

Regulation der BOB.1/OBF.1-Expression
und
der BOB.1/OBF.1-Proteinstabilität

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Jannic Böhm
aus
Saarbrücken

Würzburg 2001

Eingereicht am: 17.07.2001

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Werner Goebel

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wirth

Gutachter: Prof. Dr. Juergen Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Zusammenfassung

Der transkriptionelle Koaktivator BOB.1/OBF.1 spielt eine wichtige Rolle in der oktamer-abhängigen Transkription in B-Lymphozyten. Mäuse, denen dieser Koaktivator fehlt, zeigen verschiedene Defekte in der B-Zellentwicklung. Besonders auffällig ist hierbei das völlige Fehlen der Keimzentren. Übereinstimmend mit diesem Phänotyp zeigten B-Zellen des Keimzentrums eine stark erhöhte BOB.1/OBF.1-Expression im Vergleich zu ruhenden B-Zellen. Im Gegensatz zu primären B-Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien zeigen transformierte korrespondierende B-Zellen keine Regulation der BOB.1/OBF.1-Expression. T-Zellen exprimieren im Gegensatz dazu BOB.1/OBF.1 erst nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

Um die unterschiedliche Regulation in B-Zellen versus T-Zellen zu untersuchen wurde der BOB.1/OBF.1-Promotor kloniert. Die Analyse der Promotor-Sequenz ergab Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CREB, NF-AT und ein SRY-Motiv. In Transfektionsstudien konnte eine deutliche Zellspezifität des Promotors gezeigt werden. Die erwartete induzierbare Aktivierung in T-Zellen war hingegen nur schwach.

Die Analyse der BOB.1/OBF.1-Regulation in B-Zellen des Keimzentrums ergab, daß die verstärkte BOB.1/OBF.1-Expression nur partiell auf eine erhöhte Expression des BOB.1/OBF.1-Transkriptes zurück zu führen ist. Vielmehr zeigte sich eine deutliche Regulation des BOB.1/OBF.1-Proteins. In einem "yeast-two hybrid screen" mit der amino-terminalen Domäne von BOB.1/OBF.1 als "bait" (Köder) konnten die beiden Proteine SIAH1 und SIAH2 als Interaktionspartner identifiziert werden. Eine beschriebene Funktion von SIAH1 und SIAH2 liegt in der Regulation der Proteinstabilität ihrer Interaktionspartner. In Ko-Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, daß SIAH1 die BOB.1/OBF.1-Proteinstabilität vermindert, ohne die transkriptionelle Expression zu beeinflussen. Die Inhibition des Proteasoms führt hierbei zu einer stark verminderten BOB.1/OBF.1-Degradation. Abschließend konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung des B-Zellrezeptors zu einer Degradation von BOB.1/OBF.1 durch SIAH1 führt und folglich die transkriptionelle Aktivierung BOB.1/OBF.1-abhängiger Reporterkonstrukte vermindert wird.

In einem zweiten "yeast-two hybrid screen" mit der carboxy-terminalen Domäne von BOB.1/OBF.1 als "bait", konnten die Interaktionspartner ABP 280 und Mcm7 identifiziert werden. Besonders die Rolle von Mcm7 in der Transkription könnte neue Aufschlüsse über die Wirkungsweise des transkriptionellen Aktivators BOB.1/OBF.1 geben.

Summary

The BOB.1/OBF.1 coactivator is critically involved in mediating octamer-dependent transcriptional activity in B lymphocytes. Mice lacking this coactivator show various defects in B cell development most notably they completely lack germinal centers. Consistent with this phenotype, BOB.1/OBF.1 levels are massively upregulated in germinal center B cells as compared to resting B cells. In contrast to primary B cells, all transformed B cell lines express BOB.1/OBF.1 in comparable amounts. In T cells, BOB.1/OBF.1 expression can be induced by stimulation with PMA and ionomycin.

To analyse the different regulation in B cells versus T cells, I cloned the BOB.1/OBF.1 promoter. Analyses of the promoter sequence showed binding sites for the transcription factors CREB, NF-AT and SRY/SOX-protein. Transfection experiments revealed a clear cell type specificity of the promoter. However the promoter was only poorly inducible in stimulated T-cells.

I have addressed the mechanism of BOB.1/OBF.1 upregulation in germinal center B cells and found that only a minor part of this regulation can be attributed to increased levels of BOB.1/OBF.1-specific mRNA. Apparently, BOB.1/OBF.1 is also regulated at the protein level. In support of this suggestion I have been able to identify two related BOB.1/OBF.1 interacting proteins, SIAH1 and SIAH2, in a yeast two-hybrid screen using the amino-terminal domain as "bait". SIAH1 and SIAH2 are known regulators of protein stability. Cotransfection experiments revealed that coexpression of SIAH results in a destabilisation of BOB.1/OBF.1 protein without affecting mRNA levels. Furthermore, proteasome inhibitors block the degradation of BOB.1/OBF.1 protein. Finally B cell receptor cross-linking also resulted in the degradation of BOB.1/OBF.1 via SIAH1 and consequently reduced transcriptional activation of BOB.1/OBF.1-dependent reporters.

Using the carboxy-terminal domain of BOB.1/OBF.1 as "bait", I identified in a second yeast-two hybrid screen the proteins ABP 280 and Mcm7 as potential interaction partners. Especially the role of Mcm7 in transcription could give new insights as to how BOB.1/OBF.1 is able to function as a transcriptional activator.

Veröffentlichung:

Boehm, J., He, Y., Greiner, A., Staudt, L., and Wirth, T. (2001). Regulation of BOB.1/OBF.1 stability by SIAH, EMBO J. (im Druck)

Danksagung

Prof. Dr. Thomas Wirth gilt mein Dank für die interessante Aufgabenstellung und die gute Betreuung. Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Kreft möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Allen Mitgliedern des Labors Wirth danke ich für die freundschaftliche und kooperative Zusammenarbeit als auch für die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft. Den Mitgliedern des MSZ gilt mein Dank für eine schöne Zeit innerhalb und außerhalb der Institutsmauern. Kerstin möchte ich für das Korrekturlesen der Arbeit danken. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die unermüdliche Unterstützung in all den Jahren.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Die B-Zelldifferenzierung.....	2
1.2. Die Rolle von Transkriptionsfaktoren in der B-Zellentwicklung.....	4
1.3. Das Oktamermotiv.....	8
1.4. Die Transkriptionsfaktoren Oct1 und Oct2.....	9
1.5. Der B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor BOB.1/OBF.1.....	13
1.6. Der Phänotyp BOB.1/OBF.1-defizienter Mäuse.....	14
1.7. Die Regulation der Proteinstabilität durch Ubiquitylierung.....	16
1.8. Ziele und Motivation der Arbeit.....	19
2. ERGEBNISSE	22
2.1. Analyse des BOB.1/OBF.1-Promotors.....	22
2.1.1. B- und T-Zellen nutzen denselben transkriptionellen Startpunkt im BOB.1/OBF.1-Promotor.....	23
2.1.2. Der klonierte BOB.1/OBF.1-Promotor zeigt eine Zellspezifität für B-Zellen aber keine Induzierbarkeit in T-Zellen.....	26
2.2. Interaktionspartner von BOB.1/OBF.1.....	31
2.2.1. Regulation von BOB.1/OBF.1 auf Protein-Niveau.....	31
2.2.2. Potentielle Interaktionspartner von BOB.1/OBF.1.....	34
2.2.3. BOB.1/OBF.1 interagiert mit SIAH1.....	39
2.2.4. Regulation der BOB.1/OBF.1-Proteinstabilität durch SIAH1.....	44
2.2.5. Die Aktivierung des B-Zellrezeptors führt zur BOB.1/OBF.1-Proteindegradation durch SIAH1.....	51
3. DISKUSSION	63
3.1. Der BOB.1/OBF.1-Promotor.....	63
3.1.1. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im BOB.1/OBF.1-Promotor.....	63
3.1.2. Potentielle Regulationsmechanismen im BOB.1/OBF.1-Promotor die zu einer Zellspezifität führen.....	65
3.1.3. Regulationsmechanismen die eine Induzierbarkeit des BOB.1/OBF.1-Promotors in T-Zellen erklären können.....	68
3.2. SIAH1 ist ein Interaktionspartner von BOB.1/OBF.1.....	71
3.2.1. Regulation von BOB.1/OBF.1 in primären Zellen.....	71
3.2.2. BOB.1/OBF.1 interagiert mit SIAH1.....	72
3.2.3. Degradation von BOB.1/OBF.1 durch SIAH1.....	73
3.2.4. Regulation der BOB.1/OBF.1-Degradation in B-Zellen.....	74

3.2.5. Die Rolle der Serine 184, 188 und 189 in BOB.1/OBF.1.....	77
3.2.6. BOB.1/OBF.1 und Bcl6	79
3.3. Interaktionspartner der BOB.1/OBF.1 carboxy-terminalen Domäne	80
3.3.1. Die potentielle Interaktion zwischen BOB.1/OBF.1 und ABP 280.....	81
3.3.2. Die potentielle Interaktion zwischen BOB.1/OBF.1 und MCM7/CDC47	83
4. METHODEN UND MATERIALIEN	85
4.1. Standardmethoden.....	85
4.1.1. Präzipitation von Nukleinsäuren.....	85
4.1.2. Phenol/Chloroform-Extraktion.....	85
4.1.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	85
4.1.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	85
4.1.5. Gelelektrophoresen.....	85
4.2. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	86
4.2.1. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	86
4.2.2. Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren.....	86
4.2.3. Die Klenow-Reaktion.....	86
4.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	86
4.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren	87
4.2.6. Transformation der Ligationsansätze.....	87
4.3. Isolation von DNA.....	87
4.3.1. Mini-Extraktion von Plasmid-DNA.....	87
4.3.2. Maxi-Extraktion von Plasmid-DNA	88
4.3.3. Präparation von genomischer DNA	88
4.4. Isolation von RNA	89
4.4.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgeweben und Gewebekulturzellen	89
4.4.2. Präparation von Gesamt-RNA aus primären Zellen für LightCycler.....	89
4.5. Hybridisierung von Nukleinsäuren.....	89
4.5.1. Koloniehybridisierung	89
4.5.2. Southern-Blot Analyse.....	90
4.5.3. Northern-Blot Analyse.....	90
4.5.4. Radioaktive Markierung von DNA-Proben.....	90
4.5.5. Aufreinigung der radioaktiv markierten DNA-Proben	90
4.6. Sequenzierung von DNA	91
4.7. "primer extension"	91
4.7.1. Radioaktive Primermarkierung	91
4.7.2. "primer extension"	91
4.8. LightCycler PCR.....	91

4.8.1. Isolation der RNA.....	91
4.8.2. Reverse Transkription.....	91
4.8.3. LightCycler PCR	92
4.8.4. Auswertungsmethode.....	92
4.9. Herstellung von Proteinextrakten	94
4.9.1. Proteinextrakte aus primären Zellen.....	94
4.9.2. Proteinextrakte aus transformierten Zelllinien.....	94
4.10. Immunoblot (Western-Blot Analyse).....	94
4.11. Expression und Aufreinigung rekombinanter Protein	95
4.11.1. Glutathion-S-Transferase (GST) markierte Proteine.....	95
4.11.2. In vitro Transkription und Translation.....	95
4.12. "pull-down assay".....	95
4.13. "yeast-two hybrid screen"	96
4.13.1. Allgemeines Arbeiten mit Hefen.....	96
4.13.2. Amplifikation der cDNA-Bibliothek	96
4.13.3. Hefe-Transformation.....	96
4.13.4. β -Galactosidase-Test.....	97
4.13.5. Plasmid-Preparation aus Hefen.....	97
4.14. Allgemeine Zellkulturtechniken.....	97
4.14.1. Zentrifugation von Zellen.....	97
4.14.2. Bestimmung der Zellzahl.....	97
4.14.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen	98
4.15. Kultivieren von Zelllinien.....	98
4.15.1. Kultivieren von transformierten Zelllinien	98
4.15.2. Kultivieren von primären Thymozyten.....	98
4.16. Transfektionen von Zelllinien	98
4.16.1. DEAE-Dextran-Transfektion von S194-Plasmazytoma, Jurkat T- und Ramos B-Zellen.....	98
4.16.2. Kalziumphosphat-Transfektion von NIH/3T3	99
4.16.3. Elektroporation von NIH/3T3-Zellen	99
4.17. Bestimmung von Enzymaktivitäten	100
4.17.1. Messung der β -Galaktosidaseaktivität.....	100
4.17.2. Messung der Luziferaseaktivität	100
4.18. Immunfluoreszenz Analysen.....	100
4.19. Messung der Protein-Halbwertszeit.....	101
4.20. Allgemein verwendete Materialien.....	101
4.20.1. Chemikalien	101
4.20.2. Puffer und Lösungen.....	102

4.20.3. Medium für Bakterien-, Hefe- und Zellkultur	103
4.20.4. Reagenzien und Antikörper	104
4.20.5. Enzyme.....	105
4.20.6. Größenstandards.....	105
4.20.7. Gebrauchsfertige Kits.....	105
4.20.8. Primer	106
4.20.9. Vektoren und Plasmide.....	106
4.20.10. Biologische Materialienf.....	107
4.20.11. Verbrauchsmaterialien	107
4.20.12. Membranen und Filter.....	108
4.20.13. Geräte	108
4.20.14. Datenverarbeitung.....	109
5. ABKÜRZUNGEN.....	110
6. LITERATUR.....	111
7. LEBENSLAUF	126
8. ERKLÄRUNG.....	127

1. Einleitung

Im Laufe der Evolution kam es zur Entstehung von komplexen vielzelligen Organismen, deren Charakteristikum u.a. die Ausbildung von spezialisierten Zellen ist. Ein Beispiel für eine derartige Zellspezialisierung stellen die Zellen des Blutes mit ihren verschiedenen Aufgaben dar.

In der Hämatopoese entwickeln sich die verschiedenen Zellen des Blutes aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle. Diese Stammzellen sind pluripotent und sich selbst erneuernd. In der pränatalen Entwicklung sind die hämatopoetischen Stammzellen zuerst im Dottersack (Maus: Tag 7 postcoitum) zu finden. Neben dem Dottersack zeigen aber auch die Aorta, die Gonadenanlagen und die Region des Mesonephros (kurz AGM) hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. In der weiteren Entwicklung sind sie dann in der fötalen Leber (Maus: Tag 10-11 postcoitum) und im adulten Tier schließlich im Knochenmark zu finden (zusammengefasst in Dzierzak and Medvinsky, 1995). Erste Einblicke in die molekularen Differenzierungsmechanismen wurden mit Hilfe natürlicher Mausmutanten (wie z.B. c-kit oder c-kit-Ligand) gewonnen (Russell, 1979). Später konnten mittels gezielter Gendeletionen oder Genmutationen in Mäusen die Einflüsse von Rezeptoren, Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren weiter aufgeklärt werden. Hierbei stellte sich heraus, daß an der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen maßgeblich eine entwicklungspezifische Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren beteiligt ist.

Eine in der Vergangenheit besonders gut untersuchte hämatopoetische Zellpopulation sind die B-Zellen. B-Zellen zeigen eine sehr koordinierte Entwicklung, an deren Ende vereinfacht dargestellt zwei Zelltypen stehen: Plasmazellen und Gedächtniszellen. Plasmazellen zeichnen sich durch die Produktion hochaffiner Antikörper aus, wohingegen Gedächtniszellen, wie der Name bereits impliziert, einen Teil des sogenannten immunologischen Gedächtnisses darstellen. Die verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung, von der Stammzelle zu den beiden terminal differenzierten Zellpopulationen, kann sowohl mit Hilfe der Expression verschiedener Oberflächenmarker bzw. funktioneller Gene, als auch über den Rekombinationsstatus der schweren und leichten Kette der Immunglobulingene nachvollzogen werden (Hardy et al., 1996; Osmond et

al., 1998). Aufgrund dieser spezifischen Charakterisierbarkeit der verschiedenen Zellpopulationen stellt die B-Zellentwicklung ein gutes Modellsystem für die eukaryontische Differenzierung von der Stammzelle zur spezialisierten reifen Zelle dar.

1.1. Die B-Zelldifferenzierung

Der Verlauf der B-Zelldifferenzierung (Abbildung 1A) kann anhand der Rekombination und Expression der Immunglobuline dargestellt werden. In den Anfangsstadien ist diese Entwicklung noch Antigen-unabhängig. Ausgehend von der pluripotenten Stammzelle entwickelt sich eine Vorläuferzelle, die proB-Zelle, in welcher die Immunglobulingene noch in der Keimbahnkonfiguration vorliegen (Hardy et al., 1996; Osmond et al., 1998). Unter der Keimbahnkonfiguration versteht man, daß die Immunglobulingene noch nicht rearrangiert sind, d.h. die V- („variable“), D- („diversity“; welche nur in der schweren Kette vorliegen) und die J-Segmente („joining“) sind voneinander getrennt. Diese proB-Zellen differenzieren dann zu präB-Zellen. Hierbei unterscheidet man zwei aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien: präBI- und präBII-Zellen. PräBI-Zellen zeigen eine partielle Rekombination der D- und J-Segmente der schweren Kette. Im Gegensatz dazu haben die präBII-Zellen die schweren (große präBII-Zellen), bzw. zusätzlich noch die leichten (kleine präBII-Zellen) Immunglobulingene komplett rearrangiert. PräBII-Zellen exprimieren zwar die komplett rearrangierte schwere Immunglobulinkette (μ -Kette), haben jedoch noch kein membranständiges IgM. Der präB-Zellrezeptor setzt sich aus der μ -Kette und den Ersatz-Leichten-Ketten VpreB und $\lambda 5$ zusammen. Über Disulfidbrücken erfolgt eine Assoziation mit CD79a/Ig α und CD79b/Ig β (Benschop and Cambier, 1999). Die Funktion des präB-Zellrezeptors liegt in der alleinigen Expression nur eines Allels der schweren Kette („allelic exclusion“) und in der Regulation des Fortgangs der frühen B-Zellentwicklung (Hardy et al., 1996; Osmond et al., 1998; ten Boekel et al., 1998). Den nächsten Schritt in der Lymphopoese stellt die Expression von IgM, bestehend aus den rearrangierten und exprimierten leichten und schweren

Einleitung

Ketten der Immunglobuline, auf der Oberfläche dar. Dieser Zelltyp wird als unreife B-Zelle bezeichnet, da er sich nach einer Antigenstimulation nicht vermehrt oder differenziert. Die unreifen B-Zellen wandern in die peripheren lymphatischen Organe wo sie sich zu reifen B-Zellen entwickeln. Reife B-Zellen koexprimieren die μ - und δ -schweren Ketten in Kombination mit der ursprünglichen κ - oder λ -leichten Kette und produzieren somit Membran-IgM und -IgD. Ein Teil dieser reifen B-Zellen wandert ins Knochenmark zurück und wird als rezirkulierende reife B-Zellen bezeichnet. Der periphere Pool von B-Zellen beinhaltet neben den bisher beschriebenen konventionellen B-Zellen noch B1-Zellen, die jedoch mengenmäßig in Milz und Lymphknoten den konventionellen B-Zellen unterlegen sind. B1-Zellen exprimieren konstitutiv CD5, CD43 und MHCII. Über ihre Herkunft und Funktion gibt es verschiedene Hypothesen (Haughton et al., 1993; Herzenberg and Kantor, 1993; Stall et al., 1996).

Reife, ruhende B-Zellen können infolge eines T-Zell-abhängigen Antigenkontaktes aktiviert werden. Hierbei kommt es zu einer Interaktion der B-Zelle mit T-Helfer-Zellen. Die aktivierte B-Zelle kann zu einer kurzlebigen Plasmazelle differenzieren, welche niedrigaffine IgM oder IgD Antikörper sezerniert oder unter Beteiligung von T-Helfer-Zellen und dendritischen Zellen Keimzentren ausbilden (Baumgarth, 2000). Im Keimzentrum finden drei wesentliche Prozesse statt. Neben der erhöhten Proliferation erfolgt eine sogenannte somatische Hypermutation in den Ig-V-Genen. Durch die Interaktion mit Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen erfolgt danach eine Affinitätsreifung derjenigen hypermutierten Klone, die eine hohe Antigenaffinität aufweisen. Das Ergebnis der Keimzentrumsreaktion sind zwei verschiedene B-Zell Subpopulationen. Die langlebigen Plasmazellen sezernieren hochaffine Antikörper, wohingegen die Gedächtniszellen das immunologische Gedächtnis darstellen, d.h. nach erneutem Kontakt mit demselben Antigen erfolgt eine verstärkte sekundäre Antikörperantwort (Hess et al., 1998; Przylepa et al., 1998; Tarlinton, 1998).

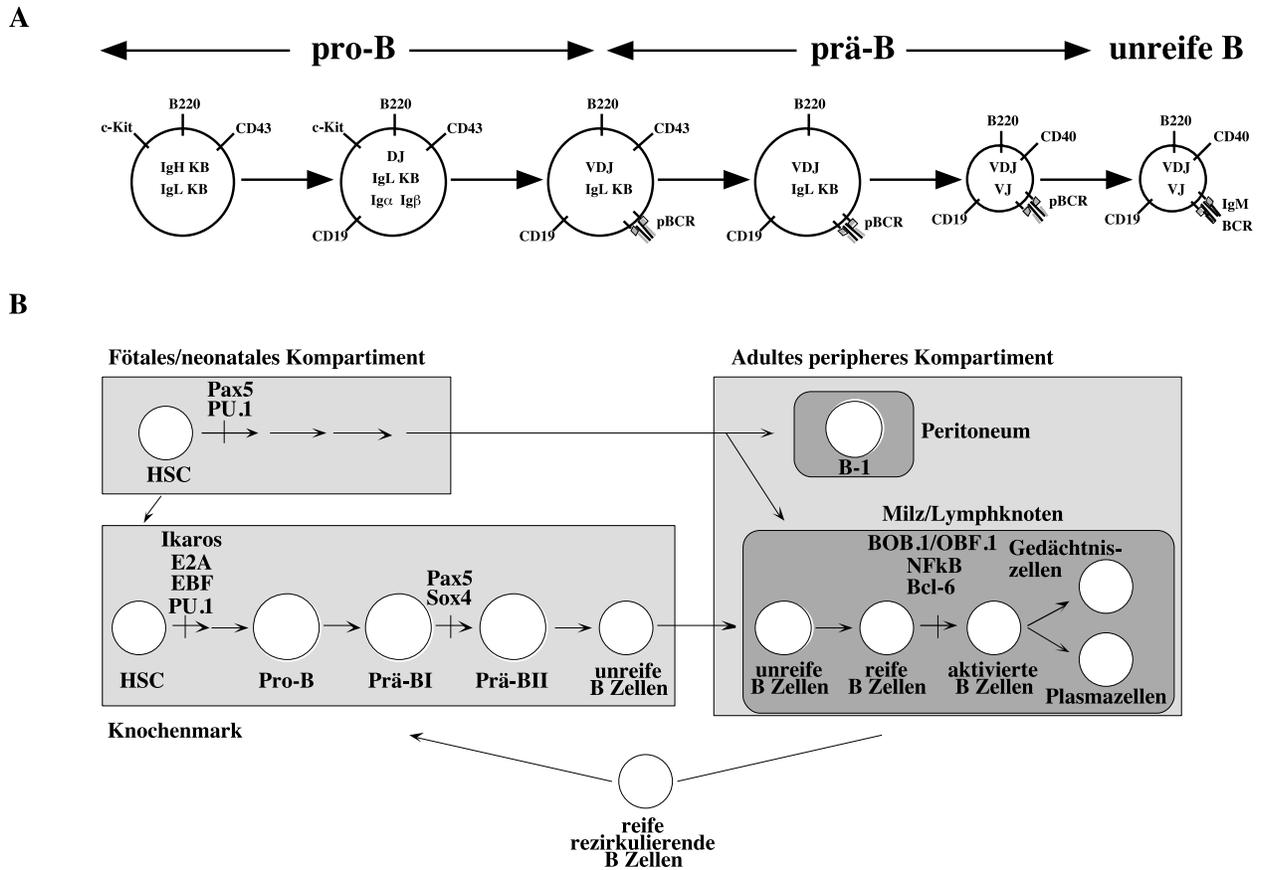


Abbildung 1: Modell der B-Lymphopoese und Expressionsmuster von Markergenen. (A) Die verschiedenen Stadien der Antigen-unabhängigen B-Zellentwicklung anhand der Expression verschiedener Oberflächenmarker bzw. den Rearrangements der Immunglobulingene. KB: Keimbahnkonfiguration; pBCR:prä-B-Zellrezeptor; BCR: B-Zellrezeptor (nach Henderson and Calame, 1998). (B) Schematische Abbildung der Antigen-unabhängigen B-Zell-Entwicklung. Die Defizienz verschiedener Transkriptionsfaktoren und deren Block in der B-Zellentwicklung sind eingezeichnet (detaillierte Beschreibung siehe Text; nach Matthias, 1998).

1.2. Die Rolle von Transkriptionsfaktoren in der B-Zellentwicklung

Die koordinierte Entwicklung von B-Zellen setzt eine zeitlich genau definierte Expression von Genen voraus. Die Kontrolle der Genexpression erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Hierbei sind Rekombinationsereignisse, Transkription, Regulation von RNA-Stabilität, Translation und posttranslationale Modifikationen zu nennen. Mit am besten untersucht, und zugleich ein zentraler Mechanismus in der Hämatopoese, ist hierbei die Regulation der Transkription durch die verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Abbildung 1B und 2).

Einleitung

Am Anfang der Hämatopoese, ausgehend von der pluripotenten Stammzelle, konnte man feststellen, daß die Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren häufig mit der Festlegung auf einen bestimmten späteren Zelltyp korreliert. Der Transkriptionsfaktor GATA-1 ist zum Beispiel notwendig, um eine Programmierung der undifferenzierten Vorläuferzelle in Richtung erythroide Differenzierung zu erreichen (Weiss et al., 1994; Zon et al., 1991). Dieser Faktor hat hierbei jedoch nicht die Potenz ein "master regulator" wie MyoD in der Myogenese zu sein (Weintraub, 1993).

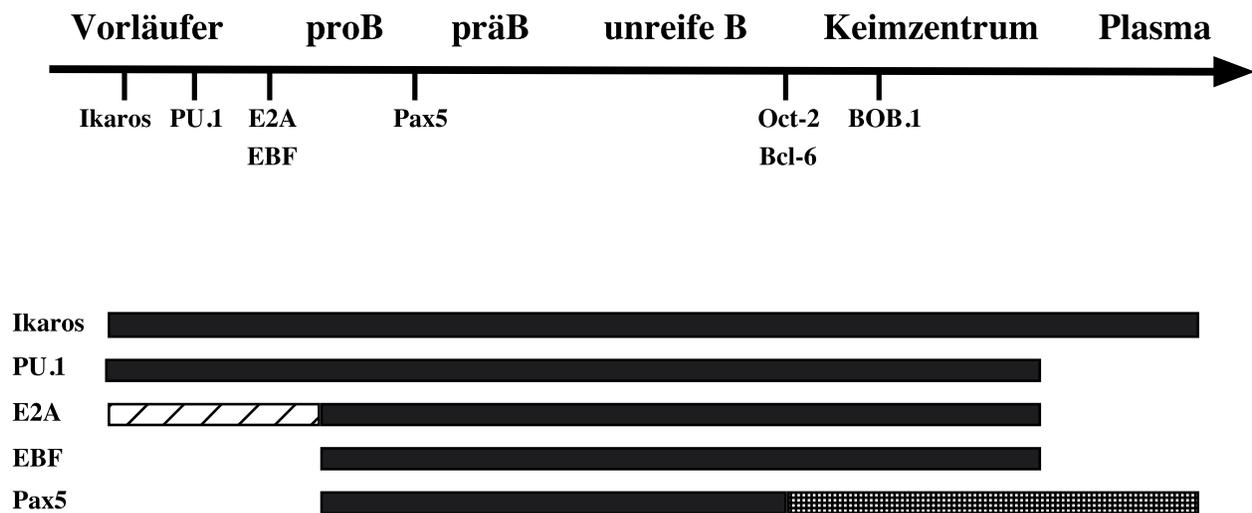


Abbildung 2: Transkriptionsfaktoren der B-Zellentwicklung. Die verschiedenen Stadien der B-Zellentwicklung sind oben quer dargestellt. Die Zeitpunkte, an denen bestimmte Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung notwendig sind, werden durch Längslinien dargestellt. Die Querbalken zeigen das Expressionsmuster der verschiedenen Faktoren. Die dunklen Balken zeigen die Expression der Faktoren. Die karierten Balkenteile zeigen eine verminderte Expression und die gestreiften Balkenteile beziehen sich auf eine angenommene Expression die jedoch nicht experimentell gezeigt wurde. Alle Expressionsprofile beziehen sich auf exprimierte mRNA (nach Henderson and Calame, 1998).

In der Lymphopoese unterscheidet man die Entwicklung der B-Zellen von denen der T-Zellen. Beiden Zelltypen liegt wahrscheinlich eine gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle, gebildet von der Stammzelle, zugrunde. Folgt man einem Modell von Busslinger, Nutt und Rolink so hängt die Entscheidung von der Expression des Notch1 Transkriptionsfaktors ab. Die Expression von Notch1 blockiert die Aktivität des E2A Transkriptionsfaktors, welcher für die Entwicklung von B-Zellen absolut notwendig ist. Dem Modell zufolge entwickeln sich Notch1 exprimierende Zellen zu

Einleitung

T-Zellen, wohingegen Zellen die kein Notch1 Signal erhalten eine ungestörte E2A-Aktivität haben und sich somit zu B-Zellen entwickeln (Busslinger et al., 2000).

E2A gehört zur Familie der „basic helix-loop-helix“ (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Durch alternatives Spleißen entstehen die Genprodukte E47, E12 und E2-5. E2A wird ubiquitär exprimiert, jedoch können sich nur in B-Zellen infolge eines speziellen Phosphorylierungsmusters E47 Homodimere bilden (Sloan et al., 1996). In allen anderen Zelltypen liegt E47 als Heterodimer, zum Beispiel mit dem bereits erwähnten MyoD, vor. E2A-Defizienz führt zu einem spezifischen Block der B-Vorläuferzellen, wodurch die oben genannte Hypothese untermauert wird (Bain et al., 1994; Zhuang et al., 1994).

Der Transkriptionsfaktor PU.1 gehört zur Familie der Ets Proteine und wird in Monozyten, Granulozyten und lymphoiden Zellen exprimiert (Klemsz et al., 1990). PU.1 defiziente Mäuse zeigen einen kompletten Verlust der T- und B-Vorläuferzellen in der fötalen Leber (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994). Viele essentielle Gene der B-Zelldifferenzierung haben Ets-Bindungsstellen in ihren Promotoren, so z.B. die im vorigen Kapitel genannten Ersatz-Leichten-Ketten Vpre-B und $\lambda 5$. Auch RAG-1, eine Komponente des Rekombinase-Komplexes, die für die Rekombination der Immunglobulingene notwendig ist enthält eine solche Bindungsstelle (Fitzsimmons and Hagman, 1996).

EBF (early B-cell factor) wurde infolge seiner Bindung an den Promotor des vorher genannten $Ig\alpha$ -Gens gefunden (Hagman et al., 1993). Fehlt dieser Transkriptionsfaktor so erfolgt ein Block in der Phase der proB-Zellentwicklung. Den Zellen fehlen die DJ-Rearrangements der schweren Kette, die Expression von RAG-1 und RAG-2, sowie von $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ (Lin and Grosschedl, 1995).

Das Ikarosgen kodiert für eine Reihe von Proteinen die durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen (Molnar and Georgopoulos, 1994). Neben Ikaros wurde mit Aiolos noch ein näher verwandter B-Zell-spezifischer Faktor gefunden (Morgan et al., 1997). Die Proteine der Ikarosfamilie bilden Homo- oder Heterodimere, wodurch ihre DNA-Bindungsspezifität und ihre transkriptionelle Aktivität beeinflusst wird (Sun et al., 1996). Ikaros-defizienten Mäusen fehlen fötale Lymphozyten und reife B-Zellen (Wang et al., 1996). Exprimiert man eine dominant negative Version von Ikaros so stellt sich ein sehr früher Block, noch vor dem Stadium der proB-Zelle, in der

Einleitung

B-Zelldifferenzierung ein (Georgopoulos et al., 1994). Zu den Genen die potentiell durch Ikaros reguliert werden, gehören RAG-1, Ig α , Vpre-B und λ 5 (Georgopoulos et al., 1997).

Alle bisher genannten Transkriptionsfaktoren waren für die Entwicklung von der Stammzelle zur proB-Zelle notwendig. Andere Faktoren wie Pax5 (auch BSAP genannt) spielen erst später in der B-Zelldifferenzierung eine Rolle (Abbildung 1 und 2). Pax5 gehört zur Familie der „paired-box homeodomain“ Transkriptionsfaktoren. Defiziente Mäuse haben zwar noch präBI-Zellen aber keine weiteren Differenzierungsstadien mehr (Urbanek et al., 1994). Untersuchungen dieser Pax5-defizienten präBI-Zellen ergaben, daß sie anders als wildtypische Zellen noch die Entwicklungspotenz zu anderen hämatopoetischen Zelllinien haben. Pax5 ist somit ein Faktor, der für die Festlegung auf die B-Zelllinie notwendig ist (Nutt et al., 1999). Als Zielgene für Pax5 wurde neben CD19 noch Ig- α , N-myc, LEF-1 und PD-1 beschrieben (Kozmik et al., 1992; Nutt et al., 1998; Nutt et al., 1997).

Nachdem die unreifen B-Zellen in die peripheren lymphoiden Organe gewandert sind, differenzieren sie zu reifen ruhenden B-Zellen. Nach Antigenkontakt kann es wie oben beschrieben zu einer Ausbildung von Keimzentren und der damit verbundenen terminalen Reifung kommen. Auch hier sind Transkriptionsfaktoren involviert. Bcl6 ist ein Zink-Finger-Protein welches als transkriptioneller Repressor fungiert (Chang et al., 1996; Seyfert et al., 1996). Es wurde kloniert, da es in B-Zell-Lymphomen häufig transloziert vorliegt (Liang et al., 1996). Diese häufige Translokation und die mit ihr verbundene Deregulation von Bcl6 in B-Zell-Lymphomen machten es zu einem Marker für transformierte Zellen, deren Ursprung die B-Zellen des Keimzentrums sind (Allman et al., 1996). Bcl6-defiziente Mäuse haben keine Keimzentren und somit keine Antikörper, die einer Affinitätsreifung unterzogen sind (Dent et al., 1997; Ye et al., 1997). Einen ähnlichen Phänotyp zeigen Mäuse, denen die Faktoren Oct-2 und BOB.1/OBF.1 fehlen. Im folgenden werden diese Faktoren näher beschrieben.

1.3. Das Oktamermotiv

Wie in den vorigen Kapiteln gezeigt, kann die B-Zellentwicklung anhand der Rekombination und Expression der Immunglobulingene verfolgt werden. Die Expression dieser Immunglobuline setzt die Existenz bestimmter B-Zell-spezifischer Faktoren voraus. Um die Rolle von Transkriptionsfaktoren genauer zu untersuchen, wurden die Promotoren der Immunglobulingene untersucht.

Hierbei fand man ein in diesen Promotoren konserviertes Motiv mit der Basenfolge ATGCAAAT - das Oktamer-Motiv (Falkner and Zachau, 1984; Parslow et al., 1984). Desweiteren fand man diese Sequenz in Promotoren anderer B-Zell-spezifischer Gene wie CD79b (Ig β) und CD20 (Hermanson et al., 1989; Thevenin et al., 1993). Neben Promotoren kommt das Oktamer-Motiv aber auch in Immunglobulinen-Enhancerelementen vor (Staudt and Lenardo, 1991). Es zeigte sich, daß das Oktamer-Motiv in einer multimerisierten Form einen starken B-Zell-spezifischen Enhancer darstellen kann (Gerster et al., 1987). Durch in vitro Transkriptionsversuche, in transienten Transfektionen und in transgenen Mäusen konnte die Notwendigkeit und Funktionalität dieses Motivs für die Expression der Immunglobuline gezeigt werden (Annweiler et al., 1992a; Bergman et al., 1984; Dreyfus et al., 1987; Jenuwein and Grosschedl, 1991; LeBowitz et al., 1988; Mason et al., 1985; Mizushima-Sugano and Roeder, 1986; Scheidereit et al., 1987; Wirth et al., 1987). Funktionelle Oktamer-Motive wurden aber auch in T-Zellen beschrieben. So ist die induzierbare Expression von T-Zell-Zytokinen wie IL-2 unter anderem von diesem Motiv abhängig (Durand et al., 1988; Ullman et al., 1991). Für Verwirrung sorgte jedoch die Beschreibung funktioneller Oktamer-Motive in den Promotoren ubiquitär exprimierter Gene wie Histon H2B und den snRNAs U2 und U6 (Carbon et al., 1987; LaBella et al., 1988; Lobo et al., 1990; Sive and Roeder, 1986; Tanaka et al., 1988). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte das Oktamer-Motiv nicht allein für die Transkription lymphoid-spezifischer Gene verantwortlich sein. Statt dessen wurde die Existenz verschiedener Oktamer-Motiv bindender Transkriptionsfaktoren vorgeschlagen, die im Promotor-Kontext unterschiedliche Eigenschaften besitzen sollten und dadurch zu einer differentiellen Genexpression in lymphoiden versus nicht-lymphoiden Zellen führen können (Schaffner, 1989).

1.4. Die Transkriptionsfaktoren Oct1 und Oct2

Die Suche nach DNA bindenden Proteinen, die spezifisch das Oktamer-Motiv erkennen, führte in B-Zellen zur Klonierung und Charakterisierung von zwei Transkriptionsfaktoren. Beide Faktoren wurden mit Hilfe des in Immunglobulin-Promotoren vorkommenden Oktamer-Motivs identifiziert (Singh et al., 1986; Staudt et al., 1986).

Der Transkriptionsfaktor Oct1 wird ubiquitär exprimiert und ist für die Expression ubiquitärer Gene wie Histon H2B verantwortlich (Abbildung 3A und Sturm et al., 1988). Neben der Expression ubiquitär exprimierter Gene, kann Oct1 aber auch die Expression von B-Zell-spezifischen Genen wie z.B. IgM vermitteln (Schubart et al., 2001). Dies geschieht wahrscheinlich im Kontext mit anderen Transkriptionsfaktoren.

Der Transkriptionsfaktor Oct2 wird im Gegensatz zu Oct1 nur in lymphoiden Zellen und einigen Zellen des Zentral-Nervensystems exprimiert. Oct2 bildet infolge alternativen Spleißens eine Familie von Isoformen (Gerster et al., 1987; He et al., 1989; Schreiber et al., 1988; Staudt et al., 1988; Wirth et al., 1991).

Oct1 und Oct2 bildeten zusammen mit den Proteinen Pit-1 und Unc-86 die Namensgeber für eine neue Gruppe von Transkriptionsfaktoren - die Transkriptionsfaktoren der POU-Familie (POU: Pit-1, Oct1/2 und Unc-86; Herr et al., 1988). Alle diese Faktoren besitzen die 150-160 Aminosäuren lange DNA-bindende POU-Domäne. Die POU-Domäne kann in eine amino-terminale 75-80 Aminosäuren lange POU-Spezifische Domäne und eine carboxy-terminale 60 Aminosäuren lange POU-Homeo Domäne unterteilt werden. Die POU-Spezifische und die POU-Homeo Domäne enthalten sogenannte "Helix-Turn-Helix"-Motive, die für die DNA-Bindung verantwortlich sind (Ryan and Rosenfeld, 1997; Sturm and Herr, 1988; Verrijzer et al., 1992). Zwischen den beiden Subdomänen befindet sich eine flexible "Linker"-Region welche es ermöglicht, daß die POU-Domäne die DNA auf beiden Seiten der Doppelhelix kontaktieren kann (Jacobson et al., 1997; Klemm et al., 1994).

Die POU-Proteine werden je nach Aminosäuresequenz der POU-Domäne und der Konservierung der "Linker"-Region in sieben Untergruppen unterteilt. Untersuchungen an verschiedenen

Einleitung

Familienmitgliedern zeigten, daß POU-Proteine sehr häufig eine Schlüsselfunktion in der Regulation von Entwicklungsprozessen haben (zusammengefasst in Ryan and Rosenfeld, 1997). So ist das oben genannte POU-Protein Unc-86 für die neuronale Differenzierung in *C. elegans*, das POU-Protein Pit-1 hingegen für die korrekte Differenzierung von Hypophysengewebe in Säugern notwendig.

Oct1 und Oct2 besitzen beide in ihren amino-terminalen Domänen eine Glutamin-reiche Transaktivierungsdomäne, die in beiden Proteinen dieselbe transkriptionelle Potenz aufweist. Die Spezifität der transkriptionellen Aktivierung liegt jedoch im carboxy-terminalen Bereich. Hier liegen unterschiedliche Transaktivierungsdomänen vor, die auch ein unterschiedliches Aktivierungspotential besitzen. Aufgrund dieser Unterschiede ist nur Oct1 fähig, die Transkription von U2 snRNA zu initiieren, nicht jedoch Oct2 (Tanaka et al., 1992). Eine Oct2-Isoform (Oct2B) ähnelt in seiner carboxy-terminalen Region dem Oct1-Protein und hat in einigen Fällen eine dem Oct1 ähnliche Transaktivierungspotenz (Tanaka et al., 1992). Von entfernteren Enhancerpositionen aus ist in B-Zellen hingegen Oct2 der aktivierende Faktor und nicht Oct1 (Annweiler et al., 1992b).

Durch die Tatsache, daß Oct1 und Oct2 das identische Oktamermotiv erkennen, jedoch unterschiedlich exprimiert werden, entwickelte man die oben genannte Hypothese weiter. Oct1 sollte die Expression von Haushalts-Genen, Oct2 die von B-Zell-spezifischen Genen kontrollieren. Diese Hypothese mußte jedoch in ihrer Einfachheit verworfen werden. Es zeigte sich bei in vitro Transkriptionsversuchen, daß Oct1 und Oct2 dieselbe transkriptionelle Potenz in Kernextrakten von B-Zellen hatten (LeBowitz et al., 1988; Pierani et al., 1990).

Um die Bedeutung von Oct2 für die B-Zell-spezifische Transkription und somit für die B-Zellentwicklung zu untersuchen, wurden Oct2-defiziente Mäuse (Oct2^{-/-}) generiert. Die Oct2^{-/-} Mäuse sterben kurz nach der Geburt aus noch ungeklärter Ursache. Untersuchungen der B-Zellen ergaben jedoch, daß sie über eine normale Anzahl von proB- und präB-Zellen in der fötalen Leber verfügen. Betrachtet man die Population der unreifen B-Zellen, so findet man eine Reduktion der Gesamtmenge um 50% (Corcoran et al., 1993). Trotz dieser Reduktion zeigte sich, daß die

Einleitung

Immunglobuline richtig rearrangiert und exprimiert werden. Um die Oct2-Defizienz in den späteren Stadien der B-Zellentwicklung untersuchen zu können, wurden die lymphoiden Kompartimente von SCID-Mäusen (die keine Lymphozyten haben) mit Oct2^{-/-}-Zellen der fötalen Leber rekonstituiert. Die so entstehenden Mäuse besitzen keine generelle Oct2-Defizienz, sondern nur noch eine lymphoid-spezifische. Hierbei zeigte sich, daß Oct2 infolge einer normalen Immunglobulinexpression dieser Tiere nicht wie ursprünglich vermutet für die Immunglobulinexpression in ruhenden B-Zellen verantwortlich sein kann. Die defizienten B-Zellen reagierten nicht mehr mit Proliferation auf die Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS), was auf einen Block des Zellzyklus in der G1-Phase zurückzuführen ist (Corcoran and Karvelas, 1994). Somit mußte die Hypothese, daß Oct2 für die B-Zell-spezifische Transkription der Immunglobuline verantwortlich ist, verworfen werden.

Aus all diesen Ergebnissen wurde gefolgert, daß ein bis dahin unbekannter zusätzlicher Faktor in B-Zellen existieren muß, welcher der Oktamer-abhängigen Transkription in B-Zellen ihre Spezifität verleiht. Diese Annahme wurde durch Befunde unterstützt, die zeigten, daß die POU-Domäne über die DNA-Bindung hinaus noch für spezifische Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. So kontaktiert sie u.a. das TATA-bindende Protein TBP, das „high mobility group protein 2“ (HMG2) und den viralen Transaktivator VP16 (Walker et al., 1994; Zwilling et al., 1994; Zwilling et al., 1995). Zusätzliche Untersuchungen ergaben, daß ein in B-Zellen vorhandener, jedoch in HeLa-Zellen fehlender Kofaktor für die Oktamer-abhängige Transkription existiert (Luo et al., 1992). Zwar ist Oct2 für die Aktivierung von Oktamer-abhängigen Enhancerelementen absolut notwendig, jedoch reicht seine Existenz in nicht-B-Zellen nicht für eine Transaktivierung aus (Annweiler et al., 1992b; Wirth et al., 1995). Dieser postulierte Kofaktor wurde OCA-B genannt (Oct-coactivator from B-cells).

