und 13 nachweisbar. Diese Analyse zeigt, dass die Chk1 Kinase und die N-Methylpurine-DNA-Glykosylase in gleichen Fraktionen und somit bei gleicher Salzkonzentration eluieren. Die Co-Elution beider endogenen Proteine in identischen Fraktionen ist ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion von Chk1 und MPG.

3.5.9 Bestimmung der zellulären Lokalisation von GST-Chk1 und MPG-V5 mittels Immunfluoreszenz

Die N-Methylpurine-DNA-Glykosylase ist verantwortlich für die Reparatur geschädigter Basen nukleärer DNA. Um die zelluläre Lokalisation der beiden Proteine Chk1 und MPG zu untersuchen, wurde die Methode der Immunfluoreszenz gewählt. HEK 293T-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern in einer Dichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Nach Transfektion mit MPG-V5 oder GST-Chk1 wurden die Zellen fixiert und nach Blockierung mit den Primärantikörpern inkubiert. Nach anschließender Inkubation mit Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488) gegen den V5 Antikörper bzw. Alexa Fluor 546 Antikörper gegen den GST Antikörper wurden die Zellkerne mit dem DAPI-Farbstoff gefärbt.

Durch diese Methode konnte eine Lokalisation der Proteine in der Zelle mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht werden.

Laut Literatur sollte Chk1 überwiegend im Kern lokalisiert sein (Puc et al. 2005), wohingegen die Lokalisation des MPG Proteins sowohl zytoplasmatisch, als auch nukleär vorliegen sollte (Kim et al. 2002).

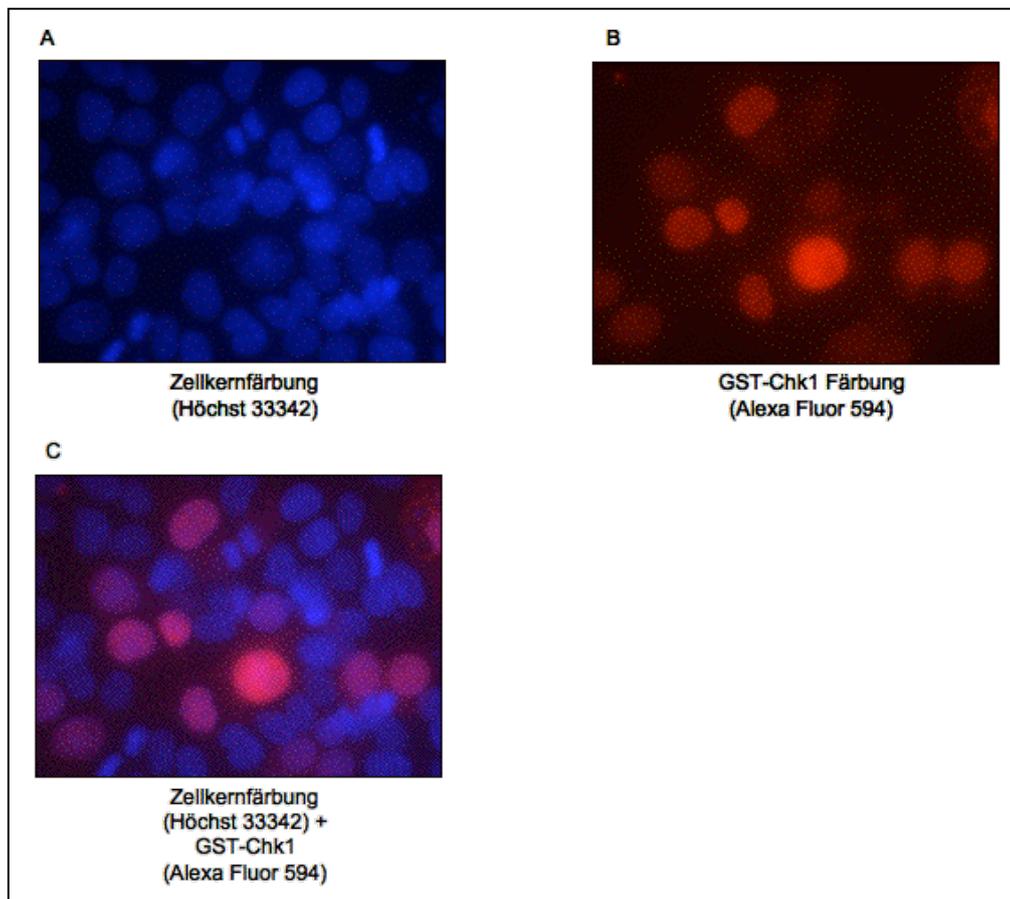


Abb. 36: Analyse der Lokalisation von GST-Chk1 in transient transfizierten HEK-293T-Zellen mittels Immunfluoreszenz. Die Detektion von GST-Chk1 erfolgte mittels GST-Antikörpermarkierung und Färbung durch Alexa Fluor 594 Farbstoff markierten Sekundäntikörper. (A) zeigt die Färbung der Zellkerne mit Höchst 33342 (B) zeigt die Anfärbung von GST-Chk1 mit Alexa Fluor 594. (C) zeigt die Überlagerung der Bilder A und B.

Der Höchst 33342 Farbstoff emittiert im blauen Wellenbereich des Lichtes. Dies ermöglicht die gleichzeitige Verwendung langwelliger Fluoreszenzfarbstoffe mit dem Höchstfarbstoff. Wie in Abb 36 Bild A zu erkennen ist, wurden die Kerne mittels des Höchst 33342 Farbstoffs angefärbt. Abbildung 36 (B) zeigt den bei einem Emissionsmaximum von 617nm absorbierenden farbstoffgekoppelten Alexa Fluor 594 Sekundäntikörper, welcher spezifisch an den GST-tag der Chk1 Kinase bindet. Die Lokalisation des GST-Chk1 Proteins wird somit sichtbar. Wie

man erkennen kann befindet sich GST-Chk1 im Zellkern. Wie deutlich in Abbildung 36 (B) zu erkennen ist, zeigt die Chk1 Färbung (rot) eine vollständige Überlappung mit der blauen Fluoreszenz, welche die Lokalisation im Zellkern signalisiert.

Um das MPG Protein in der Immunfluoreszenz detektieren zu können, wurde Alexa Fluor 488 gekoppelter Antikörper verwendet. Dieser Antikörper hat sein Fluoreszenzmaximum im grünen Bereich.

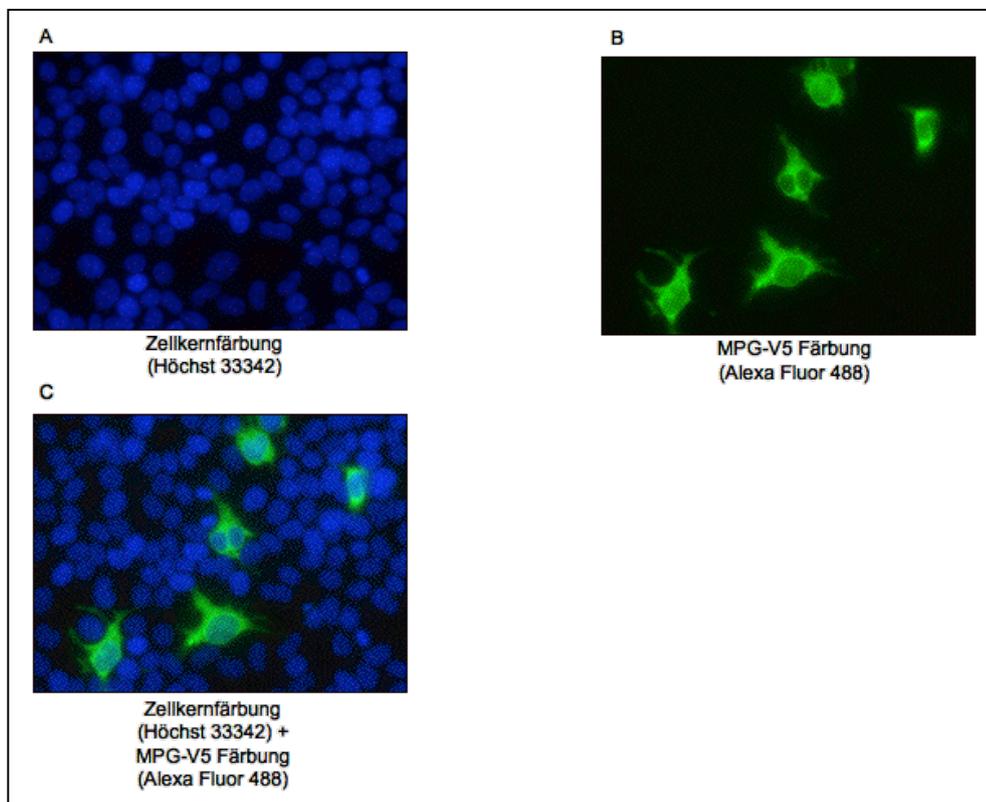


Abb. 37: Analyse der Lokalisation von MPG-V5 in transient transfizierten HEK-293T-Zellen mittels Immunfluoreszenz. Die MPG Detektion erfolgte durch Färbung mit Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper. (A) zeigt die Färbung der Zellkerne mit Höchst 33342. (B) zeigt die Färbung des V5-markierten MPG Proteins, sichtbar gemacht durch den Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundärantikörper. (C) zeigt die Überlagerung der Bilder A und B.