Einleitung

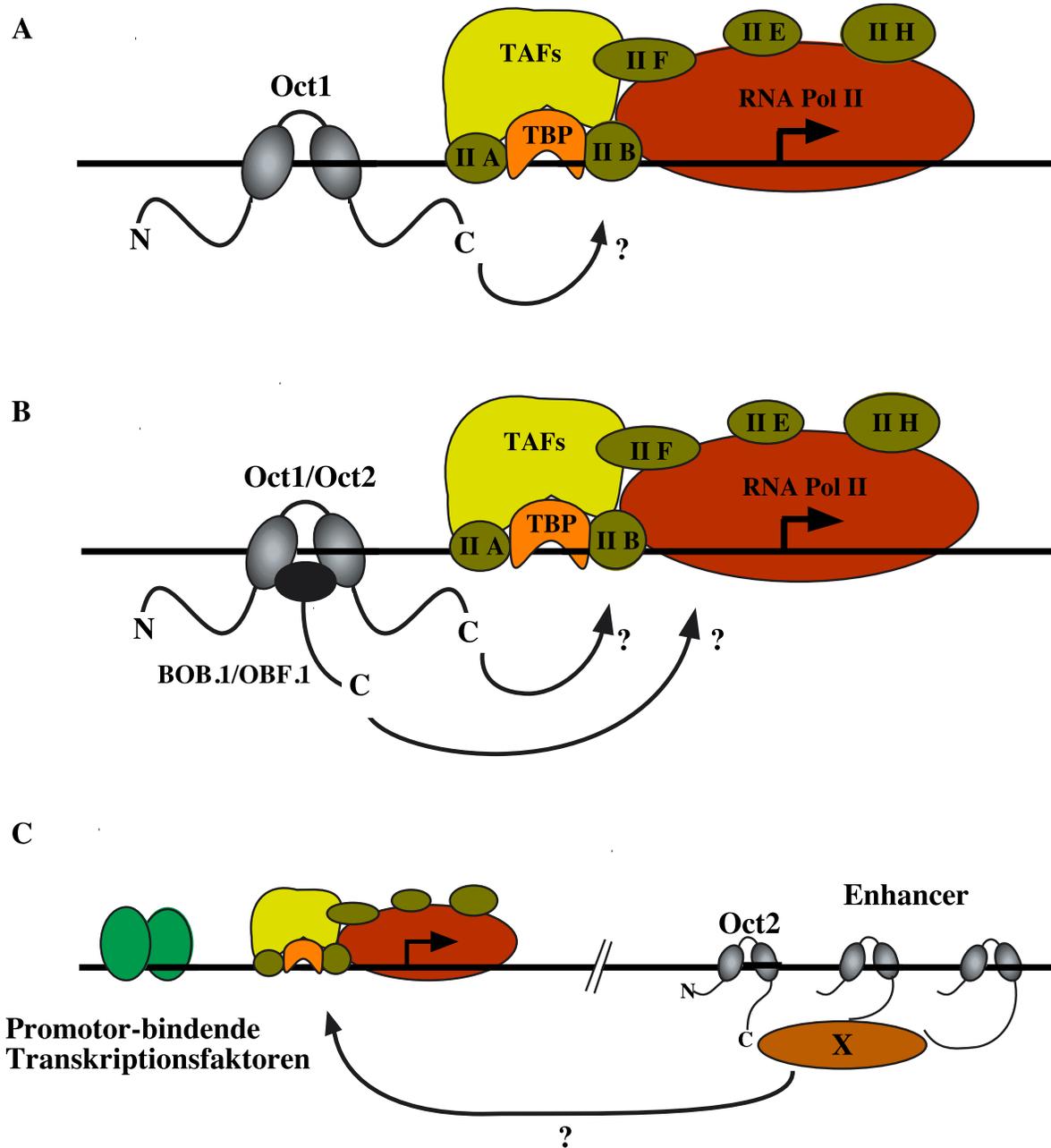


Abbildung 3: Regulation Oktamer-motiv-abhängiger Transkription. (A) Ubiquitär exprimiertes Oct1 vermittelt die Transkription von Haushalts-Genen wie Histon 2B und snRNAs. (B) Promotoren B-Zell-spezifischer Gene werden in Kombination von Oct1 oder Oct2 zusammen mit BOB.1/OBF.1 aktiviert. (C) Die Transaktivierung von Enhancern, die Oktamer-motive enthalten, erfolgt über Oct2 und einen bis dato unbekanntem Kofaktor aus B-Zellen. (nach "Transcription Factors: Normal and Malignant Development of Blood Cells")

1.5. Der B-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor BOB.1/OBF.1

Die cDNA von OCA-B wurde von zwei verschiedenen Gruppen fast gleichzeitig mit Hilfe eines modifizierten „yeast one hybrid screens“ bzw. später von einer dritten Gruppe mittels biochemischer Aufreinigung kloniert. Der Kofaktor OCA-B erhielt auf diese Weise noch zwei weitere Namen: BOB.1 (B-cell Oct-binding protein) und OBF.1 (Oct-binding factor) (Gstaiger et al., 1995; Luo and Roeder, 1995; Strubin et al., 1995). BOB.1/OBF.1 ist ein 256 Aminosäuren langes, Prolin-reiches Protein. Es zeigt bislang keine Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen, jedoch existieren kurze Sequenzen, die eine geringe Homologie zu anderen Transkriptionsfaktoren und -aktivatoren haben (Ford et al., 1998; Gstaiger et al., 1995; Luo and Roeder, 1995).

BOB.1/OBF.1 kann in zwei funktionelle Untereinheiten aufgeteilt werden. Der amino-Terminus interagiert mit den Proteinen Oct1 und Oct2, jedoch nicht mit den Vertretern der anderen Oct-Transkriptionsfaktoren (Pfisterer et al., 1995; Strubin et al., 1995). Die Interaktion findet hierbei mit den beiden POU-Subdomänen statt (Babb et al., 1997; Gstaiger et al., 1996). Zusätzlich erfolgt eine Interaktion mit dem Oktamer-Motiv der DNA (Babb et al., 1997; Cepek et al., 1996; Gstaiger et al., 1996). All diese Experimente sprechen für die Existenz eines ternären Komplexes bestehend aus der DNA mit Oktamer-Motiv, den daran gebundenen Transkriptionsfaktoren Oct1 oder Oct2 und den mit der POU-Domäne und der DNA interagierenden Kofaktor BOB.1/OBF.1 (Abbildung 3B). Hierbei wirkt BOB.1/OBF.1 wie eine molekulare Klammer, welche die POU-Subdomänen auf der DNA zusammenhält (Babb et al., 1997; Sauter and Matthias, 1998). Analysen der Kristallstruktur eines BOB.1/OBF.1 Peptids, welches mit Oct1 an die DNA bindet, zeigte, daß die Aminosäuren 16-38 im Kristall hochgeordnete Positionen einnehmen und für die verschiedenen Interaktionen des amino-Terminus zuständig sind (Chasman et al., 1999).

Der carboxy-Terminus von BOB.1/OBF.1 enthält eine starke transkriptionelle Transaktivierungsdomäne (Gstaiger et al., 1995; Luo and Roeder, 1995; Pfisterer et al., 1995; Strubin et al., 1995). Hier konnte gezeigt werden, daß eine Interaktion sowohl mit Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie wie TBP und TFIIB, als auch mit anderen

Transkriptionsfaktoren wie PC4 vorliegen kann (Luo et al., 1998; Luo and Roeder, 1995; Schubart et al., 1996a).

Die Expression von BOB.1/OBF.1 konnte in allen bisher untersuchten B-Zelllinien gezeigt werden (Gstaiger et al., 1995; Luo and Roeder, 1995; Schubart et al., 1996a; Strubin et al., 1995). Hierbei liegt eine konstitutive Expression vor. Im Gegensatz dazu zeigen T-Zellen eine induzierbare BOB.1/OBF.1-Aktivität. Nach Stimulation von T-Zellen mit Ionomycin in Verbindung mit Phorbol ester kommt es zur Expression von BOB.1/OBF.1 (Sauter and Matthias, 1997; Zwilling et al., 1997). In Transkriptionsexperimenten mit GAL-BOB.1/OBF.1-Fusionsproteinen stellte sich die Phosphorylierung der Serine 184, 188 und 189 als notwendig für die transkriptionelle Aktivität heraus (Zwilling et al., 1997).

Die Entdeckung von BOB.1/OBF.1 ergab eine sinnvolle Erklärung für die oben genannte Expression von Immunglobulinen in B-Zellen von Oct2 defizienten Mäusen. Da BOB.1/OBF.1 mit beiden Oct-Proteinen interagieren kann, scheint es für die Expression der Immunglobuline irrelevant zu sein, ob sich der ternäre Komplex unter der Beteiligung von Oct1 oder Oct2 formiert.

1.6. Der Phänotyp BOB.1/OBF.1-defizienter Mäuse

Drei Arbeitsgruppen haben durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen BOB.1/OBF.1-defiziente Mäuse generiert (Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996a). Wie in Oct2-defizienten Mäusen liegt in BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen kein Block in der frühen B-Zellentwicklung vor. Neuere Untersuchungen der BOB.1/OBF.1-defizienten Mäuse zeigten jedoch einen Defekt in der frühen B-Zellentwicklung. Hierbei ist die Menge an transitionellen B-Zellen (B-Zellen die aus dem Knochenmark emigrieren und in die sekundären lymphatischen Organe wandern) im Knochenmark reduziert (Hess et al., 2001). Neben dieser Zellpopulation waren die späteren Stadien, wie die reifen rezirkulierenden B-Zellen in Knochenmark reduziert. In der Milz fand man eine dreifache Reduktion der reifen B-Zellen (Nielsen et al., 1996;

Schubart et al., 1996a), in den Lymphknoten gar eine vier- bis fünffache (Nielsen et al., 1996). Obwohl BOB.1/OBF.1 sowohl in konventionellen B-Zellen als auch in B1-Zellen exprimiert wird, zeigte die B1-Zellpopulation keinen Phänotyp in den BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen (Nielsen et al., 1996). Die Populationen der anderen hämatopoetischen Zellen, also T-Zellen, myeloide Zellen und Erythrozyten waren normal (Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996a). Die Analysen der Transkription der μ und κ Immunglobuline ergaben keinen Hinweis auf einen Defekt. Die Menge an Serum-IgM war folglich normal (Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996a) bzw. leicht erhöht (Kim et al., 1996). Den deutlichsten Effekt zeigten die BOB.1/OBF.1-defizienten Mäuse jedoch nach Immunisierung mit Antigen. Zwar wurden noch primäre B- und T-Zell-Zonen in den sekundären lymphatischen Organen angelegt, die Ausbildung von sogenannten Keimzentren aber unterblieb. Infolge dessen waren die Serumlevel der sekundären Immunglobulin-Isotypen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA und IgE deutlich reduziert. Es zeigte sich auch, daß die Transkription dieser Immunglobulin-Isotypen per se in BOB.1/OBF.1-defizienten Zellen im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist. Dieses Ergebnis wurde dahingehend interpretiert, daß der 3'-Immunglobulinenhancer nach erfolgter Immunglobulin-Rekombination näher am Promotor lokalisiert und dadurch andere Regulationsmechanismen zum Tragen kommen könnten (Kim et al., 1996). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß mutante Milzzellen nach Stimulation des B-Zellrezeptors eine verringerte Proliferationsantwort aufwiesen (Kim et al., 1996). Um der Fragestellung nachzugehen, ob der BOB.1/OBF.1^{-/-}-Phänotyp ein B-Zell-intrinsischer ist, wurden Transferexperimente durchgeführt. Hierbei wurden Knochenmarkszellen von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen in sublethal bestrahlte Wildtyp-Mäuse injiziert. Der sich entwickelnde Phänotyp war mit dem der BOB.1/OBF.1-defizienten Maus identisch, was einen B-Zell-intrinsischen Entwicklungsdefekt bewies (Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996a). Zusätzlich konnte in Transferexperimenten mit gereinigten T-Zellen gezeigt werden, daß diese keine Defekte aufwiesen (Qin et al., 1998; Schubart et al., 1996a).

Interessanterweise war in Oct2/BOB.1/OBF.1-doppeldefizienten Mäusen ebenfalls die Expression von IgM nicht reduziert. Dieses Ergebnis deutet auf eine neue Rolle von Oct1 in der Transkription der Immunglobuline hin. Da der ubiquitär exprimierte Faktor Oct1 ausreicht um die

Immunglobuline zu exprimieren, müssen zusätzliche B-Zell-spezifische Faktoren eine Rolle spielen. Wie im Falle der BOB.1/OBF.1-Defizienz sind auch hier die sekundären, gewichteten Antikörpermengen reduziert (Schubart et al., 2001).

Verfolgt man die BOB.1/OBF.1-Expression über den Verlauf der B-Zellentwicklung *in vivo*, so zeigen sich in den B-Zellen des Keimzentrums die höchsten Expressionswerte (Greiner et al., 2000; Qin et al., 1998). Desweiteren konnte in ruhenden primären B-Zellen gezeigt werden, daß das BOB.1/OBF.1-Transkript nach erfolgter Stimulation mit LPS oder anti-CD40/IL-4 vermehrt exprimiert wird (Greiner et al., 2000). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den gefundenen Daten aus B-Zelllinien, die keine bzw. eine geringe Regulierbarkeit ihrer konstitutiven BOB.1/OBF.1-Expression aufweisen.

1.7. Die Regulation der Proteinstabilität durch Ubiquitylierung

Einige Transkriptionsfaktoren wie p53 und c-Jun werden neben der transkriptionellen Kontrolle noch über die Proteinstabilität reguliert. Hierbei erfolgt eine Ubiquitylierung der Proteine und ein daran anschließender Abbau über das Proteasom. Die Ubiquitylierung beruht auf der Aktivität von drei verschiedenen Proteinen, dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1), dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (Ubc oder E2) und der Ubiquitin-Ligase (E3). Die E3-Proteine interagieren mit den E2 und mit dem Protein das ubiquityliert werden soll, sie vermitteln also die Spezifität der Ubiquitylierungs-Reaktion. Untersuchungen zur Struktur von E3-Proteinen zeigten, daß alle eine spezielle Ring-Finger-Domäne aufweisen (Joazeiro and Weissman, 2000; Lorick et al., 1999). Ein Beispiel für solch ein E3 Ring-Finger-Protein ist Mdm2, welches für die Degradation des oben erwähnten p53 verantwortlich ist (Fang et al., 2000; Honda et al., 1997). Auch die Proteine SIAH1 und SIAH2, die im weiteren noch eine Rolle spielen werden, gehören zur Klasse der Ubiquitin-Ligasen (E3). Beide Proteine sind Homologe des Proteins Sina in *Drosophila* (Sina: seven in absentia; SIAH: seven in absentia homolog). Die Homologie zwischen SIAH in Säugern und Sina

Einleitung

in der Fliege ist mit 80% sehr hoch (Carthew and Rubin, 1990; Hu et al., 1997a). Für beide Proteine wurde eine Funktion als Ubiquitin-Ligase beschrieben. Im Gegensatz zu SIAH ist die Rolle von Sina in einem komplexen Entwicklungsprozeß, nämlich der Augenentwicklung von *Drosophila*, beschrieben. Infolge der hohen Homologie und der identischen Funktion als Ubiquitin-Ligase soll im Folgenden auf die Situation im *Drosophila*-Auge näher eingegangen werden.

Ähnlich wie die B-Zellentwicklung stellt die Augenentwicklung von *Drosophila* ein Modellsystem der Zelldifferenzierung dar. Das adulte Facettenauge von *Drosophila* enthält ca. 800 identische, hexagonal geformte, funktionelle Untereinheiten, Ommatidien genannt. Jedes Ommatidium besteht aus 20 Zellen, den acht neuronalen Photorezeptorzellen (R1-R8), vier Semperzellen, die den Kristallkegel bilden und acht akzessorischen Zellen. Untersuchungen ergaben, daß am Anfang der Entwicklung die Zellen eines Ommatidiums nicht fixierte Linien darstellen, sondern die Richtung ihrer Differenzierung von den verschiedenen Zell-Zell-Interaktionen abhängt (Hotta and Benzer, 1970; Lawrence and Green, 1979; Ready et al., 1976). Die Ommatidienentwicklung beginnt mit der Differenzierung der R8-Zelle. Die restlichen Photorezeptorzellen differenzieren dann in der Reihenfolge R2/R5, R3/R4, R1/R6 und schließlich R7. Die besten Einblicke in die Differenzierung ergab hierbei die Untersuchung des Photorezeptors R7 (Rubin, 1991).

Die R7-Entwicklung beginnt mit der Expression des Rezeptors Sevenless (Sev) auf der präsumptiven R7-Zelle und der Expression des Liganden Bride-of-Sevenless (Boss) auf der R8 Zelle (Abbildung 4 und Reinke and Zipursky, 1988). Sev gehört zu den Transmembranrezeptoren, die auf ihrer cytosolischen Seite eine Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzen (Basler and Hafen, 1988; Hafen et al., 1987). Nach der Bindung von Boss an Sev, kommt es zu einer Aufnahme des Boss-Sev-Komplexes in die Zelle (Cagan et al., 1992). Im Zuge dieser Interaktion mit Boss erfolgt eine Autophosphorylierung von Sev, welche anschließend zur Aktivierung der Ras1-Signaltransduktionskaskade führt.

Der aktivierte Sev-Rezeptor rekrutiert das Adapterprotein Downstream of receptor kinase (Drk), welches seinerseits den Guanin-Nukleotid Austauschfaktor Son of Sevenless (Sos) rekrutiert (Olivier et al., 1993; Simon et al., 1993). Der Komplex Sev/Drk/Sos aktiviert dann Ras1, welches

Einleitung

dann die Raf Kinase (eine MAPKKK) aktiviert. Die folgenden Kinase-Glieder der Signaltransduktion sind Dsor1 (MAPKK) und Rolled (MAPK) (Biggs et al., 1994; Tsuda et al., 1993). Die aktivierte Kinase Rolled ist in der Lage verschiedene Proteine wie z.B. die Transkriptionsaktivatoren Jun und Pointed als auch den transkriptionellen Repressor Yan zu phosphorylieren (Brunner et al., 1994; O'Neill et al., 1994; Rebay and Rubin, 1995; Treier et al., 1995).

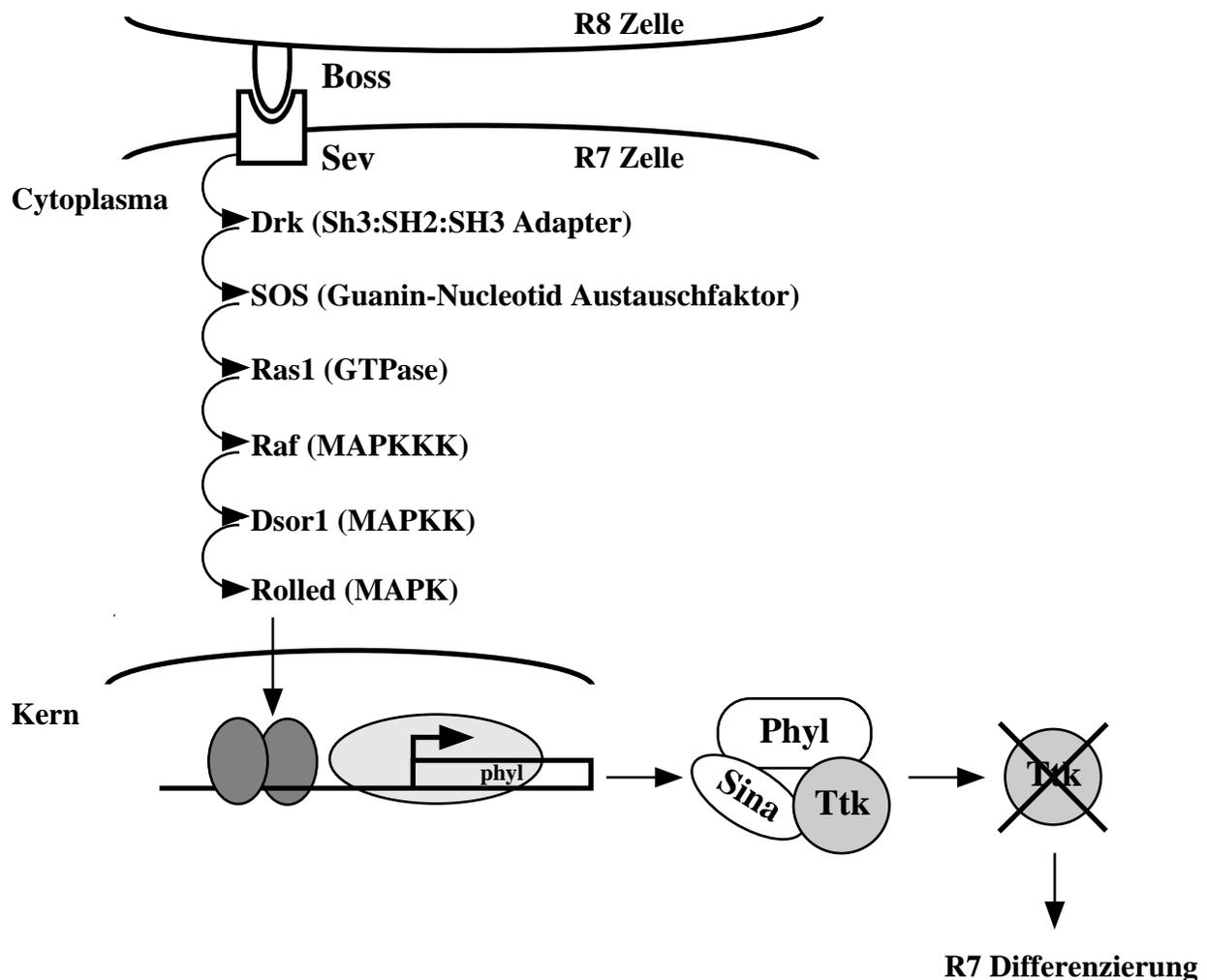


Abbildung 4: Die Signalkaskade für die Differenzierung des Photorezeptors R7. Genauere Erklärung im Text. (nach Tang et al. 1997 und Wassarman et al., 1995)

Eines der ersten neu transkribierten Gene nach erfolgter Sev-Stimulation ist das nukleäre Protein Phyllopod (Phyl) (Chang et al., 1995; Dickson et al., 1995). Phyl ist in der R7-Entwicklung ein notwendiges Protein. Die ektopische Expression von Phyl bewirkt, daß sich Vorläufer der Kristallkegelzellen in Richtung R7 und Pigmentzellen in Richtung neuronale Zellen differenzieren. Neben Phyl spielen die Proteine Seven in absentia (Sina) und Tramtrack (Ttk) eine wichtige Rolle in der R7-Differenzierung.

Das tramtrack-Gen kodiert für zwei alternativ gespleißte, transkriptionelle Repressoren (Brown et al., 1991; Read and Manley, 1992) und unterdrückt die Differenzierung zum R7-Photorezeptor (Lai et al., 1996; Xiong and Montell, 1993). In der R7-Differenzierung kommt es infolge der Aktivierung von Sev und der Ras-Kaskade zu einer Expression von Phyl. Phyl stellt einen Adapter dar, welcher Sina und Ttk binden kann. Die Folge dieses Sina/Phyl/Ttk Komplexes ist, daß Sina die Ubiquitinylierung von Ttk bedingt, welches anschließend über das Proteasom abgebaut wird. Mit dem Fehlen des transkriptionellen Repressors entwickeln sich die Zellen weiter zum R7-Photorezeptor (Li et al., 1997; Tang et al., 1997).

1.8. Ziele und Motivation der Arbeit

Wie oben beschrieben, sieht man in B-Zelllinien eine konstitutive, in T-Zellen hingegen eine induzierbare Expression von BOB.1/OBF.1. Die ursprüngliche Annahme einer gleichmäßig konstitutiven BOB.1/OBF.1-Expression in B-Zellen mußte infolge der Daten aus den BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen modifiziert werden. Zwar ist BOB.1/OBF.1 über die B-Zellentwicklung hinweg exprimiert, jedoch zeigen die Mengen an Transkript als auch an Protein deutliche Unterschiede. Besonders die B-Zellen des Keimzentrums zeigen eine deutlich erhöhte BOB.1/OBF.1-Expression. Die für diese Regulation verantwortlichen Mechanismen sind unbekannt. So stellen sich im wesentlichen drei Fragen: i) wie erfolgt die Modulation der BOB.1/OBF.1-Expression über die B-Zelldifferenzierung hinweg ii) warum liegt in den bisher

getesteten B-Zelllinien eine gleichmäßig konstitutive BOB.1/OBF.1-Expression vor und iii) welche Mechanismen führen zu einer Expression von BOB.1/OBF.1 in T-Zellen nach erfolgter Stimulation mit PMA und Ionomycin?

Als einfachsten Mechanismus kann man Kontrollelemente im Promotor von BOB.1/OBF.1 annehmen, deren zugehörige Transkriptionsfaktoren in B-Zelllinien konstitutiv, in T-Zellen jedoch induzierbar exprimiert werden. Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollte der BOB.1/OBF.1-Promotor kloniert und charakterisiert werden. Hierbei sollte die Charakterisierung der im Promotor bindenden Transkriptionsfaktoren Aufschluß darüber geben, wie die Regulation im Kontext der B-Zelldifferenzierung bzw. im Kontext der Stimulation von T-Zellen mit PMA und Ionomycin erfolgt.

Im Abschnitt 1.5 wurden verschiedene Interaktionspartner von BOB.1/OBF.1 genannt. All diese Proteine wurden, mit Ausnahme der Oct-Proteine, ohne einen systematischen "screen" erhalten. Es stellte sich somit die Frage ob BOB.1/OBF.1 noch mit anderen Proteinen interagieren kann und welche Funktion eine derartige Interaktion auf BOB.1/OBF.1-vermittelte Transkription haben würde. Prinzipiell kann man BOB.1/OBF.1 in zwei funktionelle Domänen einteilen. Die aminoterminal Domäne ist für die Interaktion mit den Faktoren Oct1 und Oct2 verantwortlich. Hier stellte sich die Frage, ob neben der Interaktion mit Oct1/2 noch andere Interaktionen möglich wären. Da BOB.1/OBF.1 als Interaktionspartner in einem "screen" mit Oct1/2 gefunden wurde, also nur nach Oct interagierende Proteinen gesucht wurde, könnte BOB.1/OBF.1 z.B. noch anderen Transkriptionsfaktoren als Kofaktor dienen.

Die carboxy-terminale Domäne von BOB.1/OBF.1 besitzt, wie vorher beschrieben, eine starke transkriptionelle Transaktivierungsdomäne. Der Mechanismus dieser Transaktivierung ist unklar. Es wurden zwar Faktoren beschrieben die an die carboxy-terminale Domäne binden können, jedoch wurde noch nie ein systematischer "screen" durchgeführt. Die Identifizierung von Interaktionspartner dieser Domäne könnte zu einem mechanistischen Verständnis der BOB.1/OBF.1-abhängigen Transkription beitragen.

Einleitung

Um diese beiden Fragestellungen experimentell zu adressieren, sollte das System des "yeast-two hybrid screens" etabliert und angewandt werden. Die Identifizierung potentieller Interaktionspartner sollte Licht auf die gestellten Fragen werfen.

2. Ergebnisse

2.1. Analyse des BOB.1/OBF.1-Promotors

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt zeigen B-Zelllinien eine konstitutive Expression von BOB.1/OBF.1., T-Zellen hingegen exprimieren BOB.1/OBF.1 erst nach erfolgter Stimulation mit dem Kalzium-Ionophor Ionomycin und dem Phorbolster Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Neben der unterschiedlichen Regulation auf transkriptioneller Ebene zeigten sich auch in der posttranslationalen Regulation Differenzen zwischen B- und T-Zellen. Für die volle transkriptionelle Potenz des BOB.1/OBF.1-Koaktivators ist eine Phosphorylierung an den Serinen 184, 188 und 189 vonnöten, wobei das Serin 184 eine herausragende Rolle spielt. Die verschiedenen Serine liegen in B-Zellen konstitutiv phosphoryliert vor, werden jedoch in T-Zellen erst nach Stimulation mit Ionomycin und Phorbolster phosphoryliert. Zusammenfassend stellt sich somit die BOB.1/OBF.1-Regulation in T-Zellen wie folgt dar: eine Stimulation mit PMA (wahrscheinlich über die Proteinkinase C) und ein Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels führt zu einer Expression des Kofaktors BOB.1/OBF.1. Gleichzeitig sind diese Stimuli für eine Phosphorylierung des Proteins und somit für dessen transkriptionelle Aktivität verantwortlich. Im Gegensatz zu T-Zellen, ist in B-Zellen kein extra Stimulus nötig (Zwilling et al., 1997).

Die Gründe für die unterschiedlichen Expressionmuster des BOB.1/OBF.1-Transkriptes in B- und T-Zellen liegen in den regulatorischen Elementen des BOB.1/OBF.1-Gens. Transkriptionsfaktoren, die in B-Zellen konstitutiv und in T-Zellen nach Stimulation vorliegen, könnten die Regulation erklären. Andere Möglichkeiten wären Transkriptionsfaktoren die posttranslational aktiviert werden müssten oder unterschiedlich verwendete Promotoren. Um die genannten Hypothesen zu überprüfen, sollte der BOB.1/OBF.1-Promotor kloniert und genauer untersucht werden.

2.1.1. B- und T-Zellen nutzen denselben transkriptionellen Startpunkt im BOB.1/OBF.1-Promotor

Wie oben erwähnt, kann die unterschiedliche transkriptionelle Expression von BOB.1/OBF.1 ihren Ursprung in der Verwendung zweier verschiedener Promotoren haben. Hierbei wäre ein Promotor in B-Zellen, der andere in T-Zellen aktiv. In einem solchen Fall sollte sich der transkriptionelle Startpunkt in B- und T-Zellen unterscheiden. In B-Zellen konnte gezeigt werden, daß eine TTTAA-Sequenz 120 bp oberhalb des ersten translatierten Codons als potentielle TATA-Box in Frage käme. Zusätzlich konnte der transkriptionelle Start 96 bp oberhalb des Start-Codons lokalisiert werden (Pfisterer et al., 1995; Schubart et al., 1996b).

Um den transkriptionellen Startpunkt in T-Zellen zu analysieren wurde die RNA der humanen Zelllinien Jurkat als Vorlage für "primer-extension"-Experimente benutzt. Die RNA von HeLa-Zellen diente hierbei als Negativ-Kontrolle, sie sollte kein BOB.1/OBF.1-Transkript enthalten. Wie erwartet, erfolgt der transkriptionelle Start in der B-Zelllinie BJAB ca. 96 Nukleotide oberhalb des ersten translatierten Codons (Abbildung 5). Jurkat T-Zellen exprimieren wie gezeigt erst nach Stimulation mit Ionomycin und Phorbol ester das BOB.1/OBF.1-Transkript. Hierbei benutzen sie denselben transkriptionellen Startpunkt wie B-Zellen, woraus zu schließen ist, daß keine exklusiven B- bzw. T-Zell-spezifischen Promotoren verwendet werden.

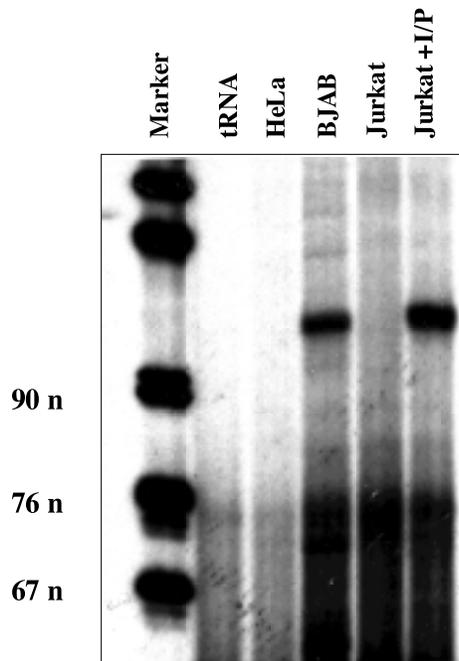


Abbildung 5: B- und T-Zellen haben denselben Startpunkt für die Transkription von BOB.1/OBF.1. Die RNA aus HeLa-Zellen, der B-Zelllinie BJAB und aus Jurkat T-Zellen, die mit PMA und Ionomycin stimuliert waren, wurde präpariert und anschließend der transkriptionelle Startpunkt mittels "primer-extension" bestimmt. I: Ionomycin; P: PMA

Um mögliche Zelllinienartefakte auszuschließen, wurden primäre Thymozyten der Maus mit Ionomycin und Phorbol ester stimuliert. Die Analyse alternativer transkriptioneller Startpunkte erforderte eine Titration der eingesetzten RNA. Hintergrund war hierbei, daß im Falle desselben Startpunktes in B- und T-Zellen, die Mengenverhältnisse an BOB.1/OBF.1-Transkript in der "primer-extension" identisch mit den Mengenverhältnissen im Northern-Blot sein müßten. Im Falle alternativer oder zusätzlicher Startpunkte in Thymozyten sollte hingegen die Menge an detektiertem BOB.1/OBF.1-Transkript in der "primer-extension" abnehmen und evtl. zusätzlich eine weitere Bande auftauchen. Wie die Abbildungen 6A und B zeigen, waren die Mengenverhältnisse in der "primer-extension" und im Northern-Blot identisch und somit die Verwendung eines einzigen BOB.1/OBF.1-Promotors auch in primären Zellen bestätigt.

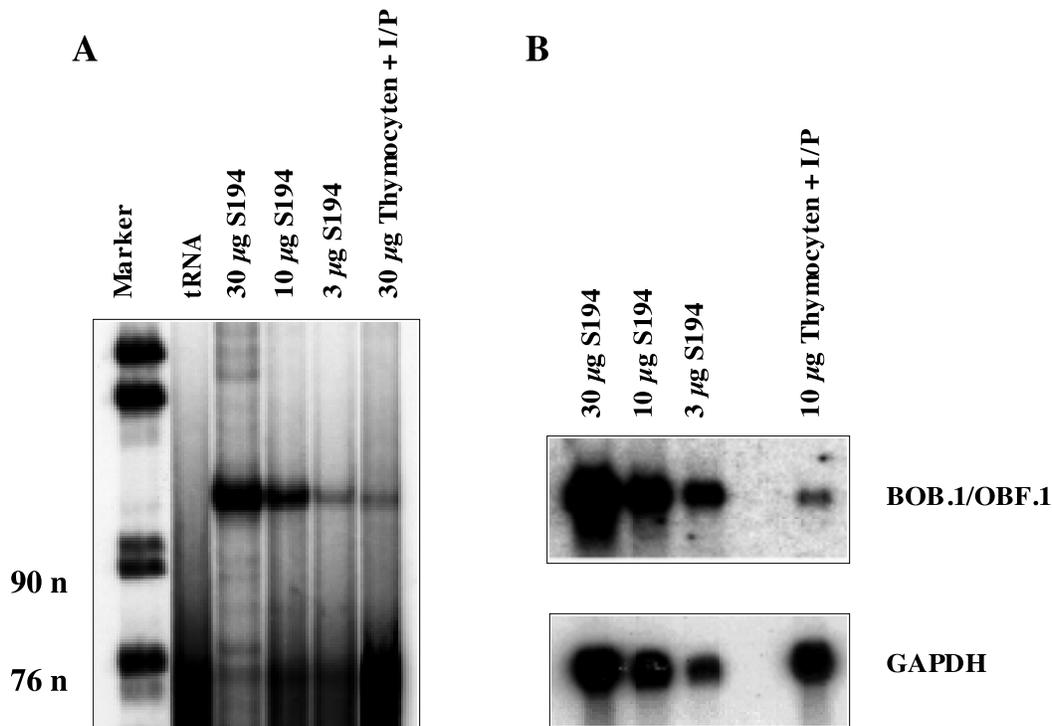


Abbildung 6: In T-Zellen existieren keine alternativen Startstellen für das BOB.1/OBF.1-Transkript. Die RNA der murinen B-Zelllinie S194 und von primären Thymozyten, die mit PMA und Ionomycin stimuliert waren, wurde präpariert und (A) im "primer extension assay" bzw. (B) im Northern-Blot miteinander verglichen. GAPDH diente als Kontrolle für die eingesetzten RNA-Mengen. I: Ionomycin; P: PMA

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die potentielle Promotor-Region 5' des transkriptionellen Startpunkts näher untersucht. In einem Projekt zur Herstellung BOB.1/OBF.1-defizienter Mäuse wurden von Jochen Hess (ebenfalls Arbeitsgruppe Th. Wirth) bereits größere Abschnitte des BOB.1/OBF.1-Gens kloniert. Mit Hilfe von PCR konnten 1,6 kb potentielle Promotor-Region 5' der transkriptionellen Startstelle subkloniert werden. Die Sequenzierung der direkten Umgebung der TATA-Box (-24 bp) ergab eine perfekt konservierte CREB/ATF-Bindungsstelle 56 Nukleotide oberhalb der transkriptionellen Startstelle (-56 bp, siehe Abbildung 6). Desweiteren konnte eine NF-AT- (-97 bp), eine SRY- (-536 bp) und Myb- Bindungsstelle (-560 bp) gefunden werden (Abbildung 7).

Ergebnisse

```
ACCTGAGAGTAACTGCCTCCACTGGAATGGAGCCTACAGTCTGTTTCAGACACACAGTGGCAGAATGT
AGCCCCGTA CTGTATGTA CTGCAGATGAGAGTCATTACCTTTCTTTGAGAGGCTTTCCATTAGCCGTGTT
GGGGTCCTAGGATTATGATAAGCTGGTACTCCTAAATCCATTAAGTCACCTTTGGGAAATCAGCTTCAG
TTAAGAAGCCTGAGTGTCTCTGTTTCTTTGAGCGAGTCGGTCCCCTTCTGTGTACATACAGTCTGA

ACAGGACCCTATATTAACAATATACTGCGCATTGTCAGGACTGGGCAGGGAGGAG v-myb
CCGTTAGATTTTA

SRY
AAGTGGATA AACAGAAAAGCAACACCGAGAACGAGGAGGCTGGTTAGTGAGGCTTGAAGAGAGGGC
AGGTGTTTCCTCCCATGGTGAGAATAGTGACCCCTGGGAATCGCATTCCCGTCGAGCTGGGACCAATG
GTAAGGTCAGTCTCGCAAATGGCCTGATAGTGTGGAACGTATGTGAGTGCCAGAGAAAGCTCGGTGT
TGTCTGTATTATCCTTTGGACCCCTCATCGCTCGGGGAGCGCTGATCCTTGACCTCATGGTCCACCCTTT
GCGTTCAGACTCTCATGCTCCTCTATGTGGCATAACACCGTGGCTGTGTGCAAATGCCGTGGCCTCCT
GTGCTGTATGGTGGTTAGTCCCAATTGGATGGCCCTGTGTCTCAAGCACTCTCCAGCCAGTGGGGGCCT

TGGGGGTGCACACAGTGGGTTGACAGGCGGTGTTGC NF-AT
TGAAGAAAAAAAAGTACAGCTCTGCCTGAGG

CREB/ATF TATA-Box
TAGGAGGATGT GATGACGTGGCCCTCTCAGCGGGA ACTCGGGCC TTTAAAAAGCTGAAGAAACAGC

+1
CTCAGGTAAACGGTGGTTCCACGGGAGGAAAGCACGCCAGTCACATTAAGAA
```

Abbildung 7: Der BOB.1/OBF.1-Promotor mit potentiellen Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren Die Bindungsstellen der verschiedenen Transkriptionsfaktoren sind grau unterlegt. Der Beginn der transkribierten RNA ist in "fett" dargestellt.

2.1.2. Der klonierte BOB.1/OBF.1-Promotor zeigt eine Zellspezifität für B-Zellen aber keine Induzierbarkeit in T-Zellen

Um die potentielle transkriptionelle Potenz dieses BOB.1/OBF.1-Promotors zu testen, wurden die 1,6 kb in einen Vektor vor ein Luciferase-Gen mit der TATA-Box des Thymidin-Kinase-Gens kloniert. Anschließend erfolgte eine Transfektion in die Fibroblastenlinie NIH/3T3 und in die B-Zelllinie S194. In B-Zellen zeigte der BOB.1/OBF.1-Promotor eine 160-fache Aktivität im Vergleich zu einem Luciferase-Konstrukt unter der Kontrolle von vier mutierten Oktamer-Motiven (4xmut.Oct). Im Gegensatz dazu war dasselbe BOB.1/OBF.1-Promotor Konstrukt in den NIH/3T3-Zellen nur 20-fach aktivierbar (Abbildung 8). Aus diesem Ergebnis läßt sich ableiten, daß

Ergebnisse

die 1,6 kb des potentiellen BOB.1/OBF.1-Promotors tatsächlich eine zellspezifische transkriptionelle Aktivität besitzen.

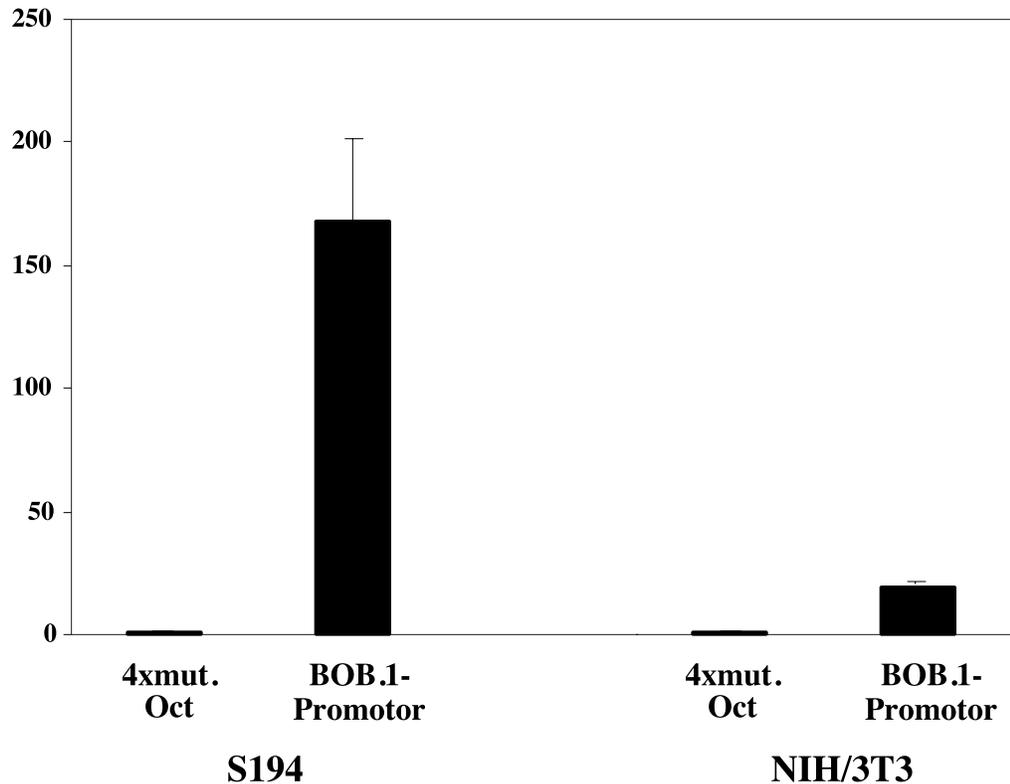


Abbildung 8: Der klonierte BOB.1/OBF.1-Promotor zeigt Zellspezifität. NIH/3T3 Fibroblasten und S194 B-Zellen wurden mit dem Kontrollplasmid 4xmut.Oct und dem BOB.1/OBF.1-Promotor Konstrukt transfiziert. 18h später wurde die relative Luciferaseaktivität bestimmt.

Neben der Zellspezifität sollte jedoch auch die Frage nach der Induzierbarkeit in T-Zellen untersucht werden. Wie in der Einleitung erwähnt, zeigen T-Zellen eine BOB.1/OBF.1-Expression nach Stimulation mit Phorbolestern und Ionomycin. Diese Stimulation der BOB.1/OBF.1-Expression kann mit Hilfe BOB.1/OBF.1-abhängiger Transkription verfolgt werden. Transfiziert man Jurkat T-Zellen mit einem Luciferase-Konstrukt, welches unter der Kontrolle von vier multimerisierten Oktamersequenzen steht, so erfolgt nach Stimulation mit Phorbolestern keine, mit Ionomycin eine geringe und mit beiden zusammen eine synergistische Expression der Luciferase. Die Luciferase-Expression kann jedoch durch die Gabe von CyclosporinA unterdrückt werden. (Sauter and Matthias, 1997; Zwilling et al., 1997). Dieses transkriptionelle Auswertesystem mit Hilfe der

Ergebnisse

Luciferase-Expression wurde im Folgenden als Kontrolle für eine erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen verwendet.

Jurkat T-Zellen wurden mit dem Luciferase-Konstrukt, welches 4 Octamer motive im Promotor enthält (4xOct) oder einer mutierten Form des Oktamer motifs im Promotor (4xmut.Oct) transfiziert und anschließend mit PMA und Ionomycin stimuliert (Abbildung 9). Neben dieser Stimulationskontrolle wurden die Jurkat T-Zellen mit dem BOB.1/OBF.1-Promotor Konstrukt transfiziert und ebenfalls mit PMA und Ionomycin stimuliert. Die Aktivierung des Konstruktes 4xOct betrug mit PMA und Ionomycin 25-fach. Demgegenüber war der BOB.1/OBF.1-Promotor nur 3-fach mit PMA und Ionomycin stimulierbar (Abbildung 9).