Abbildung 37 A zeigt die Höchst 33342 Färbung der Zellkerne. Wie in Abbildung 37 B deutlich wird, zeigt die grüne Fluoreszenz die Lokalisation des MPG Proteins

überwiegend im zytoplasmatischen Bereich, sowie granuläre Strukturen im perinukleären Bereich der Zelle. Dies wird bei insbesondere nach Überlagerung beider Bilder (Abb. 37 C) deutlich.

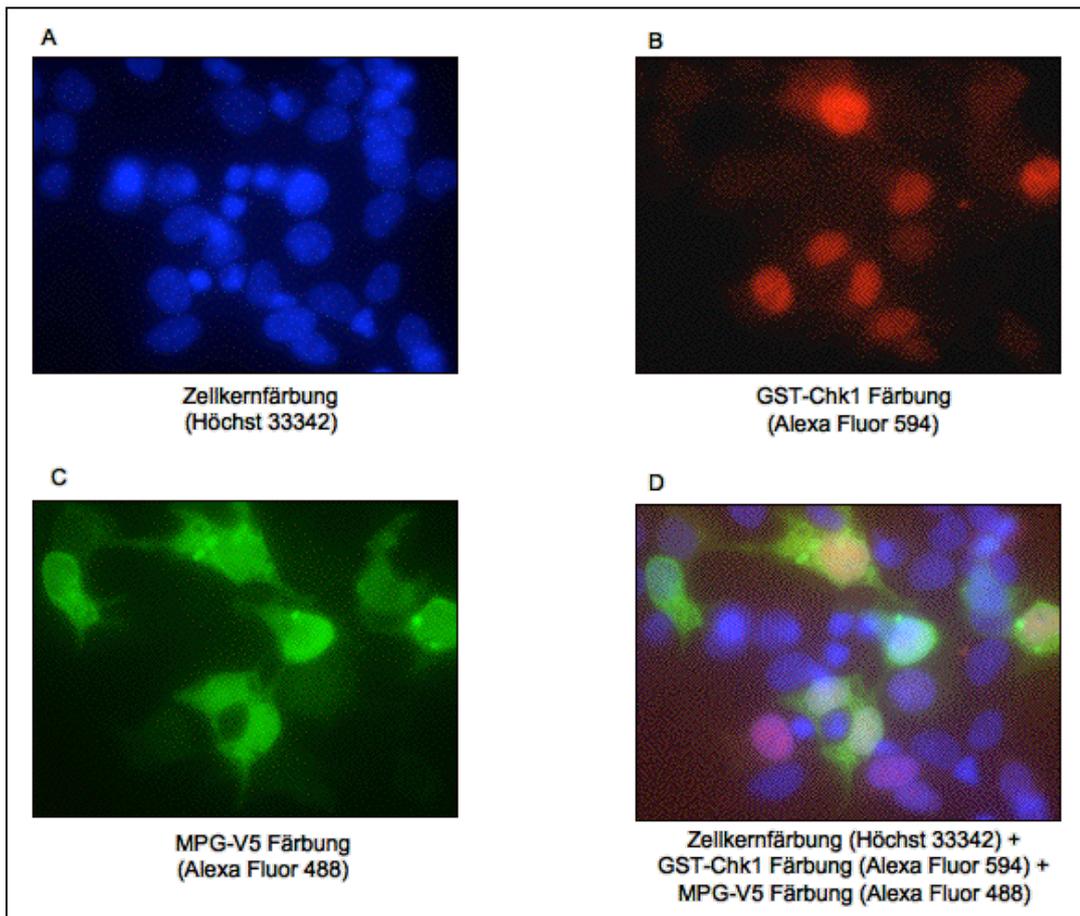


Abb. 38: Analyse der Lokalisation von MPG-V5 und GST-Chk1 in co-transfizierten HEK-293T Zellen mittels Immunfluoreszenz. Die Detektion von MPG-V5 erfolgte mittels V5-Antikörper und Alexa Fluor 488 Sekundärantikörper. (A) zeigt die Färbung der Zellkerne mit Höchst 33342. (B) zeigt die Färbung von GST-Chk1, sichtbar gemacht durch Alexa Fluor 594 Sekundärantikörper. (C) zeigt die Färbung des V5-markierten MPG Proteins, sichtbar gemacht durch Alexa Fluor 488 Sekundärantikörper. (D) zeigt die Überlagerung der Bilder A, B und C.

Bild A (Abb. 38) der Immunfluoreszenzfärbung zeigt die Färbung der Kerne der HEK293 Zellen durch den Höchst 33342 Farbstoff. In Abbildung B ist GST-Chk1 bei Co-Transfektion mit MPG-V5 zu sehen. Wie bereits zuvor zeigt sich GST-Chk1 überwiegend nukleär lokalisiert. Abbildung 38 C zeigt die Lokalisation der N-

Methylpurine-DNA-Glykosylase in den HEK293T-Zellen bei Co-Transfektion mit GST-Chk1. In Abbildung 37 B ist das MPG Protein bei transienter Einzeltransfektion in HEK-293T Zellen überwiegend im Zytoplasma und perinukleär lokalisiert. Im Fall der Co-Transformation Diese Abbildung (Abb. 38 C) befindet sich ein Großteil des MPG Proteins im Kern der Zellen, was insbesondere bei Überlagerung der Bilder deutlich wurde. Des Weiteren sind einige besonders deutlich zu erkennende, helle granuläre Strukturen im Bereich des Kerns zu sehen. Die stark fluoreszierenden Punkte scheinen wiederum perinukleär lokalisiert zu sein. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das MPG-Protein bei Co-Transfektion mit GST-Chk1 in HEK-293T Zellen eine Veränderung der Lokalisation zeigt. Die Lokalisation der Chk1 Kinase hingegen verändert sich nicht (Abb. 38 B).

3.5.10 Bestimmung der Lokalisation der GST-Chk1 Kinase und des MPG-V5 Proteins in transfizierten HEK-293T Zellen mittels Immunfluoreszenz nach Behandlung mit Cisplatin

In diesem Versuch wurden die HEK-293T Zellen entweder, wie schon zuvor, mit MPG-V5 oder GST-Chk1 Einzel- oder Co-Transfiziert. Anschließend fand eine Behandlung der Zellen mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin (10mM) für 24h statt. Cisplatin gehört zu der Gruppe der DNA-alkylierenden Agenzien (Zytostatika).

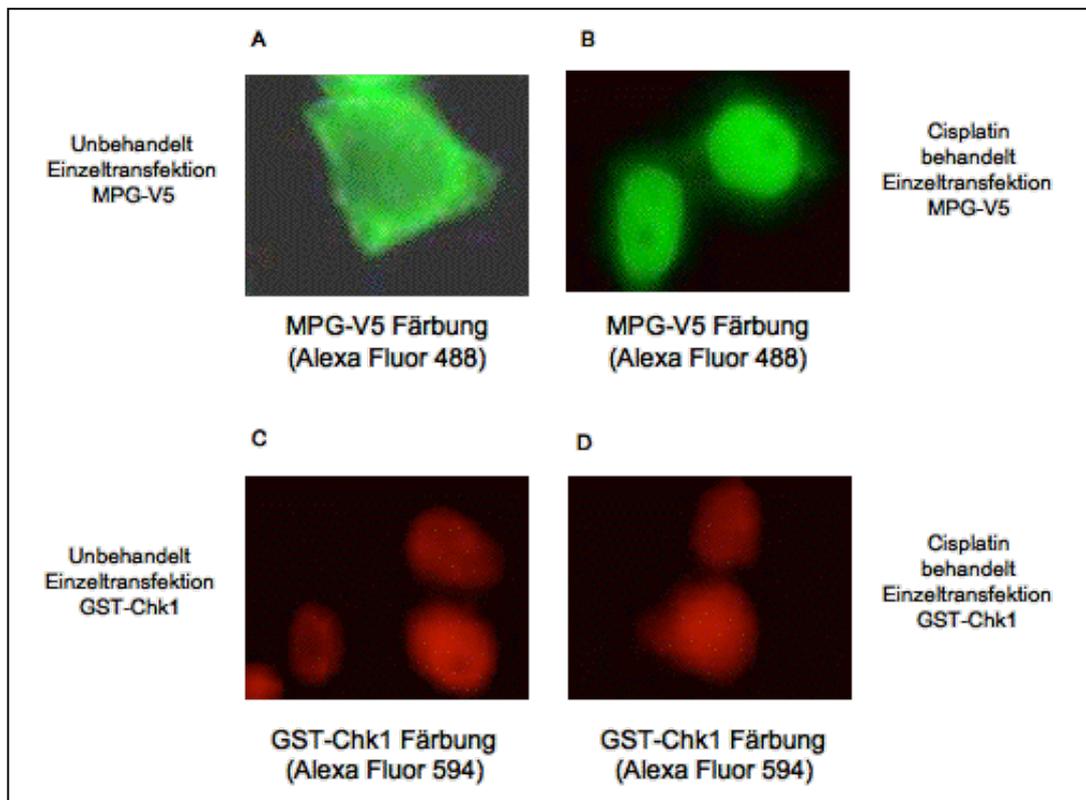


Abb. 39: Analyse der Lokalisation von MPG-V5 und GST-Chk1 in HEK-293T Zellen nach Behandlung mit Cisplatin mittels Immunfluoreszenz. Die MPG Detektion erfolgte mittels V5-Antikörper und Färbung durch Alexa Fluor 488 Sekundäntikörper. Die Chk1 Detektion mit GST-Antikörper und Alexa Fluor 594 Sekundäntikörper. (A) zeigt die Färbung des MPG-V5 Proteins in unbehandelten HEK-293T Zellen, sichtbar gemacht durch Alexa Fluor 594 Sekundäntikörper. (B) in Cisplatin behandelten Zellen. (C) zeigt die Färbung der GST-Chk1 Kinase in unbehandelten HEK-293T Zellen, sichtbar gemacht durch Alexa Fluor 594 Sekundäntikörper, (D) in mit Cisplatin behandelten Zellen.

Abbildung 39 A zeigt die Lokalisation des MPG Proteins mittels Färbung (grün) durch Alexa Fluor 488 gekoppelten Sekundäntikörper. Die Lokalisation des MPG-V5 Proteins zeigt sich, wie bereits in Abbildung 37 B bei transients Einzeltransfektion hauptsächlich im zytoplasmatischen Bereich der Zelle, eine geringe Menge ist auch in Nukleus zu finden (Abb. 39 A). Nach Behandlung mit Cisplatin zeigt sich deutlich eine vermehrte Konzentration von MPG im Nukleus (Abb. 39 B). Die Lokalisation von MPG verschiebt sich von einer zytoplasmatischen Lokalisation ohne Behandlung, in den Nukleus nach

Behandlung mit Cisplatin. Die entsprechende Färbung der Zellkerne mittels Höchst 33342 Farbstoff fehlt.

Abbildung 39 C zeigt die Lokalisation des Chk1 Proteins in einzeltransfizierten HEK-293T Zellen. Chk1 ist, in wie bereits zuvor in Abb. 38 B zu sehen, im Kern lokalisiert. Ein identisches Bild zeigt sich nach Behandlung mit Cisplatin bei Einzeltransfektion der GST-Chk1 Kinase (Abb. 39 D). Die Lokalisation im Kern bleibt also erhalten.

Dieses Experiment gibt einen ersten Hinweis darauf, dass sich nach Behandlung der Zellen mit dem Zytostatikum Cisplatin die Lokalisation der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase vom Zytoplasma in den Nukleus verlagert.

4. Diskussion

Die Chk1 Proteinkinase gehört zur Klasse der Serin/Threonin Kinasen und spielt eine bedeutungsvolle Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus nach DNA Schädigung nach Aktivierung durch die Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) and Ataxia Telangiectasia-Related (ATR) Kinasen.

Chk1 Substrate wie die Tyrosinphosphatasen Cdc25A/B/C (Hasepass et al. 2003, Furnari et al. 1997), der Tumorsuppressor p53 (Shieh et al. 2000) und sein Verwandter p73 alpha (Gonzales et al. 2003), die Kinasen p107wee1 (Furnari et al. 1997) und Tausled like kinase Tik1 (Groth et al. 2003) konnten bisher identifiziert werden.

In eukaryotischen Organismen reguliert Chk1 durch Phosphorylierung die Protein Phosphatasen Cdc25A/C (Kim et al. 1999, Xiao et al. 2003, Sancar et al. 2004, Bartek et al. 2001) und somit die Transition der Zelle in verschiedene Zellzyklusphasen. Die zentrale Rolle von Chk1 verdeutlicht die Relevanz der Identifikation weiterer neuer Substrate und Interaktionspartner von Chk1 für das Verständnis des komplexen Mechanismus der Signaltransduktion und lässt vermuten, dass es weitere Substrate und Interaktionspartner gibt, die insbesondere die DNA Reparaturmechanismen oder die Apoptose regulieren.

4.1 Substratidentifikationsmethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Identifikationsmethoden angewandt, um neue Substrate bzw. Interaktionspartner der Chk1 Kinase zu identifizieren.

Der biochemische Ansatz KESTREL wurde verwendet, um über chromatographische Auftrennung und in vitro Kinasetests phosphorylierte Substrate zu identifizieren. Mit Hilfe des molekularbiologischen Hefe-2-Hybrid Systems wurde versucht, Interaktionspartner durch Protein-Protein Wechselwirkungen in der Hefe zu identifizieren.

Im biochemischen Ansatz kam die KESTREL Methode zur Anwendung, mit Hilfe derer bereits erfolgreich Substrate für verschiedenste Kinasen identifiziert wurden (Knebel et al. 2001, McNeill et al. 2004, Murray et al. 2004, Cole et al. 2004, Eysers et al. 2005, Cartlidge et al. 2005, Auld et al. 2005, Cuomo et al. 2005, Peng et al. 2006, Jaleel et al. 2007). Um die bestmöglichen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Durchführung zu schaffen, wurden die hier dargestellten Versuche in Zusammenarbeit mit dem Entwickler dieser Methode (Knebel et al. 2001) an der University of Dundee, MRC Phosphorylation Unit in Schottland durchgeführt.

4.2 Die Suche nach Substraten der Chk1 Kinase mittels KESTREL

Mittels dieser proteinbiochemischen Analyse sollten nach chromatographischer Auftrennung durch Anionenaustauschchromatographie und sich anschließender Kinasereaktion mit aufgereinigtem GST-Chk1, neue Substrate in den Proteinfractionen identifiziert werden (Knebel et al. 2001).

Diese Art der biochemischen Identifikation von Substraten durch den KESTREL Assay birgt jedoch einige Tücken. Unter anderem erhält ein Zellextrakt sowohl das Zielprotein als auch eine große Menge weiterer Kinasen, welche entsprechende, im Extrakt enthaltene Substrate, phosphorylieren können. Nach Inkubation des Extraktes mit der exogen zugeführten Kinase könnte dies zu einer erhöhten Hintergrundphosphorylierung führen, welche potentielle Substrate von Chk1 maskieren würde. Um unspezifische Phosphorylierung zu detektieren, wurden die Fraktionen mit und ohne rekombinante GST-Chk1 Kinase analysiert. Das Problem einer zu starken Hintergrundphosphorylierung und somit der Maskierung potentieller Substrate stellte in den hier durchgeführten in-vitro Kinase Assays jedoch nicht das zentrale Problem dar. In beiden Autoradiogrammen waren deutliche Banden zu detektieren, welche nicht durch Hintergrundphosphorylierung durch andere Kinasen maskiert wurden und nur in den Fraktionen mit exogen zugeführter Kinase zu detektieren waren. Die Autoradiogramme zeigten deutlich

phosphorylierte Banden, welche spezifisch nur in den Fraktionen mit exogen zugeführter Kinase zu detektieren waren.