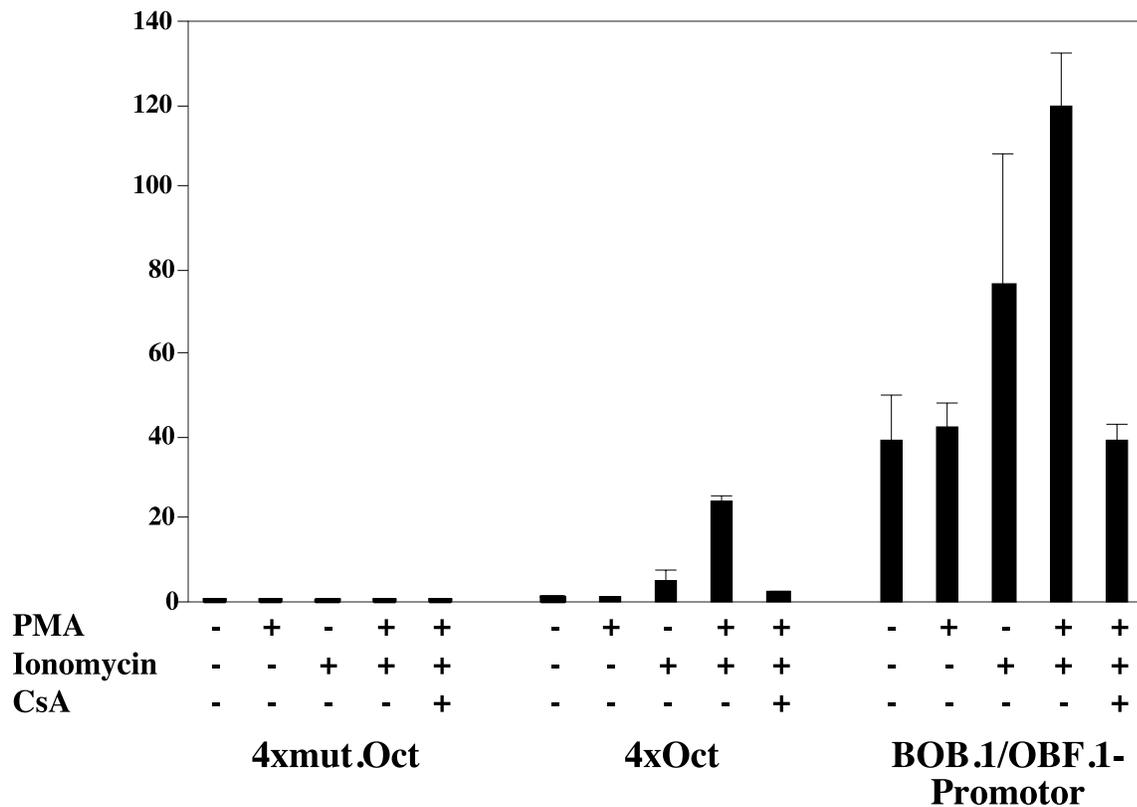


Abbildung 9: Der BOB.1/OBF.1-Promotor zeigt nur eine geringe Induzierbarkeit durch PMA und Ionomycin in T-Zellen. Jurkat T-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden 4xmut.Oct oder 4xOct oder dem BOB.1/OBF.1-Promotor transfiziert. Nach Stimulation der Zellen mit PMA, Ionomycin oder beiden zusammen wurde die relative Luciferaseaktivität gemessen.

Ergebnisse

Da der klonierte 1,6 kb große BOB.1/OBF.1-Promotor in T-Zellen bereits eine hohe Basalaktivität besitzt, wurde angenommen, daß weitere Regulationsmechanismen notwendig sind. So könnten z.B. "Silencer"-Motive 5' oder 3' des Promotors für eine Repression der BOB.1/OBF.1-Expression in uninduzierten T-Zellen führen. Desweiteren könnte der Promotor durch Histone komplexiert sein, so daß er erst mittels bestimmter Faktoren wie z.B. Histon-Acetyltransferasen geöffnet werden muß. Beide Annahmen können nicht über Transfektionsexperimente untersucht werden, sondern benötigen die Analyse des Promotors im Kontext der genomischen DNA.

Einen möglichen Zugang zu der komplexen Regulation von Transkription auf genomischer Ebene bietet der „DNase Hypersensitivity-Assay“. Er basiert auf der Tatsache, daß Transkriptionsfaktoren, die an regulatorische Stellen binden, die DNA an diesen Stellen sensitiver gegenüber DNase machen. Verdaut man die genomische DNA mit Restriktionsenzymen, so entstehen DNA-Fragmente definierter Größe, die mit radioaktiv markierten Sonden, welche direkt neben der Restriktionsschnittstelle binden, im Southern-Blot nachgewiesen werden können. Binden innerhalb solcher DNA-Fragmente Transkriptionsfaktoren, so erhält man nach DNase-Verdau verkürzte Fragmente. Diese sind mittels der Sonden nachweisbar. Da man die Bindungsstelle der Sonden kennt, läßt sich über die Länge der verkürzten DNA-Fragmente die Regionen, in denen die Faktoren binden, genau kartieren.

5' des Exon 1 gelegene DNA-Fragmente aus dem humanen Genom, deren Klonierung im Rahmen einer Translokationsuntersuchung erfolgte, wurden mir von der Arbeitsgruppe Kerckaert zur Verfügung gestellt (Galieque Zouitina et al., 1996). Die Restriktionsanalyse dieser Fragmente ergab letztendlich das in Abbildung 10 gezeigte Restriktionsmuster des BOB.1/OBF.1-Lokus. In Absprache mit David Cockerill (Hanson Center, Cancer Research, University of Adelaide, Australia), der den "Hypersensitivity-Assay" durchführen sollte wurden zwei Sonden konstruiert und anschließend im Southern-Blot getestet (Abbildung 10, schematisch gezeigt).

Der "Hypersensitivity-Assay" wurde mit der B-Zelllinie Raji und der T-Zelllinie Jurkat durchgeführt. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede zwischen B- und T-Zellen in der DNase-Sensitivität. Auch zwischen unstimulierten und stimulierten Jurkat T-Zellen waren keine Unterschiede nachweisbar.

Ergebnisse

Da keine unterschiedlichen DNA-Bindungsstellen in den beiden Ansätzen gefunden wurden, erfolgt die Regulation des BOB.1/OBF.1-Promotors wahrscheinlich über die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an dieselben DNA-Motive oder über eine Modulation der Aktivität der verschiedenen Transkriptionsfaktoren. So könnten Kofaktoren, die nicht an die DNA binden, sondern mit den im Promotor bindenden Transkriptionsfaktoren interagieren, für die Regulation verantwortlich sein. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit des Ergebnisses wäre, daß sich regulatorische Elemente noch weiter außerhalb der hier untersuchten Bereiche befinden.

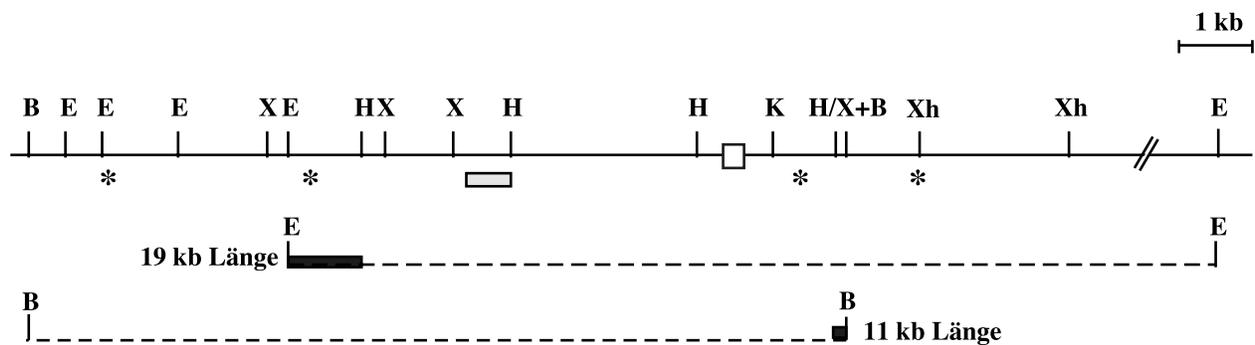


Abbildung 10: Restriktionskartierung der BOB.1/OBF1 Promotorregion und der "DNase Hypersensitivity (DH)" Test. Das durchsichtige Rechteck stellt Exon1 dar. Die beiden verwendeten Sonden (schwarze Rechtecke) und die durch sie nachweisbaren EcoRI und Bam HI Fragmente sind dargestellt. Die Sterne bezeichnen einzelne gefundene DH-Stellen, das graue Rechteck eine Region mit mehreren DH-Stellen. (B: BamHI; E: EcoRI; H: HindIII; K: KpnI; X: XbaI; Xh: XhoI)

2.2. Interaktionspartner von BOB.1/OBF.1

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, lässt sich BOB.1/OBF.1 in T-Zellen mit PMA und Ionomycin induzieren. In allen bisher untersuchten transformierten B-Zelllinien liegt zwar eine unregulierte, konstitutive BOB.1/OBF.1-Expression vor, jedoch spiegelt diese nicht den natürlichen Zustand wieder. Wie die BOB.1/OBF.1 defizienten Mäuse zeigten, ist BOB.1/OBF.1 besonders an der Entstehung der Keimzentren beteiligt. Folgerichtig sind es die B-Zellen des Keimzentrums, die die höchste BOB.1/OBF.1-Expression aufweisen (Greiner et al., 2000; Qin et al., 1998). Da die Regulation der BOB.1/OBF.1-Expression in diesem Abschnitt der B-Zellentwicklung unbekannt ist, sollte diese in primären B-Zellen genauer untersucht werden.

2.2.1. Regulation von BOB.1/OBF.1 auf Protein-Niveau

Die Zellen des Keimzentrums exprimieren im Gegensatz zu den restlichen B-Zellen bestimmte Oberflächenmarker, wie z.B. CD38. Um die Regulation von BOB.1/OBF.1 genauer zu untersuchen, wurden in Kooperation mit Axel Greiner (Pathologie Würzburg) primäre CD38-negative nicht-Keimzentrums B-Zellen und CD38-positive Keimzentrums B-Zellen aus menschlichen Mandeln aufgereinigt. Anschließende FACS-Analysen ergaben eine ca. 95%-ige Reinheit der Zellen (Ergebnis nicht gezeigt). Aus den beiden Zellpopulationen wurde sowohl Gesamt-RNA als auch Gesamt-Protein gewonnen.

Da die erhaltenen Mengen aufgrund der kleinen Menge an Ausgangszellen relativ gering ausfiel, wurde die Menge an BOB.1/OBF.1-Transkript mittels quantitativer LightCycler-PCR bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der die Menge an Amplifikat direkt nach der Elongation mit Hilfe des interkalierenden und dadurch fluoreszierenden Agens CyberGreen quantitativ gemessen werden kann. Durch diese Methode lässt sich die Menge an Amplifikat über die PCR-Zyklen hinweg verfolgen. Die Quantifizierung erfolgt über die mathematische 2. Ableitung der sigmoiden Produktkurve (dies entspricht dem Wendepunkt der Kurve, siehe Abbildung 11).

Ergebnisse

Dieser Wendepunkt gibt die Anzahl an Zyklen an die nötig sind um das erste Mal ein Amplifikat zu messen. Über Verdünnungen der cDNA erhält man die Effizienz der PCR (Abbildung 11). Setzt man in zwei verschiedenen Zellpopulationen die Anzahl der nötigen Zyklen zum Nachweis einer bestimmten cDNA miteinander in Relation, so erhält man eine relative Quantifizierung des Ausgangstranskripts bezogen auf eine Zellpopulation (dem sog. Kalibrator der gleich 1 gesetzt wird).

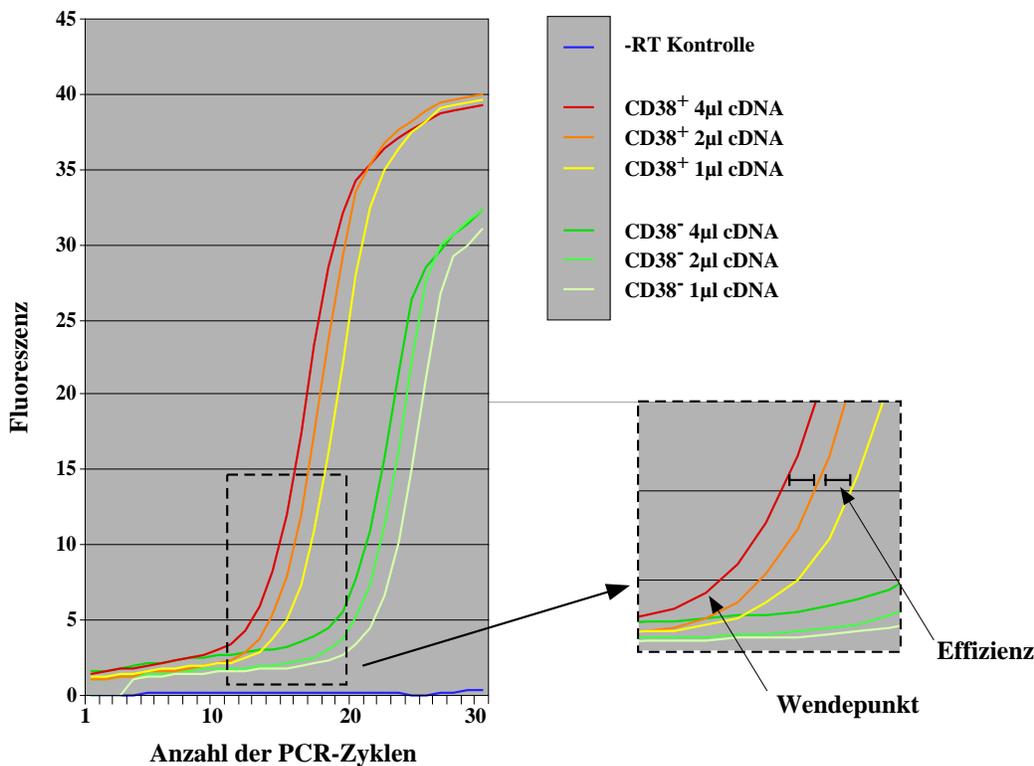


Abbildung 11: Die LightCycler PCR. Dargestellt ist als Beispiel die LightCycler-PCR für das CD38-Transkript. Die cDNA CD38⁺ und CD38⁻ B-Zellen wurde 4:2:1 verdünnt eingesetzt. Der Kurvenverlauf gibt die Zunahme an Amplifikat wieder. Der Wendepunkt dient der Bestimmung der relativen Menge des Transkriptes. Die Effizienz muß in den beiden cDNA-Populationen gleichbleiben. -RT: cDNA-Synthese ohne Reverse-Transkriptase.

Die RNA der beiden primären Zellpopulationen wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend in der PCR eingesetzt. Als Abgleich der CD38⁻ gegen die CD38⁺ Zellen wurde das Transkript des Haushaltsgens Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) verwendet. PBGD ist als Kontrolltranskript

Ergebnisse

wegen seiner Eigenschaft, keiner Genfamilie anzugehören, keine bekannten Pseudogene und einen niedrigen Expressionslevel zu haben, als Abgleich in quantitativen PCRs besonders gut geeignet (Fink et al., 1998; Fink et al., 1999). Die Expression von PBGD wurde in beiden Zellpopulationen somit als gleich angenommen und alle restlichen Daten auf diese Transkriptmenge normiert. Als Positivkontrolle diente die Expression von CD38-Transkript. Hier zeigte sich eine 15-fache Induktion des CD38-Transkripts von nicht-Keimzentrum B-Zellen zu Keimzentrums B-Zellen, was im Einklang zu der im FACS gemessenen 95%-igen Reinheit der Population stand (Abbildung 12A und Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu der deutlichen Induktion von CD38-RNA zeigte das BOB.1/OBF.1-Transkript nur eine Induktion um den Faktor 1,5 in den B-Zellen des Keimzentrums.

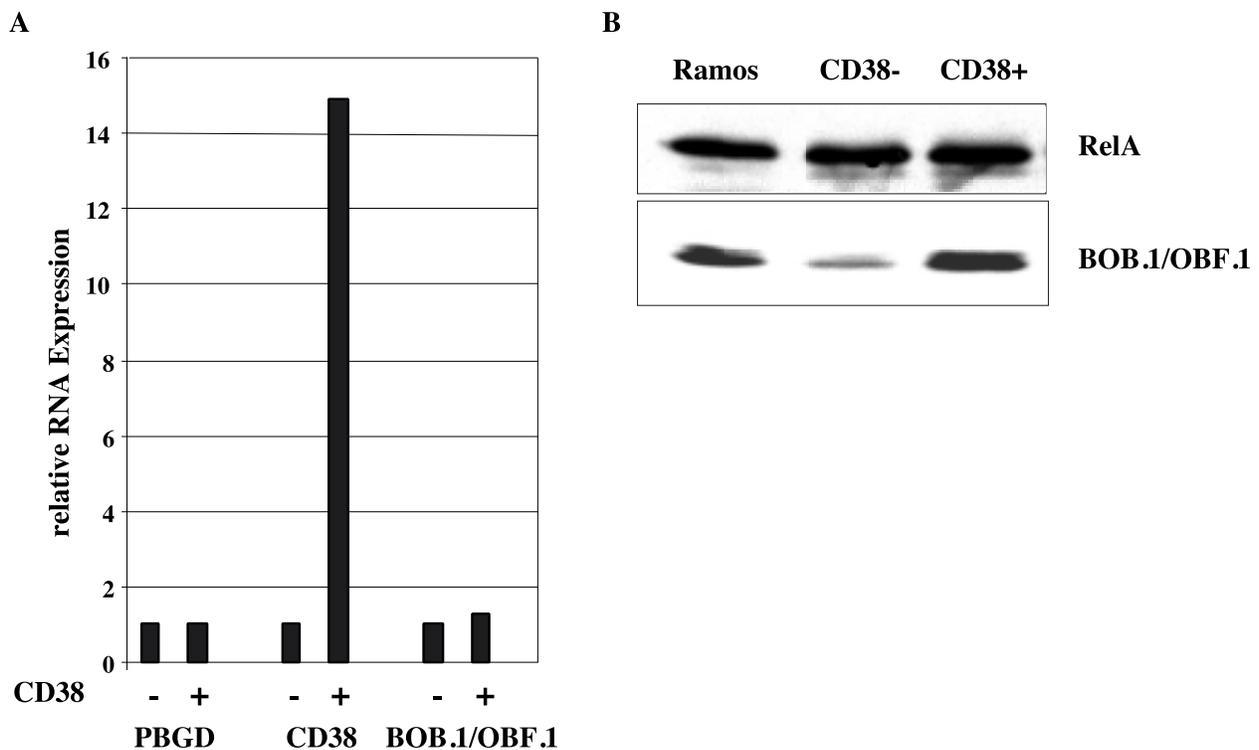


Abbildung 12: BOB.1/OBF.1 wird auch auf Proteinebene reguliert. CD38⁻ nicht-Keimzentrums B-Zellen und CD38⁺ Keimzentrums B-Zellen wurden aufgereinigt und RNA bzw. Protein isoliert. **(A)** Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend die Expression von PBGD, CD38 und BOB.1/OBF.1 in der LightCycler-PCR relativ quantifiziert. Die Expression von PBGD diente hierbei dem Abgleich. **(B)** Die Proteinextrakte der beiden Zellpopulationen wurden im Western-Blot auf BOB.1/OBF.1-Expression untersucht. Die Expression von RelA diente als Ladekontrolle, der Extrakt aus der humanen B-Zelllinie Ramos hingegen als Positivkontrolle.

Diese geringe Induktion stand im Widerspruch zu den im Western-Blot gewonnenen Daten. Hierbei wurde der Proteinextrakt der B-Zelllinie Ramos als Positivkontrolle verwendet. Die Expression von RelA diente als Ladekontrolle. Im Gegensatz zu der geringen Induktion des BOB.1/OBF.1-Transkriptes, zeigte das BOB.1/OBF.1-Protein eine deutliche, 6-8 fache Induktion in den B-Zellen des Keimzentrums (Abbildung 12B).

Somit wird BOB.1/OBF.1 während der B-Zellentwicklung nicht nur über transkriptionelle sondern auch über translationelle oder posttranslationelle Ereignisse reguliert.

Um Faktoren zu identifizieren, welche die BOB.1/OBF.1-Proteinstabilität beeinflussen können, wurde ein "yeast-two hybrid screen" durchgeführt.

2.2.2. Potentielle Interaktionspartner von BOB.1/OBF.1

Der „yeast-two hybrid screen“ ermöglicht es, neue Interaktionspartner eines Proteins zu finden. Hierbei wird ein Hefestamm (hier HF7c), der eine Defizienz für die Synthese von Tryptophan (*trp1-901*) und Leucin (*leu 2-3*) aufweist, verwendet. Das zur Histidinsynthese nötige *HIS3* (*his 3-200*) ist zwar defizient, jedoch unter der Kontrolle eines Gal abhängigen Promotors ($GAL1_{UAS}$ - $GAL1_{TATA}$ -*HIS3*) wieder eingeführt. Ebenfalls unter der Kontrolle eines Gal-abhängigen Promotors steht die Expression von β -Galactosidase ($GAL4_{17\text{-mers}(x3)}$ - $CYC1_{TATA}$ -*lacZ*).

Die cDNA von BOB.1/OBF.1, welches als „Köder“ (engl. bait) für neue Interaktionspartner diente, wurde in ein Plasmid im Leseraster zur DNA-Bindungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors kloniert. Zusätzlich zu BOB.1/OBF.1 exprimiert dieses „bait“-Plasmid noch *Trp1*, womit eine Selektion der Transformanten auf Tryptophansynthese ermöglicht wird. Die verwendete cDNA-Bank aus Jurkat T-Zellen war in einen Vektor als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors kloniert. Zusätzlich codierte dieser sogenannte „prey“-Vektor (dt. Beute) für *Leu2*, womit eine Selektion auf Leucinsynthese ermöglicht wird. Transformiert man die oben genannten defizienten Hefen mit den beiden Vektoren, so kann es zu

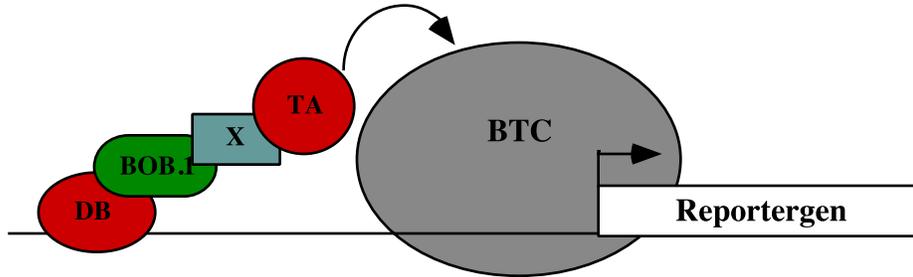
Ergebnisse

einer Interaktion von BOB.1/OBF.1 und einem Protein X aus der cDNA-Bank kommen. In diesem Falle wird durch die Interaktion der Gal4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert (Abbildung 13A). Diese Rekonstituierung ermöglicht die Synthese von Histidin, wodurch die Hefen auf Tryptophan, Leucin und Histidin defizienten Nährmedien wachsen können. Zusätzlich zu Histidin erfolgt noch die Expression von β -Galactosidase, welche in einem Galactosidase-Test zu einer Blaufärbung führt.

Die amino-terminale Domäne von BOB.1/OBF.1 interagiert mit den Proteinen Oct1 und Oct2. Hier stellte sich die Frage, ob noch andere Faktoren an diese Domäne in BOB.1/OBF.1 binden können und ob diese mit der beobachteten Proteinstabilität in Verbindung gebracht werden können. Die carboxy-terminale Domäne von BOB.1/OBF.1 beinhaltet hingegen die Funktion der transkriptionellen Koaktivierung. Der hierbei zugrunde liegende genaue molekulare Mechanismus dieser Koaktivierung ist unklar. Es stellte sich somit die Frage, welche Faktoren von BOB.1/OBF.1 kontaktiert werden, um eine transkriptionelle Aktivierung zu vermitteln. Desweiteren enthält er die kritischen Serine 184, 188 und 189, deren Kinase unbekannt ist.

Da BOB.1/OBF.1 ein transkriptioneller Kofaktor ist, mußten für den "yeast-two hybrid screen" erst alle transaktivierenden Domänen lokalisiert werden. Hierzu wurden verschiedene Fragmente von BOB.1/OBF.1 in den "bait"-Vektor kloniert und nach Transformation auf Blaufärbung getestet. Es stellte sich heraus, daß das BOB.1/OBF.1-Gesamtprotein wie erwartet die Transkription des Reporters β -Galactosidase aktiviert (Ergebnis nicht gezeigt). Der "screen" wurde somit zweigeteilt, für Proteine, die mit dem amino-terminalen und solche, die mit dem carboxy-terminalen Bereich interagieren können. Im amino-terminalen Bereich zeigte nur das Fragment der Aminosäuren 1-72 keine autonome Reporteraktivierung, wohingegen ein größeres Fragment mit den Aminosäuren 1-126 β -Galactosidaseaktivität induzierte (Abbildung 13B). Somit liegt in dem Bereich der Aminosäuren 72-126 eine transaktivierende Domäne von BOB.1/OBF.1.

A



B



C

	screen 1	screen 2
Transformationseffizienz	6,8 x 10⁶	2,5 x 10⁶
Anzahl β-Gal positiver Klone	98	2
Anzahl β-Gal pos. Klone nach Retransformation	3	2
erhaltene cDNAs	3 x SIAH1	SIAH1/2

D

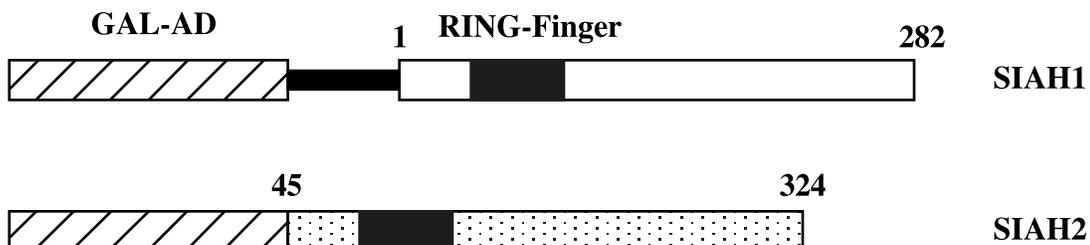


Abbildung 13: Prinzip des "yeast-two hybrid screens", die Vorversuche, der "screen" und die gefundenen interagierenden Klone SIAH1 und SIAH2. (A) Prinzip des "yeast-two hybrid screens" mit der Rekonstituierung des Gal4-Transkriptionsfaktors bei einer Interaktion von BOB.1/OBF.1 mit dem Protein X. (B) Die versch. BOB.1/OBF.1 Fragmente wurden in den "bait"-Vektor kloniert, in HF7C transformiert und anschließend die β-Galaktosidaseaktivität bestimmt. (C) Zusammenfassung des "yeast-two hybrid screens" mit den amino-terminalen Aminosäuren 1-72 als "bait". (D) Die beiden gefundenen Interaktionspartner SIAH1 und SIAH2. Der SIAH1-Klon enthielt einen Teil der 3'-untranslatierten Region (schwarzer Balken). Der SIAH2-Klon enthielt nur die codierende Sequenz ab Aminosäure 45.(aa: Aminosäure; DB: DNA-Bindungsdomäne; TA: Transaktivierungsdomäne)

Klone, die den gesamten carboxy-Terminus von Aminosäure 103-256 enthielten, färbten sich wie erwartet blau (Abbildung 13B). Eine transaktivierende Domäne von BOB.1/OBF.1 liegt, wie bei den Experimenten mit dem amino-Terminus gezeigt, in der Region der Aminosäuren 72-126. Die Deletion dieser Region führte zu einem Klon, der die Aminosäuren 127-256 enthielt, sich jedoch auch blau färbte. Eine weitere bekannte transaktivierende Domäne liegt in dem äußersten carboxy-Terminus. Hierbei handelt es sich um eine saure Region bestehend aus mehreren Glutaminsäureresten. Die Deletion dieser Domäne ergab die verbleibenden Aminosäuren 127-228, welche keine β -Galactosidase-Expression mehr vermittelten (Abbildung 13B). Somit konnte dieser carboxy-terminale BOB.1/OBF.1-Klon für den folgenden "yeast-two hybrid screen" verwendet werden.

Für die Interaktionen mit dem amino-terminalen Bereich wurde die für die Aminosäuren 1-72 codierende cDNA von BOB.1/OBF.1 als „bait“ verwendet. Zwei unabhängige "screens" ergaben eine Interaktion mit den Proteinen SIAH1 und SIAH2 (Abbildung 13C). Die gefischten cDNAs für SIAH1 waren identisch und codierten alle für das gesamte Protein. Sie enthielten jedoch noch zusätzlich die 3'-untranslatierte Region. Die cDNA für SIAH2 enthielt nur die codierende Sequenz ab Aminosäure 45 (Abbildung 13D).

Der "yeast-two hybrid screen" des carboxy-Terminus von BOB.1/OBF.1 mit den Aminosäuren 127-228 wurde mit Hilfe einer cDNA-Bibliothek aus der menschlichen Milz durchgeführt (Tabelle 14A). Die restlichen Rahmenbedingungen waren dieselben wie im Falle des amino-terminalen BOB.1/OBF.1-"screens". Von den gefundenen Klonen erwiesen sich folgende Klone in der Retransformation als positiv: Immunglobulin κ light chain, KIAA0553, Mcm7, RanBPM und ABP280. Alle diese Klone wurden mehrfach gefunden. Demgegenüber stehen solche positiven Klone, die nur einmal gefunden wurden, wie Thymosin beta, JBP1, ARF-1, KIAA0120, testis enhanced transcript und PR02760. Alle restlichen Klone stellten Artefakte dar. So lag z.B. die interagierende Sequenz in der normalerweise nicht translatierten 3'-Region eines Gens (Tabelle

14B). Auf die potentielle Interaktion mit ABP280 und Mcm7 wird in der Diskussion näher eingegangen, da sie im Rahmen der Doktorarbeit nicht weiter bearbeitet wurde.

A	Transformationseffizienz	$2,5 \times 10^7$
	β-Gal positive Klone	158
	mehrfach gefundene in der Retransformation β-Gal positive Klone:	
	Immunglobulin κ light chain (3x)	
	KIAA0553 RNA (5x)	
	Mcm7/hCDC47 (15x)	
	RanBPM (29x)	
	ABP 280 (14x)	
	einzelne gefundene in der Retransformation β-Gal positive Klone:	
	KIAA0120 RNA	
	ARF-1/ADP ribosylation factor	
	Thymosin β	
	JBP-1/Jun-binding protein-1	
	testis enhanced gene transcript	
	20 Klone sind in der Retransformation β-Gal positiv, codieren jedoch für unbekannte Transkripte	
B	gefundene in der Retransformation β-Gal positive Klone, die sich nach der Sequenzierung als Artefakte herausstellten:	
	SWI/SNF (3'-untranslatierte Region)	
	JAAK2-Kinase (falsche Orientierung der cDNA)	
	VAMP2/Synaptobrevin2 (3'-untranslatierte Region)	

Abbildung 14: Tabellarische Zusammenfassung des "yeast-two hybrid screen" mit der carboxy-terminalen Domäne von BOB.1/OBF.1. (A) Auflistung der Eckdaten des "screens" und der gefundenen Interaktionspartner. (B) Beispiele für gefundene Artefakte.

2.2.3. BOB.1/OBF.1 interagiert mit SIAH1

Die 3' untranslatierte Region von SIAH1 enthielt kein Stop-Codon und die cDNA war im richtigen Leseraster zur Gal4-Aktivierungsdomäne, so daß das Protein in Hefen korrekt translatiert wurde. Um eine Interaktion mit der normalerweise untranslatierten Region von SIAH1 auszuschließen, wurde nur die codierende SIAH1-cDNA in den "prey"-Vektor kloniert und zusammen mit dem vorher verwendeten BOB.1/OBF.1-"bait"-Plasmid in HF7c transformiert. Sowohl die Wachstumsselektion als auch der anschließende β -Galactosidase-Assay ergaben eine Interaktion der beiden Proteine (Abbildung 15 oben).

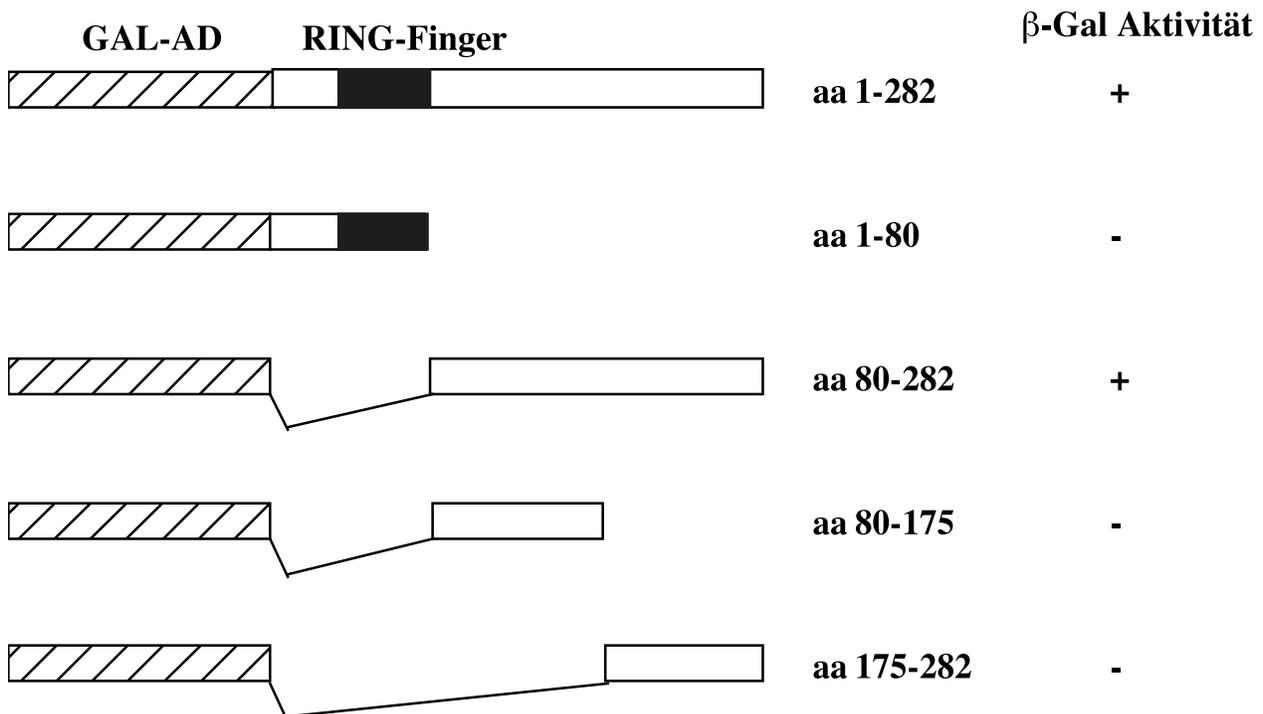


Abbildung 15: Interaktion von BOB.1/OBF.1 mit verschiedenen Fragmenten von SIAH1. Die codierende Sequenz bzw. verschiedene Fragmente von SIAH1 wurden in den "prey"-Vektor kloniert, anschließend zusammen mit dem BOB.1/OBF.1-"bait"-Vektor in HF7c transformiert und die β -Galactosidaseaktivität der Transformanten bestimmt. (AD: Aktivierungsdomäne)

SIAH1 und SIAH2 sind humane Homologe des aus Drosophila bekannten Proteins Sina. Wie dieses besitzen sie einen für Ubiquitin-Ligasen typischen Ring-Finger. Aufgrund dieses Ring-Finger-Motivs können Sina als auch SIAH1 und SIAH2 in zwei funktionelle Untereinheiten

Ergebnisse

aufgeteilt werden - eine amino-terminale, den Ring-Finger beinhaltende, und eine carboxy-terminale Domäne. Die genauere Kartierung der Interaktion von BOB.1/OBF.1 mit SIAH1, erfolgte durch die Subklonierung verschiedener Domänen von SIAH1 in den "prey"-Vektor. Die anschließende Wachstumsselektion und die β -Galactosidase-Aktivität ergab, daß BOB.1/OBF.1 mit dem carboxy-terminalen Bereich von SIAH1 interagiert. Teilt man diese carboxy-terminale Domäne von SIAH1 bei Aminosäure 175, so erfolgt keine Interaktion mehr. Somit ist die gesamte Domäne für eine Interaktion mit BOB.1/OBF.1 notwendig.

Die Interaktion zwischen BOB.1/OBF.1 und SIAH1 sollte in einem Hefe unabhängigen System bestätigt werden. Dazu wurden GST-Fusionsproteine mit den verschiedenen Domänen von SIAH1 kloniert. Die aufgereinigten GST-SIAH1 Proteine wurden mit S³⁵ markiertem, in vitro translatiertem BOB.1/OBF.1-Protein inkubiert und anschließend präzipitiert ("pulldown assay"). Wie die Ergebnisse aus dem Interaktionstest in Hefen bereits vermuten ließen, wird BOB.1/OBF.1 nur von SIAH1 in seiner vollen Länge oder von der carboxy-terminalen Domäne präzipitiert. Die amino-terminale Domäne von SIAH1 interagiert nicht mit BOB.1/OBF.1 (Abbildung 16A Oben). Dieser experimentelle Ansatz wurde anschließend dazu verwendet, die Domänen von BOB.1/OBF.1, die mit SIAH1 interagieren, zu bestimmen. Auch wenn im "yeast-two hybrid assay" der amino-terminale Teil von BOB.1/OBF.1 mit SIAH1 interagiert, wäre eine zusätzliche Interaktion des carboxy-Terminus mit SIAH1 denkbar. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde der amino-Terminus und der carboxy-Terminus von BOB.1/OBF.1 in vitro translatiert und radioaktiv markiert. Die anschließende Präzipitation mit den GST-SIAH1-Fusionsproteinen ergab, daß der carboxy-Terminus von BOB.1/OBF.1 nicht mit SIAH1 interagiert (Abbildung 16A Mitte). Wie erwartet erfolgt eine Interaktion des amino-Terminus von BOB.1/OBF.1 mit dem Gesamtprotein von SIAH1 und dem carboxy-terminalen Fragment (Abbildung 16A unten).

Desweiteren zeigte sich, daß das GST-SIAH1 Protein als auch der carboxy-Terminus von SIAH1 in der Lage sind, natives BOB.1/OBF.1 aus einem Lysat von S194 B-Zellen zu präzipitieren. Das amino-terminale GST-Fusionsprotein hingegen interagiert nicht mehr mit BOB.1/OBF.1 (Abbildung 16B).

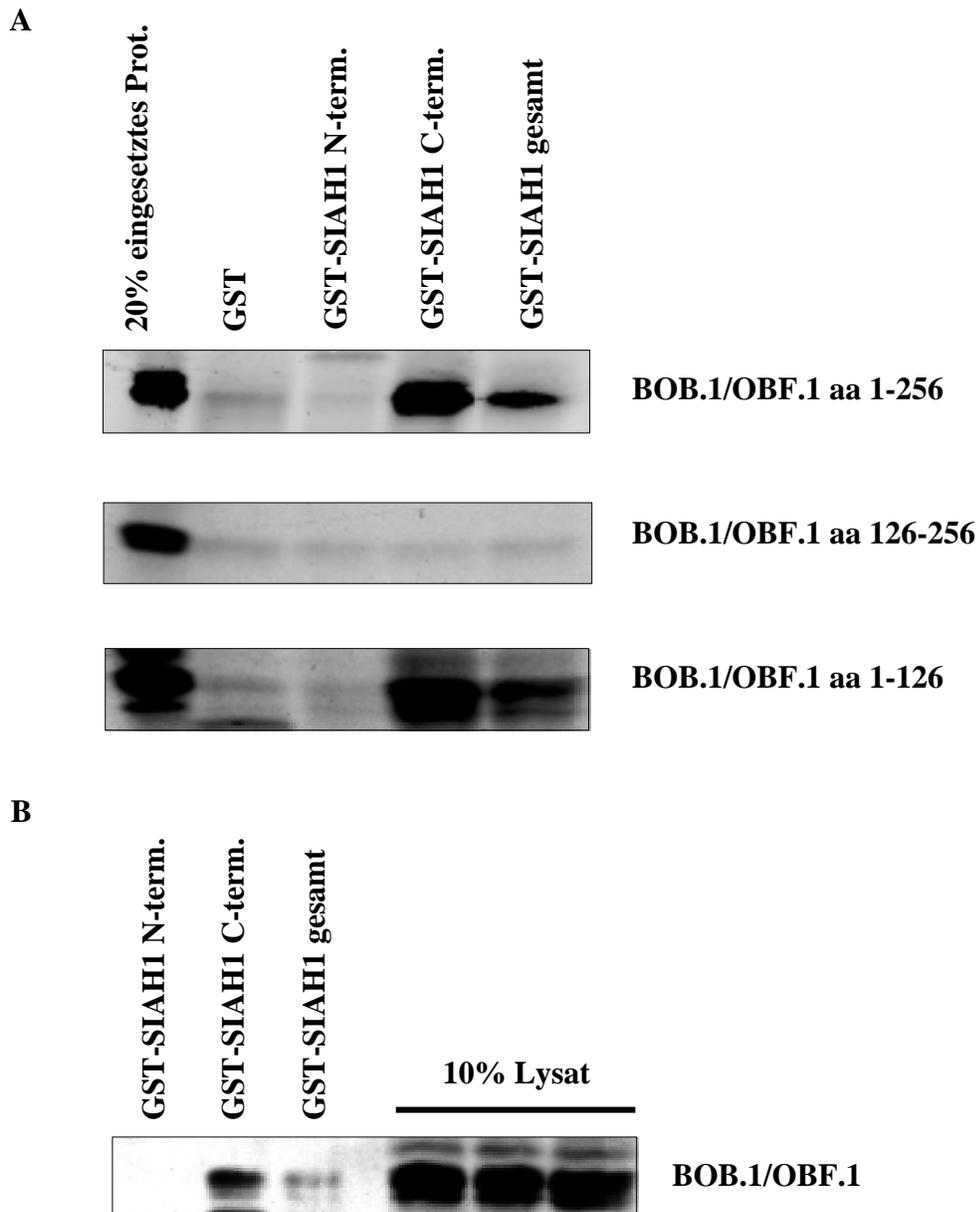


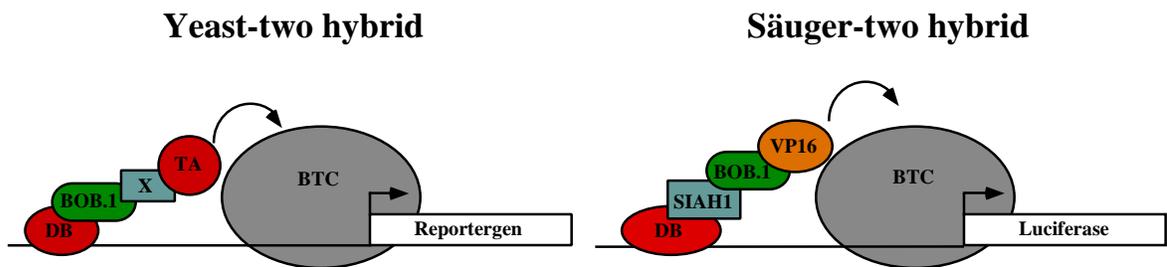
Abbildung 16: BOB.1/OBF.1 und SIAH1 interagieren in vitro. Der amino- und der carboxy-Terminus von SIAH1 als auch das gesamte SIAH1 Protein wurden als GST-Fusionsproteine kloniert, exprimiert und aufgereinigt. (A) Der amino- und der carboxy-Terminus von BOB.1/OBF.1 als auch das gesamte BOB.1/OBF.1-Protein wurden in vitro translatiert, mit S³⁵ markiert und anschließend mit den GST-SIAH1 Proteinen präzipitiert ("pull down"). (B) Der Extrakt der B-Zelllinie S194 wurde mit den verschiedenen GST-SIAH1 Proteinen inkubiert und präzipitiertes BOB.1/OBF.1 im Western-Blot nachgewiesen. (aa: Aminosäuren)

Als nächstes stellte sich die Frage, ob BOB.1/OBF.1 auch in vivo und in Säugerzellen mit SIAH1 interagieren kann. Zu diesem Zweck wurde das System des "Säuger-two hybrid" Systems gewählt (Abbildung 17A). Hierzu wurden die verschiedenen Domänen von SIAH1 als Fusionsproteine mit

Ergebnisse

der Gal4-DNA-Bindungsdomäne kloniert. Der amino-terminale Bereich von BOB.1/OBF.1 wurde als Fusionsprotein mit dem viralen transkriptionellen Aktivator VP16 kloniert. Als Reporter wurde ein Plasmid verwendet, welches Luciferase unter der Kontrolle eines Gal-abhängigen Promotors exprimiert. Transfizierte NIH/3T3 Fibroblasten sollten im Falle einer Interaktion von BOB.1/OBF.1 und SIAH1, wie im "yeast-two hybrid", einen funktionellen Transkriptionsfaktor rekonstituieren, der durch seine Bindung an das Gal-DNA-Motiv im Promotor zur Luciferase-Expression führt.

A



B

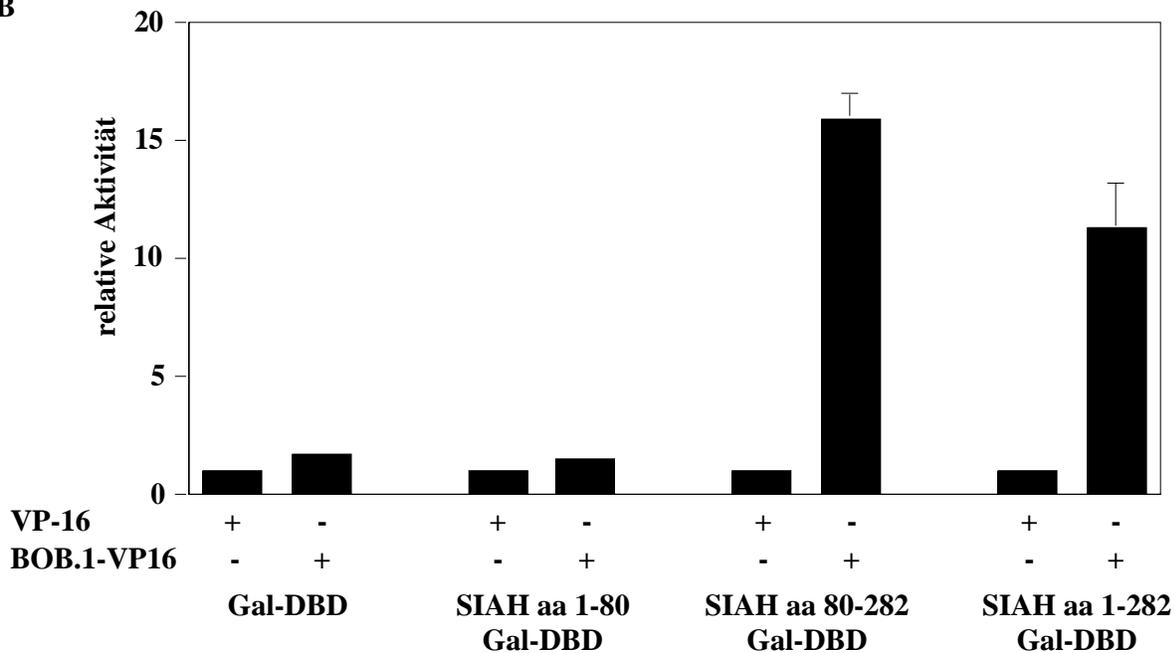


Abbildung 17: BOB.1/OBF.1 und SIAH1 interagieren im "Säuger-two hybrid" System. (A) Prinzip des "Yeast-two hybrid" Systems im Vergleich zum "Säuger-two hybrid" System. Der amino- und der carboxy-Terminus von SIAH1 als auch die gesamte codierende Sequenz für SIAH1 wurden im "Säuger-two hybrid" als Gal4-Fusionsprotein in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert. BOB.1/OBF.1 wurde als Fusionsprotein mit VP16 kloniert. Die Interaktion von SIAH1 und BOB.1/OBF.1 führt zur Transkription der Luciferase. (B) NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit den versch. Gal-SIAH1 Konstrukten, BOB.1/OBF.1-VP16 und einem Luciferase-Reporter unter der Kontrolle eines Gal-abhängigen Promotors transfiziert. Positive Interaktionen können mittels Luciferasemessung identifiziert werden. (DB: DNA-Bindungsdomäne; TA: Transaktivierungsdomäne).

Ergebnisse

Wie erwartet kam es nur im Falle der carboxy-terminalen Domäne und des gesamten SIAH1 Proteins zu einer signifikanten Induktion der Luciferaseaktivität. Die Gal4-DNA-Bindungsdomäne alleine bzw. die Fusion mit der amino-terminalen Domäne von SIAH1 führten zu keiner Induktion der Luciferase (Abbildung 17B).

Wenn BOB.1/OBF.1 und SIAH1, wie gezeigt, in Säugerzellen interagieren, so sollten sie auch in der Zelle kolokalisiert sein. Dieser Hypothese wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz nachgegangen. Transfiziert man BOB.1/OBF.1 in NIH/3T3, so ergibt sich eine Färbung des Kerns als auch des Cytoplasmas (Ergebnis nicht gezeigt). Die Färbung von Flag-markiertem SIAH1 ergab ein gesprenkeltes Muster sowohl im Kern als auch im Cytoplasma (Abbildung 18B).

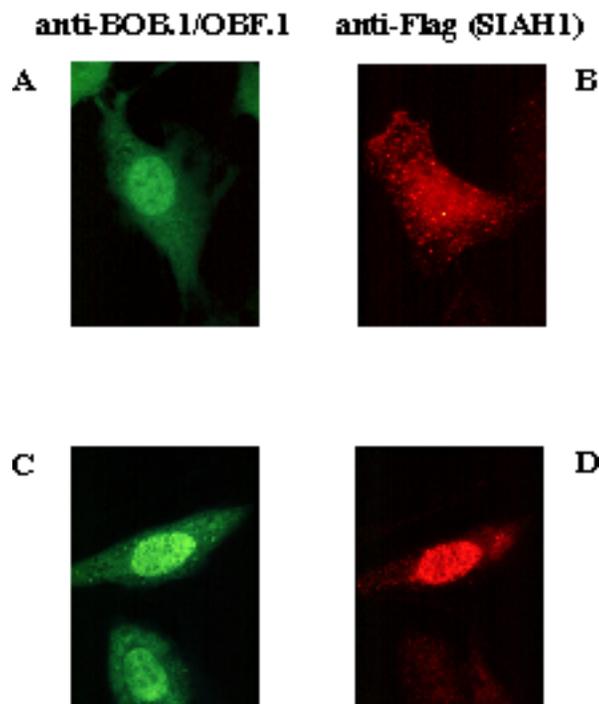


Abbildung 18: NLS-BOB.1/OBF.1 ist in der Lage die subzelluläre Lokalisation von SIAH1 zu ändern. NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit (A) NLS-BOB.1/OBF.1, (B) Flag-SIAH1 oder (C,D) beiden zusammen transfiziert. Die anschließende Immunfluoreszenz erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen BOB.1/OBF.1 und FLAG-markiertem SIAH1.

In Kotransfektionen von BOB.1/OBF.1 und Flag-SIAH zeigte sich eine partielle Kollokalisierung der beiden Proteine, d.h. BOB.1/OBF.1 zeigte ebenfalls ein gesprenkeltes Lokalisationsmuster (Ergebnisse nicht gezeigt). Um einen deutlicheren Effekt in der Kollokalisierung der beiden Proteine zu erhalten wurde eine Kernlokalisationssequenz (NLS, nuclear localization sequence) an BOB.1/OBF.1 kloniert. Das Lokalisationsmuster in der Immunfluoreszenz ergab konsequenterweise eine starke Färbung des Kerns (Abbildung 18A). In Kotransfektionen von NLS-BOB.1/OBF.1 und Flag-SIAH1 ergab sich eine starke Färbung von BOB.1/OBF.1 im Kern (Abbildung 18C). Gleichzeitig zeigte SIAH1 nicht mehr die gesprenkelte Verteilung, sondern translozierte ebenfalls in den Kern (Abbildung 18D). Somit läßt sich die subzelluläre Lokalisation von SIAH1 über die Interaktion mit NLS-BOB.1/OBF.1 ändern.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß der amino-Terminus von BOB.1/OBF.1 mit dem carboxy-Terminus von SIAH1 interagiert. Diese Interaktion konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unabhängig vom "yeast-two hybrid screen" gezeigt werden.

2.2.4. Regulation der BOB.1/OBF.1-Proteinstabilität durch SIAH

Sina, das SIAH Homolog aus *Drosophila*, ist für die Ubiquitylierung und anschließende Degradation von Tramtrack verantwortlich. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, daß sowohl SIAH1 im Falle von DCC (deleted in colon cancer) als auch SIAH2 im Falle von NCoR (nuclear co-repressor) in der Lage sind, Proteindegradation zu vermitteln (Hu et al., 1997b; Zhang et al., 1998a). Ausgehend von diesen Befunden lag die Vermutung nahe, daß die Interaktion von SIAH1 mit BOB.1/OBF.1 zu einer BOB.1/OBF.1-Degradation führen könnte.

Diese Hypothese wurde in einem Kotransfektionsexperiment von BOB.1/OBF.1 und HA-Epitop markiertem SIAH1 (HA-SIAH1) in NIH/3T3 Fibroblasten überprüft. Zusätzlich transfiziertes MyoD diente hierbei als Transfektionsabgleich und Transfektionskontrolle. Aus den transfizierten Zellen wurde sowohl Protein für Western-Blot Analysen als auch RNA für Northern-Blot Analysen

Ergebnisse

präpariert. Gleicht man die exprimierten Proteinmengen für MyoD ab, so erhält man nach Kofunktions von SIAH1 eine deutliche Reduktion der BOB.1/OBF.1-Proteinmenge (Abbildung 19A). Im Gegensatz zum BOB.1/OBF.1-Protein verändert sich die Expression der BOB.1/OBF.1 RNA nicht (Abbildung 19B).

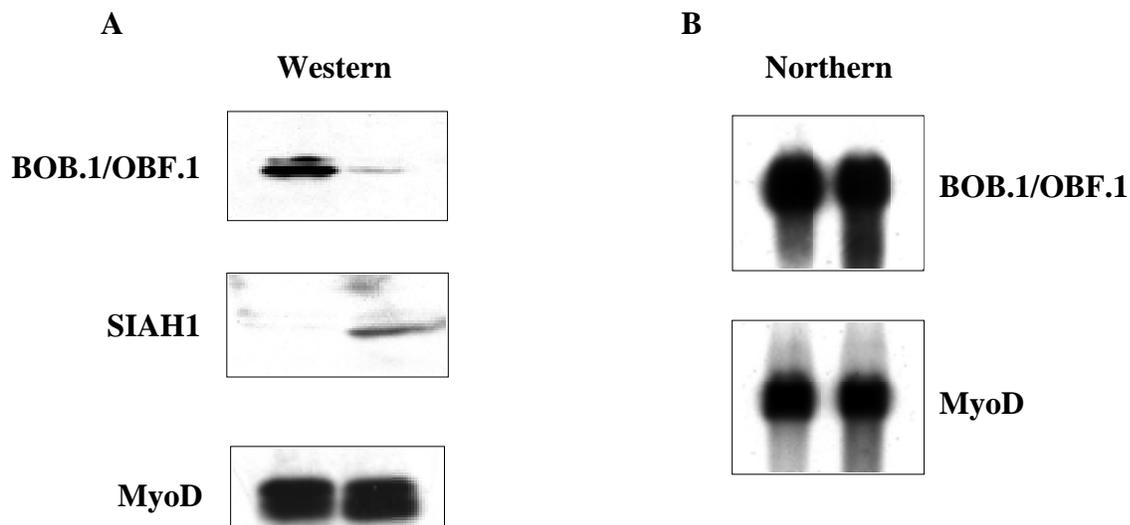


Abbildung 19: Die Interaktion von BOB.1/OBF.1 und SIAH1 führt zu einem Abbau des BOB.1/OBF.1-Proteins. NIH/3T3 wurden mit Expressionsplasmiden für BOB.1/OBF.1, SIAH1 und MyoD transfiziert. Aus den transfizierten Zellen wurde Protein und RNA isoliert und im (A) Western-Blot bzw. im (B) Northern-Blot untersucht. MyoD diente als Ladekontrolle.

Untersuchungen von Sina und SIAH haben gezeigt, daß die carboxy-terminale Domäne für eine Homodimerisierung der Proteine verantwortlich ist. Im Gegensatz zum sehr instabilen SIAH1 Protein, zeigt die carboxy-terminale Domäne eine deutlich gesteigerte Proteinstabilität, da der für die Ubiquitylierung nötige amino-terminale Ring-Finger fehlt (Hu and Fearon, 1999).

Wenn nun BOB.1/OBF.1 spezifisch durch SIAH1 degradiert wird, so sollte die gleichzeitige Überexpression der carboxy-terminalen Domäne von SIAH1 den Effekt einer BOB.1/OBF.1-Stabilisierung haben. Theoretisch sind hierbei zwei Mechanismen denkbar, der carboxy-Terminus von SIAH1 bindet an SIAH1 oder er bindet an BOB.1/OBF.1. In beiden Fällen sollte die Interaktion von BOB.1/OBF.1 und SIAH1-Gesamtprotein verhindert werden.

Ergebnisse

Diese Vermutung wurde erneut mittels Kotransfektionsexperimenten in NIH/3T3 Zellen überprüft. Wie vorher gezeigt, erfolgt eine BOB.1/OBF.1-Proteindegradation, wenn BOB.1/OBF.1 zusammen mit SIAH1 transfiziert wird. Steigende Mengen an kotransfiziertem SIAH1-carboxy-Terminus verhindern jedoch zunehmend diesen BOB.1/OBF.1-Abbau (Abbildung 20).

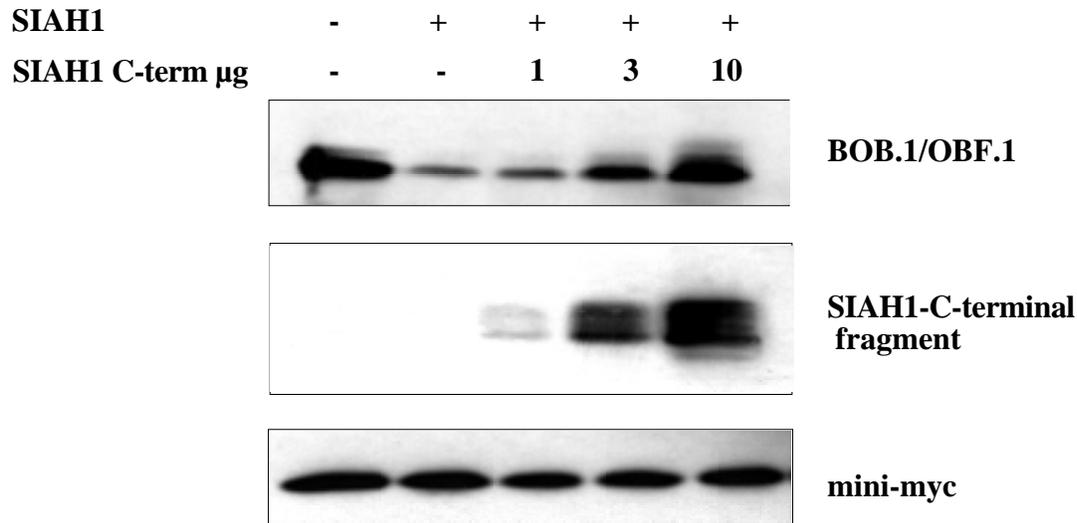


Abbildung 20: Der SIAH1 vermittelte BOB.1/OBF.1-Abbau ist spezifisch blockierbar. NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit Expressionsplasmiden für BOB.1/OBF.1, SIAH1, steigenden Mengen der carboxy-terminalen Domäne von SIAH1 und mini-myc transfiziert. Die Proteinexpression wurde im Western-Blot untersucht. Mini-myc diente als Ladekontrolle.

Um die SIAH1 vermittelte Degradation des BOB.1/OBF.1-Proteins zu quantifizieren, wurde eine Halbwertszeitbestimmung mittels eines „pulse chase“ Experiments durchgeführt. Hierzu wurden NIH/3T3 Fibroblasten mit BOB.1/OBF.1 bzw. BOB.1/OBF.1 und SIAH1 transfiziert. Metabolisch radioaktiv markiertes BOB.1/OBF.1 wurde aus den lysierten Zellen präzipitiert und mittels Phosphor-Imager die Menge an radioaktivem BOB.1/OBF.1 bestimmt.

Die Halbwertszeit von transfiziertem BOB.1/OBF.1 beträgt in NIH/3T3 Zellen 3h und wird durch die Kotransfektion von SIAH1 um den Faktor 2 auf 1,5h reduziert (Abbildung 21 A und B).

Ergebnisse

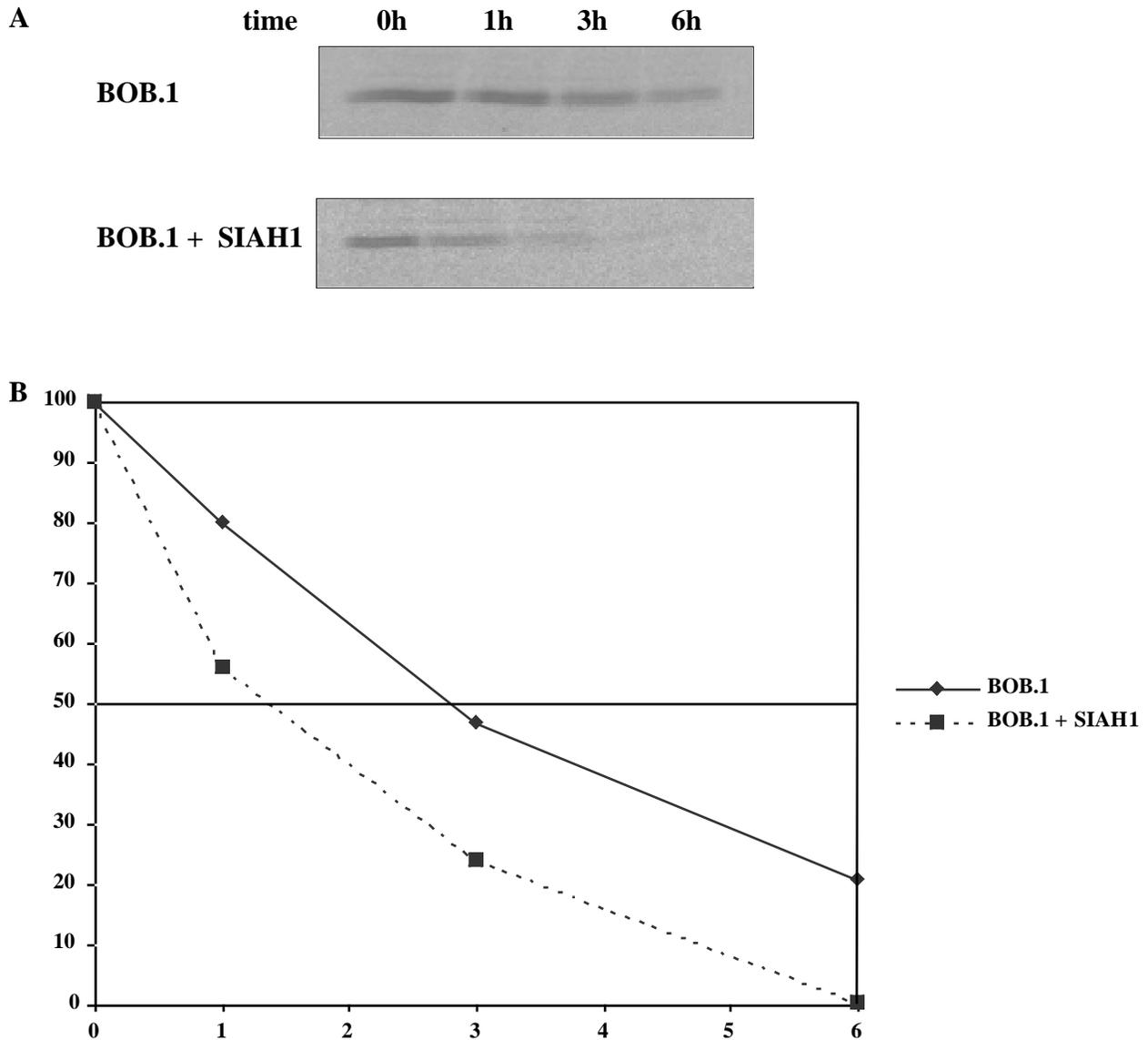
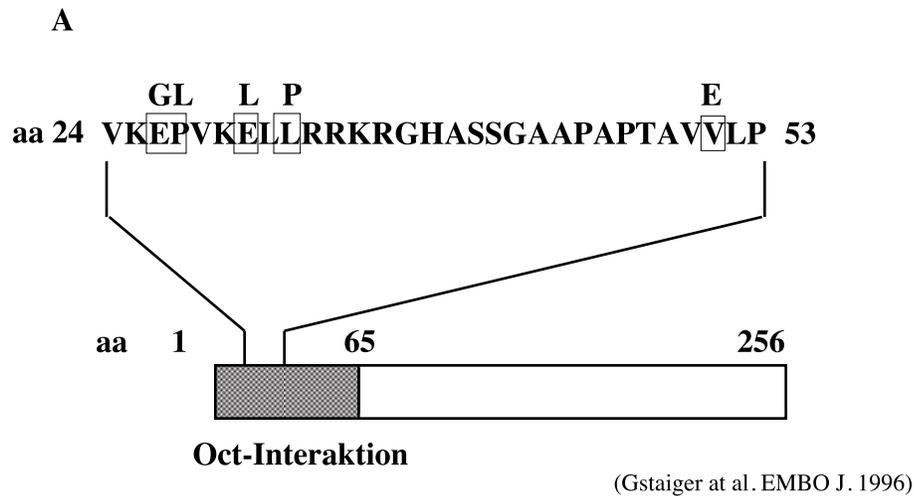


Abbildung 21: SIAH1 reduziert die Halbwertszeit von BOB.1/OBF.1. NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit Expressionsplasmiden für BOB.1/OBF.1 und SIAH1 transfiziert, gefolgt von einer metabolischen Markierung der Proteine. (A) Zu versch. Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert, BOB.1/OBF.1 präzipitiert und im Radiogramm analysiert. (B) Die Quantifizierung der Banden ergab die Halbwertszeiten von BOB.1/OBF.1 +/- SIAH1.

Neben der Interaktion mit SIAH1 ist der amino-terminale Bereich von BOB.1/OBF.1 auch noch für die Interaktion mit der POU-Domäne von Oct1 und Oct2 verantwortlich. Es stellte sich somit die Frage, ob dieselben Aminosäuren in BOB.1/OBF.1 für die Interaktionen mit den beiden Proteinen, SIAH und Oct, verantwortlich sind. In der Vergangenheit wurden Punktmutationen von BOB.1/OBF.1 beschrieben, die spezifisch die Interaktion mit der POU-Domäne verhindern. Besonders Mutationen in einem kurzen, ca. 7-10 Aminosäure langen Stück um die

Ergebnisse

Aminosäureposition 30 zeigen deutliche Effekte (Gstaiger et al., 1996). Mutationen, die jedoch außerhalb dieser Region liegen, wie z.B. Aminosäure 51, zeigen keine Beeinflussung der Interaktion mit der POU-Domäne (Abbildung 22A). Diese Daten wurden später durch röntgenkristallographische Untersuchungen des ternären Komplexes bestätigt (Chasman et al., 1999).



B

transformierte Konstrukte	β-Gal Aktivität
SIAH1 + BOB.1/OBF.1(wt)	+
SIAH1 + BOB.1/OBF.1(L32P)	+
SIAH1 + BOB.1/OBF.1(E30L)	+
SIAH1 + BOB.1/OBF.1(E26G+P27L)	+
SIAH1 + BOB.1/OBF.1(V51E)	-

Abbildung 22: SIAH1 und Oct kontaktieren unterschiedliche Aminosäuren in BOB.1/OBF.1. (A) Punktmutanten in der amino-terminalen Domäne von BOB.1/OBF.1, die nicht mehr mit Oct1 bzw. Oct2 interagieren können. Eine Ausnahme ist hierbei die Punktmutante V51E. (B) Interaktion von SIAH1 mit den verschiedenen Punktmutanten von BOB.1/OBF.1 aus A in HF7c.

Um der oben genannten Fragestellung nachzugehen, wurde SIAH1 in den „bait“-Vektor und die verschiedenen BOB.1/OBF.1-Punktmutanten in den „prey“-Vektor kloniert. Die Interaktion wurde

Ergebnisse

mittels β -Galactosidase-Aktivität in den transformierten Hefen gemessen. Es zeigte sich, daß alle BOB.1/OBF.1-Punktmutanten, die nicht mehr mit der POU-Domäne von Oct interagieren können, noch an SIAH1 binden. Hingegen zeigte die Punktmutante der Aminosäure 51, welche noch an Oct binden kann, keine Interaktion mehr mit SIAH1 (Abbildung 22B).

Somit ließ sich zeigen, daß SIAH1 und Oct unterschiedliche Subdomänen der amino-terminalen Region in BOB.1/OBF.1 kontaktieren.

Wenn die Einführung der Punktmutation an Position 51 in BOB.1/OBF.1 die Interaktion mit SIAH1 verhindert, dann sollte diese Punktmutante auch nicht mehr durch SIAH1 degradiert werden. Zur Beantwortung dieser Hypothese wurden die Punktmutanten E30L, welche noch mit SIAH1 interagiert, und V51E, welche nicht mehr mit SIAH1 interagiert, in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert. In Kotransfektionsexperimenten mit SIAH1 und einem Kontrollprotein wurde in NIH/3T3 Fibroblasten die BOB.1/OBF.1-Degradation untersucht. Wie erwartet erfolgt ein Abbau von wildtypischem BOB.1/OBF.1 als auch von der Punktmutante E30L. Dieser Abbau ist abhängig von der kotransfizierten Menge an SIAH1 (Abbildung 23). Die Punktmutante V51E, welche im "yeast-two hybrid assay" keine Interaktion mehr mit SIAH1 zeigte, wird hingegen wie erwartet nicht mehr degradiert (Abbildung 23).

Auch wenn Oct und SIAH1 unterschiedliche Subdomänen von BOB.1/OBF.1 kontaktieren, könnte die Bindung des einen Partners über eine sterische Behinderung die Bindung des anderen Partners verhindern. In Anlehnung an Abbildung 20, sollte in mit BOB.1/OBF.1 und SIAH1 transfizierten NIH/3T3 Zellen steigende Mengen an Oct2-Protein die Bindung von BOB.1/OBF.1 an SIAH1 verhindern und konsequenterweise die BOB.1/OBF.1-Proteindegradation blockieren. Es zeigte sich jedoch, daß die BOB.1/OBF.1-Proteinstabilität mit zunehmender Menge an kotransfiziertem Oct2 nicht beeinflußt wurde (Ergebnis nicht gezeigt). Somit erfolgt die Kontrolle der Degradation durch SIAH1 nicht über die Menge an Oct1 oder Oct2.

Ergebnisse

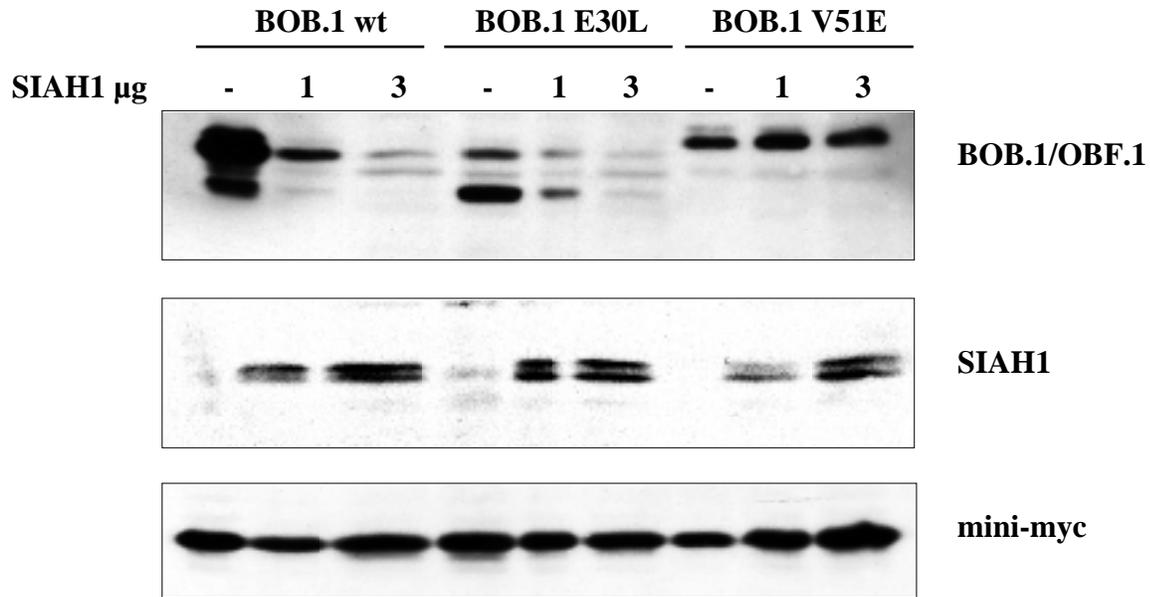


Abbildung 23: Die BOB.1/OBF.1-Punktmutante V51E wird nicht mehr von SIAH1 abgebaut. Die BOB.1/OBF.1-Punktmutanten E30L und V51E sowie wildtypisches BOB.1/OBF.1 wurden in eukaryontische Expressionsvektoren kloniert und in NIH/3T3 zusammen mit SIAH1 kotransfiziert. Anschließend wurden die Zell-Lysate im Western-Blot analysiert.

Frühere Publikationen zeigten, daß in der von Sina und SIAH1 vermittelten Proteindegradation das Proteasom beteiligt ist (Hu et al., 1997b; Li et al., 1997; Tang et al., 1997; Zhang et al., 1998a). Um der Fragestellung nachzugehen, ob die durch SIAH1 vermittelte BOB.1/OBF.1-Proteindegradation ebenfalls über den Proteasomenkomplex läuft, wurde der Proteasomen-Inhibitor MG132 verwendet. NIH/3T3 Fibroblasten wurden hierfür mit BOB.1/OBF.1 und SIAH1 kotransfiziert und anschließend für 6h mit MG132 inkubiert. Durch den Proteasomen-Inhibitor ließ sich die SIAH1 vermittelte BOB.1/OBF.1-Degradation zu ca. 50% verhindern (Abbildung 24). Somit vermittelt SIAH1 als Ubiquitin-Ligase vermutlich eine über das Proteasom vermittelte BOB.1/OBF.1-Proteindegradation.

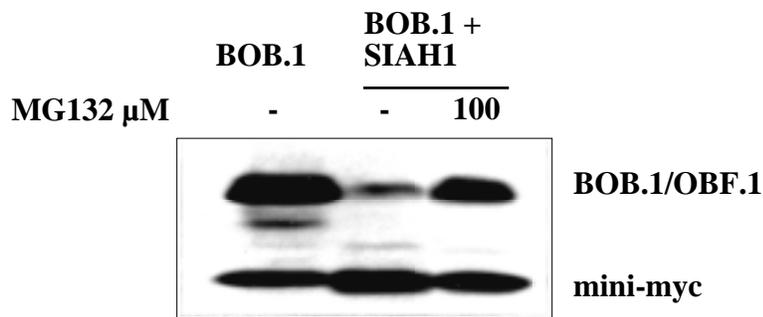


Abbildung 24: Der Proteinabbau von BOB.1/OBF.1 ist Proteasomen-abhängig. NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit Expressionsvektoren für BOB.1/OBF.1 und SIAH1 transfiziert. Nach 6h Inkubation mit MG132 wurden die Zellen lysiert und die Proteinmengen im Western-Blot analysiert.

2.2.5. Die Aktivierung des B-Zellrezeptors führt zur BOB.1/OBF.1-Proteindegradation durch SIAH1

Im Zuge der B-Zellreifung in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe, kommt es wiederholt zu einer Aktivierung des B-Zellrezeptors. Die B-Zelllinie Ramos stammt von Keimzentrum B-Zellen ab. Ziel war es die Auswirkung der BOB.1/OBF.1-Expression nach Stimulation des B-Zellrezeptors zu untersuchen und zu klären, ob die durch SIAH1 vermittelte BOB.1/OBF.1-Degradation hierdurch beeinflusst wird. Um die Aktivierung des B-Zellrezeptors nachzuahmen, wurden Ramos B-Zellen mit anti-IgM Antikörpern inkubiert. Hierbei zeigte sich, daß die BOB.1/OBF.1-Proteinmenge nach 12h Inkubation mit anti-IgM deutlich reduziert war (Abbildung 25).

Wie in Abbildung 24 gezeigt, ist die SIAH1 vermittelte BOB.1/OBF.1-Degradation Proteasomen-abhängig. Sollte die verminderte BOB.1/OBF.1-Proteinmenge in Ramos B-Zellen nach anti-IgM Inkubation durch SIAH1 vermittelt werden, so muß eine Sensitivität gegenüber MG132 vorliegen. Die gleichzeitige Inkubation von Ramos B-Zellen mit anti-IgM und MG132 blockierte den BOB.1/OBF.1-Abbau und bestätigte die Vermutung einer SIAH1-abhängigen Degradation (Abbildung 25).

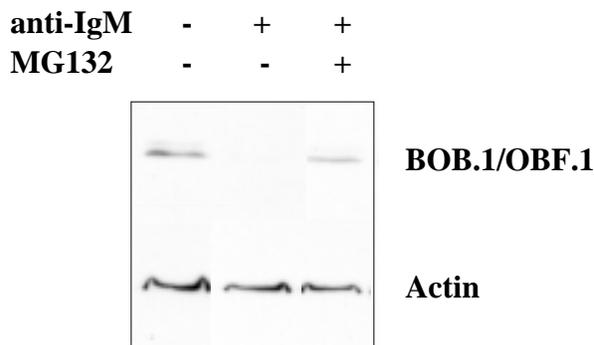


Abbildung 25: Die Aktivierung des B-Zellrezeptors in Ramos B-Zellen führt zu einer Proteasomen-abhängigen Degradation von BOB.1/OBF.1. Ramos B-Zellen wurden mit anti-IgM bzw. anti-IgM und MG132 inkubiert. Die Zell-Lysate wurden anschließend im Western-Blot analysiert (die Abbildung entstand in Kooperation mit Y. He vom NIH).

Erst die Etablierung dieses Systems der BOB.1/OBF.1-Degradation mittels Aktivierung des B-Zellrezeptors erlaubte eine genaue Untersuchung der BOB.1/OBF.1-Degradation durch SIAH mit endogen exprimiertem Protein. Potentiell mögliche Artefakte, die in Folge der Überexpression von Proteinen in Zellen entstehen können, sind somit reduziert bzw. ganz ausgeschlossen.

Nach der Aktivierung des B-Zellrezeptors könnte es zu einer de novo Synthese von SIAH1 oder alternativ zu einer Aktivierung des SIAH1 Proteins kommen. Da kein SIAH1-Antikörper existiert, der endogenes SIAH1 Protein detektieren kann, ließ sich diese Frage nicht in letzter Konsequenz klären. Jedoch kann mittels LightCycler die Menge an SIAH1-Transkript und somit die Hypothese der Neusynthese untersucht werden. Aus unstimulierten und stimulierten Ramos B-Zellen wurde Protein und RNA, welche anschließend in cDNA umgeschrieben wurde, gewonnen. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Stimulation diente die Degradation von BOB.1/OBF.1-Protein (Abbildung 26A). Die LightCycler PCR wurde über die Expression des Haushaltgens PBGD abgeglichen. Die anschließende Bestimmung der BOB.1/OBF.1-Transkriptmenge ergab eine Induktion um den Faktor 2 in aktivierten Ramos B-Zellen (Abbildung 26B). Somit ist die Reduktion der

Ergebnisse

BOB.1/OBF.1-Proteinmenge nicht mit einer verminderten Transkription von BOB.1/OBF.1 zu erklären.

Die Menge an SIAH1 spezifischem Transkript wird nach der Stimulation um den Faktor 3 bis 4 erhöht, womit die Hypothese der Neusynthese bestätigt werden kann (Abbildung 26B).

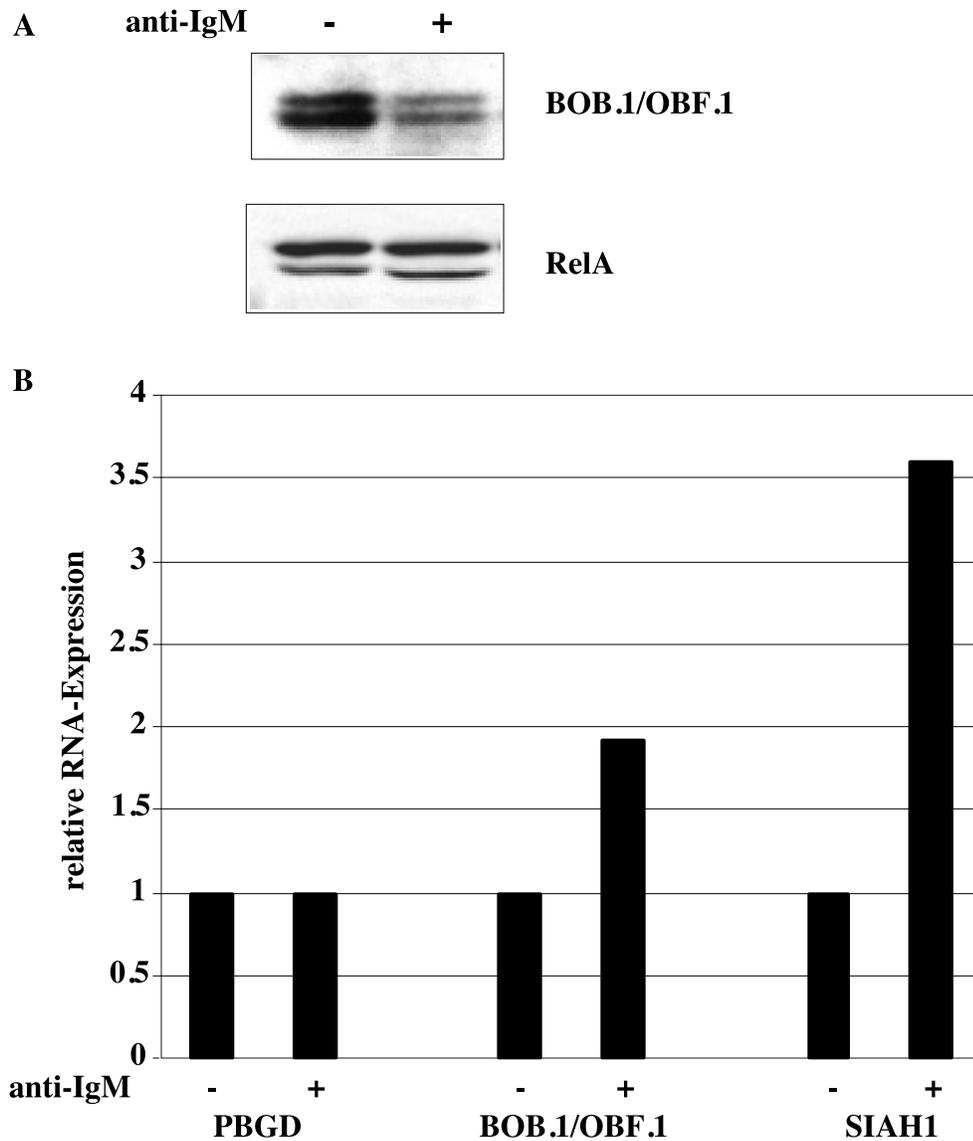


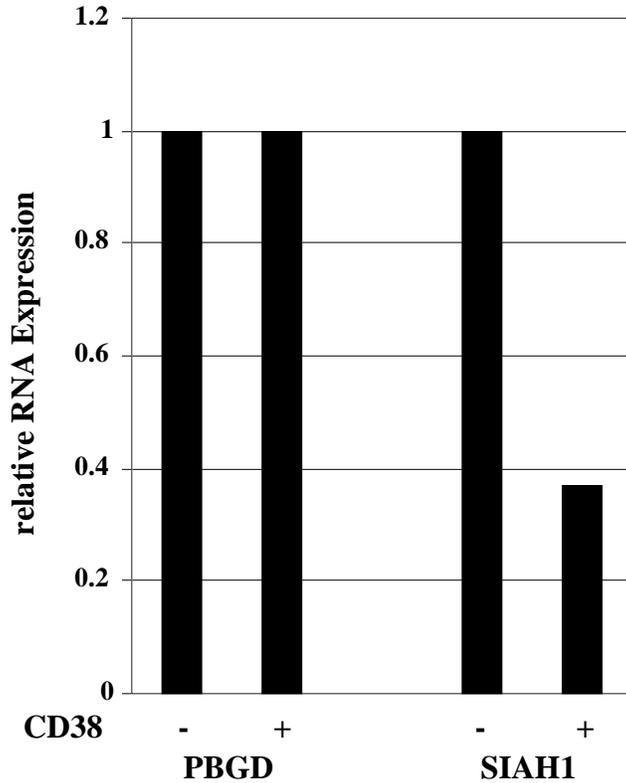
Abbildung 26: Die Aktivierung des B-Zellrezeptors führt zu einer Induktion von SIAH1. Ramos B-Zellen wurden mit anti-IgM inkubiert und anschließend Protein und RNA isoliert. (A) Die Proteinextrakte wurden im Western-Blot analysiert. (B) Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend die relative Expression von PBGD, BOB.1/OBF.1 und SIAH1 im LightCycler bestimmt. PBGD diente zum Abgleich.

Ergebnisse

Anders als in Ramos B-Zellen erfolgt, wie in Abbildung 12 gezeigt, in stimulierten primären B-Zellen des Keimzentrums eine Induktion der BOB.1/OBF.1-Expression. Um der Frage nachzugehen, ob auch diese Expression mit einer Regulation von SIAH1 einhergeht, wurden die cDNAs von CD38⁻ und CD38⁺ B-Zellen des Keimzentrums mittels LightCycler-PCR auf die Expression von SIAH1 untersucht. CD38⁺ B-Zellen die im Western-Blot eine deutlich höhere BOB.1/OBF.1-Expression hatten (Abbildung 12), zeigten eine gleichzeitige Reduktion der Expression des SIAH1-Transkriptes um den Faktor 2,7 (Abbildung 27A). Somit erfolgt in den primären B-Zellen des Keimzentrums ebenso wie in den Ramos B-Zellen eine reziproke Regulation von BOB.1/OBF.1 und SIAH1.

Neben der Regulation der SIAH1-Expression, wäre eine Regulation der Interaktion zwischen BOB.1/OBF.1 und SIAH1 denkbar. So könnte z.B. nach Phosphorylierung eines der beiden Proteine die Interaktion mit dem Partner unterbleiben, wodurch es zu einer Proteinstabilisierung von BOB.1/OBF.1 käme. Um diese potentielle Möglichkeit zu untersuchen, wurden die Lysate von CD38⁻ und CD38⁺ B-Zellen mit den GST-SIAH1-Fusionsproteinen (siehe Abbildung 16) gemischt. Wenn BOB.1/OBF.1 in CD38⁺ B-Zellen so modifiziert wäre, daß es nicht mehr mit SIAH1 interagieren könnte, so sollte in GST-Präzipitationen BOB.1/OBF.1 aus dem CD38⁺-Lysat nicht mehr kopräzipitiert werden. Wie in Abbildung 27B gezeigt ist dies nicht der Fall. Aus beiden B-Zellpopulationen läßt sich mit dem carboxy-Terminus von SIAH1 das BOB.1/OBF.1-Protein präzipitieren. Der amino-Terminus von SIAH1 diene hierbei als Negativ-Kontrolle. Wie vorher erwähnt gibt es zur Zeit keinen SIAH1-Antikörper, so daß die Frage nach einer Modifikation von SIAH1 in CD38⁺ B-Zellen offen bleiben muß. Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die BOB.1/OBF.1-Proteinstabilität in B-Zellen u.a. durch die transkriptionelle Expression von SIAH1 reguliert wird.

A



B

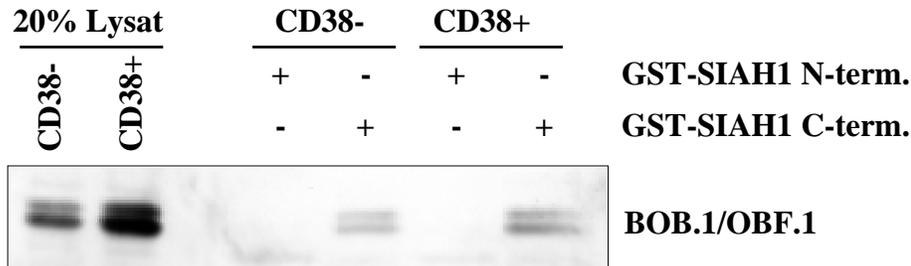


Abbildung 27: SIAH1 wird in B-Zellen des Keimzentrums transkriptionell reguliert. (A) cDNA von primären CD38⁻ und CD38⁺ B-Zellen wurden auf SIAH1 Expression im LightCycler untersucht. PBGD diente dem Abgleich. (B) BOB.1/OBF.1 und SIAH1 interagieren auch in CD38⁺ B-Zelllysaten miteinander. Lysate von CD38⁻ und CD38⁺ B-Zellen wurden mit GST-SIAH-Fusionsproteinen inkubiert und präzipitiert. Kopräzipitiertes BOB.1/OBF.1 wurde mittels Western-Blot analysiert.

Wie in der Einleitung dargestellt, ist Sina für die R7 Entwicklung notwendig. Die genaue Analyse des dazu notwendigen Signaltransduktionsweges zeigte eine Aktivierung des Sev-Rezeptors und nachgeschaltet eine Kaskade verschiedener Proteinkinasen. Diese Signalkaskade von Drosophila hat ihr Pendant im mitogenen Signaltransduktionsweg von Säugerzellen, welcher u.a. auch nach der Stimulation des B-Zellrezeptors aktiviert wird (DeFranco, 1997). Ausgehend von den Daten in

Ergebnisse

Drosophila sollte untersucht werden, ob die SIAH1 vermittelte BOB.1/OBF.1-Degradation über die Aktivierung der mitogenen Kaskade läuft. Hierzu wurden Ramos B-Zellen mit anti-IgM und PD98059, einem Inhibitor der MEK-Aktivierung, inkubiert. Die Gabe des Inhibitors ändert an der BOB.1/OBF.1-Proteinmenge nichts (Abbildung 28). Wie bereits vorher gezeigt erfolgt ein BOB.1/OBF.1-Abbau nach Stimulation der Ramos B-Zellen mit anti-IgM. Blockiert man jedoch die mitogene Signaltransduktion auf Höhe der MEK, so erfolgt ein Block in der BOB.1/OBF.1-Proteindegradation (Abbildung 28).