In den vorliegenden durchgeführten Assays stellte die schwache Intensität der potentiell durch Chk1 phosphorylierten Banden bzw. die Art und Weise des Auftretens der Signale nur in einer Fraktion und nicht in mehreren aufeinander folgenden, ein Problem dar. Von entscheidender Bedeutung für den KESTREL Versuch stellte sich die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und insbesondere auch die Variabilität der Chk1 Kinase Aktivität dar.

4.2.1 Untersuchung zur Abnahme der Signalstärke der Chk1 Kinase im radioaktiven Kinase Assay

Die Reduktion der Autophosphorylierung der Chk1 Kinase könnte auf proteolytischen Abbau der Kinase durch in der Fraktion enthaltene Proteasen zurückzuführen sein. In gewissen Maß findet ein proteolytischer Abbau der Chk1 Kinase im Assay statt. Schon in Abwesenheit von Proteinfractionen ist eine radioaktiv gelabelte Doppelbande im Autoradiogramm erkennbar, ein Signal bei circa 80kDa und ein weiteres radioaktiv markiertes Signal bei circa 70kDa. Die substratphosphorylierende Aktivität des Chk1 Proteins wurde durch Zugabe von GST-markierten Cdc25C(200-256) Protein im radioaktiven Kinase Assay nachgewiesen (Abb. 13). Die Abnahme der Autophosphorylierung über mehrere Fraktionen wie in der zweiten Chromatographie gezeigt, lässt sich vermutlich nicht auf proteolytischen Abbau durch Proteasen allein zurückzuführen. Üblicherweise lässt sich proteolytischer Abbau durch Zugabe von Protease Inhibitoren in einem gewissen Rahmen reduzieren. Weiterführende Versuche, zur Problembekämpfung der möglichen Degradation, führten jedoch zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Die Zugabe eines Cocktails aus Protease Inhibitoren führte nicht zu einer Stabilisierung des Signals der Autophosphorylierung. Um zu untersuchen, ob es sich um eine spezifische Inhibition der Chk1 Kinase durch einen proteinogenen Inhibitor handelt, wurde die Fraktion in der das Signal der Autophosphorylierung

der Chk1 Kinase am stärksten abnahm, erneut über eine Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt, um eine weitere Auftrennung der Proteinkomponenten zu erreichen. Im Anschluß wurde erneut ein radioaktiver Kinase Assay durchgeführt und die Fraktion mit der stärksten Abnahme des Signals über eine Gelfiltrationsäule aufgetrennt. Diese Gelfiltrationsäule trennt Proteine nach Ihrer Größe. Ziel war es, hierbei ein akkumuliertes Protein zu detektieren, welches im Vergleich mit anderen Fraktionen, welche ein reguläres Bild der Autophosphorylierung der Chk1 Kinase zeigen, spezifisch in dieser erneut chromatographisch aufgetrennten Fraktion auftaucht. Sollte solch ein Protein detektiert werden können, so wäre der nächste Schritt die massenspektrometrische Identifikation gewesen.

Leider führte diese Auftrennung hinsichtlich der Identifikation eines spezifischen Inhibitorproteins der Chk1 Kinase, zu keinem eindeutigen Ergebnis. Trotz erneuter chromatographischer Auftrennung enthielt die Fraktion noch immer relativ viele, nicht eindeutig zu trennende Banden, um diese massenspektrometrisch bestimmen zu können.

4.2.2 Untersuchungen zur Desphosphorylierung der Chk1 Kinase im radioaktiven Kinase Assay

Eine andere Erklärung für die Abnahme der Autophosphorylierung im Kinase Assay wäre eine enzymatische Dephosphorylierung der Chk1 Kinase durch in den Fraktionen erhaltene Proteinphosphatasen. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass nach Inkubation von GST-Chk1 mit und ohne Fraktion, im Western Blot ein deutlicher elektrophoretischer Laufunterschied zu detektieren war (Abb. 40).

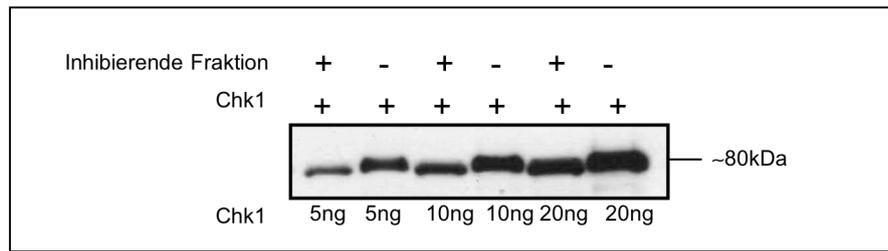


Abb. 40: Western-Blot der Inkubation der GST-Chk1 Kinase mit inhibierender Fraktion. Western-Blot nach Inkubation verschiedener Konzentrationen (5ng, 10ng, 20ng) der GST-Chk1 mit einer Fraktion der chromatographischen Aufreinigung des Rattenleberextraktes, welche zuvor eine deutliche Inhibition der Phosphorylierung im Kinase-Assay zeigte.

In weiterführenden Versuchen wurden Kinasereaktionen in An- und Abwesenheit eines Cocktails aus Phosphatase Inhibitoren inkubiert (*Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II, Calbiochem*). Dieser Versuch führte zur Stabilisierung der Autophosphorylierung der GST-Chk1 Kinase. Dies legte also den Schluss nahe, dass eine Dephosphorylierung der GST-Chk1 Kinase in bestimmten Fraktionen für die Reduktion der Autophosphorylierung verantwortlich war, so dass daraus geschlossen werden konnte, dass es sich bei diesem Phänomen um eine Desphosphorylierung der GST-Chk1 Kinase handelt. Hierbei wurde festgestellt, dass die Zugabe der Menge an Phosphatase Inhibitor stark variierten musste, um eine vollständige Aufhebung der Inhibition der Chk1 Kinase zu erhalten. In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass auch aus anderen Proteinfamilien stammende Kinasen (MAPK1, Chk2 und RSK1) durch Zugabe der Proteinfraktionen dephosphoryliert wurden (Abb. 41).

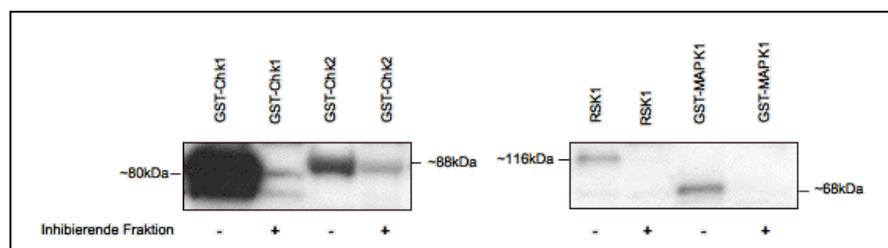


Abb. 41: Kinase Assay verschiedener Kinasen mit inhibierender Fraktion. Western-Blot nach Inkubation der GST-Chk1, GST-Chk2, RSK1 und GST-MAPK1 Kinase mit einer Fraktion der chromatographischen Aufreinigung des Rattenleberextraktes, welche zuvor eine deutliche Inhibition der Phosphorylierung im Kinase-Assay zeigte.

Eine weitere Erklärung für die Reduktion der Autophosphorylierung von Chk1 wäre ein in den Fraktionen vorhandener „ATP Fänger“, der das phosphorylierte ATP mit hoher Affinität bindet oder umsetzt, so dass kein [γ - 32 P] ATP mehr für die GST-Chk1-getriebene Phosphorylierung zur Verfügung steht.

4.2.3 Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des KESTREL Versuchs

Als weiteres und signifikantestes Problem stellte sich die Reproduzierbarkeit der Versuche, insbesondere des radioaktiven Kinase Assays, dar.

In bereits publizierten KESTREL Versuchen (Murray et al. 2004, Evers et al. 2005) wurden phosphorylierte Banden meist in mehreren aufeinanderfolgenden Fraktionen mit einem typischen glockenkurven-artigen Signalverlauf detektiert. Diese Signalverteilung konnte in den hier durchgeführten Tests nicht beobachtet werden. Die Intensität der Signale im Autoradiogramm erschienen annähernd gleich stark in aufeinander folgenden Fraktionen oder nur als Einzelsignal in einer Fraktion (Abb. 14).

Identisch durchgeführte KESTREL Ansätze führten bei mehrfacher Wiederholung der chromatographischen Auftrennung und des sich anschließenden Kinase Assays zu keiner zufriedenstellenden Reproduzierbarkeit. Vergleicht man die beiden Chromatogramme beider dargestellten KESTREL Assays (Abbildung 7 und Abbildung 15) wird zumindest die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Auftrennung der Rattenleberextrakte deutlich. Das erste Chromatogramm zeigt die gleichen *peaks* in der UV-Absorption wie die zweite Chromatographie. Das Profil der UV-Absorption ist dem der zweiten Chromatographie sehr ähnlich. Diese Ergebnisse wurden durch die Analyse der gefärbten Gele unterstützt (Abb.8, Abb.16).

Um auszuschließen, dass die Probleme auf das Ausgangsmaterial, das präparierte Rattenleberextrakt, zurückzuführen sind, wurden Versuche mit

Helazellen- und Helazellenkernextrakten durchgeführt, die ebenfalls zu keiner Identifikation von Substraten führten.

Auf Grund der dargestellten Probleme wurde der KESTREL Ansatz zur Substratidentifikation eingestellt, da die Ergebnisse trotz mehrmaliger Wiederholung, detaillierter Analysen zur Verbesserung des Versuchs und intensiver Versuche zur Optimierung der Versuchsbedingungen, keine zufriedenstellenden reproduzierbaren Ergebnisse lieferten.

4.2.4 Zusammenfassung und Ausblick der KESTREL Versuche

Die detaillierte Übereinstimmung des Elutionsverhaltens der Proteine und deren übereinstimmenden *peaks* in den Chromatogrammen, sowie die Kongruenz des Elutionsmusters der Proteine im Coomassie Gel führten zu der Annahme, dass es sich bei dem Problem der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, um ein Chk1 Kinasen spezifisches Problem handeln könnte. Die aus einer Anionenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen wurden von Frau Friederike Krop im Rahmen ihrer Diplomarbeit zur Identifikation von Substraten der Tyrosinkinase *Pyk2* eingesetzt (Krop, 2005). Die Reaktion wurde einerseits mit GST-*Pyk2*, andererseits mit einer *Pyk2*-Mutante Y402F durchgeführt. Dieser KESTREL Assay zeigte ein über mehrere Fraktionen verlaufendes phosphoryliertes Signal, welches reproduzierbar war. In weiteren massenspektrometrischen Analysen konnte ein neues Substrat, MAT2A (*Methionine Adenosyltransferase II, alpha*) der *Pyk2* Kinase identifiziert werden.

An der University of Dundee wurden weitere KESTREL Versuche mit GST-Chk1 durchgeführt. Jedoch führten die Versuche zu keiner Identifikation (J. Rouse, persönliche Kommunikation).

Dies unterstützt die Annahme, dass es sich hier um ein Chk1 spezifisches Problem handelt und nicht auf die chromatographische Auftrennung der Extrakte bzw. die Präparation der Lysate zurückzuführen ist, da diese ausreichend auf mögliche Fehlerquellen getestet wurden. Unterstützend zeigen sich hier die

Ergebnisse, mit den durch diese Arbeit chromatographisch gewonnenen Fraktionen, der Diplomarbeit von Frau Friederike Krop. Des Weiteren findet die Methode vielfach eine erfolgreiche Anwendung mit unterschiedlichsten Ausgangsproteinen (Knebel et al. 2001, McNeill et al. 2004, Murray et al. 2004, Cole et al. 2004, Eyers et al. 2005, Cartlidge et al. 2005, Auld et al. 2005, Cuomo et al. 2005, Peng et al. 2006, Jaleel et al. 2007).

4.3 Die Suche nach Interaktionspartnern von Chk1 Kinase mittels des Hefe-2-Hybrid Systems

Mittels dieses auf dem Transkriptionsfaktor Gal4 von *Saccharomyces cerevisiae* basierenden Systems zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen (Fields and Song, 1989), sollten in der vorliegenden Arbeit Interaktionspartner der Chk1 Kinase identifiziert werden.

Die erfolgreiche Verwendung des Hefe-2-Hybrid Systems für die Identifikation von Kinase Substraten wurde mehrfach bewiesen (Yang et al. 1992, Andreasson et al. 2005, Polte and Hanks, 1995).

In dieser Arbeit wurde das MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 von Clontech und der Hefestamms AH109 verwendet. Hierzu wurde die cDNA Bibliothek des fötalen Gehirns, die in den Beutevektor pACT2 inseriert war, verwendet.

4.3.1 Verifizierung des Hefe-2-Hybrid Systems

Nach erfolgreicher Klonierung des Chk1 Konstruktes in den entsprechenden Ködervektor pGBKT7, wurde das Wachstumsverhalten der Hefen unter verschiedenen Selektionsbedingungen getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass die Zugabe von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT), einem inhibitor des His3-

Reportergens, durch die Verwendung des AH109 Hefestamms, nicht erforderlich war.

Zur Überprüfung des Hefe-2-Hybrid Systems wurden unterschiedliche initiale Versuche durchgeführt, welche die Stabilität und somit die basalen Voraussetzung zur Verwendung des Systems verifizierten. Diese initialen Tests zeigten die Selektivität des Systems und Ihre Eignung für den zentralen Hefe-2-Hybrid Assay zur Identifikation von neuen Interaktionspartnern der Chk1 Kinase.

Einen zentralen Aspekt bildete die Untersuchung zur Eignung des konstruierten GAL4-BD-Köderplasmid Chk1 für den Hefe-2-Hybrid *Screen*. Damit waren die Grundvoraussetzungen für die Durchführung eines Hefe-2-Hybrid *Screenings* geschaffen. Die Expression der Bindedomänenfusion konnte in Hefe gezeigt werden (Abb. 20) und hatte ebenfalls keinen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Hefen. Eine Aktivierung aller Reportergene (His3, Ade, LacZ) durch das Köderprotein allein konnte im Vorfeld ausgeschlossen werden.

4.3.2 Initialer Hefe-2-Hybrid Screen

Der initiale Screen wurde mit der Wildtyp-Variante der Chk1 Kinase durchgeführt. Nach Selektion der Klone auf Selektionsplatten (SD/-Leu/-Trp/-His, SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) und einem anschliessendem LacZ Test zeigten sieben Klone eine positive Blaufärbung im β -Galaktosidase Test. Nach Überprüfung auf Selbstaktivierung konnte ein Klon ausgeschlossen werden. Die fünf verbleibenden Klone wurden isoliert und sequenziert. Durch Sequenzrecherchen konnten folgende Proteine identifiziert werden:

- (2) N-Methylpurine-DNA Glykosylase Isoform C
- (3) und (7) Ankyrin Repeat Domain 7 (ANKRD7)
- (4) Histone Family, Member V Isoform 2
- (5) NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) 1 Beta Subcomplex, 10
- (6) Cytochrom C Oxidase Subunit VIIA Polypeptide 2 (Liver) Precursor

Um die Interaktionspartner zu verifizieren, wurden diese in HEK-293T Zellen exprimiert und im Anschluss Co-Präzipitationsstudien mit Chk1 untersucht. Das Ankyrin Repeat Domain 7 (ANKRD7) Protein ließ sich nicht in HEK-293T Zelle exprimieren. Weder durch Optimierung der Transfektionsbedingungen, noch durch Wechsels des Transfektionsreagenzes konnte eine Expression des Ankyrin Repeat Domain 7 (ANKRD7) Proteins erreicht werden. Ein eventuelles Problem könnte hier in der posttranslationalen Prozessierung des Proteins in den HEK-293T-Zellen liegen.

4.3.3 N-Methylpurine-DNA-Glykosylase , MPG

In HEK-293T Zellen wurde die Interaktion in eukaryotischen Zellen durch Co-Präzipitationsanalyse untersucht. Nach transienter Co-Transfektion der V5-getaggten identifizierten Proteine und GST-Chk1, zeigte von den untersuchten Kandidaten lediglich die N-Methylpurine-DNA-Glykosylase eine positive Interaktion. Hierdurch konnte also die Interaktion von Chk1 und MPG in einem weiteren Experiment bestätigt werden. Diese bestätigte Interaktion ist ein weiterer Hinweis auf die physiologische Interaktion beider Proteine.