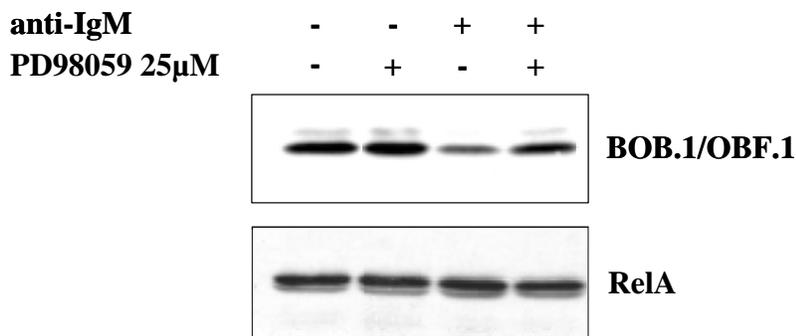


Abbildung 28: Die SIAH1 vermittelte BOB.1/OBF.1-Degradation erfolgt nach Aktivierung der mitogenen Kaskade. Ramos B-Zellen wurden mit anti-IgM bzw. mit anti-IgM und dem Inhibitor PD98059 inkubiert. BOB.1/OBF.1 wurde im Western-Blot nachgewiesen. RelA diente als Ladekontrolle.

Somit ergibt sich in Ramos B-Zellen das folgende Bild, die Aktivierung des B-Zellrezeptors führt zu einer nachfolgenden Aktivierung der mitogenen Signaltransduktionskaskade welche die SIAH1 vermittelte BOB.1/OBF.1-Degradation unter Beteiligung des Proteasoms nach sich zieht.

Fusionsproteine der carboxy-terminalen Aminosäuren 126-256 von BOB.1/OBF.1 mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne zeigten in der Vergangenheit in Gal-abhängigen Reporterassays in Jurkat T-Zellen keine Aktivität. Erst nach Stimulation der transfizierten T-Zellen mit PMA und Ionomycin erfolgte eine Phosphorylierung der Serine 184, 188 und 189. Diese Phosphorylierung ist für die transkriptionelle Aktivität der Gal-BOB.1/OBF.1-Fusionsproteine notwendig. Um die Notwendigkeit der Phosphorylierung zu beweisen, wurden die Serine durch Alanin bzw. durch Glutaminsäure ersetzt. Die Alaninmutanten zeigten keine induzierbare Aktivität mehr. Die

Ergebnisse

Glutaminmutanten hingegen, welche durch die negative Ladung den Phosphorylierungszustand imitierten, zeigten eine erhöhte Aktivität in Jurkat T-Zellen nach Stimulation mit Ionomycin und PMA. Als entscheidend ergab sich die Phosphorylierung an der Position 184. Die benötigte BOB.1/OBF.1-Kinase ist unbekannt. Da nach Rezeptorstimulation in B-Zellen verschiedene Kinasen, wie die der mitogenen Kaskade, aktiviert werden, wurde die Auswirkung der BOB.1/OBF.1-Phosphorylierung gegenüber dem SIAH1 vermittelten Abbau untersucht. Die Punktmutationen wurden hierzu in die cDNA von BOB.1/OBF.1 eingeführt, so daß das Gesamtprotein und nicht nur der carboxy-terminale Bereich exprimiert werden konnte (Abbildung 29 A). NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit den verschiedenen BOB.1/OBF.1-Punktmutanten und SIAH1 kotransfiziert. Unabhängig von der eingeführten Mutation erfolgte in allen Fällen eine Degradation des Proteins durch SIAH1 (Abbildung 29B).

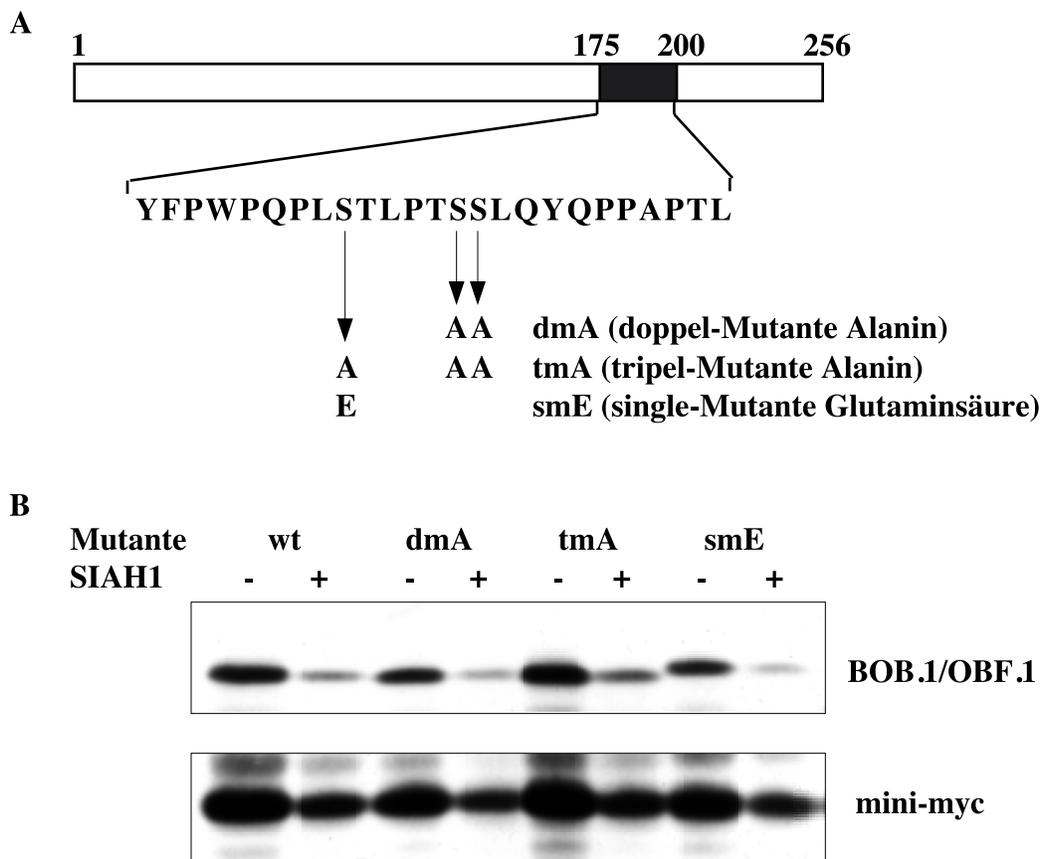


Abbildung 29: Die Mutation der Serine 184, 188 und 189 ändert nichts am Abbau durch SIAH1. (A) Schematische Darstellung der in BOB.1/OBF.1 eingeführten Mutationen. (B) NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit Expressionsvektoren der versch. Serin-Mutanten von BOB.1/OBF.1 und mit SIAH1 transfiziert. Kotransfiziertes mini-myc diente später als Ladekontrolle. Der Abbau wurde im Western-Blot analysiert.

Ergebnisse

Um die in den Gal-BOB.1/OBF.1-Fusionsproteinen gewonnenen Daten für die Mutationen im Gesamtprotein zu bestätigen, erfolgte eine Transfektion von NIH/3T3 Zellen mit den Reporterkonstrukten 4xOct und 4xmut.Oct.

Die Kontroll-Transfektionen der Gal-Fusionsproteinen mit der Verwendung eines Luciferase-Reporters unter der Kontrolle von Gal-Bindungsmotiven im Promotor, ergaben die erwarteten Ergebnisse. Der carboxy-Terminus war in der wildtypischen Form um den Faktor 50 gegenüber der Gal4-DNA-Bindungsdomäne induziert (Abbildung 30A). Die Alaninmutation der Serine 188 und 189 reduzierten die Aktivität drastisch und die zusätzliche Mutation des Serins 184 ergab eine Reduktion auf den Basalwert. Die Einführung eines Glutamatrestes an der Position 184 imitierte den Phosphorylierungszustand und ergab eine auf den Faktor 130 zusätzlich gesteigerte transkriptionelle Aktivität

Ganz anders verhielten sich jedoch die Punktmutanten des BOB.1/OBF.1-Gesamtproteins. Unter der Verwendung von 4xOct (enthält ein Luciferasegen unter der Kontrolle eines Promotors mit 4 Octamer-motiven) und 4xmut.Oct (die Octamer-motive sind mutiert) erfolgte die Transfektion in NIH/3T3 Fibroblasten. Hier zeigte keine der Alaninmutanten eine reduzierte Aktivität gegenüber der wildtypischen Form (Abbildung 30B). Die Tripelmutante der Serine 184, 188 und 189 zeigte im Gegenteil sogar eine erhöhte Aktivität. Die Einführung eines Glutamatrestes an der Position 184 zeigte im Gegensatz zu den Gal-Fusionsproteinen keine erhöhte Aktivität. Als Kontrolle dieses Experiments wurde eine carboxy-terminal deletierte Form von BOB.1/OBF.1 verwendet (delta C-term.), welche eine reduzierte Aktivität besitzt (Luo et al., 1998 und Abbildung 30B).

Worin die Unterschiede zwischen den Gal-BOB.1/OBF.1 Fusionsproteinen und den BOB.1/OBF.1-Gesamtproteinen begründet sind, ist unklar, jedoch stellt dieses Ergebnis die Notwendigkeit der Phosphorylierung für die transkriptionelle Aktivität von BOB.1/OBF.1 in Frage.

Ergebnisse

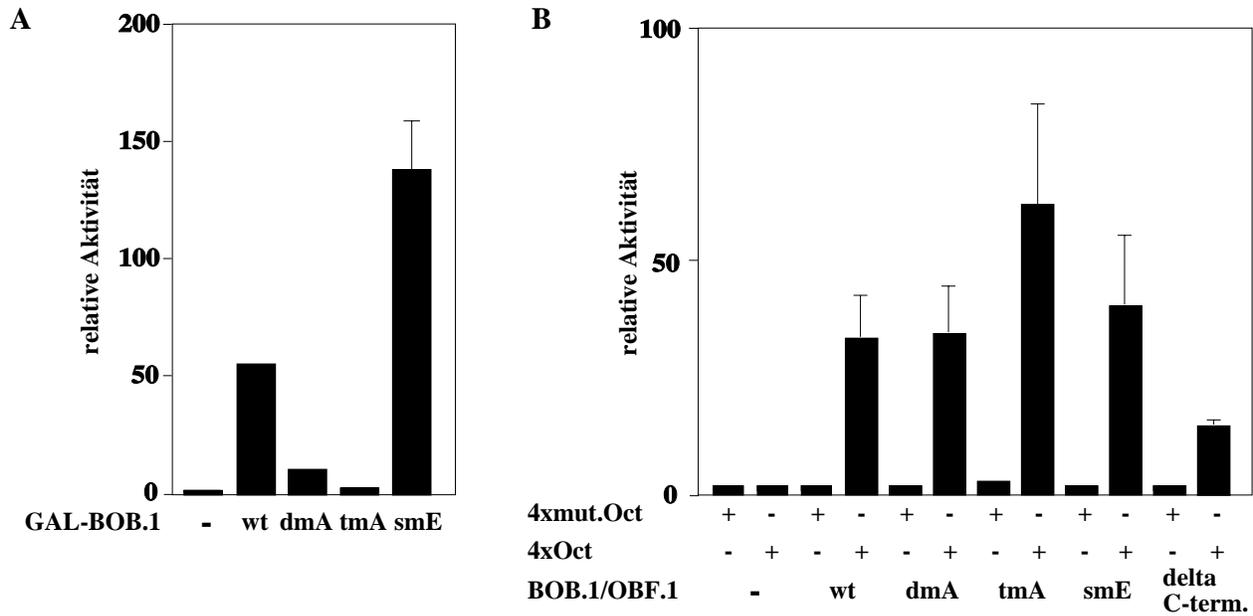


Abbildung 30: Die Serin-Mutanten zeigen keinen transkriptionellen Effekt. NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit den Serinmutationen im carboxy-Terminus als (A) Gal-Fusionsprotein transfiziert. Als Reporter wurde ein Luciferasekonstrukt mit einem Gal-abhängigen Reporter verwendet. (B) Alternativ wurden die Serinmutationen in das BOB.1/OBF.1-Gesamtprotein eingeführt und mit den Reportern 4xmut.Oct und 4xOct transfiziert.

Da BOB.1/OBF.1 ein Kofaktor Octamer-abhängiger Transkription ist, sollte die Interaktion mit SIAH1 und die anschließende BOB.1/OBF.1-Degradation zu einer verminderten Octamer-abhängigen transkriptionellen Aktivität führen. Dieser Fragestellung wurde durch Luciferase-Reporterassays in NIH/3T3 Fibroblasten und Ramos B-Zellen nachgegangen.

Transfiziert man NIH/3T3 Fibroblasten mit BOB.1/OBF.1 und dem Reporter 4xOct, so kommt es unter Beteiligung des endogen exprimierten Oct1 zur Expression von Luciferase (Pfisterer et al., 1995). Steigende Mengen von kotransfiziertem SIAH1 reduzieren hingegen die Luciferaseaktivität in einer Dosisabhängigkeit (Abbildung 31A). Die Spezifität dieser Regulation wurde durch die Kotransfektion eines Luciferasekonstruktes, welches unter der Kontrolle des Haushaltsgen-Promotors Thymidin-Kinase steht, und SIAH1 gezeigt. Die Kotransfektion von SIAH1 hatte keinen Einfluß auf die Luciferaseaktivität (Abbildung 31B).

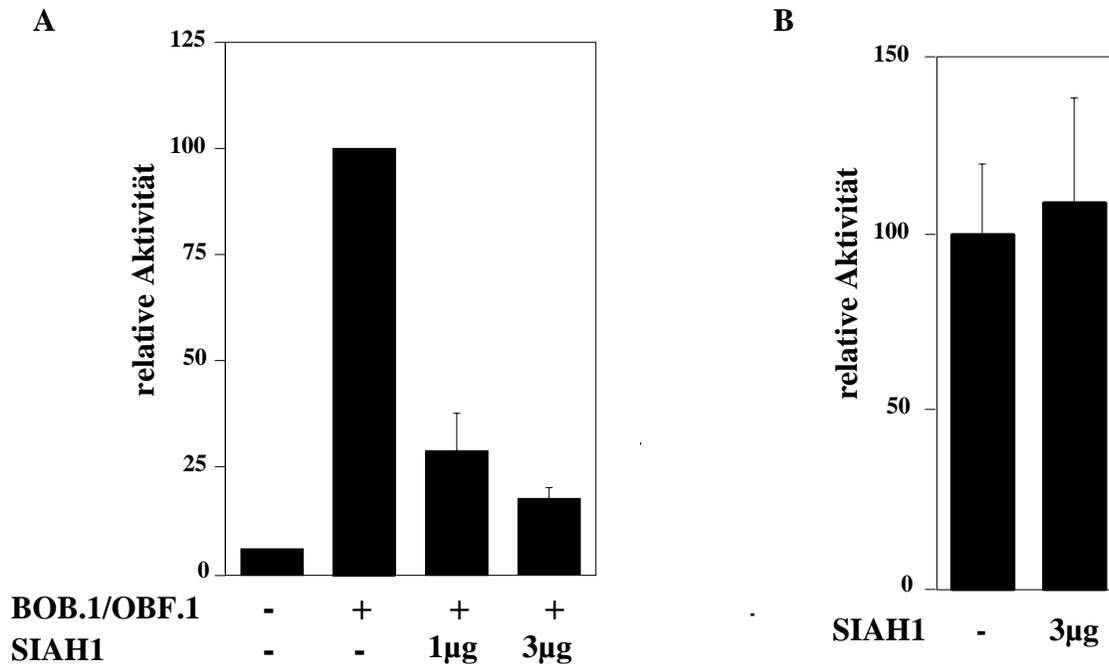


Abbildung 31: SIAH1 vermindert die BOB.1/OBF.1-abhängige Transkription. (A) NIH/3T3 Fibroblasten wurden mit Expressionsplasmiden für BOB.1/OBF.1 und SIAH1 transfiziert. Als Reporter diente 4xOct. 18h später wurde die Luciferaseaktivität gemessen. (B) Kontrolltransfektion von SIAH1 zusammen mit einem Luciferasekonstrukt unter der Kontrolle des Thymidin-Kinase Promotors.

Um die transkriptionelle Aktivierung des nativ exprimierten BOB.1/OBF.1 in Ramos B-Zellen zu untersuchen wurde ein Reporterplasmid (ED) verwendet, welches neben dem Octamermotiv noch zusätzlich E-Box-Motive im Promotor vor dem Luciferasegen besitzt. Diese E-Box Motive führen zu einer erhöhten Basalaktivität des Promotors, wobei die Induktionsfähigkeit durch BOB.1/OBF.1 in Verbindung mit Oct1/2 erhalten bleibt (Pfisterer et al., 1995). Im Kontrollplasmid (Ed) zu ED wurden die Octamer motive im Promotor mutiert, die E-Box-Motive jedoch beibehalten. Transfiziert man Ramos B-Zellen mit diesen Konstrukten, so erhält man abhängig von dem funktionellen Octamermotiv im Promotor eine starke Induktion der Luciferaseaktivität (Abbildung 32A). Dieselben transfizierten Zellen zeigen jedoch eine deutliche Reduktion der Induktion (3-4 fach) nach Inkubation mit anti-IgM (Abbildung 32A). Diese Reduktion war zu erwarten, da BOB.1/OBF.1 wie gezeigt nach anti-IgM Inkubation reduziert wird.

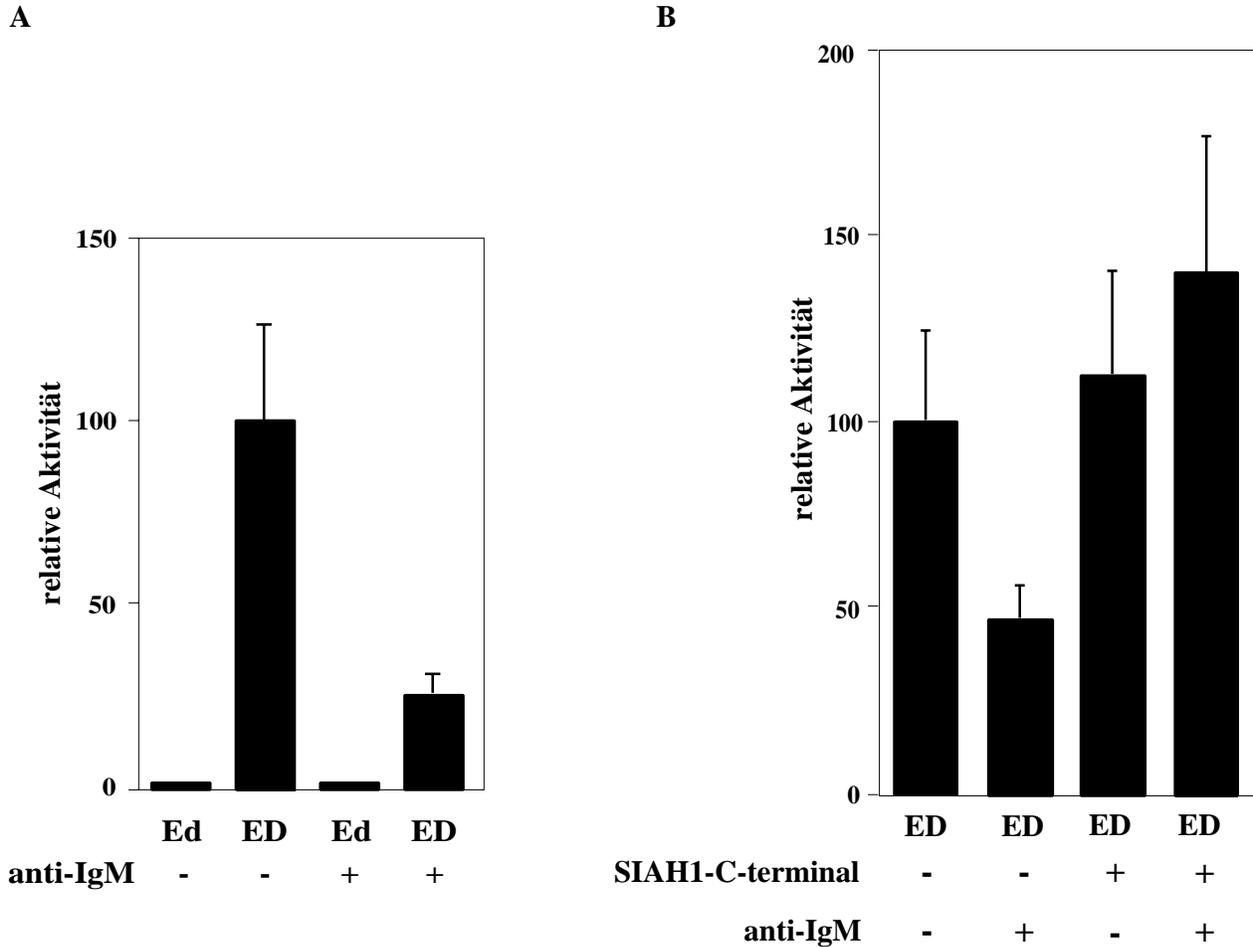


Abbildung 32: Die Stimulation des B-Zellrezeptors vermindert die BOB.1/OBF.1-abhängige Transkription durch SIAH1. (A) Ramos B-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden ED (Octamermotiv im Promotor) und Ed (mutiertes Octamermotiv im Promotor) transfiziert, mit anti-IgM inkubiert und nach 18h die Luciferaseaktivität gemessen. (B) Ramos B-Zellen wurden mit der carboxy-terminalen Domäne von SIAH1 und, wie in A, mit ED transfiziert. Nach Inkubation mit anti-IgM erfolgte nach 18h die Messung der Luciferaseaktivität.

Auch wenn der Mechanismus für die transkriptionelle Regulation auf eine BOB.1/OBF.1-Degradation durch SIAH1 hinweist, beweist er noch nicht, daß die Expression von SIAH1 das Schlüsselereignis nach der Aktivierung des B-Zellrezeptors darstellt. Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, wurde der carboxy-Terminus von SIAH1 kotransfiziert. Wie in Abbildung 20 gezeigt, erfolgt durch die Expression des carboxy-Terminus von SIAH1 ein spezifischer Block in der SIAH1 vermittelten BOB.1/OBF.1-Degradation. Dieser Block der BOB.1/OBF.1-Degradation sollte sich in den Ramos B-Zellen in der Erhaltung der transkriptionellen Aktivität nach anti-IgM Inkubation niederschlagen. Transfizierte Ramos B-Zellen zeigten nach Transfektion

Ergebnisse

von ED und anschließender Inkubation mit anti-IgM die erwartete Reduktion der Luciferaseaktivität (Abbildung 31B). Diese Reduktion der Luciferaseaktivität war in den Kotransfektionen mit dem carboxy-Terminus von SIAH1 nicht mehr zu beobachten (Abbildung 32B).

Die B-Zellrezeptorstimulation führt somit über den mitogenen Signaltransduktionsweg zu einer Degradation von BOB.1/OBF.1 durch SIAH1 und anschließend zu einer verminderten Expression BOB.1/OBF.1-abhängiger Zielgene in Ramos B-Zellen.

3. Diskussion

3.1. Der BOB.1/OBF.1-Promotor

Der transkriptionelle Koaktivator BOB.1/OBF.1 zeigt in B-Zelllinien eine konstitutive Expression. In der T-Zelllinie Jurkat hingegen erfolgt die Expression erst nach Stimulation mit PMA und Ionomycin. Um diese unterschiedliche Expression zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit die transkriptionelle Regulation des BOB.1/OBF.1-Gens untersucht. Hierbei zeigte sich, daß der transkriptionelle Start in B- und T-Zellen identisch ist. Der klonierte BOB.1/OBF.1-Promotor enthält Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren wie CREB, NF-AT und SRY. Transfektionsuntersuchungen ergaben eine B-Zell-spezifische Aktivität des klonierten Promotors, jedoch keine Induzierbarkeit in T-Zellen. In "DNase-Hypersensitivity"-Tests konnten darüber hinaus keine unterschiedlichen Loci erhöhter DNase-Sensitivität in B- versus T-Zellen bzw. in unstimulierten versus stimulierten T-Zellen gefunden werden.

3.1.1. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im BOB.1/OBF.1-Promotor

Die Regulation eines Gens in unterschiedlichen Zellpopulationen kann u.a. über die Verwendung alternativer Promotoren erfolgen. Beispielsweise wird der in der Einleitung (Punkt 1.2) erwähnte Transkriptionsfaktor GATA1 zellspezifisch von einem proximalen (erythroiden) und einem distalen (testikulären) Promotor reguliert (Moroni et al., 1997; Vannucchi et al., 1999). Um die Hypothese einer Regulation über unterschiedliche Promotoren zu untersuchen, wurden die BOB.1/OBF.1-Transkripte von B-Zellen und unstimulierten als auch stimulierten T-Zellen miteinander verglichen. Es zeigte sich, daß alle untersuchten Zelllinien denselben transkriptionellen Startpunkt haben und somit denselben Promotor benutzen.

Diskussion

Die klonierte BOB.1/OBF.1-Promotorregion enthält potentielle Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Die in Abbildung 7 gezeigte Sequenz stammt aus der Maus. Vergleicht man diese Sequenz mit der humanen Sequenz von der Arbeitsgruppe Kerckaert (Galieque Zouitina et al., 1996), so sind die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren CREB, NF-AT und SRY konserviert. Die Bindungsstelle für v-myb hingegen ist nicht konserviert und wird somit im Folgenden nicht weiter besprochen.

Direkt oberhalb der TATA-Box befindet sich die CREB/ATF Bindungsstelle, das sogenannte cAMP-responsive Element (CRE). In Säugern findet man drei Gene die für cAMP-responsive Transkriptionsfaktoren kodieren: CREB, CREM und ATF-1 (Foulkes et al., 1992; Hoeffler et al., 1988; Rehfuss et al., 1991). Alle drei sind in der Lage an das CRE zu binden und zu transaktivieren. CREB, CREM und ATF-1 gehören zur Klasse der "basic-domain-leucine-zipper" Proteine (bZip), welche sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können. Sowohl CREB als auch CREM und ATF-1 kodieren wiederum für verschiedene Isoformen, die durch unterschiedliche transkriptionelle Regulationsmechanismen entstehen. So ist für CREM die Verwendung alternativen Spleißens, alternativer Benutzung von Start-Codons und die alternative Transkription von einem intronischen Promotor bekannt (Sassone-Corsi, 1995).

Neben dem CRE wurde im BOB.1/OBF.1-Promotor weiter 5' eine NF-AT Bindungsstelle charakterisiert. Die NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) Transkriptionsfaktoren bestehen aus vier Familienmitgliedern, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden. Ihre Regulation erfolgt über die Calcium-abhängige Phosphatase Calcineurin. Calcineurin dephosphoryliert NF-AT und ermöglicht so den Transport in den Kern. Demgegenüber erfolgt ein Kernexport nach erneuter Phosphorylierung (zusammengefasst in Rao et al., 1997). NFAT1 wurde sowohl in B- als auch in T-Zellen beschrieben. Interessanterweise zeigen NF-AT1-defiziente Mäuse eine normale Immunkompetenz. Der Phänotyp beschränkte sich auf eine Verstärkung einiger primärer und sekundärer Immunantworten, verbunden mit einer erhöhten Anzahl an Th2-Zellen. Diese Ergebnisse führten zu der Ansicht, daß andere Mitglieder der NF-AT-Familie NF-

AT1 ersetzen können (Xanthoudakis et al., 1996). In vielen NF-AT-Zielgenen, wie IL-2, IL-4, IL-5, GM-CSF etc. liegt in direkter Nachbarschaft der NF-AT Bindungsstelle in 3'-Position eine AP-1-Bindungsstelle (Cockerill et al., 1995; Rao, 1994). NF-AT und AP-1 bilden einen Transkriptionskomplex welcher die Stabilität der Bindung von NF-AT an die DNA deutlich erhöht (Chen et al., 1995; Jain et al., 1993). In dem klonierten BOB.1/OBF.1-Promotor fehlt eine solche AP-1 Bindungsstelle.

Das letzte im BOB.1/OBF.1-Promotor gefundene Consensus-Motiv stellt eine Bindungsstelle für SRY, Sox und andere verwandte Mitglieder der HMG-Box-Familie dar. Es gibt drei Familienmitglieder, die an dieses Motiv binden können und die eine bekannte Rolle in B- bzw. T-Zellen spielen: TCF1 (T cell factor 1), LEF1 (lymphoid enhancer-binding factor 1) und Sox4 (Oosterwegel et al., 1991; Travis et al., 1991; van de Wetering et al., 1993). Während TCF1 ausschließlich in T-Zellen exprimiert wird, findet man LEF1 in den pro- und präB-Zellstadien. TCF1- und LEF1-defiziente Mäuse zeigten, daß beide Faktoren in T-Zellen zum Teil redundante Funktionen haben (Okamura et al., 1998). Der Transkriptionsfaktor Sox4 wird hingegen in B- und in T-Zellen exprimiert. Sox4-defiziente Mäuse sterben bereits embryonal am Tag 14 infolge kardiovaskulärer Defekte. Transferexperimente zeigten, daß Sox4 für die Differenzierung und Expansion von proB-Zellen nötig ist, die T-Zellentwicklung wird hingegen nicht beeinflusst (Schilham et al., 1996).

3.1.2. Potentielle Regulationsmechanismen im BOB.1/OBF.1-Promotor die zu einer Zellspezifität führen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsstudien des BOB.1/OBF.1-Promotors ergaben, daß er wie erwartet eine Zellspezifität für B-Zellen zeigt. In Fibroblasten war er hingegen nicht aktiv. Die Arbeitsgruppe um Roeder an der Rockefeller Universität publizierte den BOB.1/OBF.1-

Promotor mit derselben, hier beschriebenen Sequenz. In ihrer Arbeit fokussierten sich die Autoren auf das CRE und konnten mittels "band-shift" Experimenten eine Bindung an das CRE in B-Zellen als auch in HeLa-Zellen zeigen. Trotz der konstitutiven Bindung des CRE in B- und nicht-B-Zellen war der BOB.1/OBF.1-Promotor, wie auch in der vorliegenden Arbeit beschrieben, zellspezifisch. Desweiteren zeigten sich in Transfektionsstudien, daß das CRE entscheidend für eine vom BOB.1/OBF.1-Promotor vermittelte Gen-Expression ist (Stevens et al., 2000). Wie läßt sich dieser Umstand der Zellspezifität des BOB.1/OBF.1-Promotors erklären?

Die verschiedenen exprimierten Isoformen von CREB/CREM/ATF haben unterschiedliche Auswirkungen auf die CRE-abhängige Transkription. So entsteht z.B. durch alternatives Spleißen von CREM der potente Inhibitor ICER (Molina et al., 1993). Neben der direkten Regulation der Transkription durch Isoformen mittels Bildung von Homo- und Heterodimeren gibt es im Falle von CREB1 in *Aplysia* auch Hinweise darauf, daß die CREB1c-Isoform die Aktivität von Kinasen, welche CREB phosphorylieren, reguliert (Bartsch et al., 1998). Die Phosphorylierung von CREB und CREM ist für die transkriptionelle Transaktivierung essentiell. Sie ermöglicht eine Interaktion mit den Ko-Aktivatoren CBP (CREB-binding protein) und p300 welche mit dem basalen Transkriptionskomplex interagieren (Arany et al., 1995; Arias et al., 1994; Chrivia et al., 1993; Kwok et al., 1994; Lundblad et al., 1995; Radhakrishnan et al., 1997).

Das CRE im BOB.1/OBF.1-Promotor bietet mit den oben genannten Daten eine Vielfalt an potentiellen Regulationsmechanismen. In B-Zelllinien könnte eine konstitutiv aktive Form der CREB/ATF-Faktoren vorliegen. Dies könnte z.B. durch eine konstitutive oder veränderte Aktivität der notwendigen Kinasen erfolgen. Die entscheidende Phosphorylierung am Serin 133 in CREB erfolgt normalerweise über die ProteinkinaseA. In B-Zellen hingegen konnte gezeigt werden, daß infolge einer Quervernetzung von Oberflächen-Immunglobulinen die ProteinkinaseC die Phosphorylierung des Serin 133 vermittelt (Xie and Rothstein, 1995). Die Aktivierungswege von CREB-Faktoren zeigen somit zellspezifische Unterschiede.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Expression B- bzw. T-Zell-spezifischer Isoformen. So gibt es Hinweise auf die differentielle Expression von verschiedenen Spleiß-Varianten von ATF in der B-

Diskussion

Zellentwicklung (Pongubala and Atchison, 1995). Desweiteren konnte eine in B-Zellen vermehrt exprimierte Form von ATF, das B-ATF, kloniert werden (Dorsey et al., 1995). In den verschiedenen B-Zelllinien zeigten Raji Burkitt's Lymphomzellen die höchste Expression von B-ATF. Burkitt Lymphome sind gleichzeitig aber auch mit anderen zusammen der Lymphomtyp mit der höchsten Expression von BOB.1/OBF.1 (Greiner et al., 2000). Die CREM Isoform ICER konnte in verschiedenen T-Zelllinien nach Inkubation mit Forskolin nachgewiesen werden. B-Zelllinien hingegen zeigten unter diesen Bedingungen keine ICER-Expression (Bodor et al., 1996). Somit ist eine unterschiedliche Regulation des BOB.1/OBF.1-Promotors in verschiedenen Zelllinien über die differentielle Expression von ICER denkbar.

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung CRE-abhängiger Transkription stellt die Modulation von CBP und p300 dar. Beide Transaktivatoren besitzen die Fähigkeit Histonacetyl-Transferasen (HAT) zu rekrutieren. Hierbei konnte gezeigt werden, daß eine Interaktion von CBP/p300 mit den beiden Histonacetyl-Transferasen p/CAF und p/CIP für die CREB-vermittelte Transkription notwendig ist (Korzus et al., 1998). Neben den HAT und dem basalen Transkriptionskomplex interagiert CBP/p300 noch mit einer Reihe signal-abhängiger Transkriptionsfaktoren. Diese Befunde haben dazu beigetragen CBP/p300 als Integrationsbasis verschiedener zellulärer Signalkaskaden zu betrachten (Goodman and Smolik, 2000).

Eine weitere interessante Regulation CRE-abhängiger Transkription wurde mit der Klonierung des Faktors ACT (activator of CREM in testis) gefunden. Der im Hoden exprimierte Faktor erlaubt eine CRE-abhängige Transkription in Kombination mit CREM jedoch ohne Involvierung von CBP/p300. Hierbei konnte gezeigt werden, daß selbst die Phosphorylierung von CREM nicht mehr notwendig ist (Fimia et al., 1999). ACT stellt jedoch keinen Einzelfall dar, so wurde mit DRAL ein zu 80% homologes Protein beschrieben welches mit Mitgliedern der CREB-Familie interagiert und primär im Herzen exprimiert wird (De Cesare et al., 1999; Genini et al., 1997). Ein für lymphoide Zellen spezifischer ACT-Verwandter ist bisher jedoch noch nicht bekannt.

Im Gegensatz zu CREB handelt es sich bei den Mitgliedern der NF-AT-Familie um weniger ubiquitär exprimierte Faktoren. So werden die Mitglieder NF-AT1, 2 und 4 verstärkt bzw.

ausschließlich in lymphoiden Geweben exprimiert (zusammengefasst in Rao et al., 1997). Diese Expressionsunterschiede könnten zu der Zellspezifität des BOB.1/OBF.1-Promotors beitragen.

Wie bereits oben erwähnt, fehlt im BOB.1/OBF.1-Promotor der „klassische“ NF-AT Partner AP-1. Jedoch konnte eine Interaktion der amino-terminalen Transaktivierungs-Domäne von NF-AT1 mit CBP/p300 gezeigt werden (Garcia-Rodriguez and Rao, 1998). Mit CREB/ATF und NF-AT liegen somit zwei Faktoren vor, die CBP/p300 rekrutieren und darüber transaktivierend wirken können.

3.1.3. Regulationsmechanismen die eine Induzierbarkeit des BOB.1/OBF.1-Promotors in T-Zellen erklären können

Folgt man den Daten aus B- und T-Zellen, so wären die folgenden Ergebnisse für den BOB.1/OBF.1-Promotor zu erwarten gewesen. Transfektionen in B-Zellen sollten zu einer hohen Aktivität führen, die Transfektion in T-Zellen hingegen sollte eine geringe Promotoraktivität ergeben. Erst nach Stimulation mit PMA und Ionomycin sollte die Aktivität des transfizierten Promotors das Niveau der Aktivität in B-Zellen erreichen.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, lag in den transienten Transfektionen des BOB.1/OBF.1-Promotors in T-Zellen eine hohe Basalaktivität vor. Diese war ca. um den Faktor drei geringer als in der parallel getesteten B-Zelllinie S194. Nach Stimulation mit PMA und Ionomycin zeigte der transfizierte BOB.1/OBF.1-Promotor eine dreifache Induktion der Luciferaseaktivität. Somit erreicht der Promotor nach der Stimulation eine ähnliche Aktivität wie in der B-Zelllinie S194. Die beobachtete Stimulation um den Faktor drei in T-Zellen ist im Vergleich zu der Stimulation des BOB.1/OBF.1-Reporterplasmids 4xOct nur gering. Aus diesem Ergebnis wurde geschlossen, daß die Basalaktivität des BOB.1/OBF.1-Promotors in T-Zellen zu hoch ist. Um fehlende regulatorische Elemente zu finden wurde ein "DNase Hypersensitivity"-Test durchgeführt, welcher jedoch keine Unterschiede zwischen B- und T-Zellen bzw. zwischen aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen ergab. Dieses

Diskussion

Ergebnis kann in zweierlei Weise interpretiert werden: i) die nötigen Elemente, um den Promotor in T-Zellen inaktiv zu halten, liegen außerhalb des untersuchten Bereichs oder ii) die gezeigten DNase sensitiven Stellen binden in B- und T-Zellen unterschiedliche Kofaktoren, welche zu einer Repression der Transkription in T-Zellen, aber nicht in B-Zellen führt.

Ein für diese zuletzt genannte Hypothese interessantes Motiv im BOB.1/OBF.1-Promotor stellt die SRY-Bindungsstelle dar. An dieses Motiv können die Transkriptionsfaktoren Sox4, TCF1 und LEF1 binden. Alle diese Faktoren gehören zur Familie der „high mobility group“ (HMG) Proteine. Sox4 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die frühe B-Zellentwicklung eine Rolle spielt (Schilham et al., 1996).

Interessanter sind jedoch die beiden Faktoren TCF1 und LEF1. TCF1 wird ausschließlich in T-Zellen exprimiert, LEF1 hingegen in T-Zellen und proB- und präB-Zellen (Reya et al., 2000). Beide Faktoren können die Transkription sowohl reprimieren als auch aktivieren. Die Interaktion mit den Ko-Repressoren der Groucho-Familie führt zu einer Rekrutierung der Histon-Deacetylase1(HDAC1) und somit zu einer Repression der Transkription (Billin et al., 2000; Brantjes et al., 2001). Im Falle einer Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges kommt es jedoch zu einer Translokation des Faktors β -Catenin in den Kern und anschließend zur Interaktion mit TCF1/LEF1 (Hecht and Kemler, 2000). Im weiteren Verlauf der transkriptionellen Aktivierung erfolgt die Rekrutierung der Faktoren CBP und p300, die mit Hilfe ihrer Histon-Acetyltransferase-Aktivität die Wirkung der HDAC1 revertieren, d.h. den Locus öffnen (Sun et al., 2000).

Mit diesem transkriptionell ambivalenten Verhalten ließen sich die transkriptionellen Ereignisse in T- und B-Zellen wie folgt erklären. Der BOB.1/OBF.1-Promotor ist in B- und T-Zellen aktiv, in nicht-lymphoiden Zellen hingegen inaktiv. Diese zellspezifische Regulation könnte über das CREB- und das NF-AT-Motiv in Verbindung mit den oben genannten Möglichkeiten vermittelt werden. Die unterschiedliche Aktivität in B- und T-Zellen könnte hingegen mit Hilfe des SRY-Motivs reguliert werden. Während in unstimulierten T-Zellen keine BOB.1/OBF.1-Expression erfolgt, findet man in proB- und präB-Zellen zumindest eine deutlich verminderte BOB.1/OBF.1-Expression im Vergleich zu aktivierten B-Zellen des Keimzentrums (Qin et al., 1998). Somit könnte in proB- und präB-Zellen, als auch in T-Zellen eine Repression der Transkription von BOB.1/OBF.1 über die

Diskussion

Faktoren LEF1 und TCF1 erfolgen. Bei der weiteren Differenzierung der B-Zellen kommt es zu einer Repression der LEF1-Expression. Somit wäre eine anschließende Induktion der Transkription von BOB.1/OBF.1 mit Hilfe der Faktoren CREB und NF-AT möglich. Anders hingegen sähe das Szenario in T-Zellen aus. Hier könnte es nach erfolgter Stimulation des T-Zellrezeptors zu einer Translokation von β -Catenin in den Kern kommen, so daß die Faktoren TCF1 und LEF1 nicht mehr reprimierend, sondern aktivierend auf die BOB.1/OBF.1-Transkription wirken würden. Dieses Modell würde erklären, warum in transienten Transfektionen des BOB.1/OBF.1-Promotors in Jurkat T-Zellen eine hohe Basalaktivität beobachtet wird (Abbildung 9). Die Repression der Transkription über TCF1/LEF1 erfolgt über die Rekrutierung von HDAC1, d.h. für die Repression ist eine Komplexierung der Promotorregion mit Histonen notwendig. Diese Komplexierung dürfte aber bei den in dieser Arbeit durchgeführten transienten Transfektionen nicht vorliegen, so daß die Repression unterbleibt und folglich der Promotor eine hohe Basalaktivität zeigen würde.

Neben der potentiellen Regulation des Promotors über die SRY Bindungsstelle, gibt es Hinweise darauf, daß auch der Faktor NF-AT eine Rolle spielen könnte. Die NF-AT-abhängige Transkription in B- und T-Zellen nach Aktivierung des Antigen-Rezeptors erfolgt über das cytoplasmatische Proto-Oncogen Vav-1. Interessanterweise zeigen Vav-1-defiziente Mäuse einen reinen T-Lymphozyten Phänotyp, die Population der B-Zellen hingegen ist relativ normal (Fischer et al., 1995; Tarakhovsky et al., 1995). Dies führte zu der Suche nach einem Vav-1-Verwandten, der dann auch kloniert und Vav-2 genannt wurde. Im Gegensatz zu dem lymphoid-spezifisch exprimierten Vav-1, wird Vav-2 auch in vielen nicht-lymphoiden Zellen exprimiert (Schuebel et al., 1996). Genauere Untersuchungen von Vav-1 und Vav-2 auf die NF-AT-abhängige Transkription in B- und T-Zellen zeigten, daß in B-Zellen sowohl Vav-1 als auch Vav-2 die NF-AT abhängige Transkription fördern, in T-Zellen hingegen ist Vav-2 dazu nicht in der Lage (Doody et al., 2000). Dieses Ergebnis wurde später in Vav-1- und Vav-2-doppeldefizienten Mäusen bestätigt (Doody et al., 2001; Tedford et al., 2001). Dieses Beispiel zeigt, daß es Unterschiede in der Regulation von NF-AT-abhängiger Transkription zwischen B- und T-Zellen gibt. Somit könnten Unterschiede in der NF-AT-Aktivierung zu einer spezifischen Regulation der BOB.1/OBF.1-Expression in B- und T-

Zellen beitragen. Wie in Abbildung 9 dargestellt bedingt die Stimulation von T-Zellen mit PMA und Ionomycin eine Expression von BOB.1/OBF.1. Beide Stimuli bedingen unter anderem aber auch eine NF-AT-Aktivierung. Zusätzlich erfolgt durch Zugabe von Cyclosporin A eine Inhibition der BOB.1/OBF.1-Expression. Cyclosporin A ist ein spezifischer Inhibitor der Phosphatase Calcineurin, die zur Aktivierung von NF-AT notwendig ist. Zusammenfassend lässt sich spekulieren, daß der Transkriptionsfaktor NF-AT für die Expression in T-Zellen eine Rolle spielen dürfte. Interessanterweise erfolgt in B-Zelllinien keine Regulation der konstitutiven Expression durch Cyclosporin A (Daten nicht gezeigt). Somit scheinen in B- und T-Zellen unterschiedliche Signaltransduktionswege bzgl. der NF-AT Aktivierung vorzuliegen. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Aktivierung von NF-AT für die BOB.1/OBF.1-Expression in B-Zellen keine Rolle spielt.

3.2. SIAH1 ist ein Interaktionspartner von BOB.1/OBF.1

BOB.1/OBF.1 wird in B-Zellen nicht nur transkriptionell sondern auch auf Protein-Niveau reguliert. Hierbei spielt der Interaktionspartner SIAH1 eine wichtige Rolle. Durch die Interaktion mit SIAH1 wird das BOB.1/OBF.1-Protein proteasomenabhängig degradiert. Diese Degradation konnte sowohl in transfizierten Fibroblasten als auch in B-Zellen nach Aktivierung des B-Zellrezeptors gezeigt werden. Endogenes SIAH1 wird hierbei auf transkriptioneller Ebene reguliert. Als Folge der Degradation von BOB.1/OBF.1 in B-Zellen kommt es zu einer Verminderung BOB.1/OBF.1-abhängiger Transkription.