Die DNA jeder Zelle ist permanent multiplen Einflüssen ausgesetzt, welche zu Mutationen, chromosomalen Anomalien, und auch zur Krebsentstehung führen können. Reparaturmechanismen, sichernden das Überleben der Zelle und sind von universeller Bedeutung.

Die N-Methylpurine-DNA-Glykosylase (MPG, 3-alkyladenine DNA glycosylase, 3-methyladenine DNA glycosidase, AAG, ADPG, anpg, ANPG, APNG, CRA36.1, DNA-3-methyladenine glycosylase, MDG, Mid1, MID1, N-methylpurine-DNA glycosirase, PIG11, PIG16) ist ein zentrales Enzym dieses Reparaturmechanismus. MPG repariert N-Alkyladdukte über den Basenexzisionsreparaturweg (*Base Excision Repair*, BER). Bei diesem Prozess werden im ersten Schritt die Alkyladdukte durch MPG und AP-Endonukleasen (A-

Purin-A-Pyrimidin-Endonukleasen) heraus geschnitten. Von MPG existieren drei Isoformen:



Abb. 42: Die drei Isoformen der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase. (aus <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Proliferierende Zellen besitzen eine erhöhte Kapazität DNA Schäden zu reparieren, als bereits differenziertes Gewebe und nicht-proliferierende Zellen (Mitchell und Hartmann, 1990). Eine Überexpression von MPG wurde u.a. in Brustkrebs, Cervixtumoren und Thymuskarzinomen beobachtet, was die Bedeutung dieses Reparaturenzyms für die Tumorgenese nahelegt (Xu et al. 1997, Moore et al 2000, Kim et al. 1998, Sohn et al. 1998, Cerda et al. 1998).

mRNA Expressionsdaten zeigen eine relativ gleichmäßige Expression der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase in den verschiedenen Zelllinien. Eine Ausnahme bildet hierbei die GTL 16_Gastric und MKN 45_Gastric Zellen, bei denen auf mRNA Ebene eine schwächere Expression zu detektieren war.

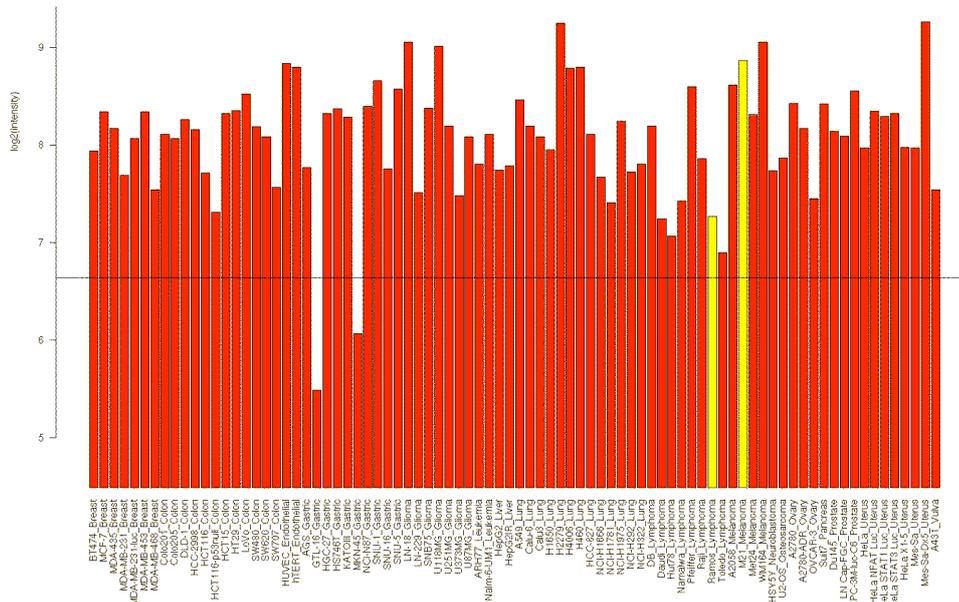


Abb. 43: mRNA Expressionsprofil der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase in unterschiedlichen Zelllinien (Anja von Heydebreck, Merck KGaA, Darmstadt). Die X-Achse zeigt die untersuchten Zelllinien, die Y-Achse gibt die Intensität der Expression logarithmisch an.

Die Chk1 Kinase zeigt ebenso ein ubiquitäres Expressionsprofil in unterschiedlichen Zelllinien. Eine Ausnahme bildet hierbei die HEPG2_Liver, HEPG21R_Liver Zelllinie und H2277_Lung, die nur eine marginale Expression von Chk1 zeigt (Expressionsprofil REDB Datenbank, Merck KGaA, Darmstadt, Daten nicht gezeigt).

Eine Expression beider Proteine in den gleichen Zellen Voraussetzung für eine physiologische Interaktion dieser.

4.3.4 Hypothese zur Relevanz der MPG-Chk1 Interaktion

Eine wichtige Voraussetzung für die Interaktion beider Proteine ist, dass beide Proteine im gleichen Kompartimenten der Zelle vorliegen. Wie bereits bei Kim et al. 2002 beschrieben, wird MPG nicht homogen exprimiert. Bisher wurde die Lokalisation der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase in HEK-293T Zellen nicht beschrieben. Nach den publizierten Expressionsdaten kommt MPG hauptsächlich

in ovariellen und testikulären Gewebe ein Zusammenhang zwischen DNA-Reparaturenzymen und männlicher Infertilität wurde vermutet (Kim et al. 2002). Des Weiteren wurde von einer Translokation der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase vom Nukleus in das Zytoplasma in malignen Ovarialtumoren berichtet (Kim et al. 2000).

Die Methode der Immunfluoreszenz bietet die Möglichkeit der Bestimmung der Lokalisation von MPG und Chk1 in der Zelle. Eine Co-Lokalisation beider Proteine in der Zelle würde die zuvor gefundene Interaktion unterstützen. Wie in 3.5.10 beschrieben, zeigte die Immunfluoreszenz, dass GST-Chk1 bei Einzeltransfektion (Abb. 36) im Kern vorliegt (Puc et al. 2005), wohingegen MPG hauptsächlich im zytoplasmatischen Bereich der Zelle nachgewiesen wurde (Abb. 37). Interessanterweise zeigte sich ein differenziertes Bild bei Co-Transfektion von GST-Chk1 und MPG-V5. Während die Lokalisation der GST-Chk1 Kinase unverändert war, zeigte das MPG Protein eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation (Abb. 38).

Weitere Versuche, bei denen die Zellen zuvor mit Cisplatin behandelt wurden, unterstützen die Hypothese der Translokation von MPG. Cisplatin gehört zu der Gruppe der DNA-alkylierenden Agenzien (Zytostatika) und aktiviert den Basenexzisionsreparaturweg. Sowohl GST-Chk1 als auch MPG-V5 zeigten nach Behandlung mit Cisplatin eine eindeutige Lokalisation im Kern. Somit befindet sich die N-Methylpurine-DNA Glykosylase nach DNA Schädigung im Kern und kann den ersten Schritt im Basenexzisionsreparaturweg die Entfernung N-Alkyladdukte, einzuleiten.

Die Interaktion der N-Methylpurine-DNA-Glykosylase (MPG) mit dem Chk1 Protein wurde über das Hefe-2-Hybrid System identifiziert und in biochemischen Co-Präzipitationsexperimenten *Pulldown* mit überexprimierten GST-Chk1 und MPG-V5 in HEK-293T Zellen bestätigt. Die Interaktion wurde also mit zwei voneinander unabhängigen Methoden nachgewiesen. Unterstützende Ergebnisse lieferten die Immunfluoreszenz, sowie die Co-Elution von MPG und Chk1 in der Anionenaustauschchromatographie. Proteine, die sich in einem Komplex befinden können nach chromatographischer Auftrennung bei gleicher Salzkonzentration

eluierten, falls die Wechselwirkung nicht salzabhängig ist (Trujillo et al. 1998). In Kinasetests konnte nicht gezeigt werden, dass MPG ein Substrat der Chk1 Kinase ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in den Versuchen zu wenig MPG als Substrat eingesetzt wurde oder dieses vielleicht bereits phosphoryliert vorlag.

MPG spielt bereits eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur, so könnte die Rolle des Proteins über eine Interaktion mit Chk1 noch weiter über diese Funktion hinausgehen.