3.2.1. Regulation von BOB.1/OBF.1 in primären Zellen

Die Analyse verschiedener B-Zelllinien ergab eine konstitutive Expression des transkriptionellen Koaktivators BOB.1/OBF.1 (Schubart et al., 1996b). Ausgehend von diesem Befund wurde

vermutet, daß auch primäre B-Zellen in den verschiedenen Entwicklungsstadien eine konstitutive BOB.1/OBF.1-Expression aufweisen. Die ersten Hinweise auf eine Regulation von BOB.1/OBF.1 kamen von Untersuchungen an der T-Zelllinie Jurkat (Zwilling et al., 1997). Diese zeigten eine Induktion des BOB.1/OBF.1-Transkriptes nach Stimulation mit PMA und Ionomycin. Jedoch ließen erst die BOB.1/OBF.1-defizienten Mäuse eine Regulation der BOB.1/OBF.1-Transkription in B-Zellen vermuten. Die BOB.1/OBF.1-defizienten Mäuse zeigen eine reduzierte Population transitioneller B-Zellen und ein völliges Fehlen von Keimzentren (Hess et al., 2001; Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996a). Folgerichtig konnte dann auch die Expression des BOB.1/OBF.1-Transkriptes in B-Zellen des Keimzentrums nachgewiesen werden (Greiner et al., 2000; Qin et al., 1998). Weitere Experimente zeigten, daß IL-4 und anti-CD40 die transkriptionelle Expression von BOB.1/OBF.1 in primären ruhenden B-Zellen induzieren können. Im Kontext dieser transkriptionellen Induzierbarkeit ergab die genauere Untersuchung des BOB.1/OBF.1-Promotors, daß dieser, konsistent mit den vorherigen Daten, IL-4 und anti-CD40 responsiv ist (Stevens et al., 2000). Neben der Induktion des BOB.1/OBF.1-Transkriptes durch IL-4 und CD40 in primären ruhenden B-Zellen lieferten diese Experimente aber auch Hinweise auf eine Regulation des BOB.1/OBF.1-Proteins (Qin et al., 1998). Primäre ruhende B-Zellen zeigten im Gegensatz zur BOB.1/OBF.1-Expression im Northern-Blot, keine Expression des BOB.1/OBF.1-Proteins im Western-Blot. Zusätzlich zu diesem Befund zeigten die Zellen nach Stimulation mit LPS zwar eine Induktion des BOB.1/OBF.1-Transkriptes als auch des Proteins, jedoch erfolgte die Zunahme des Proteins schneller als die des Transkriptes. Hieraus wurde gefolgert, daß neben der Regulation auf transkriptioneller Ebene noch zusätzliche posttranslationale Regulationsmechanismen eine Rolle spielen (Qin et al., 1998). Wie in dieser Arbeit gezeigt (Abbildung 12), konnten diese Vermutungen im Falle der Regulation von BOB.1/OBF.1-Protein in CD38⁻ nicht-Keimzentrums B-Zellen versus CD38⁺ Keimzentrums B-Zellen bestätigt werden. Beide B-Zellentwicklungsstadien exprimieren vergleichbare Mengen an BOB.1/OBF.1-Transkript. Die Proteinexpression hingegen zeigt, wie früher beschrieben, einen deutlichen Anstieg von BOB.1/OBF.1 in den CD38⁺ Keimzentrums B-Zellen.

3.2.2. BOB.1/OBF.1 interagiert mit SIAH1

Der Befund der Regulation des BOB.1/OBF.1-Proteins in B-Zellen führte über einen "yeast-two hybrid screen" zur Identifikation von SIAH1 und SIAH2 als Interaktionspartner von BOB.1/OBF.1. Die Interaktion findet über den carboxy-Terminus von SIAH1 und den amino-Terminus von BOB.1/OBF.1 statt. SIAH kann in zwei funktionelle Domänen unterteilt werden, der amino-terminalen und der carboxy-terminalen. Die amino-terminale Domäne bedingt die Funktion von SIAH als Ubiquitin-Ligase (E3), sie enthält das für diese Proteinfamilie typische Ring-Zink-Finger Motiv (Joazeiro and Weissman, 2000; Lorick et al., 1999). Die carboxy-terminale Domäne hingegen ist für die Interaktion mit verschiedenen Proteinen verantwortlich. Zum einen kann SIAH genauso wie Sina, das Homolog aus *Drosophila*, Homodimere bilden. Diese Homodimerisierung bedingt eine Instabilität des SIAH Proteins, wobei es abhängig von der Ring-Zink-Finger-Domäne zu einer Degradation des Dimerpartners kommt (Hu and Fearon, 1999). Zum anderen erfolgt mittels der carboxy-terminalen Domäne die Interaktion mit den Proteinen DCC (deleted in colon cancer), NCoR (nuclear co-repressor), Vav-1, β -Catenin und, wie in dieser Arbeit gezeigt, mit BOB.1/OBF.1 (Germani et al., 1999; Hu et al., 1997b; Liu et al., 2001; Matsuzawa and Reed, 2001; Zhang et al., 1998a). Eine Ausnahme bildet die Interaktion mit BAG1. Hier bedingten Deletionen im amino-terminalen als auch im carboxy-terminalen Bereich von SIAH einen Verlust der Bindung (Matsuzawa et al., 1998).

3.2.3. Degradation von BOB.1/OBF.1 durch SIAH1

In *Drosophila* führt die Interaktion von Sina mit Tramtrack zu einer Degradation von Tramtrack. Für Tramtrack, BAG1 und DCC konnte gezeigt werden, daß diese Degradation auf der durch Sina/SIAH vermittelten Ubiquitylierung beruht (Hu et al., 1997b; Li et al., 1997; Sourisseau et al., 2001; Tang et al., 1997). Folgerichtig stellte sich später heraus, daß Sina/SIAH, wie oben erwähnt, zu den Ubiquitin-Ligasen gehören.

Neben BAG1 und DCC führt die Interaktion mit SIAH auch im Falle von NCoR, β -Catenin und BOB.1/OBF.1 zu einer Degradation des jeweiligen Proteins. Diese Degradation wird in allen Fällen durch das Proteasom vermittelt. Wie in dieser Arbeit, konnte auch für die restlichen Interaktionspartner gezeigt werden, daß der Proteasomen-Inhibitor MG132 die Degradation verhindert (Germani et al., 1999; Hu et al., 1997b; Zhang et al., 1998a).

Die Interaktion eines Proteins mit SIAH bedingt aber nicht notwendigerweise dessen Degradation. Vav-1 ist hier als Ausnahme zu nennen. Die Interaktion mit SIAH2 führt hier zu einer Unterbrechung der Signaltransduktion. Als Folge davon kommt es zu einem Block in der Aktivierung von NF-AT in T-Zellen nach erfolgter Stimulation mit CD3 und CD28. Wurden in der bisherigen Literatur die beiden humanen Formen von SIAH, SIAH1 und SIAH2, immer als funktionelle Isomere beschrieben, so stellt Vav1 auch hier eine Ausnahme dar. SIAH1 kann zwar wie SIAH2 mit Vav-1 interagieren, jedoch nicht die Signalübertragung unterbrechen (Germani et al., 1999).

3.2.4. Regulation der BOB.1/OBF.1-Degradation in B-Zellen

Wie in Abbildung 25 gezeigt erfolgt nach Aktivierung des B-Zellrezeptors (BCR) ein Abbau des BOB.1/OBF.1-Proteins. Dieser BOB.1/OBF.1-Abbau nach Aktivierung des BCR wird in B-Zellen genau wie in den mit SIAH1 transfizierten NIH/3T3-Zellen über das Proteasom vermittelt. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß SIAH1 diesen Abbau bedingt (Abbildung 32). Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß MAPK eine Rolle in der Signalübertragung spielt. Die hier beschriebenen Ergebnisse ähneln sehr stark den Befunden in Drosophila. Dort kommt es infolge einer Aktivierung des Rezeptors Sevenless zu einer MAPK-abhängigen Degradation von Tramtrack. Die Interaktion mit Sina und Phyllopod bedingt eine Ubiquitinylierung von Tramtrack, welches anschließend durch das Proteasom degradiert wird (Li et al., 1997; Tang et al., 1997). Somit beschränken sich die Homologien zwischen Fliege und Säuger

nicht nur auf die Proteine Sina und SIAH und deren identische Funktion, sondern schließt auch noch die verwendeten Signalkaskaden mit ein (Abbildung 33).

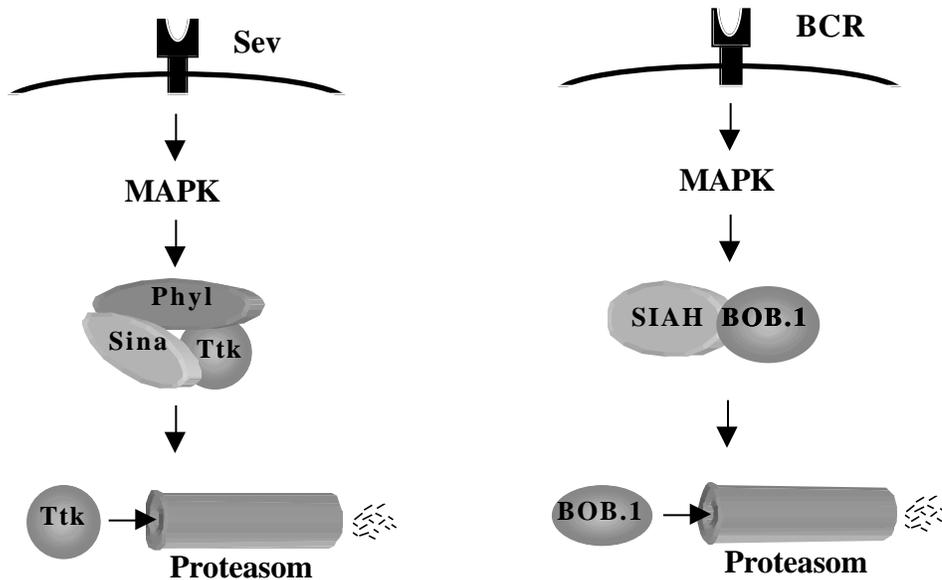


Abbildung 33: Degradation von Ttk durch Sina im Drosophila-Auge und BOB.1/OBF.1 durch SIAH1 in menschlichen B-Zellen. Genauere Erläuterung im Text.

Keine der vorher genannten Publikationen adressierte die Frage nach der Regulation des Abbaus. Wie in Abbildung 12 gezeigt erfolgt in der B-Zellentwicklung von $CD38^-$ zu $CD38^+$ B-Zellen eine Regulation der Menge an BOB.1/OBF.1-Protein. Da SIAH1 als funktioneller Interaktionspartner des BOB.1/OBF.1-Proteins identifiziert wurde, stellte sich die Frage nach der Regulation dieses Abbaus durch SIAH1. Hierbei sind verschiedene Szenarien möglich: i) SIAH1 wird transkriptionell reguliert ii) die Interaktion von BOB.1/OBF.1 und SIAH1 wird infolge einer Modifikation von BOB.1/OBF.1 moduliert iii) die Interaktion von BOB.1/OBF.1 und SIAH1 wird infolge einer Modifikation von SIAH1 beeinflusst. Wie sich herausstellte wird SIAH1 auf transkriptioneller Ebene reguliert. Hierbei konnte sowohl eine Repression im Falle der $CD38^+$ versus $CD38^-$ B-Zellen als auch eine Aktivierung der SIAH1-Transkription im Falle der Ramos B-Zellen gezeigt werden (Abbildung 26 und 27). Da der Promotor von Sina und SIAH nicht bekannt ist, läßt sich über die

hierfür nötigen Transkriptionsfaktoren nichts aussagen. BOB.1/OBF1 kann sowohl aus CD38⁻ als auch aus CD38⁺ B-Zellen des Keimzentrums mit SIAH1 präzipitiert werden (Abbildung 27B). Somit erscheint die Verhinderung der Interaktion mittels einer Modifikation durch BOB.1/OBF.1 als relativ unwahrscheinlich. Die Hypothese einer fehlenden Interaktion durch eine Modifikation von SIAH1 kann infolge eines geeigneten anti-SIAH1 Antikörpers nicht getestet werden und bleibt damit offen.

Wie gezeigt erfolgt in primären Zellen des Keimzentrums eine Reduktion der SIAH1-Transkription mit gleichzeitiger höherer Expression von BOB.1/OBF.1-Protein (Abbildung 12 und 27). Diese Regulation kann durch zwei übergeordnete Mechanismen erreicht werden: veränderte IgM-Expression und Modulation des Signalweges. Die B-Zellen im Keimzentrum werden in zwei Subpopulationen unterteilt, die hochproliferativen Zentroblasten und die Zentrocyten. Für die Zentroblasten konnte gezeigt werden, daß sie ihr Oberflächen-IgM nur noch schwach exprimieren (MacLennan, 1994). Somit würde der Signalgeber für eine Expression von SIAH1 fehlen und als Folge dessen würde das BOB.1/OBF.1-Protein stabil exprimiert werden. Desweiteren erfolgt in Keimzentrumzellen eine Modulation des B-Zellrezeptor-Signalweges durch CD22 und Fcγ (Cambier, 1997; Tedder et al., 1997). Auch hierdurch könnte eine Expression von SIAH1 verhindert werden.

Neben der transkriptionellen Regulation könnte auch eine Stabilisierung des ubiquitinylierten BOB.1/OBF.1-Proteins erfolgen. In Burkitt Lymphom-Zellen und Hodgkin Lymphom-Zellen, die beide von Keimzentrum-B-Zellen abgeleitet werden, fand man eine andere Zusammensetzung der Proteasomenuntereinheiten als in lymphoblastoiden Zellen, die nicht von Keimzentrumzellen abgeleitet werden (Frisan et al., 2000). Durch diese Veränderung der Proteasomenuntereinheiten wäre eine verminderte Degradation des ubiquitinylierten BOB.1/OBF.1 denkbar.

3.2.5. Die Rolle der Serine 184, 188 und 189 in BOB.1/OBF.1

Eine bekannte Modifikation von BOB.1/OBF.1 in B-Zellen und nach Stimulation in T-Zellen stellt die Phosphorylierung der Serine 184, 188 und 189 dar (Zwilling et al., 1997). Obwohl SIAH nicht an den carboxy-Terminus von BOB.1/OBF.1 bindet, wäre eine Regulation der Proteinstabilität z.B. über eine Verminderung der Ubiquitylierung der den Serinen benachbarten Lysine denkbar. Diese potentielle Regulation konnte zwar ausgeschlossen werden, jedoch zeigten die verschiedenen Mutanten von BOB.1/OBF.1 ein interessantes transkriptionelles Verhalten. In früheren Publikationen konnte gezeigt werden, daß die Mutation der Serine zu Alanin zu einem kompletten Verlust der transkriptionellen Potenz von BOB.1/OBF.1 führt (Zwilling et al., 1997). Die verschiedenen Mutanten wurden in den carboxy-Terminus von BOB.1/OBF.1 eingeführt, der dann als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne exprimiert wurde. In dieser Arbeit wurden die Mutanten jedoch in das BOB.1/OBF.1-Gesamtprotein eingeführt. Die Kontroll-Transfektion der GAL-BOB.1/OBF.1-Mutanten in NIH/3T3 ergab das bereits beschriebene Ergebnis. Die Transfektion der Serin-Mutationen im BOB.1/OBF.1-Gesamtprotein ergab hingegen keine signifikanten Auswirkungen auf die transkriptionelle Potenz von BOB.1/OBF.1. Somit stellt sich die Frage nach der Relevanz der vorher beschriebenen Phosphorylierung, die in Jurkat T-Zellen für eine Aktivierung GAL-BOB.1/OBF.1-abhängiger Transkription notwendig war. Prinzipiell scheinen zwei unabhängige Ereignisse für die transkriptionelle Aktivität von BOB.1/OBF.1 notwendig zu sein (Krapp and Strubin, 1999). Zum ersten bedarf es der Bindung an Oct1/2. Fusioniert man BOB.1/OBF.1 an ein anderes DNA-bindendes Protein so erfolgt keine bzw. eine sehr viel schwächere transkriptionelle Aktivierung. Die Interaktion von BOB.1/OBF.1 mit Oct1/2 bedingt wahrscheinlich eine Konformationsänderung von BOB.1/OBF.1. Die volle Transaktivierung von BOB.1/OBF.1 bedarf zudem des amino- und des carboxy-Terminus, trunkeerte Formen haben eine reduzierte Aktivität. Zum zweiten zeigten Experimente in Hefen, daß BOB.1/OBF.1 an Oct gebunden keine generelle Aktivierung der Transkription bedingt. Fusionen von Oct an VP16 zeigten hingegen in Verbindung mit BOB.1/OBF.1 einen stark synergistischen

Diskussion

Effekt. Somit entfaltet BOB.1/OBF.1 seine komplette Aktivität erst in Verbindung mit weiteren Transkriptionsfaktoren bzw. Koaktivatoren.

Nimmt man diese beiden Ereignisse der Aktivierung BOB.1/OBF.1-abhängiger Transkription könnte man folgende Erklärung für die beobachteten Ergebnisse geben:

BOB.1/OBF.1 bindet an Oct1/2 und erfährt dadurch eine Konformationsänderung. Diese Konformationsänderung ist Voraussetzung für eine Interaktion mit anderen transkriptionellen Faktoren. Einer dieser Kofaktoren könnte z.B. PC4 sein, welches mit BOB.1/OBF.1 interagiert (Luo et al., 1998). Geht man davon aus, daß diese zusätzlich nötigen Kofaktoren in B-Zellen und in NIH/3T3-Zellen konstitutiv und in T-Zellen erst nach PMA/Ionomycin Stimulation exprimiert sind, so erhält man die in dieser Arbeit und in (Zwilling et al., 1997) beschriebenen Ergebnisse. Nimmt man weiter an, daß die Konformationsänderung im Falle von Fusionsproteinen zwischen der GAL-DNA-Bindungsdomäne und dem BOB.1/OBF.1-carboxy-Terminus erst nach erfolgter Phosphorylierung von Serin 184 erfolgt, erklären sich auch die mit den Gal-BOB.1/OBF.1-Fusionsproteinen gewonnenen Ergebnisse. Somit würde die Phosphorylierung nur im Falle von nicht an Oct1/2 gebundenem BOB.1/OBF.1 eine Rolle für die Transaktivierung spielen.

Eine alternative Erklärung könnte durch die Sekundärstruktur der BOB.1/OBF.1-Mutanten gegeben werden. Ersetzt man die Serinreste 184, 188 und 189 durch Glutaminsäurereste (die eine Phosphorylierung imitieren), so induziert man nach Berechnungen des Programms Lasergene an dieser Stelle eine α -Helix. Dieselbe α -Helix erhält man im Falle der Alaninmutanten. Auch die Kombination von Alanin und Glutamat führt immer zu einer α -Helix solange alle drei Serinpositionen von dieser Änderung betroffen sind. Diese Veränderungen könnte wie folgt interpretiert werden. Die Phosphorylierung der Serine in BOB.1/OBF.1 führt zu einer Induktion der transkriptionellen Potenz in BOB.1/OBF.1, z.B. durch eine Konformationsänderung. Diese α -Helix wird aber auch im Falle der Alaninmutanten eingeführt, so daß diese Mutante dieselbe transkriptionelle Aktivierung besitzt wie das phosphorylierte BOB.1/OBF.1. Nimmt man an, daß die Kinase die für die Phosphorylierung von BOB.1/OBF.1 verantwortlich ist, in B-Zellen und NIH/3T3 konstitutiv, in T-Zellen aber erst nach PMA und Ionomycin Stimulation exprimiert wird,

so erhält man das in Abbildung 30B dargestellte Ergebnis. Im Falle der Gal-BOB.1/OBF.1-Fusionsproteine könnte die alleinige Induktion der α -Helix nicht ausreichen. Hier könnte eine Phosphorylierung von BOB.1/OBF.1 für die volle transkriptionelle Potenz notwendig sein.

3.2.6. BOB.1/OBF.1 und Bcl6

Wie in Abbildung 12 gezeigt, liegt in Keimzentrums-B-Zellen eine höhere Expression des BOB.1/OBF.1-Proteins vor. Interessanterweise zeigt der transkriptionelle Repressor Bcl6, der in der Einleitung unter Punkt 1.2 bereits beschrieben wurde, ein identisches Expressionsmuster. Untersuchungen der Proteinexpression ergaben, daß auch Bcl6 in Keimzentren am höchsten exprimiert ist (Cattoretti et al., 1995; Onizuka et al., 1995). Zusätzlich ergab sich in Keimzentrums-B-Zellen und verschiedenen Lymphomen eine exakte Übereinstimmung der Expressionsmuster von BOB.1/OBF.1 und Bcl6 (Greiner et al., 2000). Die Expression von Bcl6 wird hierbei neben der Transkription auch von der Proteinstabilität beeinflusst. So erfolgt in Keimzentrums-B-Zellen im Vergleich zu ruhenden B-Zellen eine erhöhte Expression des Bcl6-Proteins bei gleichbleibender Expression des Bcl6-Transkriptes (Allman et al., 1996). Somit zeigen die Proteine BOB.1/OBF.1 und Bcl6 nicht nur dieselben Expressionsmuster, sondern noch zusätzlich eine identische Regulation über die Proteinstabilität. Die in der Einleitung erwähnten Phänotypen von BOB.1/OBF.1-defizienten Mäusen stimmen mit denen von Bcl6-defizienten Mäusen darin überein, daß beide keine Keimzentren mehr bilden können (Dent et al., 1997; Kim et al., 1996; Nielsen et al., 1996; Schubart et al., 1996a; Ye et al., 1997).

Bcl6 gehört wie der transkriptionelle Repressor Tramtrack aus *Drosophila* zu der Familie der POZ/Zink-Finger Proteine. Wie in Abbildung 33 gezeigt erfolgt in *Drosophila* eine Degradation von Tramtrack über Sina, dem Homolog zu SIAH. Man konnte daher die Hypothese aufstellen, daß Bcl6 wegen seiner Verwandtschaft zu Tramtrack mit SIAH interagieren könnte und dadurch abgebaut wird. Tatsächlich zeigten neuere Untersuchungen, daß die Aktivierung des B-Zellrezeptors in Ramos B-Zellen zu einer Degradation von Bcl6 führt. Diese Degradation wird über eine

Ubiquitylierung von Bcl6 und einem anschließenden Abbau über das Proteasom vermittelt (Niu et al., 1998). Die Parallelen zum Abbau von BOB.1/OBF.1 durch SIAH1 in Ramos B-Zellen sind offensichtlich. Folgerichtig konnte in einem "yeast-two hybrid screen", bei dem der carboxy-terminale Teil von SIAH1 als "bait" verwendet wurde, Bcl6 als Interaktionspartner identifiziert werden (Ergebnis nicht gezeigt). Daß Bcl6 tatsächlich über SIAH1 reguliert wird, konnte mittlerweile von der Arbeitsgruppe Staudt gezeigt werden (persönliche Mitteilung, Publikation in Vorbereitung). Folglich könnte SIAH1 eine Schlüsselrolle in der B-Zellentwicklung spielen, indem es gleichzeitig bestimmte, für die B-Zelldifferenzierung notwendige Faktoren reguliert.

3.3. Interaktionspartner der BOB.1/OBF.1 carboxy-terminalen Domäne

Im "yeast two hybrid assay" mit der carboxy-terminalen Domäne von BOB.1/OBF.1 wurden die folgenden Proteine mehrfach als Interaktionspartner identifiziert: Immunglobulin κ light chain, KIAA0553-Transkript, MCM7/hCDC47, RanBPM und ABP 280 (Abbildung 14). Für die Interaktion von BOB.1/OBF.1 mit der Immunglobulin κ light chain gibt es zum jetzigen Zeitpunkt keine sinnvolle Hypothese. Das Protein zum KIAA0553-Transkript ist unbekannt und die translatierte Sequenz zeigte auch keine konservierten Domänen die auf eine potentielle Funktion in Verbindung mit BOB.1/OBF.1 schließen lassen würde. Der Klon RanBPM ist höchstwahrscheinlich ein Artefakt. Er wurde ebenfalls in einem unabhängigen "yeast two hybrid screen" mit einem anderen "bait" aber derselben cDNA-Bank identifiziert. Im weiteren Verlauf soll daher nur auf die Interaktion mit den Proteinen MCM7 und ABP 280 eingegangen werden.

3.3.1. Die potentielle Interaktion zwischen BOB.1/OBF.1 und ABP 280

ABP 280 (für actin binding protein mit einem Molekulargewicht von 280 kD), auch Filamin 1 genannt, ist die vorherrschende, nicht-muskuläre Isoform der Aktin-bindenden Proteine. ABP 280 ist im Cytoplasma direkt unterhalb der Plasmamembran lokalisiert, wo es durch Homodimerisierung eine Quervernetzung der Actinfilamente bedingt (Cunningham et al., 1992). Die Auswirkungen dieser Quervernetzung sind vielfältig, so bedingt sie eine erhöhte Mechanoprotektion, ist aber auch für Zelladhäsion und Zellmigration verantwortlich (Glogauer et al., 1998; Ohta et al., 1999; Ott et al., 1998).

Neben dieser "klassischen" Rolle der Actin-Quervernetzung zeigte sich, daß ABP 280 zunehmend eine Rolle in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden spielt. Die Stimulation von Melanomzellen mit TNF- α führt zu einer Aktivierung der SAPK (Stress-aktivierten Proteinkinase). Diese Aktivierung erfolgt durch die Kinase SEK-1. SEK-1 bindet nach TNF α -Stimulation verstärkt an den carboxy-terminalen Bereich von ABP 280. In ABP 280-defizienten Melanomzellen konnte gezeigt werden, daß eine Aktivierung der SAPK nach TNF α -Stimulation nicht mehr erfolgt (Marti et al., 1997).

In Jurkat T-Zellen konnte eine Assoziation des Adaptorproteins Lnk mit ABP 280 nachgewiesen werden. Auch hier erfolgt die Interaktion mit dem carboxy-terminalen Bereich von ABP 280 (He et al., 2000). Die physiologische Bedeutung dieser Interaktion ist zwar nicht bekannt, doch kann auch hier über eine Weiterleitung von T-Zellrezeptor-Signalen spekuliert werden.

Desweiteren erfolgt eine Interaktion von ABP 280 mit Mitgliedern der Smad-Proteinfamilie. Die physiologische Relevanz dieser Interaktion wurde wieder mit den bereits erwähnten ABP 280-defizienten Melanomzellen analysiert. In wiltypischen Zellen erfolgt eine Phosphorylierung von Smad2 nach Stimulation mit TGF- β . Smad2 transloziert anschließend mit Smad4 in den Kern und bedingt die Transkription von Zielgenen. In den ABP 280-defizienten Melanomzellen konnte gezeigt werden, daß nach erfolgter Stimulation mit TGF- β die Phosphorylierung deutlich reduziert ist. Somit erfolgt keine Translokation in den Kern, wodurch die Transkription von transfizierten Reportergenen unterblieb (Sasaki et al., 2001).

Die Interaktion von BOB.1/OBF.1 mit dem carboxy-Terminus von ABP 280 könnte verschiedene mögliche Funktionen haben. Eigene Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von BOB.1/OBF.1 mit Hilfe von Immunfluoreszenz zeigten die erwartete nukleäre Lokalisation eines transkriptionellen Kofaktors. Daneben fand sich aber auch ein beträchtlicher Anteil von BOB.1/OBF.1 im Cytoplasma. Diese cytoplasmatische Lokalisation konnte von der Arbeitsgruppe Roeder zumindest partiell aufgeklärt werden. Ihren Ergebnissen zufolge wird BOB.1/OBF.1 von zwei verschiedenen Initiation-Codons aus translatiert. Die Translation von dem neu gefundenen CTG führt zu einem um 14 Aminosäuren verlängerten BOB.1/OBF.1-Protein. Dieses wird anschließend so prozessiert, daß es nur noch 7 Aminosäuren länger ist als das ursprünglich bekannte BOB.1/OBF.1-Protein. Diese 7 Aminosäuren mit dem amino-terminal endständigen Glycin stellen jedoch eine perfekte Myristoilierungs-Konsensussequenz dar. Transfiziertes myristoilertes BOB.1/OBF.1 lokalisiert im Cytoplasma, in geringen Mengen auch direkt an der Plasmamembran. In B-Zellextrakten hingegen findet man es sowohl im Cytoplasma als auch im Kern. Die Myristoilierung mit der damit verbundenen Lokalisationsänderung bedingt eine reduzierte transkriptionelle Aktivität des transfizierten BOB.1/OBF.1 (Yu et al., 2001). Die Lokalisation von myristoilertem BOB.1/OBF.1 im Cytoplasma bzw. an der Membran führte zu der Spekulation, daß BOB.1/OBF.1 eventuell eine neue Rolle als Signalmolekül in der B-Zellentwicklung spielen könnte.

ABP 280 lokalisiert normalerweise ebenfalls direkt unterhalb der Plasmamembran. Somit wäre eine prinzipielle Kolo-kalisation von myristoilertem BOB.1/OBF.1 und ABP 280 möglich. Mit seinen oben beschriebenen Funktionen in der Weiterleitung von Signalen könnte ABP 280 eine Art Adapter zwischen B-Zellrezeptorsignalen und BOB.1/OBF.1 darstellen. BOB.1/OBF.1 könnte anschließend so modifiziert werden, daß es in den Kern transloziert und anschließend die Transkription von Zielgenen bedingt.

Interessanterweise erfolgt bei beiden Proteinen eine Regulation durch Calcium. Wie vorher bereits erwähnt, erfolgt die Expression von BOB.1/OBF.1 als auch die Induktion der transkriptionellen

Potenz von BOB.1/OBF.1 in T-Zellen erst nach Stimulation mit PMA und dem Calcium-Ionophor Ionomycin. In Endothelzellen konnte gezeigt werden, daß ABP 280 nach Stimulation mit Ionomycin von der Plasmamembran weg ins Cytoplasma transloziert. Dies geschieht infolge einer verminderten Interaktion mit filamentösem Actin. Die physiologische Relevanz dieser Calcium-Sensitivität bei BOB.1/OBF.1 und ABP 280 bleibt stark spekulativ.

3.3.2. Die potentielle Interaktion zwischen BOB.1/OBF.1 und MCM7/CDC47

MCM7 (für minichromosome maintenance), auch CDC47 genannt, ist ein Protein das zu der Familie der MCM-Proteine gehört. Diese spielen eine Rolle in der DNA-Replikation. Hierbei bilden die Familienmitglieder MCM 2-7 einen Präinitiations-Komplex an eukaryotischen "Origins". MCM1 codiert für einen Transkriptionsfaktor welcher mit der Replikation nur indirekt über die Regulation der Expression verschiedener Replikationsfaktoren in Verbindung steht. Weitere Daten lassen vermuten, daß die Mitglieder 2-7 neben der Replikations-Initiation auch in der Elongation eine Rolle spielen (zusammengefasst in Tye, 1999). Hierbei zeigte sich, daß der Subkomplex bestehend aus MCM4, 6 und 7 eine Helicase-Aktivität besitzt (Ishimi, 1997). Dieser Befund führte zu der Hypothese, daß die Rekrutierung des MCM-Komplexes zu einer Umorganisation der Chromatinstruktur führt.

Neben dieser "klassischen" Rolle der MCM-Proteine häufen sich die Hinweise auf eine Funktion verschiedener Mitglieder in der Transkription. Erste Überlegungen einer zusätzlichen Rolle für die Mitglieder der MCM-Familie entstanden aus der Beobachtung heraus, daß Säuger-Zellen mindestens 10^6 Kopien der MCMs pro Kern aufweisen. Damit liegt ihre Zahl deutlich über der für die "Origins" benötigten Menge (Burkhart et al., 1995). In Verbindung mit der Helicase-Aktivität des oben genannten MCM-Subkomplexes erschien eine Beteiligung an transkriptionellen Ereignissen wahrscheinlich. Die Arbeitsgruppe um James Darnell konnte schließlich eine Interaktion zwischen MCM5 und dem Transkriptionsfaktor Stat1 α zeigen. Die transkriptionelle Potenz von Stat1 α ist abhängig von einer Phosphorylierung am Serin727 in der

Diskussion

Transaktivierungsdomäne. Es stellte sich heraus, daß die Interaktion mit MCM5 dieses phosphorylierte Serin benötigt. Somit war der Hinweis auf eine Rolle von MCM5 in der Stat1 α -abhängigen Transkription gegeben. In transienten Transfektionsanalysen konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Transfektion von MCM5 einen deutlichen positiven Effekt auf die Stat1 α -abhängige Transkription hatte (Zhang et al., 1998b). Weitere Untersuchungen ergaben, daß neben MCM5 auch MCM3, welches mit MCM5 als Komplex vorliegt, für die Stat1 α -vermittelte Transkription eine Rolle spielt. Hierbei sind Mutanten von MCM5 denen die Helicase-Aktivität fehlt, transkriptionell inaktiv (DaFonseca et al., 2001). Genauere Analysen der potentiellen Funktion von MCM-Proteinen in der Transkription zeigten, daß die Mitglieder der MCM-Replikationsfaktoren mit dem Holoenzym der RNA-PolymeraseII assoziiert sind. In Gelfiltrationsexperimenten mit HeLa-Extrakten konnte eine Ko-Elution von MCM3 und MCM7 mit der RNA-PolymeraseII gezeigt werden. Desweiteren zeigten Xenopus Oocyten, denen ein Antikörper gegen MCM2 injiziert wurde, eine spezifische Inhibition der durch die RNA-PolymeraseII vermittelten Transkription (Yankulov et al., 1999).

Die genannten Daten lassen vermuten, daß die Interaktion von BOB.1/OBF.1 mit MCM7 eine ähnliche Funktion hat wie die von Stat1 α mit MCM5. Die Rekrutierung von MCM7 in den Transkriptionskomplex bestehend aus Oct1/2 und BOB.1/OBF.1 könnte zweierlei Folgen haben: i) die MCM-Proteine rekrutieren die RNA-PolymeraseII und ii) die Helicase-Aktivität der MCM-Proteine bedingt eine Umformung der Chromatinstruktur und somit eine bessere Zugänglichkeit des Locus für andere Faktoren der Transkription.

Der genaue Mechanismus der transkriptionellen Transaktivierung durch BOB.1/OBF.1 ist bisher unklar. Die Interaktion von BOB.1/OBF.1 mit MCM7 könnte diese Lücke schließen und erklären wie es nach Bindung von BOB.1/OBF.1 in Kombination mit Oct1/2 zur Rekrutierung der RNA-PolymeraseII kommt.

4. Methoden und Materialien

4.1. Standardmethoden

4.1.1. Präzipitation von Nukleinsäuren

4.1.1.1. Präzipitation von DNA

Die DNA wurde aus einer wäßrigen Lösung durch Zugabe von 0,3M Natriumacetat pH5,2 (Endkonzentration) und 2,5 Volumen Ethanol oder 0,6 Volumen Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation pelletiert, mit 75% Ethanol gewaschen und getrocknet. Falls nicht anders vermerkt, wurde die DNA entweder in Wasser oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

4.1.1.2. Präzipitation von RNA

Die RNA wurde aus einer wäßrigen Lösung durch Zugabe von 0,3M Natriumacetat pH5,2 (Endkonzentration) und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde analog zu der DNA weiter behandelt und anschließend in DEPC-H₂O aufgenommen.

4.1.2. Phenol/Chloroform-Extraktion

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) versetzt, kräftig durchmischt und für 5-10min zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und die DNA-Lösung wie in Kapitel 4.1.1.1 beschrieben präzipitiert.

4.1.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Dabei entspricht 1OD einer Konzentration von 50µg DNA/ml und 40µg RNA/ml.

4.1.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Aliquots der Proteinextrakte wurden mit einer 0,15M Natriumchlorid-Lösung auf ein Endvolumen von 100µl gebracht und 1ml Bradford-Lösung (100mg Coomassie G250; 50ml Ethanol; 100ml 85% Phosphorsäure; 850ml Wasser) zugegeben. Nach kurzem Mischen und 2min Inkubation bei RT wurde die optische Dichte der Lösung bei 595nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichkurve (BSA=„bovine serum albumin“) abgeschätzt, die durch mehrere Ansätze einer BSA-Eichlösung mit Proteinkonzentrationen zwischen 1-20µg hergestellt wurde.

4.1.5. Gelelektrophoresen

Alle Gelelektrophoresen die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in Maniatis et al. 1989 „Molecular Cloning. A laboratory manual“ beschrieben. Die verwendeten Farbmarker und Lösungen sind im Kapitel 4.20.2 aufgeführt.

4.2. Klonierung von DNA-Fragmenten

4.2.1. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die Bedingungen für den Restriktionsverdau sowie die Enzymmenge und der entsprechende Puffer entsprachen den Angaben der Hersteller (Fa.Amersham; Fa.Biolabs; Fa.Boehringer Mannheim). Bei DNA aus Miniextraktionen wurden 5µg RNase A zugesetzt. Der Restriktionsverdau wurde 1-2h bei 37°C inkubiert und anschließend ein Aliquot auf einem Agarosegel (1% Agarose; 1xTAE; 3-5µg EtBr) analysiert.

4.2.2. Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Die Abspaltung terminaler Phosphatgruppen mit einer Alkalischen Phosphatase (CIP=„Calf intestine phosphatase“; Fa.Boehringer Mannheim) wurde durchgeführt, um eine Religation des linearisierten Vektors zu verhindern.

Pipettierschema:

1-10 µg	linearisierter Vektor
5 µl	10xCIP-Puffer
1 µl	CIP (20U/µl)
ad. 20 µl	H ₂ O

Die Inkubation erfolgte für 15min bei 37°C und anschließend für 15min bei 56°C. Danach wurde erneut 1µl CIP (20U/µl) zugegeben und nochmals 15min bei 37°C inkubiert.

4.2.3. Die Klenow-Reaktion

Die Klenow-Reaktion dient zum Auffüllen von DNA-Enden mit einem 5'-Überhang und wird durch die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E.coli* katalysiert. Die Reaktion wurde nach vorheriger Inaktivierung des Restriktionsenzym durchgeführt, indem 2µl dNTPs (2,5mM) und 1µl „Klenow“-Polymerase (10U/µl) zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert wurde. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Enzym durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolpräzipitation inaktiviert.

4.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Region, die das gewünschte DNA-Fragment bzw. den linearisierten Vektor enthielt, wurde aus dem präparativen Agarosegel (1% Agarose; 1xTAE; 3-5µg/ml EtBr) ausgeschnitten und in ein Eppendorfröhrchen mit einem kleinen Loch überführt. Die Agarose wurde zerkleinert, indem sie durch das kleine Loch in ein zweites Eppendorfröhrchen zentrifugiert wurde (1min; 13000rpm; Eppendorfszentrifuge). Die zerkleinerte Agarose wurde mit gleichem Volumen Phenol versetzt, gemischt und auf Trockeneis eingefroren. Nach 10-15min Zentrifugation bei RT wurde der wäßrige Überstand abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform zweimal extrahiert (1min; 13000rpm; Eppendorfszentrifuge). Anschließend wurde die DNA durch Ethanolpräzipitation pelletiert und in Wasser oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

4.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren

Die DNA-Fragmente wurden gegenüber den linearisierten Vektoren in einem zwei- bis fünffachen Überschuß eingesetzt und die Ligation durch eine T4-DNA-Ligase (Fa.Amersham) katalysiert.

Pipettierschema:

2 µl	linearisierter Vektor (10-100ng)
2 µl	DNA-Fragment
2 µl	10xLigase-Puffer
1 µl	T4-DNA-Ligase (1-4U/µl)
ad. 20 µl	H ₂ O

Die Inkubation wurde für 3-4h bei RT oder über Nacht bei 16°C durchgeführt.

4.2.6. Transformation der Ligationsansätze

4.2.6.1. Chemokompetente Bakterien

100-150µl der chemokompetenten Bakterien (*E.coli* Stamm DH5α; im Labor vorrätig) wurden auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 10-20µl des Ligationsansatzes erfolgte für 20-30min eine Inkubation auf Eis und anschließend ein Hitzeschock für 90sec bei 42°C. Anschließend wurde 1ml LB-Medium zu den Bakterien gegeben, der Ansatz für 1h bei 37°C geschüttelt und 10% bzw. 90% der Transformation auf Antibiotika-enthaltende Agarplatten (Ampicillin 50µg/ml oder Kanamycin 25µg/ml; je nach verwendetem Vektor) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.6.2. Elektrokompente Bakterien

Der Transformationsansatz wurde durch Ethanolpräzipitation pelletiert und in 20µl Wasser aufgenommen. Davon wurden 2-4µl zu 40µl elektrokompente Bakterien (*E.coli* Stamm DH5α; im Labor vorrätig), die zuvor auf Eis aufgetaut wurden, zugegeben. Die Elektroporation erfolgte in einer 0,1cm Küvette bei 25µF und 1,8kV (Gene Pulser; Fa.BIO RAD). Nach der Elektroporation wurde 1ml LB-Medium zu den Bakterien gegeben und die Zellen für 1h bei 37°C geschüttelt. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte analog zu den chemokompetenten Bakterien (Kapitel 4.2.6.1).

4.3. Isolation von DNA

4.3.1. Mini-Extraktion von Plasmid-DNA

Einzelkolonien von Bakterien, die ein gewünschtes Plasmid oder Cosmid enthielten, wurden bei 37°C in 2ml LB-Medium (50µg/ml Ampicillin oder 25µg/ml Kanamycin) gewachsen. 1,5ml der Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfröhrchen überführt und für 1min bei 13000rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 100µl Lösung 1 (50mM Glukose; 25mM Tris/HCl pH 8,0; 10mM EDTA) gelöst und anschließend 200µl Lösung 2 (0,2N Natriumhydroxid; 1% SDS) zugegeben, vorsichtig gemischt und 5-10min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150µl Lösung 3 (5M Kaliumacetat; 11,5% Essigsäure) und vorsichtigem Mischen wurde für 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand

wurde in ein neues Eppendorfröhrchen mit 400µl Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) überführt und sorgfältig gemischt. Nach einer Zentrifugation für 5min bei 13000 rpm wurde der wäßrige Überstand entnommen und die DNA durch Ethanol-fällung pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 20-50µl Wasser oder 1xTE-Puffer aufgenommen.

4.3.2. Maxi-Extraktion von Plasmid-DNA

250ml LB-Medium (50µg/ml Ampicillin oder 25µg/ml Kanamycin) wurde mit einer Einzelkolonie der Bakterien angeimpft und über Nacht unter Schütteln inkubiert (37°C; 200rpm; Schüttelinkubator). Die Bakterienkultur wurde in einem 250ml Zentrifugenbecher pelletiert (5000rpm; 10min, 4°C; GSA-Rotor; Fa.Sorvall) und das Pellet in 10ml Lösung 1 (siehe 4.6.1.) suspendiert. Nach 10min Inkubation bei RT wurde 20ml Lösung 2 (siehe 4.6.1.) zugegeben und für 10min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 15ml Lösung 3 (siehe 4.6.1.), 10min Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation (10min; 10000rpm; 4°C; GSA-Rotor; Fa.Sorvall). Der Überstand wurde über einen Faltenfilter filtriert und in einem 50ml Zentrifugenröhrchen (Fa.Greiner) gesammelt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol gefällt, pelletiert (5000rpm; 10min; Heraeus-Zentrifuge) und in 4,5ml 1xTE-Puffer gelöst.

Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte über einen Cäsiumchlorid-Gradienten. Zunächst wurden 4,8g Cäsiumchlorid und 200-400µl einer Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) zugesetzt und durch vortexen gründlich gemischt. Die entstandenen Präzipitate wurden durch Zentrifugation (5000rpm; 5-10min; Heraeus-Zentrifuge) entfernt und der Überstand in ein Polycarbonat-Röhrchen (Quickseal; Fa.Beckmann) überführt. Nach einer Zentrifugation von 4-12h (VTi65-Rotor; 55-60000rpm, 20°C; Ultrazentrifuge) war die Plasmid-DNA deutlich als Bande sichtbar und konnte mit Hilfe einer 2ml Spritze mit Kanüle abgezogen werden. Die Plasmid-Lösung wurde in ein frisches Polycarbonat-Röhrchen (Quickseal; Fa.Beckmann) überführt, mit einer Cäsiumchlorid-Lösung (0,85g/ml) aufgefüllt und die Zentrifugation (s.o.) wiederholt. Die Plasmid-Bande wurde erneut abgezogen und das Ethidiumbromid mit wassergesättigten Butanol (ca. 4-5 Durchgänge) ausgeschüttelt. Nach Verdünnung der DNA-Lösung (1:4 mit 1xTE-Puffer) wurde die DNA wie beschrieben (siehe 4.1.1.1.) gefällt und in 1xTE-Puffer gelöst.

4.3.3. Präparation von genomischer DNA

Für die Präparation von genomischer DNA aus Geweben wurden die Proben in 500µl TNES-Puffer (50mM Tris/HCl pH 7,5; 100mM EDTA pH 8,0; 100mM NaCl; 1% SDS) zusammen mit 400µg Proteinase K für 4-12h bei 56°C lysiert. Zu dem Lysat wurden 500µl Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) zugegeben, gut gemischt und für 5-10min bei 13000rpm zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge). Die genomische DNA im wäßrigen Überstand wurde durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt und pelletiert (10min; 13000rpm; Eppendorfszentrifuge). Das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100µl Wasser aufgenommen.

Für die Präparation von genomischer DNA aus Gewebekulturzellen wurden diese zunächst pelletiert (5min; 900-1000rpm; Heraeus-Zentrifuge) und mit 1ml 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die gleiche Vorgehensweise wie bei den Geweben.

4.4. Isolation von RNA

4.4.1. Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgeweben und Gewebekulturzellen

Das entsprechende Gewebe / Gewebekultur Zellen wurden in einem 12,5ml Zentrifugenröhrchen (Fa.Sarstedt) in 4ml Solubilisierungspuffer (4ml Guanidiniumthiocyanat; 25mM Natriumacetat; 100mM β -Mercaptoethanol; 0,5% Natriumlauroylsarcosine) homogenisiert (20500rpm; 20-30sec; Ultra-Turrax T25). Anschließend wurden 4ml Phenol (wassergesättigt, pH4,0), 800 μ l Chloroform und 400 μ l 3M Natriumacetat pH4,2 zugegeben und gemischt. Nach 10min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (10000rpm; 15min; 4°C; SS34- oder SA600-Rotor; Fa.Sorvall) wurde die wäßrige Phase in ein neues 12,5ml Zentrifugenröhrchen (Fa.Sarstedt) überführt und die RNA mit einem Volumen Isopropanol gefällt (30-60min; -20°C). Die präzipitierte RNA wurde durch Zentrifugation pelletiert, in 500 μ l Solubilisierungspuffer (s.o.) aufgenommen und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Es folgte erneut eine Präzipitation der RNA mit 500 μ l Isopropanol (30-60min; -20°C). Die gefällte RNA wurde pelletiert (10min; 13000rpm; Eppendorfzentrifuge), zweimal mit 75% Ethanol gewaschen und in 200 μ l DEPC-H₂O aufgenommen. Die Lagerung der RNA erfolgte unter Ethanol (2,5 Volumen Ethanol; 0,3M Natriumacetat pH 5,2) bei -20°C.

4.4.2. Präparation von Gesamt-RNA aus primären Zellen für LightCycler

s 4.8.1

4.5. Hybridisierung von Nukleinsäuren

4.5.1. Koloniehybridisierung

Um Bakterien mit dem gewünschten Plasmid oder Cosmid nachweisen zu können, wurden die Kolonien von der Agarplatte auf Nylonmembranen (Hybond-N; Fa.Amersham) übertragen. Für die spätere Zuordnung der positiven Signale wurde die Nylonmembran in einem asymmetrischen Muster mit einer Tinte-getränkten Kanüle durchstoßen, wodurch gleichzeitig die Membran und die Agarplatte markiert wurden. Die Bakterien auf den Nylonmembranen wurden nach dem Transfer mit der Denaturierungslösung (0,5M Natriumhydroxid; 5M Natriumchlorid) lysiert, die gleichzeitig zu einer Denaturierung der DNA führte. Anschließend wurden die Membranen zweimal mit einer Neutralisierungslösung (0,5M Tris/HCl pH7,5; 1,5M Natriumchlorid) behandelt und einmal mit 4xSSC gewaschen. Die Nylonmembranen wurden zwischen 3MM Whatman-Papier gelegt und durch Faustschläge die Flüssigkeits- und Bakterienreste entfernt. Die DNA wurde durch eine UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker; Fa.Amersham) irreversibel an die Nylonmembranen gebunden und danach in der Hybridisierungslösung (0,5M Phosphatpuffer pH7,2; 7%SDS; 1mM EDTA) prähybridisiert (1h; 65°C; Hybridisierungsofen; Fa.Hybaid). Anschließend wurde die ³²P-markierte Probe zugegeben und über Nacht hybridisiert (65°C; Hybridisierungsofen; Fa.Hybaid). Am nächsten Tag wurden die Membranen einmal mit Waschlösung 1 (40mM Phosphatpuffer pH7,2; 5% SDS; 1mM EDTA pH8,0) und dreimal mit Waschlösung 2 (40mM Phosphatpuffer pH7,2; 1% SDS; 1mM

EDTA pH8,0) gewaschen. Die Waschschrirte erfolgten jeweils für 15min bei 65°C in dem Hybridisierungssofen (Fa.Hybaidd). Nach einem kurzen Schwenken der Nylonmembranen in 4xSSC wurden sie in Frischhaltefolie eingepackt und auf einem Röntgenfilm exponiert (-80°C; Verstärkerscreen).

4.5.2. Southern-Blot Analyse

Für die Southern-Blot Analyse wurden 10µg genomische DNA bzw. Cosmid-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und die DNA-Fragmente zusammen mit einem Längenstandard über ein Agarosegel (1% Agarose; 1xTAE; 3-5µg EtBr) aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel fotografiert (UV-Videosystem; Fa.Sony) und die DNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N; Fa.Amersham) übertragen. Der Transfer erfolgte über Vakuum (Vakuum-Blotter; Fa.Appligene) mit 10xSSC, wobei die DNA zunächst mit einer Denaturierungslösung (siehe 4.5.1) und anschließend einer Neutralisierungslösung (siehe 4.5.1) behandelt wurde. Nach dem Transfer wurden zunächst die Lage der einzelnen Taschen des Agarosegels mit Bleistift auf die Nylonmembran übertragen und dann die DNA durch UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker; Fa.Amersham) irreversibel an die Membran gebunden. Die Bedingungen für die Hybridisierung und die Exposition entsprachen der Beschreibung in Kapitel 4.5.1..

4.5.3. Northern-Blot Analyse

Für die Northern-Blot Analyse wurden 10µg Gesamt-RNA bzw. 2-5µg Oligo-dT-RNA in 20µl Probenpuffer (pro Ansatz 10µl Formamid; 3,5µl Formaldehyd; 1µl 20xMOPS; 5,5µl DEPC-H₂O) gelöst und nach Hitzedenaturierung (15min; 56°C) durch ein Formaldehydgel (1% Agarose; 18ml Formaldehyd/100ml; 1xMOPS) aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1mg/ml) gefärbt und fotografiert (UV-Videosystem; Fa.Sony). Die RNA wurde durch Vakuum (Vakuum-Blotter; Fa.Appligene) mit 10xSSC auf eine Nylonmembran (Hybond-N; Fa.Amersham) übertragen und danach die Lage der einzelnen Taschen des Formaldehydgels mit Bleistift auf der Nylonmembran markiert. Durch UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker; Fa.Amersham) wurde die RNA irreversibel an die Membran gebunden. Alle folgenden Schritte wurden analog zu der Koloniehybridisierung (4.5.1.) durchgeführt.

4.5.4. Radioaktive Markierung von DNA-Proben

Die radioaktiven DNA-Proben für die Koloniehybridisierungen bzw. Southern- und Northern-Blot Analysen wurden durch Anwendung des „rediprime II“ (Fa.Amersham) Kits nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

4.5.5. Aufreinigung der radioaktiv markierten DNA-Proben

Gebrauchsfertige Säulen („push columns“; Fa.Stratagene) wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet, um überschüssige Nukleotide von den markierten DNA-Proben zu trennen.

4.6. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA sowie amplifizierter Fragmente aus PCR-Reaktionen erfolgte nach dem Protokoll der Firma Perkin Elmer.

Ansatz der PCR:

400 ng Plasmid DNA

5 pmol Primer

4 µl Sequenzier-Mix

ad 10 µl HPLC-Wasser

Die Analyse erfolgte im ABI PRISM 310 Genetic Analyzer durch Frau Dr. Escher bzw. Frau Sabine Linder

4.7. "primer extension"

4.7.1. Radioaktive Primermarkierung

2pmol des Primers OCA-B37 wurden mit 50µCi P³² γ-ATP mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase markiert. Die Markierung erfolgte nach dem Protokoll der Firma Amersham. Die markierten Primer wurden über Säulen aufgereinigt und im Scintillations-Zähler vermessen.

4.7.2. "primer extension"

30µg aufgereinigte RNA (s. 4.7.1.) wurden mit mindestens 5x10⁴ cpm (count per minute) des markierten Primers mittels Ethanol präzipitiert, getrocknet und in 10µl 1xPE aufgenommen. Die Hybridisierung des Primers erfolgte bei 45°C für 120 min im Wasserbad. Dem Ansatz wurden 40µl Reverse Transkriptase Mix zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Die entstandene DNA wurde präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 10µl 95% Formid, 30mM Natriumhydroxyd und Bromphenolblau aufgenommen und mittels eines 8%-igen Sequenziergels aufgetrennt. Die Analyse erfolgte mittels Autoradiographie.

4.8. LightCycler PCR

4.8.1. Isolation der RNA

Die Isolation der RNA aus Zellkulturzellen und primären Zellen für die LightCycler Anwendung erfolgte mit Hilfe des "High Pure RNA Isolation Kit", die Durchführung erfolgte nach dem zugehörigen Protokoll der Firma Roche.

4.8.2. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription der präparierten RNA erfolgte mittels der MMLV-RT und nach dem zugehörigen Protokoll der Firma GIBCO-BRL.

4.8.3. LightCycler PCR

Die erhaltenen cDNAs wurden 1:10 verdünnt. Anschließend erfolgte nochmals eine serielle Verdünnung im Verhältnis 4:2:1. Je 4µl der Verdünnungen wurden in die LightCycler Reaktion eingesetzt.

Pipettierschema der PCR:

- 4µl cDNA
- 1,2µl Magnesiumchlorid (Roche)
- 1µl Primer-Mix (je 10D/ml)
- 1µl CyberGreen-Mix (Roche)
- ad 10µl Wasser (Roche)

Jede cDNA-Verdünnung wurde dreimal im LightCycler quantifiziert. Die Effizienzen der PCRs lagen zwischen 1,85 und 2,00. Bei der Amplifikation eines Gens waren die Unterschiede in der Effizienz nicht größer als 0,05.

4.8.4. Auswertungsmethode

Die Auswertung erfolgte als relative Quantifizierung unter Anlehnung an die Literatur von Roche und Perkin Elmer zum Thema Relative Quantifizierung:

Eine der beiden Zellpopulationen (Population I) wurde als Kalibrator verwendet, d.h. die Werte für ein Gen wurden im Kalibrator immer gleich 1 gesetzt und die Werte der anderen Zellpopulation (Population II) werden im Anschluß auf diesen Wert bezogen. In Excel wurden die Daten als Punkte in ein Koordinatensystem eingetragen, auf der X-Achse wurde der dekadische Logarithmus der eingesetzten cDNA Menge (4µl, 2µl und 1µl ergeben somit 0,6, 0,3 und 0) aufgetragen, auf der Y-Achse die Werte der benötigten PCR-Zyklen (Wendepunkt der Kurve, s. Abbildung 11). Anschließend wurde eine Regressionsgerade durch die Punkte gelegt. Hiermit konnten der Korrelationskoeffizient und die Geradengleichung ermittelt werden. Alle Zyklus-Werte wurden in die Ausgleichsgerade des Kalibrators eingesetzt und die korrespondierenden cDNA-Mengen der Zellpopulation II errechnet. Anschließend wurden alle cDNA-Mengen der verschiedenen untersuchten Gene durch die zugehörigen cDNA-Mengen des Kontrollgens dividiert (Abgleich der Mengen auf das Kontrollgen, d.h. die cDNA-Mengen im Kontrollgen werden für den Kalibrator und die Zellpopulation II gleich 1 gesetzt). Im Anschluß daran wurden die so erhaltenen Werte der Zellpopulation II durch die des Kalibrators geteilt (d.h. der Kalibrator wird gleich 1 gesetzt, die Menge an zugehöriger cDNA in der Population II wird als x-fache Induktion dargestellt).

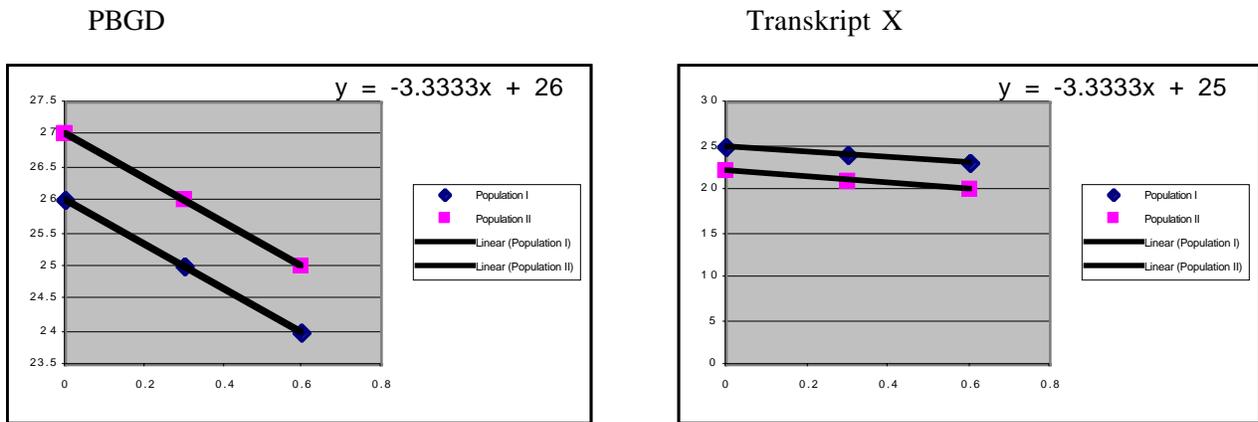
Material und Methoden

Im folgenden ist die Berechnung beispielhaft dargestellt:

Gemessene Werte für die Populationen I und II

	Zellpopulation I		Zellpopulation II	
	cDNA-Menge	PCR-Zyklen	cDNA-Menge	PCR-Zyklen
PBGD:	4µl	24	4µl	25
	2µl	25	2µl	26
	1µl	26	1µl	27
Transkript X	4µl	23	4µl	20
	2µl	24	2µl	21
	1µl	25	1µl	22

Regressionsgeraden für die PCR-Werte:



Berechnete cDNA-Mengen mittels der Regressionsgeraden für die Population I

	Zellpopulation I cDNA-Menge	Zellpopulation II cDNA-Menge
PBGD:	4µl	2µl
	2µl	1µl
	1µl	0,5µl
Transkript X	4µl	32µl
	2µl	16µl
	1µl	8µl

Abgleich des Transkriptes X gegen PBGD (Werte für Transkript X dividiert durch die zugehörigen Werte von PBGD)

	Zellpopulation I cDNA-Menge	Zellpopulation II cDNA-Menge
Transkript X	1	16
	1	16
	1	16

Das Transkript ist von Zellpopulation I zu Zellpopulation II 16-fach induziert.

4.9. Herstellung von Proteinextrakten

4.9.1. Proteinextrakte aus primären Zellen

Die primären Zellen (z.B. Zellen der Milz oder Thymozyten) wurden pelletiert (1min; 1000rpm; Heraeus-Zentrifuge), mit 1ml 1xPBS gewaschen und dabei in ein Eppendorfröhrchen überführt (20-30sec; 13000rpm; Eppendorfszentrifuge). Anschließend wurden sie in einem dreifachen Volumen RIPA-Puffer (50mM Tris/HCl pH8,0; 150mM Natriumchlorid; 0,1% SDS; 0,5% DOC; 1% NP40; 1mM DTT; 1mM PMSF) lysiert, für 5-10min auf Eis inkubiert und die Proteinextrakte zentrifugiert (10min; 13000rpm; 4°C; Eppendorfszentrifuge). Die Überstände wurden abgenommen, aliquotiert und ein Teil der Aliquots direkt für die Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. Der Rest wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und später in Western-Immunoblot Analysen eingesetzt. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -80°C.

4.9.2. Proteinextrakte aus transformierten Zelllinien

Für die Proteinextrakte aus transformierten Zelllinien (z.B. S194-Plasmacytoma und NIH/3T3-Fibroblasten Zellen) wurden die Zellen pelletiert (5min; 1000rpm; Heraeus-Zentrifuge), mit 1ml 1xPBS gewaschen und dabei in ein Eppendorfröhrchen überführt (20-30sec; 13000rpm; Eppendorfszentrifuge). Je nach experimentellem Ansatz wurden die Zellen mit unterschiedlichen Extraktionspuffern lysiert:

a) Für die Bestimmung der Luziferaseaktivität nach transienten Transfektionen wurden die Zellen in 100µl Triton-X-100 Extraktionspuffer (100mM Kaliumphosphatpuffer pH7,4; 0,2% Triton-X-100; 1mM DTT) lysiert, 5-10min auf Eis inkubiert und anschließend die Proteinextrakte zentrifugiert (10min; 13000rpm; 4°C; Eppendorfszentrifuge). Der Überstand wurde direkt für die Bestimmung der Luziferase- und β -Galaktosidaseaktivität verwendet.

b) In Experimenten, in denen die Proteinextrakte ausschließlich in Western-Immunoblot Analysen eingesetzt wurden, erfolgte der Zellaufschluß in einem dreifachen Volumen RIPA-Puffer (50mM Tris/HCl pH8,0; 150mM Natriumchlorid; 0,1% SDS; 0,5% DOC; 1% NP40; 1mM DTT; 1mM PMSF). Nach Inkubation für 5-10min auf Eis wurden die Extrakte zentrifugiert (10min; 13000rpm; 4°C; Eppendorfszentrifuge) und der Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen überführt. Die Konzentration der Proteinextrakte wurde nach der Bradford-Methode bestimmt und die Proteinextrakte entweder direkt für Western-Immunoblot Analysen verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -80°C.

4.10. Immunoblot (Western-Blot Analyse)

Proteinextrakte wurden in 2xLaemmli-Puffer (12,5ml 1M Tris/HCl pH 6,8; 10ml 20% SDS; 11,25ml Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; 1-2% β -Mercaptoethanol; ad 50ml H₂O) aufgekocht (15min; 96°C), zusammen mit einem Größenstandard („low range“; Fa.BIO RAD) über ein 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und danach auf eine PVDF-Membran (Fa.Millipore), die zuvor nach den Angaben des Herstellers aktiviert wurde, transferiert. Der Transfer erfolgte in einer „Semidry“-

Apparatur (Fa.BIO RAD) nach den Angaben des Herstellers. Nach dem Transfer erfolgte für 1h bei RT die Behandlung der Membran mit Blockmilch (1xPBS; 7.5% Magermilchpulver; 0,5% Tween-20) und anschließend die Inkubation mit dem ersten Antikörper in Blockmilch (1-2h; RT; Horizontalschüttler). Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal 15min in Waschpuffer (1xPBS; 0,5% Tween-20) geschüttelt und anschließend der Peroxidase-gekoppelte, zweite Antikörper (Fa.Sigma) in Blockmilch (Verdünnung 1:5000) zugegeben. Nach der Inkubation für 30-60min auf dem Horizontalschüttler wurde die Membran dreimal 15min gewaschen (s.o.), nach den Angaben der Hersteller entwickelt („ECL-System“ Fa.Amersham) und auf einen Röntgenfilm exponiert.

4.11. Expression und Aufreinigung rekombinanter Protein

4.11.1. Glutathion-S-Transferase (GST) markierte Proteine

Die Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine mit GST-Markierung erfolgte in Anlehnung an die Anleitung von Amersham/Pharmacia. Die mit dem Plasmid transformierten DH5 α wurden ü.N. bei 37°C in 100 ml LB inkubiert. 40 ml dieser Kultur wurden danach zum Animpfen von 500ml LB verwendet. Die Bakterien erhielten bei einer OD von 0,6 250 μ l IPTG (50mg/ml) und wurden für weitere 3h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (8000 rpm JA20 Rotor Beckman) und in eiskaltem PBS resuspendiert (50 μ l/ml Kultur). Die Bakterien wurden sonifiziert und anschließend Triton X-100 (Endkonz. 1%) zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurden der Überstand mit Glutathion-Sepharose (1ml) für 2h bei 4°C inkubiert. Die "beads" wurden in einer Säule mit Filter aufgefangen, mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml 10mM Glutathion in 50mM Tris-HCl für 1h bei 4°C inkubiert. Das Eluat wurde von Herrn Slupsky (MSZ, Würzburg) über eine Sepharose-Säule aufgereinigt. Die erhaltenen Fraktionen wurden im Polyacrylamid-Gel analysiert.

4.11.2. In vitro Transkription und Translation

Die Expression von Proteinen in vitro erfolgte mit dem TNT Coupled Reticulozyten Lysat System von Promega nach dem mitgelieferten Protokoll.

4.12. "pull-down assay"

Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden für 2h mit Zell-Lysaten oder mit in vitro translatierten Proteinen in TLB-Puffer bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l Glutathion-Sepharose zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Die Glutathion-Sepharose wurde anschließend abzentrifugiert und mit TLB gewaschen. Die Analyse der kopräzipitierten Proteine erfolgte im Western-Blot.

4.13. "yeast-two hybrid screen"

4.13.1. Allgemeines Arbeiten mit Hefen

Der im yeast-two hybrid screen verwendete Hefestamm ist HF7c. Dieser Stamm wächst auf Vollmediumplatten (YPD). Die Selektion auf das "bait"-Plasmid erfolgt über ein Selektionsmedium mit Tryptophan-Defizienz (-Trp). Die Selektion auf das "prey"-Plasmid erfolgt über ein Selektionsmedium mit Leucin-Defizienz (-Leu). Die Selektion auf eine Interaktion des Proteins im "bait"- und dem im "prey"-Plasmid erfolgt über ein Selektionsmedium mit Tryptophan-, Leucin- und Histidin-Defizienz unter Zugabe von 5mM 3Amino1,2,4Triazol (Fa.Sigma).

4.13.2. Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Die Jurkat cDNA-Bank wurde von Herrn Bernd Neufeld zur Verfügung gestellt (MSZ). Die Amplifikation der Milz cDNA-Bank erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Clontech. Der Titer der Bank betrug 2×10^9 /ml. 5×10^7 unabhängige Klone wurden auf 120 14,5cm LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert. Alle Klone wurden mit 5ml LB-Medium von den Platten gekratzt, die Menge an LB auf 2l aufgestockt und im Schüttler für weitere 2h inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf sechs 500ml Zentrifugenbecher verteilt und bei 4°C, 3000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit je 50ml Lösung1 resuspendiert (s. 4.3.2.). Anschließend wurde wie bei einer normalen Maxi-Extraktion mit 100ml Lösung2 und 150ml Lösung3 und anschließender Zentrifugation verfahren. Alle Überstände wurden vereinigt und mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde in TE aufgenommen mit Ethidiumbromid und Cäsiumchlorid versetzt und im VTi50 für zweimal 24h bei 50.000rpm zentrifugiert. Die erhaltenen Banden wurden wie in 4.3.2. beschrieben aufbereitet.

4.13.3. Hefe-Transformation

4.13.3.1. Hefe-Transformation für einzelne Plasmide

1,5 ml einer üN gewachsenen Kultur wurden kurz abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Mit den verbleibenden 50-100µl wurden die Hefen resuspendiert und 10µl "carrier"-DNA (2mg/ml) zugegeben. Nach Zugabe von 1µg Plasmid-DNA wurde der Ansatz kurz gevortext. Nach Zugabe von 500µl Plate-Mix (45% PEG-4000, 100mM Lithiumacetat, 10mM Tris-HCl pH7,5, 1mM EDTA) wurde erneut gevortext. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20µl DTT (1M), vortexen und Inkubation bei RT für 6-8h. Bei 42°C erfolgte für 10min ein Hitzeschock. Anschließend wurden die Hefen auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

4.13.3.2. Hefe-Transformation für cDNA-Banken

Die Transformation der Hefen mit einer cDNA-Bank erfolgte in Anlehnung an (Gietz et al., 1995). 100ml der das "bait"-Plasmid enthaltenden Hefekultur wurden üN bei 30°C in -Trp-Selektionsmedium inkubiert. 300ml YPD-Medium wurden am nächsten Tag mit $1,5 \times 10^9$ Zellen angeimpft und bis zu einer Dichte von 2×10^7 Zellen/ml kultiviert. Anschließend wurden die Hefen bei 3000g abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und der Reihe nach folgende Substanzen auf das Pellet

gegeben: 14,4ml PEG, 2,16ml Lithiumacetat (1M), 1,5ml "carrier"-DNA (2mg/ml), 300µg cDNA-Bank (1µg/µl), 2,7ml Wasser. Der Ansatz wird gevortext und für 30min bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 35min. Die Platten wurden für 7-14 Tage bei 30°C inkubiert. Wachsende Klone wurden anschließend auf die Expression von β -Galactosidase getestet.

4.13.4. β -Galactosidase-Test

Die Hefen wurden auf -Trp/-Leu/-His Platten auf eine Nitrocellulose-Membran ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Membran wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend, mit den Kolonien nach oben, auf ein mit Reaktionspuffer (100mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,4; 10mM Kaliumchlorid; 1mM Magnesiumsulfat; 35µl/10ml β -Mercaptoethanol, 500µl/10ml X-Gal (Fa. Appllichem) Stocklsg (20mg/ml)) getränktes Whatmanpapier gelegt. Die Farbentwicklung wurde über 8h hinweg beobachtet.

4.13.5. Plasmid-Preparation aus Hefen

1,5ml von Übernachtskulturen wurden kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 100µl STET-Puffer resuspendiert. Dieselbe Volumenmenge Glassperlen wurde zu den resuspendierten Hefen gegeben und 5min gevortext. Nach Zugabe von weiteren 100µl STET-Puffer (8% Saccharose, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 5% Triton X-100) und kurzem vortexen, wurde der Ansatz für 3min in kochendes Wasser gestellt und anschließend bei 4°C 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 50µl 7.5M Ammoniumacetat versetzt und für 30min auf -20°C gestellt. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 4°C für 10min. Der Überstand wird mit 2 Volumeneinheiten Ethanol versetzt, für 30min auf -20°C gestellt und die DNA präzipitiert. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde in kompetente DH5 α transformiert.

4.14. Allgemeine Zellkulturtechniken

4.14.1. Zentrifugation von Zellen

Die Zentrifugationsschritte wurden, falls nicht anders vermerkt, in einer Heraeus-Zentrifuge bei 900-1000rpm für 5min durchgeführt.

4.14.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zunächst wurde ein Deckglas angebracht und dann ein Tropfen einer Zellsuspension seitlich zugegeben. Unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl in einem großen Quadrat bestimmt, die mit 1×10^4 multipliziert die Zellzahl/ml ergab. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension vor dem Zählen mit Trypanblau angefärbt. Nach ca. 30sec waren die toten Zellen blau angefärbt und wurden bei der Zellzahlbestimmung nicht berücksichtigt.

4.14.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden pelletiert und $0,1-1 \times 10^7$ Zellen in 1ml gekühltem Einfriermedium (90% FCS; 10% DMSO) suspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,8ml (Fa.Greiner) überführt und in einer Styroporbox bei -70°C langsam eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert, bis die Zellsuspension aufgetaut war. Danach wurde die Zellsuspension in ein 15ml Zentrifugenröhrchen (Fa.Greiner) mit 10ml DMEM-Medium bzw. RPMI-Medium überführt und zentrifugiert (5min; 900rpm; Heraeus-Zentrifuge). Das Zellpellet wurde in DMEM-Medium bzw. RPMI-Medium aufgenommen und in Kultur genommen.

4.15. Kultivieren von Zelllinien

4.15.1. Kultivieren von transformierten Zelllinien

Die verwendete B-Zelllinie (S194-Plasmazytoma und Ramos-Zellen) und Fibroblasten-Zelllinien (NIH/3T3) wurden in DMEM-Medium bzw. die Ramos-Zellen in RPMI-Medium (Fa. Gibco BRL) kultiviert (37°C ; 5% CO_2). Das Medium wurde mit 10% Kälberserum (FCS; Fa.PAN); 1xPenicillin/Streptomycin (Fa.GIBCO BRL) und $50\mu\text{M}$ β -Mercaptoethanol supplementiert. Im Falle von RPMI-Medium kamen noch Glutamin (Fa. Gibco BRL) dazu. Während die S194-Plasmazytoma Zellen und die Ramos-Zellen in normalen Petrischalen (Fa.Greiner) als Suspensionskultur gehalten wurden, erfolgte die Kultivierung von NIH/3T3-Zellen in beschichteten Gewebekulturschalen (Fa.Greiner). Die Kulturen wurden je nach Zelldichte alle zwei bis vier Tage zwischen 1:2 und 1:10 in frisches Medium umgesetzt. Für das Umsetzen wurden die NIH/3T3-Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen und danach mit Trypsin/EDTA (Fa.Gibco BRL) trypsinisiert. Nach dem Ablösen wurden die Zellen in DMEM-Medium aufgenommen, pelletiert und in frischem DMEM-Medium ausplattiert.

4.15.2. Kultivieren von primären Thymozyten

Der Thymus wurde aus der Maus präpariert und Einzelzell-Suspensionen hergestellt, indem die Organe in DMEM-Medium (siehe 4.15.1) mit dem Stempel einer 5ml Spritze über steriles Mull (ca. 1cm^2 große Stücke) gedrückt wurden. Die Zellsuspension aus dem Thymus wurde direkt in Kultur genommen

4.16. Transfektionen von Zelllinien

4.16.1. DEAE-Dextran-Transfektion von S194-Plasmazytoma, Jurkat T- und Ramos B-Zellen

Die DNA für die Transfektion wurde durch Ethanolpräzipitation gefällt und das Pellet unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 1,3ml TS-Puffer (1ml Magnesiumchlorid/Kalziumchlorid-Lösung (10mg/ml); 99ml 1xTD pH7,4 (4g Natriumchlorid; 0,19g Kaliumchlorid; $50\mu\text{g}$ Di-Natriumhydrogenphosphat; 1,5g Tris; ad. 500ml Wasser)) gelöst. Der DNA-

Lösungen wurden 75µl DEAE-Dextran (10mg/ml) zugegeben, vorsichtig gemischt und inkubiert (15min; RT). In dieser Zeit wurden die Zellen pelletiert und einmal mit TS-Puffer gewaschen (5min; 13000rpm; Heraeus-Zentrifuge). Das Zellpellet wurde im DNA-DEAE-Mix aufgenommen und inkubiert (15min; RT). Während der Inkubation wurde das Röhrchen mehrmals durch leichtes Klopfen durchmischt, um das Verklumpen von Zellen und DEAE-Dextran zu verhindern. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 10µM Chloroquin, das in 10ml DMEM-Medium (siehe 4.15.1) enthalten war (30min; 37°C). Nach der Chloroquin-Behandlung wurden die Zellen pelletiert (5min; 900rpm; Heraeus-Zentrifuge), in 10ml DMEM-Medium aufgenommen und kultiviert (37°C; 5% CO₂). Nach 16-20h wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt.

4.16.2. Kalziumphosphat-Transfektion von NIH/3T3

Die DNA wurde wie in Kapitel 4.16.1 beschrieben vorbereitet und danach in 225µl Wasser gelöst. Zu der DNA-Lösung wurden zunächst 250µl 2xHBS pH7,04 (280mM Natriumchlorid; 1,5mM Natriumhydrogenphosphat; 12mM Glukose; 50mM Hepes) und anschließend langsam 25µl 2,5M Kalziumchlorid unter ständigem Schütteln zugegeben. Die Lösung wurde für 20min bei RT inkubiert, wobei sich Kalziumphosphat-DNA-Kopräzipitate ausbildeten, die eine Trübung der Lösung verursachten. In dieser Zeit wurden die Zellen für die Transfektion vorbereitet, wobei für einen Transfektionsansatz eine ca. 60-70% konfluente Gewebekulturschale (94mm; Fa.Greiner) mit Fibroblasten verwendet wurde. Von den Zellen wurde das Medium abgesaugt, anschließend das Kopräzipitat direkt auf die Zellen gegeben und 10-20min bei RT inkubiert. Danach wurden 10ml frisches DMEM-Medium (siehe 4.15.1) zugegeben und die Zellen weiter kultiviert (37°C; 5% CO₂). Nach 16-20h wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt.

4.16.3. Elektroporation von NIH/3T3-Zellen

Die DNA wurde wie in Kapitel 4.16.1 beschrieben vorbereitet und danach in 200µl 1xPBS gelöst. Pro Transfektionsansatz wurde die Hälfte einer konfluenten Gewebekulturschale (145mm; Fa.Greiner) mit NIH/3T3-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (Fa.GIBCO BRL) abgelöst. Nach dem Ablösen wurden die Zellen in 10ml DMEM-Medium (siehe 4.15.1) suspendiert, zentrifugiert und dreimal mit 1xPBS gewaschen (5min; 900rpm; Heraeus-Zentrifuge). Das Zellpellet wurde in der DNA-Lösung suspendiert und in eine Küvette (0,4cm; Fa.BIO RAD) überführt. Die Elektroporation wurde bei 0,45kV und 250µF (Gene Pulser; Fa.BIO RAD) durchgeführt. Nach 10min Inkubation bei RT wurden die Zellen in DMEM-Medium aufgenommen und auf Gewebekulturplatten ausplattiert.

4.17. Bestimmung von Enzymaktivitäten

4.17.1. Messung der β -Galaktosidaseaktivität

Für den Abgleich von transienten Transfektionen wurden zu den Ansätzen 100-200ng DNA eines Expressionsvektors für β -Galaktosidase zugegeben. Ein künstliches Substrat der β -Galaktosidase ist ONPG (Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktosidase), bei dessen Spaltung eine Gelbfärbung nachgewiesen werden kann. 10-20 μ l der Proteinextrakte (siehe 4.9.1.) aus transienten Transfektionen wurden mit 500 μ l Reaktionspuffer (100mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,4; 10mM Kaliumchlorid; 1mM Magnesiumsulfat; 35 μ l/10ml β -Mercaptoethanol) und 100 μ l ONPG (4mg/ml) gemischt und solange bei 37°C inkubiert, bis eine deutliche Gelbfärbung sichtbar wurde. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 μ l 1M Natriumcarbonat gestoppt und die Absorption bei 420nm im Photometer gemessen.

4.17.2. Messung der Luziferaseaktivität

Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte durch Bestimmung der Lichteinheiten, die bei der Umsetzung des Substrates Luziferin unter ATP-Verbrauch entstand. 5-10 μ l des Proteinextraktes aus Zellen (siehe 4.9.2.) wurden mit 50-100 μ l Reaktionsmix (Angesetzt nach den Angaben des Herstellers; Fa.Boehringer Mannheim) gemischt und die Luziferaseaktivität für 10sec gemessen (Biolumat; Fa.Berthold). Zusätzlich wurde die Hintergrundaktivität des Reaktionsmixes ohne Proteinextrakt bestimmt und die absolute Luziferaseaktivität unter Berücksichtigung der Hintergrundaktivität berechnet. Bei Messungen der Luziferaseaktivität von transienten Transfektionen wurde die relative Luziferaseaktivität anhand der β -Galaktosidaseaktivität (siehe 4.17.1) in den Proteinextrakten berechnet und dargestellt.

4.18. Immunfluoreszenz Analysen

Immunfluoreszenz Analysen wurden verwendet, um die zelluläre Lokalisation BOB.1/OBF.1 und SIAH1 in transient transfizierten NIH/3T3-Zellen nachzuweisen. Die transfizierten Zellen wurden auf einem Deckglas, das sich in einer Gewebekulturplatte („6 well“; Fa.Greiner) befand, ausplattiert und für 20h inkubiert (37°C; 5% CO₂). Danach wurden die angewachsenen Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen, mit 1xPBS/4% Paraformaldehyd fixiert (15min; RT). Nach dreimaligen Waschen mit 1xPBS wurden die unspezifische Bindungsstellen mit 1xPBS/0,5% Triton-X-100 geblockt (30min; RT) und die Zellen anschließend mit dem 1. Antikörper (4mg/ml anti-FLAG bzw. anti-BOB.1/OBF.1 1:200 in 1xPBS/0,2% Tween 20) inkubiert (30min; 37°C). Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper wurden die Zellen dreimal mit 1xPBS/0,2% Tween 20 gewaschen und mit dem 2. Antikörper (anti-Kaninchen FITC bzw. anti-Maus Texas-Rot 1:300 in 1xPBS/0,2% Tween 20) inkubiert (30min; 37°C). Die Zellen wurden anschließend dreimal mit 1xPBS gewaschen und die Zellkerne mit 30-50 μ l Hoechst-Reagenz (25 μ g/ml Endkonzentration) angefärbt (10-20min; 37°C; abgedunkelt). Nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS/0,2% Tween 20 wurden die Deckgläser auf Objektträger plaziert und mit Mowiol eingedeckt.

4.19. Messung der Protein-Halbwertszeit

NIH/3T3 Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und μ N. kultiviert. Die Zellen wurden anschließend trypsinisiert und auf 1cm Gewebekulturschalen ausgesät. Nach 3h wurde das DMEM abgesaugt und durch Medium mit dialysiertem Serum ersetzt. Nach 1h erfolgte die Zugabe von 1mCi/ml S^{35} -markiertem Cystein/Methionin für eine halbe Stunde. Anschließend wurde dieses Medium durch DMEM dem zusätzlich Cystein und Methionin zugefügt war ersetzt. Die Lyse der Zellen in TLB erfolgte sofort danach (0h Wert), oder zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Lysate wurden mit dem monoklonalen BOB.1/OBF.1 Antikörper für 1h bei 4°C inkubiert und anschließend mit ProteinA-Sepharose präzipitiert. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot.

4.20. Allgemein verwendete Materialien

4.20.1. Chemikalien

APS	Guanidiniumthiocyanat	Natriumdodecylsulfat
Bromphenolblau	Hepes	Natriumhydrogencarbonat
Butanol	Isopropanol	Natrium-di-hydrogenphosphat
Cäsiumchlorid	Kaliumacetat	Di-Natriumhydrogenphosphat
Chloroform	Kaliumchlorid	Natriumhydroxid
Diethanolamin	Kalium-di-hydrogenphosphat	Natriumlauroylsarcosin
DMSO	Di-Kaliumhydrogenphosphat	Nonidet P40
DOC	Kalziumchlorid	Paraformaldehyd
DTT	Magnesiumchlorid	Phenol
EDTA	Magnesiumsulfat	Phosphorsäure
Essigsäure	β -Mercaptoethanol	PMSF
Ethanol	Methanol	Salzsäure
Ethidiumbromid	MOPS	TEMED
Formaldehyd	Natriumacetat	Tris-Base
Formamid	Natriumazid	Triton-X-100
Glycerin	Natriumchlorid	Tween-20
Glycin	Natriumcitrat	Xylencyanol

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Fa.Merck; Fa.Roth; Fa.Boehringer Mannheim; Fa.BIO RAD; Fa.GIBCO BRL; Fa.Pharmacia; Fa.Riedel de Haen; Fa.Serva; Fa.Sigma; Fa.Applichem; Fa.Fluka

Material und Methoden

4.20.2. Puffer und Lösungen

DNA-Farbmarker	15%	Glycerin
	10%	Ficoll
	40mM	EDTA
	0,2%	Xylencyanol
	0,2%	Bromphenolblau
20xMOPS	0,4M	MOPS
	100mM	Natriumacetat
	10mM	EDTA
10xPBS pH 7,2	87,65g	Natriumchlorid
	2g	Kaliumchlorid
	11,7g	Di-Natriumhydrogenphosphat
	2,4g	Natrium-di-hydrogenphosphat
	ad. 1l	H ₂ O
1xPE	1.25M	Kaliumchlorid
	50mM	Tris/HCl pH 7,5
	5 mM	EDTA
1M Phosphatpuffer	85g	Di-Natriumhydrogenphosphat
	4ml	85% orto-Phosphorsäure
	ad. 1l	H ₂ O
Reverse Transcriptase Mix	8 µl	5xPuffer (von der Firma mitgeliefert)
	1µl	dNTP-Mix (20mM pro Nucleotid)
	0,4µl	BSA (10 mg/ml)
	29,6µl	DEPC-Wasser
	1µl	MMLV-RT (200 U/µl)
20xSSC	3M	Natriumchlorid
	0,3M	Natriumcitrat
50xTAE	242g	Tris-Base
	57,2ml	Essigsäure
	37g	EDTA
	ad. 1l	H ₂ O

Material und Methoden

10xTBE	1M	Tris-Base
	1M	Borsäure
	20mM	EDTA pH8,0
1xTE	10mM	Tris/HCl pH7,5
	1mM	EDTA pH 8,0
TLB	25mM	Tris pH 8,0
	150mM	Natriumchlorid
	2mM	EDTA
	1%	Triton X-100
	10%	Glycerin

4.20.3. Medium für Bakterien-, Hefe- und Zellkultur

Bakterienmedien:

LB-Medium	10g	Trypton	Fa.Difco
	5g	Hefe-Extrakt	Fa.Difco
	10g	Natriumchlorid	
	ad. 1l	H ₂ O	

LB-Platten	LB-Medium	
	1,5% Bacto-Agar	Fa.Difco

Hefemedien:

Aminosäure-Lösung	Arginin	0,2g
Für 100ml	Histidin*	0,1g
	Isoleucin	0,6g
	Leucin*	0,6
	Lysin	0,4
	Methionin	0,1g
	Phenylalanin	0,6g
	Threonin	0,5g
	Tryptophan*	0,4g

* je nach Selektionsbedingungen wurde diese Aminosäure weggelassen
alle Aminosäuren von Fa. Sigma

Material und Methoden

YPD	Yeast Extract	11g
	Bacto Peptone	22g
	Adenin	55mg
	ad 900ml Wasser+ 100ml 20% Glucose	
Selektionsmedium	Difco yeast nitrogen base	2g
	Ammoniumsulfat	6g
	Tyrosin	55mg
	Uracil	55mg
	Adenin	55mg
	Ad 900ml Wasser + 100ml Glucose + 10ml Aminosäure-Lösung	

Alle Medien und Komponenten für die Zellkultur wurden, falls nicht anders angegeben von der Fa.GIBCO BRL verwendet.

Dulbecco's Modified Eagels Medium (DMEM)

RPMI-Medium

100xGlutamin

10xPenicilin/Streptomycin

Trypsin/EDTA

Kälberserum (Fa.PAN)

4.20.4. Reagenzien und Antikörper

Acrylamid/Methyl-	Fa.Applichem	Kanamycin	Fa.Sigma
Bisacrylamid (37,5:1)			
Agarose	Fa.GIBCO BRL	1kb-ladder	Fa.Gibco BRL
Ampicillin	Fa.Applichem	Lipopolysaccharide	Fa.Sigma
BSA	Fa.Boehringer Mannheim		Fa.BIO RAD
Chloroquin	Fa.Sigma	Lympholyte-M	Fa.Cedarlane
Coomasie Brilliant Blue G250	Fa.Serva	Magermilchpulver	Fa.Applichem
DEAE-Dextran	Fa.Sigma	Mowiol	von der AG Dr.S.Ludwig und Prof. Fischer (MSZ Würzburg) zur Verfügung gestellt
DEPC	Fa.Sigma	ONPG	Fa.Applichem

Material und Methoden

Desoxyribonukleotide	Fa.GeneCraft	³² P-markierte Nukleotide (dCTP, γATP)	Fa.Amersham
Ficoll 400	Fa.Pharmacia	S ³⁵ -Methionin, S ³⁵ -Cystein	Fa.Amersham
Glukose	Fa.Applichem	Tetrazyklin	Fa.Sigma
Hoechst Reagenz 33258	Fa.Hoechst	Trypanblau	Fa.Boehringer Mannheim
Antikörper für Immunoblot:	Kanninchen anti- BOB.1/OBF.1 Maus anti BOB.1/OBF1 anti-RelA Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kanninchen anti-myc 9E10 anti-HA 12CA5		im Labor vorhanden Fa.Santa Cruz Biotechnology Fa.Sigma AG Rapp MSZ
Antikörper für Immunfluoreszenz:	anti-FLAG M2 anti-BOB.1/OBF.1 Ziege-anti-Maus Texas-Red Ziege-anti-Kanninchen FITC		Fa. Kodak im Labor vorhanden Fa.Dianova Fa.Dianova

4.20.5. Enzyme

Die Reaktionsbedingungen wurden nach den Angaben der jeweiligen Enzymhersteller gewählt.

Restriktionsendonukleasen (Fa.Biolabs; Fa.Amersham und Fa.Boehringer Mannheim)

Klenow-Polymerase (Fa.Biolabs)

T4-DNA-Ligase (Fa.Amersham)

T4-Polynukleotidkinase (Fa. Amersham)

CIP (Fa.Boehringer Mannheim)

Taq-DNA-Polymerase (Fa.GeneCraft und Fa.Pharmacia)

Proteinase K (Fa.Sigma)

RNase A (Fa.Sigma)

4.20.6. Größenstandards

1kb ladder (Fa.GIBCO BRL)

4.20.7. Gebrauchsfertige Kits

ECL-System (Fa.Amersham)

High Pure RNA Isolation Kit (Roche)
 LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)
 MMLV Reverse Transcriptase Kit (Fa.GIBCO BRL)
 pMOS(T)-Klonierungs-KIT (Fa.Amersham)
 rediprime II (Fa.Amersham)
 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Fa.Pierce)
 TNT Coupled Reticulocyte Lysate (Promega)

4.20.8. Primer

Primer Extension	OCA-B37	TGAAGCAGACAGTTTGGC
LightCycler	PBGD forward	AGCTGCAGAGAAAGTTCCC
	PBGD reverse	GTTACGAGCAGTGATGCC
	CD38 forward	ATCAGCCACTAATGAAGTTGG
	CD38 reverse	ATCAGCCACTAATGAAGTTGG
	BOB.1/OBF.1 forward	CACAGCTCCGGAGCAAGCC
	BOB.1/OBF.1 reverse	CCTTCCACAGAGAGAGTGTGG
	SIAH1 forward	GCCGTCAGACTGCTACAGC
	SIAH1 reverse	AGCTGTACGATTGCGAAGAAC
"prey"-Sequenzierung	Gal-AD	TACCACTACAATGGATG
SIAH1-Klonierung		
SIAH1-amino-terminal	SIAH1-Xho-fo1	CGCCTCGAGAAATGAGCCGTCAGAC
	SIAH1-Eco-re1	GCGAATTCATCCCAAAGGGCCCCG
SIAH1-carboxy-terminal	SIAH1-Xho-fo2	GCCCTCGAGGATCCATTCGCAACTTG
	SIAH1-Eco-re2	GGCCAGAATTCGTTTGATTGCCATTT CAAC

4.20.9. Vektoren und Plasmide

Die 1,6kb des BOB.1/OBF.1-Promotors wurden in den Vektor pTATA-Luc (im Labor vorhanden) kloniert. Die Vektoren 4xOct und 4xmut.Oct wurden bei Pfisterer et al. 1995 beschrieben. Als "bait"-Plasmid wurde pPCH1 (Carsten Hagemann, MSZ) und als "prey"-Plasmid die Vektoren pGAD10 und pACT2 (beide Fa.Clontech) verwendet. Die Fragmente von SIAH1 wurden für den Hefe-Interaktionsassay in pACT2 kloniert. Für die GST-Fusionsproteine erfolgte die Klonierung in pGEX4T2 (Fa.Pharmacia). BOB.1/OBF.1 lag für die in vitro Translation im Vektor pMT-PKA (Petra

Pfisterer AG Wirth) im Labor vor. Für den "Säuger-two hybrid" Test wurden die SIAH1-Fragmente in den Vektor pG4MpolyII (im Labor vorhanden) kloniert. BOB.1/OBF.1-VP16 wurde bereits früher von Petra Pfisterer kloniert. MyoD war in pCS2+MT kloniert (Ralf Schreck, MSZ). Das HA-markierte SIAH1 und das FLAG-markierte wurde von Yunsheng He (NIH, Bethesda) zur Verfügung gestellt. Die carboxy-terminale Domäne von SIAH1 für die Degradations-Tests wurde in pCS2+MT kloniert. Mini-Myc stellt ein BOB.1/OBF.1 Konstrukt in pCS2+MT dar welches infolge eines verschobenen Leserasters nur noch für ein 22 Aminosäuren langes "non-sense" Protein codiert. Für die Transfektionsuntersuchungen in NIH/3T3 wurde BOB.1/OBF.1 in den Vektor pcDNA3 (Clontech) kloniert. Die Vektoren ED und Ed wurden in Pfisterer et al. 1995 beschrieben.