4.4 Ausblick

Untersuchungen haben gezeigt, dass der Tumorsuppressor p53, ein Substrat der Chk1 Kinase, in der Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur beteiligt ist (Offer et al. 2001, Zhou et al. 2001, Seo et al. 2002). Die Erforschung der Beziehung zwischen Zellzykluskontrolle und DNA Reparatur ist ein interessantes Feld, welches viele Möglichkeiten bietet, neue Ansätze in der Entwicklung von Chemotherapeutika zu erforschen und die Gelegenheit eröffnet innovative Komponenten innerhalb der onkologischen Forschung zu eruieren.

Um die physiologische Bedeutung der Chk1 Interaktion mit MPG näher zu verifizieren, wurden initiale Versuche mit siRNA Transfektionen durchgeführt. Die Methode der siRNA (*short interfering RNA*) ist ein posttranskriptioneller Gen *silencing* Mechanismus. Durch die Herunterregulation von Chk-1 und MPG in HEK-293T Zellen sollte ein funktioneller Zusammenhang in DNA Reparatur oder Zellzykluskontrolle untersucht werden. Zur Herunterregulation wurden spezifische gegen die Chk1 und MPG RNA gerichtete siRNA's generiert. Diese initialen Versuche zeigten eine spezifische Herunterregulation von Chk1 und MPG. In weiterführenden Versuchen wäre es nun möglich, den Einfluss verschiedener Chemotherapeutika, vor allem Induktoren des BER, auf den Signalweg des DNA-Schadensantwort zu untersuchen.

5. Literaturverzeichnis

Abraham RT, (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Development* 15, 2177-2196.

Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NH, Zhu S, Qiu JL, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M, Newman MA, Bjørn Nielsen H, Hirt H, Somssich I, Mattsson O, Mundy J. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* 2005 Jul 20;24(14):2579-89.

Auld GC, Campbell DG, Morrice N and Cohen P (2005). Identification of calcium-regulated heat stable protein of 24 kDa (CRHSP24) as a physiological substrate for PKB and RSK using KESTREL. *Biochem J.* 389:775-783.

Bartek J and Lukas J (2001). Mamalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell, Biol.*, 13, 738–747.

Bartek, J, Falck J, and Lukas, J (2001). Chk2 kinase — a busy messenger. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 875-884.

Bartek J and Lukas J (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, Vol 3, 421-429.

Cartlidge RA, Knebel A, Peggie M, Alexandrov A, Phizicky EM and Cohen P (2005). The tRNA methylase METTL1 is phosphorylated and inactivated by PKB and RSK in vitro and in cells. *EMBO J.* 24:1696-1705.

Cerda SR, Turk PW, Thor AD, Weitzman SA (1998). Altered expression of the DNA repair protein, N-methylpurine-DNA glycosylase(MPG) in breast cancer. *FEBS Lett* 431:12-18.

Chen M-S, Hurov J, White LS, Woodford-Thomas T, Piwnica-Worms H (2001). Absence of Apparent Phenotype in Mice Lacking Cdc25C Protein Phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 21: 3853-3861.

Chen P, Luo C, Deng Y, Ryan K, Register J, Margosiak S, Tempczyk-Russell A, Nguyen B, Myers P, Lundgren K, Kan CC, O'Connor PM (2000). The 1.7 Å crystal structure of human cell cycle checkpoint kinase Chk1: implications for Chk1 regulation. *Cell* 100, 681-92.

Chen Y, Sanchez Y (2004). Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair* 3 (8-9), 1025-32.

Chini CC and Chen J (2006). Repeated Phosphopeptide Motifs in Human Claspin Are Phosphorylated by Chk1 and Mediate Claspin Function. *J. Biol. Chem.*, Vol. 281, Issue 44, 33276-33282.

Chini CC and Chen J (2004). Claspin, a regulator of Chk1 in DNA replication stress pathway. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):1033-7.

Chuen-Pei NG, Lee HC, Ho CW, Arooz T, Siu WY, Lau A, and Poon RYC (2004). Differential Mode of Regulation of the Checkpoint Kinases CHK1 and CHK2 by Their Regulatory Domains. *J. Biol. Chem.* 279 (10), 8808-8819.

Cole A, Knebel A, Morrice N, Robertson LS, Irving AJ, Connolly CN and Sutherland C (2004). GSK-3 phosphorylation of the Alzheimers epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons. *J. Biol. Chem.* Vol 279 pp50176-50180.

Connell-Crowley L, Connell-Crowley L, Solomon MJ, Wei N, Harper JW (1993). Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro. *Mol Biol Cell.* 4 (1), 79-92.

Cortez D, Wang Y, Qin J & Elledge SJ (1999). Requirements of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286, 1162-1166.

Costanzo V, Robertson K, Ying CY, Kim E, Avvedimento E, Gottesman M, Grieco D and Gautier J (2000). Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Mol. Cell* 6, 649-659.

Cuomo ME, Knebel A, Platt G, Morrice N, Cohen P and Mittnacht S (2005). Regulation of microfilament organization by KSHV- cyclin/ cdk phosphorylation of caldesmon. *J. Biol. Chem.* 280:35844-58.

Dianov GL, Prasad R, Wilson SH, Bohr VA (1999). Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J. Biol. Chem.* 274,13741-13743.

Dunaway S, Liu HY, Walworth NC (2005). Interaction of 14-3-3 protein with Chk1 affects localization and checkpoint function. *J Cell Sci* 118 (Pt1), 39-50.

Elledge SJ (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.

Eyers CE, McNeill HE, Knebel A, Morrice N, Arthur S, Cuenda A and Cohen P (2005). The phosphorylation of CapZ-interacting protein (CapZIP) by stress-activated protein kinases triggers its dissociation from CapZ. *Biochem J.* 389: 127-135.

Fields and Song (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* Jul 20;340(6230):245-6.

Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, Sobol RW, Wilson SH, Dogliotti E. (1998). Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry.* March 17;37(11):3575-80.

Friedberg EC, Walker GC and Siede W (1995). DNA repair and mutagenesis, Washington, D.C.ASM Press, pp 1-698.

Furnari B, Rhind N and Russell P (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* 277, 1495-1497.

Gatei M, Young D, Cerosaletti KM, Desai-Mehta A, Spring K, Kozlov S, Lavin MF, Gatti RA, Concannon P, Khanna K (2000). ATM-dependent phosphorylation of nibrin in response to radiation exposure. *Nature Genet.* 25, 115-119.

Gonzalez S, Prives C, Cordon-Cardo C (2003). p73 α Regulation by Chk1 in Response to DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* 23: 8161-8171.

Green C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lowndes, N, (2000). A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Current Biology*, Volume 10, Issue 4, Page R171.

Groth A, Lukas J, Nigg EA, Sillje HH, Wernstedt C, Bartek J, and Hansen K (2003). Human Toslled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint. *EMBO J.*, 22, 1676-1687.

Hartwell LH and Weinert TA (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241, 317-322.

Hasepass I, Voit R and Hoffmann I (2003). Phosphorylation at serine 75 is required for UV-mediated degradation of human Cdc25A phosphatase at the S-phase checkpoint. *J. Biol. Chem.* 278, 29824-29829.

Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287, 1824-1827.

Hunter T (1995). When is a Lipid Kinase Not a Lipid Kinase? When it is a Protein Kinase. *Cell*, 83:1-4.

Jaleel M, Nichols RJ, Deak M, Campbell DG, Gillardon F, Knebel A, Alessi DR (2007). LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. *Biochem J.* Jul 15;405(2):307-17.

Jiang K, Pereira E, Maxfield M, Russell B, Godelock DM and Sanchez Y (2003). Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on Ser-345. *J Biol Chem* 278 (27), 25207-17.

Johnson RD, Jasin M (2001). Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 2):196-201.

Kastan MB, Bartek J (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*; 432:316–323.

Kim NK, An HJ, Kim HJ (2002). Altered expression of the DNA repair protein, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in human gonads. *Anticancer Res.* 22 (2A): 793-8.

Kim NK, Lee SH, Seo JS, Cha KY (1998). Tissue-specific expression and activation of N-methylpurine-DNA glycosylase(MPG) in SV40 Tantigen gene expressing transgenic mice. *Mol Cells* 8:383-387.

Kim SH, Li C and Maller JL (1999). A maternal form of the phosphatase Cdc25A regulates early embryonic cell cycles in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 212:381-391.

Kim ST, Lim D.-S, Canman C.E, Kastan M.B (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* 274:3 7538-37543.

King FW, Skeen J, Hay N, Shtivelman E (2004). Inhibition of Chk1 by activated PKB/Akt. *Cell Cycle.* 2004 May;3(5):634-7.

Knebel A, Morrice N, Cohen P (2001). A novel method to identify protein kinase substrates: eEF2 kinase is phosphorylated and inhibited by SAPK4/p38delta. *EMBO J.* 20, 4360.

Kolodner RD and Marsischky GT (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev*, 9, 89-96.

Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M and Slupphaug G (2000). Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett.* 476, 73–77.

Krop F (2005). Identifizierung neuer Substrate der cytosolischen Tyrosinkinase Pyk2. Diplomarbeit.

de Laat WL, Jaspers NGJ, Hoeijmakers JHJ (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13: 768-785.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* Aug 15;227(5259):680-5.

Lee JH and Paull TT (2004). Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex. *Science*, April 2; 304(5667): 93 - 96.

Lim DS, Kim ST, Xu B, Maser RS, Lin J, Petrini JHJ, Kastan MB. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404, 613-617.

Niida H, Katsuno Y, Banerjee B, Hande MP, Nakanishi M (2007). Specific Role of Chk1 Phosphorylations in Cell Survival and Checkpoint Activation. *Mol. Cell. Biol.* 27: 2572-2581.

Nilsen H and Krokan HE (2001). Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis*, July 1, 22(7): 987-998.

Martin SG, Laroche T, Suka N, Grunstein M & Gasser SM (1999). Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* 97, 621-633.

McNeill H, Knebel A, Arthur JS, Cuenda A, Cohen P (2004). A novel UBA and UBX domain protein that binds polyubiquitin and VCP and is a substrate for SAPKs. *Biochem J.* Dec 1;384(Pt 2):391-400.

Melo J and Toczyski D, (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 237-45.

Mihaylova, R. S. Bindra, J. Yuan, D. Campisi, L. Narayanan, R. Jensen, F. Giordano VT, Johnson RT, Rockwell S and Glazer PM (2003). Decreased Expression of the DNA Mismatch Repair Gene Mlh1 under Hypoxic Stress in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.*, May 1, 23(9): 3265 – 3273.

Mills D, Sinclair DA and Guarente L (1999). MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double strand breaks. *Cell* 97, 609-620.

Mitchell DL, Hartman PS (1990). The regulation of DNA repair during development. *Bioessay* 12:74-79.

Moore DH, Michael H, Tritt R, Parson SH and Kelly MR (2000). Alterations in the expression of the DNA repair/redox enzyme APE7ref-1 in epithelial ovarian cancers. *Clinical Res* 6(2): 602-609.

Murray JT, Campbell DG, Morrice N, Auld GC, Shpiro N, Marquez R, Peggie M, Bain J, Bloomberg GB, Grahammer F, Lang F, Wulff P, Kuhl D, Cohen P (2004). Exploitation of KESTREL to identify N-myc downstream-regulated gene family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochem J.* Vol 384 pp477-488.

O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet.* 33: 497-501.

O'Neill T, Giarratani L, Chen P, Lyer L, Lee CH, Bobiak M, Kanai F, Zhou BB, H. Chung J and Rathbun GA (2002). Determination of Substrate Motifs for Human Chk1 and hCds1/Chk2 by the Oriented Peptide Library Approach. *J. Biol. Chem.*, May 3, 277(18): 16102-16115.

Peng C, Knebel A, Morrice N, Li XJ, Barringer K, Li J, Jakes S, Werneburg B and Wang L (2006). Pim Kinase Substrate Identification and Specificity. *Journal of Biochemistry* 141:353-362.

Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS and Piwnica-Worms H (1997). Mitotic and G2checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501-1505.

Puc J, Keniry M, Li HS, Pandita TK, Choudhury AD, Memeo L, Mansukhani M, Murty VV, Gaciong Z, Meek SE, Piwnica-Worms H, Hibshoosh H, Parsons R (2005). Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell*. Feb;7(2):193-204.

Rhind N and Russell P (2000). Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways. *J Cell Sci*.113: 3889-3896.

Sancar A, Lindsey-Boltz L, Unsal-Kacmaz K, and Linn S, (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* 73: 39-85.

Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H and Elledge SJ (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, 277, 1497-1501.

Scharer OD and Jiricny J (2001). Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *BioEssays*, 23:, 270–281.

Seeberg E, Eide L, Bjoras M, (1995). The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci*. 20: 391-397.

Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y and Prives C (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 2000 14: 289-300.

Shiromizu T, Goto H, Tomono Y, Bartek J, Totsukawa G, Inoko A, Nakanishi M, Matsumura F, Inagaki M (2006). Regulation of mitotic function of Chk1 through phosphorylation at novel sites by cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1). *Genes Cells.* May;11(5):477-85.

Shimuta K, Nakajo N, Uto K, Hayano Y, Okazaki K and Sagata N (2002). Chk1 is activated transiently and targets Cdc25A for degradation at the *Xenopus* midblastula transition. *EMBO J.* 2002 July 15; 21(14): 3694–3703.

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531(1-2):231-251.

Smits VA, Reaper PM, Jackson SP (2006). Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr Biol.* Jan 24;16(2):150-9.

Sohn TJ, Kim NK, An HJ, Ko JJ, Hahn TR, Oh D, et al (1998). Gene amplification and expression of the DNA repair enzyme, N-methylpurine- DNA glycosylase(MPG) in HPV-infected cervical neoplasias. *Anticancer Res* 21:2405-2411.

Stucki M and Jackson SP (2004). MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair* 3:953-957.

Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai, Shinohara A and Takeda S (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 17:5497–5508.

Takai H, Tominaga K, Motoyama N, Minamishima YA, Nagahama H, Tsukiyama T, Ikeda K, Nakayama K, Nakanishi M, Nakayama K. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in *Chk1'* mice. *Genes & Development* 14(12), 1439-47.

Thomas R. Polte and Steven K. Hanks (1995). Interaction Between Focal Adhesion Kinase and Crk-Associated Tyrosine Kinase Substrate p130Cas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 92, No. 23, pp. 10678-10682.

Tibbetts RS, Abraham RT (2000). PI3K-related kinases-roles in cell-cycle regulation and DNA damage responses. In: *Signaling networks and cell cycle control: the molecular basis of cancer and other diseases*. Bethesda (MD): Humana Press; p. 267–301.

Trujillo KM, Yuan SSF, Lee E, and Sung P, (1998). Nuclease Activities in a Complex of Human Recombination and DNA Repair Factors Rad50, Mre11, and p95*. *J Biol Chem*, Vol. 273, Issue 34, 21447-21450.

Uto K, Inoue D, Shimuta K, Nakajo N, Sagata N (2004). Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism. *The EMBO Journal* 23, 3386-3396.

Voet & Voet (1994). *Biochemistry*. Wiley-VCH.

Walworth, NC, (2000). Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Curr. Opinion in Cell Biology* 12: 697-704.

Wood RD (1997). Nucleotide Excision Repair in Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 272, No. 38, Issue of September 19, pp. 23465-23468.

Wu X, Ranganathan V, Weisman DS, Heine WF, Ciccone DN, O'Neill TB, Crick KE, Pierce KA, Lane WS, Rathbun G, Livingston DM, Weaver DT (2000). ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response. *Nature* 405, 477-482.

Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, Zhang H (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA damaging agents. *J Biol Chem.* 278 (24), 21767-73.

Xu Y & Baltimore D (1996). Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev.* 10, 2401-2410.

Xu Y, Moore DH, Brosbears J, Liu I, Wilson TM and Kelley MR (1997). The apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/ref-1) DNA repair enzyme is elevated in premalignant and malignant cervical cancer. *Anticancer Res* 17(5B): 3713-3719.

Yang X, Hubbard EJ, Carlson M, (1992). A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science*, Vol. 257 no.5070, pp. 680-682.

Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 30:285-89.

Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H (2002). Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14795-14800.

Zhao S, Weng YC, Yuan SS, Lin YT, Hsu HC, Lin SC, Gerbino E, Song MH, Zdzienicka MZ, Gatti RA, Shay JW, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY (2000). Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products. *Nature* 405, 473-477.

Zhou BB, Elledge SJ, (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, Nov 23;408 (6811): 433-9.

Zhao H and Piwnica-Worms H (2001). ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4129-4139.

Zhou BB, Sausville EA (2003). Drug discovery targeting Chk1 and Chk2 kinases. *Progress in Cell Cycle Research* .5, 413-421.