4.20.10. Biologische Materialienf

Bakterienstamm (*E.coli*) DH5 α

Hefestamm HF7c

Zelllinien S194 Plasmazytoma-B-Zellen

NIH/3T3 Maus-Fibroblasten

Ramos B-Zelllinie (reife B-Zellen des Keimzentrums)

4.20.11. Verbrauchsmaterialien

Elektroporations-Küvetten (0,1cm, 0,2cm und 0,4cm; Fa.BIO RAD)

Einfrierröhrchen (1.8ml; Fa.Greiner)

Eppendorfröhrchen (0,1ml, 0,5ml, 1,5ml und 2,2ml; Fa.Eppendorf)

Gewebekulturplatten (6 well; Fa.Greiner)

Gewebekulturflaschen (25cm² und 75cm²; Fa.Renner und Fa.Greiner)

Gewebekulturschalen (94mm und 145mm; Fa.Greiner)

Plastikpipetten (1ml; 2ml; 5ml; 10ml; 25ml; Fa.Greiner und Fa.Renner)

Hybridisierungsröhrchen (Fa.Hybaid)

Küvetten (Kristallglas; Fa.Hellma)

Küvetten (Plastik; Fa.Sarstedt)

LightCycler Glaskapillaren (Roche)

Neubauer-Zählkammer (Fa.GLW)

Petrischalen (94mm und 145mm; Fa.Greiner)

Pipettenspitzen (10 μ l; 200 μ l; 1ml; Fa.Gilson)

Polycarbonröhrchen/Quickseals (5ml; Fa. Beckmann)

Röntgenfilme (Fa.Kodak und Fa.Fuji)

Spritzen und Kanülen (Fa.Braun Melsungen)

SubQ-Spritzen (Fa.Becton Dickinson)

Zentrifugenröhrchen (15 und 50ml; Fa.Greiner)

Zentrifugenröhrchen (12,5ml; Fa.Sarstedt)

Zentrifugenbecher (250ml; Fa.Sorvall)

4.20.12. Membranen und Filter

DEAE-Papier (Fa.Sigma)
Faltenfilter (Fa.Hartenstein)
Hybond-C extra (Fa.Amersham)
Hybond-N (Fa.Amersham)
3MM Whatman Papier (Fa.Hartenstein)
push columns (Fa.Stratagene)
PVDF (Fa.Millipore)
Sterilfilter (0,22µm und 0,45µm; Fa.Millipore)

4.20.13. Geräte

Analysenwaagen (Fa.Satorius)
Bidest-Anlage (Fa.Millipore)
Brutschränke (Fa.Heraeus)
ELISA-Reader (Fa.Berthold)
Eppendorffzentrifuge (Fa.Heraeus)
Eismaschine (Fa.Scotsman)
Elektroporator (Fa.BIO RAD)
FACSCalibur (Fa.Becton Dickinson)
Feinwaage (Fa.Scaltec)
Filmentwickler (Fa.Kodak)
Heraeus-Zentrifuge (Fa.Heraeus)
Horizontalschüttler (Fa.GFL)
Hybridisierungsöfen (Fa.Hybaid)
Kühlschränke (Fa.Liebherr; Fa.Kedro)
LightCycler (Roche)
Lumat (Fa.Berthold)
Magnetrührer (Fa.IKA Labortechnik)
Mikropipetten (P10; P20; P100; P200; P1000; Fa.Gilson)
Mikroskop (Fa.Leica)
pH-Meter (Fa.Knick)
Phospho-Imager BAS 2000 (Fa.Fuji)
Photometer (Fa.Hitachi)
Schüttelinkubator (Fa.New Brunswick Scientific)
Scintillations-Zähler (Fa. Packard)
Semidry-Apparatur (Fa.BIO RAD)
Spannungsgeräte (Fa.Desaga und Fa.BIO RAD)
Vakuumtrockner (Fa.Bachenhofer)
Spektralphotometer (Fa.Hitachi und Fa. Pharmacia)
Sterilbank (Fa.Heraeus)

Thermocycler (Fa.MWG)
Überkopfschüttler (Fa.Heidolph)
Ultra Turrax T25 (Fa.Janke&Kunkel)
Ultrazentrifuge und VTi65-Rotor (Fa.Beckmann)
UV-Crosslinker (Fa.Amersham)
UV-Anlage (Fa.Herolab)
UV-Videosystem (Fa.Sony)
Vakuum-Blotter (Fa.Appligene)
Vortex (Fa.Bender&Hohbein)
Wasserbad (Fa.GFL)

4.20.14. Datenverarbeitung

Für die Auswertung der verschiedenen Meßdaten und Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde ein Power Macintosh G3 Rechner verwendet (Fa.Apple). Folgende Programme wurden dabei angewandt:

Word 98
Exel 98
Canvas 6
Lasergene Navigator
Netscape Navigator 4.7
Cricket Graph III
Adobe Photoshop 5.0
Endnote 4

5. Abkürzungen

Nicht aufgeführt werden international gebräuchliche Abkürzungen des SI-Systems oder Abkürzungen die im Text erklärt sind.

AD	Aktivierungsdomäne
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin 5`Triphosphat
BCR	B-Zellrezeptor ("B cell receptor")
β-Gal	β-Galactosidase
bp	Basenpaare ("base pairs")
BTC	basaler Transkriptionskomplex
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CsA	Cyclosporin A
DB	DNA Bindedomäne
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.coli	Escherichia coli
FCS	fötales Kälberserum ("fetal calf serum")
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LB	L-Broth Medium
Leu	Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK/ERK aktivierende Kinase
mRNA	"messenger"-RNA
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rpm	Umdrehungen pro Minute ("revolutions per minute")
RT	Raumtemperatur
TA	Transaktivierungsdomäne
Trp	Tryptophan
üN	über Nacht

6. Literatur

- Allman, D., Jain, A., Dent, A., Maile, R. R., Selvaggi, T., Kehry, M. R., and Staudt, L. M. (1996). BCL-6 expression during B-cell activation, *Blood* 87, 5257-68.
- Annweiler, A., Müller, U., and Wirth, T. (1992a). Functional analysis of defined mutations in the immunoglobulin heavy-chain enhancer in transgenic mice, *Nucl Acids Res* 20, 1503-1509.
- Annweiler, A., Müller-Immerglück, M., and Wirth, T. (1992b). Oct2 transactivation from a remote enhancer position requires a B-cell-restricted activity, *Mol Cell Biol* 12, 3107-3116.
- Arany, Z., Newsome, D., Oldread, E., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1995). A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein., *Nature* 374, 81-84.
- Arias, J., Alberts, A. S., Brindle, P., Claret, F. X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J., and Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor, *Nature* 370, 226-9.
- Babb, R., Cleary, M. A., and Herr, W. (1997). OCA-B is a functional analog of VP16 but targets a separate surface of the Oct-1 POU domain, *MolCellBiol* 17, 7295-7305.
- Bain, G., Robanus Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., van Roon, M., *et al.* (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements, *Cell* 79, 885-892.
- Bartsch, D., Casadio, A., Karl, K. A., Serodio, P., and Kandel, E. R. (1998). CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation, *Cell* 95, 211-23.
- Basler, K., and Hafen, E. (1988). Control of photoreceptor cell fate by the sevenless protein requires a functional tyrosine kinase domain, *Cell* 54, 299-311.
- Baumgarth, N. (2000). A two-phase model of B-cell activation, *Immunol Rev* 176, 171-80.
- Benschop, R. J., and Cambier, J. C. (1999). B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates, *Curr Opin Immunol* 11, 143-51.
- Bergman, Y., Rice, D., Grosschedl, R., and Baltimore, D. (1984). Two regulatory elements for immunoglobulin κ light chain gene expression, *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 7041-7045.
- Biggs, W. H., 3rd, Zavitz, K. H., Dickson, B., van der Straten, A., Brunner, D., Hafen, E., and Zipursky, S. L. (1994). The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway, *Embo J* 13, 1628-35.
- Billin, A. N., Thirlwell, H., and Ayer, D. E. (2000). Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator, *Mol Cell Biol* 20, 6882-90.
- Bodor, J., Spetz, A. L., Strominger, J. L., and Habener, J. F. (1996). cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3536-41.

- Brantjes, H., Roose, J., van De Wetering, M., and Clevers, H. (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors, *Nucleic Acids Res* 29, 1410-9.
- Brown, J. L., Sonoda, S., Ueda, H., Scott, M. P., and Wu, C. (1991). Repression of the *Drosophila* fushi tarazu (*ftz*) segmentation gene, *Embo J* 10, 665-74.
- Brunner, D., Ducker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H., and Klambt, C. (1994). The ETS domain protein pointed-P2 is a target of MAP kinase in the sevenless signal transduction pathway, *Nature* 370, 386-9.
- Burkhart, R., Schulte, D., Hu, D., Musahl, C., Gohring, F., and Knippers, R. (1995). Interactions of human nuclear proteins P1Mcm3 and P1Cdc46, *Eur J Biochem* 228, 431-8.
- Busslinger, M., Nutt, S. L., and Rolink, A. G. (2000). Lineage commitment in lymphopoiesis, *Curr Opin Immunol* 12, 151-8.
- Cagan, R. L., Kramer, H., Hart, A. C., and Zipursky, S. L. (1992). The bride of sevenless and sevenless interaction: internalization of a transmembrane ligand, *Cell* 69, 393-9.
- Cambier, J. C. (1997). Positive and negative signal co-operativity in the immune system: the BCR, Fc gamma RIIB, CR2 paradigm, *Biochem Soc Trans* 25, 441-5.
- Carbon, P., Murgo, S., Ebel, J.-P., Krol, A., Tebb, G., and Mattaj, I. W. (1987). A common octamer motif binding protein is involved in the transcription of U6 snRNA by RNA polymerase III and U2 snRNA by RNA polymerase II, *Cell* 51, 71-79.
- Carthew, R. W., and Rubin, G. M. (1990). *seven in absentia*, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye, *Cell* 63, 561-77.
- Cattoretti, G., Chang, C. C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B. H., Falini, B., Louie, D. C., Offit, K., Chaganti, R. S., and Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells, *Blood* 86, 45-53.
- Cepek, K. L., Chasman, D. I., and Sharp, P. A. (1996). Sequence-specific DNA binding of the B-cell-specific coactivator OCA-B, *Genes Dev* 10, 2079-2088.
- Chang, C. C., Ye, B. H., Chaganti, R. S., and Dalla-Favera, R. (1996). BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6947-52.
- Chang, H. C., Solomon, N. M., Wassarman, D. A., Karim, F. D., Therrien, M., Rubin, G. M., and Wolff, T. (1995). *phyllopod* functions in the fate determination of a subset of photoreceptors in *Drosophila*, *Cell* 80, 463-72.
- Chasman, D., Cepek, K., Sharp, P. A., and Pabo, C. O. (1999). Crystal structure of an OCA-B peptide bound to an Oct-1 POU domain/octamer DNA complex: specific recognition of a protein-DNA interface, *Genes Dev* 13, 2650-2657.
- Chen, L., Oakley, M. G., Glover, J. N., Jain, J., Dervan, P. B., Hogan, P. G., Rao, A., and Verdine, G. L. (1995). Only one of the two DNA-bound orientations of AP-1 found in solution cooperates with NFATp, *Curr Biol* 5, 882-9.
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R., and Goodman, R. H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP, *Nature* 365, 855-9.

- Cockerill, P. N., Bert, A. G., Jenkins, F., Ryan, G. R., Shannon, M. F., and Vadas, M. A. (1995). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhancer function is associated with cooperative interactions between AP-1 and NFATp/c, *Mol Cell Biol* 15, 2071-9.
- Corcoran, L. M., and Karvelas, M. (1994). Oct-2 is required early in T cell independent B cell activation for G1 progression and for proliferation, *Immunity* 1, 635-645.
- Corcoran, L. M., Karvelas, M., Nossal, G. J. V., Ye, Z.-S., Jacks, T., and Baltimore, D. (1993). Oct-2, although not required for early B-cell development, is critical for later B-cell maturation and for postnatal survival, *Genes Dev* 7, 570-582.
- Cunningham, C. C., Gorlin, J. B., Kwiatkowski, D. J., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Byers, H. R., and Stossel, T. P. (1992). Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion, *Science* 255, 325-7.
- DaFonseca, C. J., Shu, F., and Zhang, J. J. (2001). Identification of two residues in MCM5 critical for the assembly of MCM complexes and Stat1-mediated transcription activation in response to IFN-gamma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3034-9.
- De Cesare, D., Fimia, G. M., and Sassone-Corsi, P. (1999). Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation, *Trends Biochem Sci* 24, 281-5.
- DeFranco, A. L. (1997). The complexity of signaling pathways activated by the BCR, *Curr Opin Immunol* 9, 296-308.
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D., and Staudt, L. M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6, *Science* 276, 589-92.
- Dickson, B. J., Dominguez, M., van der Straten, A., and Hafen, E. (1995). Control of Drosophila photoreceptor cell fates by phyllopod, a novel nuclear protein acting downstream of the Raf kinase, *Cell* 80, 453-62.
- Doody, G. M., Bell, S. E., Vigorito, E., Clayton, E., McAdam, S., Tooze, R., Fernandez, C., Lee, I. J., and Turner, M. (2001). Signal transduction through Vav-2 participates in humoral immune responses and B cell maturation, *Nat Immunol* 2, 542-547.
- Doody, G. M., Billadeau, D. D., Clayton, E., Hutchings, A., Berland, R., McAdam, S., Leibson, P. J., and Turner, M. (2000). Vav-2 controls NFAT-dependent transcription in B- but not T-lymphocytes, *Embo J* 19, 6173-84.
- Dorsey, M. J., Tae, H. J., Sollenberger, K. G., Mascarenhas, N. T., Johansen, L. M., and Taparowsky, E. J. (1995). B-ATF: a novel human bZIP protein that associates with members of the AP-1 transcription factor family, *Oncogene* 11, 2255-65.
- Dreyfus, M., Doyen, N., and Rougeon, F. (1987). The conserved decanucleotide from the immunoglobulin heavy chain promoter induces a very high transcriptional activity in B-cells when introduced into an heterologous promoter, *EMBO J* 6, 1685-1690.
- Durand, D. B., Shaw, J. P., Bush, M. R., Replogle, R. E., Belagaje, R., and Crabtree, G. R. (1988). Characterization of antigen receptor response elements within the interleukin-2 enhancer, *Mol Cell Biol* 8, 1715-24.

- Dzierzak, E., and Medvinsky, A. (1995). Mouse embryonic hematopoiesis, *Trends Genet* *11*, 359-362.
- Falkner, F. G., and Zachau, H. G. (1984). Correct transcription of an immunoglobulin κ gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements, *Nature* *310*, 71-74.
- Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H., and Weissman, A. M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53, *J Biol Chem* *275*, 8945-51.
- Fimia, G. M., De Cesare, D., and Sassone-Corsi, P. (1999). CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT, *Nature* *398*, 165-9.
- Fink, L., Seeger, W., Ermert, L., Hanze, J., Stahl, U., Grimminger, F., Kummer, W., and Bohle, R. M. (1998). Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking, *Nat Med* *4*, 1329-33.
- Fink, L., Stahl, U., Ermert, L., Kummer, W., Seeger, W., and Bohle, R. M. (1999). Rat porphobilinogen deaminase gene: a pseudogene-free internal standard for laser-assisted cell picking, *Biotechniques* *26*, 510-6.
- Fischer, K.-D., Zmuidzinas, A., Gardener, S., Barbacid, M., Bernstein, A., and Girdos, C. (1995). Defective T cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+CD8+ thymocytes, *Nature* *374*, 474-476.
- Fitzsimmons, D., and Hagman, J. (1996). Regulation of gene expression at early stages of B-cell and T-cell differentiation, *Curr Opin Immunol* *8*, 166-74.
- Ford, E., Strubin, M., and Hernandez, N. (1998). The Oct-1 POU domain activates snRNA gene transcription by contacting a region in the SNAPc largest subunit that bears sequence similarities to the Oct-1 coactivator OBF-1, *Genes Dev* *12*, 3528-40.
- Foulkes, N. S., Mellström, B., Benusiglio, E., and Sassone-Corsi, P. (1992). Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator, *Nature* *355*, 80-84.
- Frisan, T., Levitsky, V., and Masucci, M. G. (2000). Variations in proteasome subunit composition and enzymatic activity in B-lymphoma lines and normal B cells [In Process Citation], *Int J Cancer* *88*, 881-8.
- Galieque Zouitina, S., Quief, S., Hildebrand, M. P., Denis, C., Lecocq, G., Collyn-d'Hooghe, M., Bastard, C., Yuille, M., Dyer, M. J. S., and Kerckaert, J. P. (1996). The B cell transcriptional coactivator BOB1/OBF1 gene fuses to the LAZ3/BCL6 gene by t(3;11)(q27;q23.1) chromosomal translocation in a B cell leukemia line (Karpas 231), *Leukemia* *10*, 579-87.
- Garcia-Rodriguez, C., and Rao, A. (1998). Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP), *J Exp Med* *187*, 2031-6.
- Genini, M., Schwalbe, P., Scholl, F. A., Remppis, A., Mattei, M. G., and Schafer, B. W. (1997). Subtractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma, *DNA Cell Biol* *16*, 433-42.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.-W., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages, *Cell* *79*, 143-156.

- Georgopoulos, K., Winandy, S., and Avitahl, N. (1997). The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis, *Annu Rev Immunol* *15*, 155-76.
- Germani, A., Romero, F., Houlard, M., Camonis, J., Gisselbrecht, S., Fischer, S., and Varin-Blank, N. (1999). hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways, *Mol Cell Biol* *19*, 3798-807.
- Gerster, T., Matthias, P., Thali, M., Jiricny, J., and Schaffner, W. (1987). Cell type-specificity elements of the immunoglobulin heavy chain gene enhancer, *EMBO J* *6*, 1323-1330.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS- DNA/PEG procedure, *Yeast* *11*, 355-60.
- Glogauer, M., Arora, P., Chou, D., Janmey, P. A., Downey, G. P., and McCulloch, C. A. (1998). The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection, *J Biol Chem* *273*, 1689-98.
- Goodman, R. H., and Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development, *Genes Dev* *14*, 1553-77.
- Greiner, A., Müller, K., Hess, J., Pfeffer, K., Müller-Hermelink, K. H., and Wirth, T. (2000). BOB.1/OBF.1 expression is upregulated in normal germinal center B cells and germinal center derived B cell lymphomas, *Am J Pathol* *156*, 501-507.
- Gstaiger, M., Georgiev, O., van Leeuwen, H., van der Vliet, P., and Schaffner, W. (1996). The B cell coactivator Bob1 shows DNA sequence-dependent complex formation with the Oct-1/Oct-2 factors, leading to differential promoter activation, *EMBO J* *15*, 2781-2790.
- Gstaiger, M., Knoepfel, L., Georgiev, O., Schaffner, W., and Hovens, C. M. (1995). A B-cell coactivator of octamer-binding transcription factors, *Nature* *373*, 360-362.
- Hafen, E., Basler, K., Edstroem, J. E., and Rubin, G. M. (1987). Sevenless, a cell-specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosine kinase domain, *Science* *236*, 55-63.
- Hagman, J., Belanger, C., Travis, A., Turck, C. W., and Grosschedl, R. (1993). Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression, *Genes Dev* *7*, 760-73.
- Hardy, R. R., Li, Y. S., and Hayakawa, K. (1996). Distinctive developmental origins and specificities of the CD5+ B-cell subset, *Semin Immunol* *8*, 37-44.
- Haughton, G., Arnold, L. W., Whitmore, A. C., and Clarke, S. H. (1993). B-1 cells are made, not born, *Immunol Today* *14*, 84-7; discussion 87-91.
- He, X., Li, Y., Schembri-King, J., Jakes, S., and Hayashi, J. (2000). Identification of actin binding protein, ABP-280, as a binding partner of human Lnk adaptor protein, *Mol Immunol* *37*, 603-12.
- He, X., Treacy, M. N., Simmons, D. M., Ingraham, H. A., Swanson, L. W., and Rosenfeld, M. G. (1989). Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development, *Nature* *340*, 35-42.
- Hecht, A., and Kemler, R. (2000). Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression, *EMBO Rep* *1*, 24-8.

- Henderson, A., and Calame, K. (1998). Transcriptional regulation during B cell development, *Annu Rev Immunol* *16*, 163-200.
- Hermanson, G. G., Briskin, M., Sigman, D., and Wall, R. (1989). Immunoglobulin enhancer and promoter motifs 5' of the B29 B-cell-specific gene, *Proc Natl Acad Sci USA* *86*, 7341-7345.
- Herr, W., Sturm, R. A., Clerc, R. G., Corcoran, L. M., Baltimore, D., Sharp, P. A., Ingraham, H. A., Rosenfeld, M. G., Finney, M., Ruvkun, G., and Horvitz, H. R. (1988). The POU domain: a large conserved region in the mammalian *pit-1*, *oct-1*, *oct-2*, and *Caenorhabditis elegans unc-86* gene products, *Genes Dev* *2*, 1513-1516.
- Herzenberg, L. A., and Kantor, A. B. (1993). B-cell lineages exist in the mouse, *Immunol Today* *14*, 79-83; discussion 88-90.
- Hess, J., Laumen, H., Muller, K. B., and Wirth, T. (1998). Molecular genetics of the germinal center reaction, *J Cell Physiol* *177*, 525-34.
- Hess, J., Nielsen, P. J., Fischer, K. D., Bujard, H., and Wirth, T. (2001). The B lymphocyte-specific coactivator BOB.1/OBF.1 is required at multiple stages of B-cell development, *Mol Cell Biol* *21*, 1531-9.
- Hoeffler, J. P., Meyer, T. E., Yun, Y., Jameson, J. L., and Habener, J. F. (1988). Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA, *Science* *242*, 1430-3.
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53, *FEBS Lett* *420*, 25-7.
- Hotta, Y., and Benzer, S. (1970). Genetic dissection of the *Drosophila* nervous system by means of mosaics, *Proc Natl Acad Sci U S A* *67*, 1156-63.
- Hu, G., Chung, Y. L., Glover, T., Valentine, V., Look, A. T., and Fearon, E. R. (1997a). Characterization of human homologs of the *Drosophila* seven in absentia (*sina*) gene, *Genomics* *46*, 103-11.
- Hu, G., and Fearon, E. R. (1999). Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins, *Mol Cell Biol* *19*, 724-32.
- Hu, G., Zhang, S., Vidal, M., Baer, J. L., Xu, T., and Fearon, E. R. (1997b). Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin- proteasome pathway, *Genes Dev* *11*, 2701-14.
- Ishimi, Y. (1997). A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex, *J Biol Chem* *272*, 24508-13.
- Jacobson, E. M., Li, P., Leon-del-Rio, A., Rosenfeld, M. G., and Aggarwal, A. K. (1997). Structure of Pit-1 POU domain bound to DNA as a dimer: unexpected arrangement and flexibility, *Genes Dev* *11*, 198-212.
- Jain, J., McCaffrey, P. G., Miner, Z., Kerppola, T. K., Lambert, J. N., Verdine, G. L., Curran, T., and Rao, A. (1993). The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun, *Nature* *365*, 352-5.

- Jenuwein, T., and Grosschedl, R. (1991). Complex pattern of immunoglobulin μ gene expression in normal and transgenic mice: nonoverlapping regulatory sequences govern distinct tissue specificities, *Genes Dev* 5, 932-943.
- Joazeiro, C. A., and Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity, *Cell* 102, 549-52.
- Kim, U., Qin, F.-F., Gong, S., Stevens, S., Luo, Y., Nussenzweig, M., and Roeder, R. G. (1996). The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes, *Nature* 383, 542-547.
- Klemm, J. D., Rould, M. A., Aurora, R., Herr, W., and Pabo, C. A. (1994). Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules, *Cell* 77, 21-32.
- Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., van Beveren, C., and Maki, R. A. (1990). The macrophage and B cell-specific transcription factor Pu.1 is related to the *ets* oncogene, *Cell* 61, 113-124.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D. W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E. M., Mullen, T. M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions, *Science* 279, 703-7.
- Kozmik, Z., Wang, S., Dorfler, P., Adams, B., and Busslinger, M. (1992). The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP, *Mol Cell Biol* 12, 2662-72.
- Krapp, A., and Strubin, M. (1999). B-Cell coactivator OBF-1 exhibits unusual transcriptional properties and functions in a DNA-bound Oct-1-dependent fashion, *Mol Cell Biol* 19, 4247-54.
- Kwok, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R., and Goodman, R. H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB, *Nature* 370, 223-6.
- LaBella, F., Sive, H. L., Roeder, R. G., and Heintz, N. (1988). Cell-cycle regulation of a human histone H2b gene is mediated by the H2b subtype-specific consensus element, *Genes Dev* 2, 32-39.
- Lai, Z. C., Harrison, S. D., Karim, F., Li, Y., and Rubin, G. M. (1996). Loss of tramtrack gene activity results in ectopic R7 cell formation, even in a *sina* mutant background, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5025-30.
- Lawrence, P. A., and Green, S. M. (1979). Cell lineage in the developing retina of *Drosophila*, *Dev Biol* 71, 142-52.
- LeBowitz, J. H., Kobayashi, T., Staudt, L., Baltimore, D., and Sharp, P. A. (1988). Octamer-binding proteins from B or HeLa cells stimulate transcription of the immunoglobulin heavy-chain promoter in vitro, *Genes Dev* 2, 1227-1237.
- Li, S., Li, Y., Carthew, R. W., and Lai, Z. C. (1997). Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack, *Cell* 90, 469-78.
- Liang, R., Chan, W. P., Chan, A. C., and Ho, F. C. (1996). Rearrangement of the *bcl-6* gene in Hodgkin's disease, lymphocyte predominant type, *Am J Hematol* 52, 63-4.

- Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF, *Nature* 376, 263-267.
- Liu, J., Stevens, J., Rote, C. A., Yost, H. J., Hu, Y., Neufeld, K. L., White, R. L., and Matsunami, N. (2001). Siah-1 Mediates a Novel beta-Catenin Degradation Pathway Linking p53 to the Adenomatous Polyposis Coli Protein, *Mol Cell* 7, 927-36.
- Lobo, S. M., Ifill, S., and Hernandez, N. (1990). cis-acting elements required for RNA polymerase II and III transcription in the human U2 and U6 snRNA promoters, *Nucleic Acids Res* 18, 2891-9.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., and Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11364-9.
- Lundblad, J. R., Kwok, R. P. S., Laurance, M. E., Harter, M. L., and Goodman, R. H. (1995). Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP., *Nature* 374, 85-88.
- Luo, Y., Fujii, H., Gerster, T., and Roeder, R. G. (1992). A novel B cell-derived coactivator potentiates the activation of immunoglobulin promoters by octamer-binding transcription factors, *Cell* 71, 231-241.
- Luo, Y., Ge, H., Stevens, S., Xiao, H., and Roeder, R. G. (1998). Coactivation by OCA-B: definition of critical regions and synergism with general cofactors, *Mol Cell Biol* 18, 3803-10.
- Luo, Y., and Roeder, R. G. (1995). Cloning, functional characterization, and mechanism of action of the B-cell-specific transcriptional coactivator OCA-B, *MolCellBiol* 15, 4115-4124.
- MacLennan, I. C. (1994). Germinal centers, *Annu Rev Immunol* 12, 117-39.
- Marti, A., Luo, Z., Cunningham, C., Ohta, Y., Hartwig, J., Stossel, T. P., Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1997). Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells, *J Biol Chem* 272, 2620-8.
- Mason, J. O., Williams, G. T., and Neuberger, M. S. (1985). Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin V_H gene promoter that includes a functional consensus sequence, *Cell* 41, 479-487.
- Matsuzawa, S., and Reed, J. C. (2001). Siah-1, SIP, and Ebi Collaborate in a Novel Pathway for beta-Catenin Degradation Linked to p53 Responses, *Mol Cell* 7, 915-26.
- Matsuzawa, S., Takayama, S., Froesch, B. A., Zapata, J. M., and Reed, J. C. (1998). p53-inducible human homologue of Drosophila seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1, *Embo J* 17, 2736-47.
- Matthias, P. (1998). Lymphoid-specific transcription mediated by the conserved octamer site: who is doing what?, *Semin Immunol* 10, 155-63.
- McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J., and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities, *Embo J* 15, 5647-58.

- Mizushima-Sugano, J., and Roeder, R. (1986). Cell-type-specific transcription of an immunoglobulin κ light chain gene *in vitro*, *Proc Natl Acad Sci USA* *83*, 8511-8515.
- Molina, C. A., Foulkes, N. S., Lalli, E., and Sassone-Corsi, P. (1993). Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor, *Cell* *75*, 875-86.
- Molnar, A., and Georgopoulos, K. (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins, *Mol Cell Biol* *14*, 8292-303.
- Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S., and Georgopoulos, K. (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation, *Embo J* *16*, 2004-13.
- Moroni, E., Cairns, L., Ottolenghi, S., Giglioni, B., Ashihara, E., Migliaccio, G., and Migliaccio, A. R. (1997). Expression in hematopoietic cells of GATA-1 transcripts from the alternative "testis" promoter during development and cell differentiation, *Biochem Biophys Res Commun* *231*, 299-304.
- Nielsen, P. J., Georgiev, O., Lorenz, B., and Schaffner, W. (1996). B lymphocytes are impaired in mice lacking the transcriptional co-activator Bob1/OCA-B/OBF1, *Eur J Immunol* *26*, 3214-3218.
- Niu, H., Ye, B. H., and Dalla-Favera, R. (1998). Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor, *Genes Dev* *12*, 1953-61.
- Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5, *Nature* *401*, 556-62.
- Nutt, S. L., Morrison, A. M., Dorfler, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1998). Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments, *Embo J* *17*, 2319-33.
- Nutt, S. L., Urbanek, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V- to DJ recombination at the IgH locus, *Genes Dev* *11*, 476-491.
- O'Neill, E. M., Rebay, I., Tjian, R., and Rubin, G. M. (1994). The activities of two Ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway, *Cell* *78*, 137-47.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J. H., and Stossel, T. P. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia, *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2122-8.
- Okamura, R. M., Sigvardsson, M., Galceran, J., Verbeek, S., Clevers, H., and Grosschedl, R. (1998). Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1, *Immunity* *8*, 11-20.
- Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E., and Pawson, T. (1993). A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, *Sos*, *Cell* *73*, 179-91.

- Onizuka, T., Moriyama, M., Yamochi, T., Kuroda, T., Kazama, A., Kanazawa, N., Sato, K., Kato, T., Ota, H., and Mori, S. (1995). BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts, *Blood* 86, 28-37.
- Oosterwegel, M., van de Wetering, M., Dooijes, D., Klomp, L., Winoto, A., Georgopoulos, K., Meijlink, F., and Clevers, H. (1991). Cloning of murine TCF-1, a T cell-specific transcription factor interacting with functional motifs in the CD3-epsilon and T cell receptor alpha enhancers, *J Exp Med* 173, 1133-42.
- Osmond, D. G., Rolink, A., and Melchers, F. (1998). Murine B lymphopoiesis: towards a unified model, *Immunol Today* 19, 65-8.
- Ott, I., Fischer, E. G., Miyagi, Y., Mueller, B. M., and Ruf, W. (1998). A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280, *J Cell Biol* 140, 1241-53.
- Parslow, T. G., Blair, D. L., Murphy, W. J., and Granner, D. K. (1984). Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: A novel conserved sequence, *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 2650-2654.
- Pfisterer, P., Zwilling, S., Hess, J., and Wirth, T. (1995). Functional characterization of the murine homolog of the B-cell-specific coactivator BOB.1/OBF.1, *JBiolChem* 270, 29870-29880.
- Pierani, A., Heguy, A., Fujii, H., and Roeder, R. G. (1990). Activation of octamer-containing promoters by either octamer-binding transcription factor 1 (OTF-1) or OTF-2 and requirement of an additional B-cell-specific component for optimal transcription of immunoglobulin promoters, *Mol Cell Biol* 10, 6204-6215.
- Pongubala, J. M., and Atchison, M. L. (1995). Activating transcription factor 1 and cyclic AMP response element modulator can modulate the activity of the immunoglobulin kappa 3' enhancer, *J Biol Chem* 270, 10304-13.
- Przylepa, J., Himes, C., and Kelsoe, G. (1998). Lymphocyte development and selection in germinal centers, *Curr Top Microbiol Immunol* 229, 85-104.
- Qin, X. F., Reichlin, A., Luo, Y., Roeder, R. G., and Nussenzweig, M. C. (1998). OCA-B integrates B cell antigen receptor-, CD40L- and IL 4-mediated signals for the germinal center pathway of B cell development, *EMBO J* 17, 5066-75.
- Radhakrishnan, I., Perez-Alvarado, G. C., Parker, D., Dyson, H. J., Montminy, M. R., and Wright, P. E. (1997). Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions, *Cell* 91, 741-52.
- Rao, A. (1994). NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes, *Immunol Today* 15, 274-81.
- Rao, A., Luo, C., and Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function, *Annu Rev Immunol* 15, 707-47.
- Read, D., and Manley, J. L. (1992). Alternatively spliced transcripts of the *Drosophila* tramtrack gene encode zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities, *Embo J* 11, 1035-44.
- Ready, D. F., Hanson, T. E., and Benzer, S. (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice, *Dev Biol* 53, 217-40.

- Rebay, I., and Rubin, G. M. (1995). Yan functions as a general inhibitor of differentiation and is negatively regulated by activation of the Ras1/MAPK pathway, *Cell* *81*, 857-66.
- Reh fuss, R. P., Walton, K. M., Loriaux, M. M., and Goodman, R. H. (1991). The cAMP-regulated enhancer-binding protein ATF-1 activates transcription in response to cAMP-dependent protein kinase A, *J Biol Chem* *266*, 18431-4.
- Reinke, R., and Zipursky, S. L. (1988). Cell-cell interaction in the Drosophila retina: the bride of sevenless gene is required in photoreceptor cell R8 for R7 cell development, *Cell* *55*, 321-30.
- Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., and Grosschedl, R. (2000). Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism, *Immunity* *13*, 15-24.
- Rubin, G. M. (1991). Signal transduction and the fate of the R7 photoreceptor in Drosophila, *Trends Genet* *7*, 372-7.
- Russell, E. S. (1979). Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists, *Adv Genet* *20*, 357-459.
- Ryan, A. K., and Rosenfeld, M. G. (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes, *Genes & Development* *11*, 1207-1225.
- Sasaki, A., Masuda, Y., Ohta, Y., Ikeda, K., and Watanabe, K. (2001). Filamin associates with smads and regulates transforming growth factor- beta signaling, *J Biol Chem* *276*, 17871-7.
- Sassone-Corsi, P. (1995). Transcription factors responsive to cAMP, *Annu Rev Cell Dev Biol* *11*, 355-77.
- Sauter, P., and Matthias, P. (1997). The B cell-specific coactivator OBF-1 (OCA-B, Bob-1) is inducible in T cells and its expression is dispensable for IL-2 gene induction, *Immunobiology* *198*, 207-16.
- Sauter, P., and Matthias, P. (1998). Coactivator OBF-1 makes selective contacts with both the POU-specific domain and the POU homeodomain and acts as a molecular clamp on DNA, *MolCellBiol* *18*, 7397-7409.
- Schaffner, W. (1989). How do different transcription factors binding the same DNA sequence sort out their jobs?, *TIG* *5*, 37-39.
- Scheidereit, C., Heguy, A., and Roeder, R. G. (1987). Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer-binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter in vitro, *Cell* *51*, 783-793.
- Schilham, M. W., Oosterwegel, M. A., Moerer, P., Ya, J., de Boer, P. A., van de Wetering, M., Verbeek, S., Lamers, W. H., Kruisbeek, A. M., Cumano, A., and Clevers, H. (1996). Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4, *Nature* *380*, 711-4.
- Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M. M., and Schaffner, W. (1988). Identification of a novel lymphoid specific octamer binding protein (OTF-2B) by proteolytic clipping bandshift assay (PCBA), *EMBO J* *7*, 4221-4229.
- Schubart, D. B., Rolink, A., Kosco-Vilbois, M. H., Botteri, F., and Matthias, P. (1996a). B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation, *Nature* *383*, 538-542.

- Schubart, D. B., Sauter, P., Massa, S., Friedl, E. M., Schwarzenbach, H., and Matthias, P. (1996b). Gene structure and characterization of the murine homologue of the B cell-specific transcriptional coactivator OBF-1, *Nucleic Acids Res* 24, 1913-1920.
- Schubart, K., Massa, S., Schubart, D., Corcoran, L. M., Rolink, A. G., and Matthias, P. (2001). B cell development and immunoglobulin gene transcription in the absence of Oct-2 and OBF-1, *Nat Immunol* 2, 69-74.
- Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., Nielsen, D. A., Song, B. J., Barbacid, M., Goldman, D., and Lee, I. J. (1996). Isolation and characterization of murine vav2, a member of the vav family of proto-oncogenes, *Oncogene* 13, 363-71.
- Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages, *Science* 265, 1573-1577.
- Seyfert, V. L., Allman, D., He, Y., and Staudt, L. M. (1996). Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6, *Oncogene* 12, 2331-42.
- Simon, M. A., Dodson, G. S., and Rubin, G. M. (1993). An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro, *Cell* 73, 169-77.
- Singh, H., Sen, R., Baltimore, D., and Sharp, P. A. (1986). A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes, *Nature* 319, 154-158.
- Sive, H. L., and Roeder, R. G. (1986). Interaction of a common factor with conserved promoter and enhancer sequences in histone H2B, immunoglobulin, and U2 small nuclear RNA (snRNA) genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6382-6.
- Sloan, S. R., Shen, C. P., McCarrick-Walmsley, R., and Kadesch, T. (1996). Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity, *Mol Cell Biol* 16, 6900-8.
- Sourisseau, T., Desbois, C., Debure, L., Bowtell, D. D., Cato, A. C., Schneikert, J., Moyse, E., and Michel, D. (2001). Alteration of the stability of Bag-1 protein in the control of olfactory neuronal apoptosis, *J Cell Sci* 114, 1409-16.
- Stall, A. M., Wells, S. M., and Lam, K. P. (1996). B-1 cells: unique origins and functions, *Semin Immunol* 8, 45-59.
- Staudt, L. M., Clerc, R. G., Singh, H., LeBowitz, J. H., Sharp, P. A., and Baltimore, D. (1988). Cloning of a lymphoid-specific cDNA encoding a protein binding the regulatory octamer DNA motif, *Science* 241, 577-580.
- Staudt, L. M., and Lenardo, M. J. (1991). Immunoglobulin gene transcription, *Annu Rev Immunol* 9, 373-398.
- Staudt, L. M., Singh, H., Sen, R., Wirth, T., Sharp, P. A., and Baltimore, D. (1986). A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes, *Nature* 323, 640-643.
- Stevens, S., Wang, L., and Roeder, R. G. (2000). Functional analysis of the OCA-B promoter, *J Immunol* 164, 6372-9.
- Strubin, M., Newell, J. W., and Matthias, P. (1995). OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer proteins, *Cell* 80, 497-506.

- Sturm, R. A., Das, G., and Herr, W. (1988). The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain, *Genes Dev* 2, 1582-1599.
- Sturm, R. A., and Herr, W. (1988). The POU domain is a bipartite DNA-binding structure, *Nature* 336, 601-604.
- Sun, L., Liu, A., and Georgopoulos, K. (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development, *Embo J* 15, 5358-69.
- Sun, Y., Kolligs, F. T., Hottiger, M. O., Mosavin, R., Fearon, E. R., and Nabel, G. J. (2000). Regulation of beta -catenin transformation by the p300 transcriptional coactivator, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12613-8.
- Tanaka, M., Grossniklaus, U., Herr, W., and Hernandez, N. (1988). Activation of the U2 snRNA promoter by the octamer motif defines a new class of RNA polymerase II enhancer elements, *Genes Dev* 2, 1764-1778.
- Tanaka, M., Lai, J.-S., and Herr, W. (1992). Promoter-selective activation domains in Oct-1 and Oct2 direct differential activation of an snRNA and mRNA promoter, *Cell* 68, 755-767.
- Tang, A. H., Neufeld, T. P., Kwan, E., and Rubin, G. M. (1997). PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism, *Cell* 90, 459-67.
- Tarakhovskiy, A., Turner, M., Schaal, S., Mee, P. J., Duddy, L. P., Rajewsky, K., and Tybulewicz, V. L. (1995). Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav, *Nature* 374, 467-70.
- Tarlinton, D. (1998). Germinal centers: form and function, *Curr Opin Immunol* 10, 245-51.
- Tedder, T. F., Tuscano, J., Sato, S., and Kehrl, J. H. (1997). CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling, *Annu Rev Immunol* 15, 481-504.
- Tedford, K., Nitschke, L., Girkontaite, I., Charlesworth, A., Chan, G., Sakk, V., Barbacid, M., and Fischer, K. D. (2001). Compensation between Vav-1 and Vav-2 in B cell development and antigen receptor signaling, *Nat Immunol* 2, 548-55.
- ten Boekel, E., Melchers, F., and Rolink, A. G. (1998). Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression, *Immunity* 8, 199-207.
- Thevenin, C., Lucas, B. P., Kozlow, E. J., and Kehrl, J. H. (1993). Cell-type- and stage-specific expression of the CD20/B1 antigen correlates with the activity of a diverged octamer DNA motif present in its promoter, *JBiolChem* 268, 5949-5956.
- Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C., and Grosschedl, R. (1991). LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected], *Genes Dev* 5, 880-94.
- Treier, M., Bohmann, D., and Mlodzik, M. (1995). JUN cooperates with the ETS domain protein pointed to induce photoreceptor R7 fate in the *Drosophila* eye, *Cell* 83, 753-60.
- Tsuda, L., Inoue, Y. H., Yoo, M. A., Mizuno, M., Hata, M., Lim, Y. M., Adachi-Yamada, T., Ryo, H., Masamune, Y., and Nishida, Y. (1993). A protein kinase similar to MAP kinase activator acts downstream of the raf kinase in *Drosophila*, *Cell* 72, 407-14.

- Tye, B. K. (1999). MCM proteins in DNA replication, *Annu Rev Biochem* 68, 649-86.
- Ullman, K. S., Flanagan, W. M., Edwards, C. A., and Crabtree, G. R. (1991). Activation of early gene expression in T lymphocytes by Oct-1 and an inducible protein, OAP40, *Science* 254, 558-62.
- Urbanek, P., Wang, Z.-Q., Fetka, I., Wagner, E. F., and Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP, *Cell* 79, 901-912.
- van de Wetering, M., Oosterwegel, M., van Norren, K., and Clevers, H. (1993). Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes, *Embo J* 12, 3847-54.
- Vannucchi, A. M., Linari, S., Lin, C. S., Koury, M. J., Bondurant, M. C., and Migliaccio, A. R. (1999). Increased expression of the distal, but not of the proximal, Gata1 transcripts during differentiation of primary erythroid cells, *J Cell Physiol* 180, 390-401.
- Verrijzer, C. P., Strating, M., Mul, Y. M., and van der Vliet, P. C. (1992). POU domain transcription factors from different subclasses stimulate adenovirus DNA replication., *Nucl Acids Res* 20, 6369-6375.
- Walker, S., Hayes, S., and O'Hare, P. (1994). Site-specific conformational alteration of the Oct-1 POU domain as the basis for differential recognition by Vmw65 (VP16), *Cell* 79, 841-852.
- Wang, J. H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A. H., Bigby, M., and Georgopoulos, K. (1996). Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation, *Immunity* 5, 537-49.
- Wassarman, D. A., Therrien, M., and Rubin, G. M. (1995). The Ras signaling pathway in Drosophila, *Curr Opin Genet Dev* 5, 44-50.
- Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks and thresholds, *Cell* 75, 1241-1244.
- Weiss, M. J., Keller, G., and Orkin, S. H. (1994). Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells, *Genes Dev* 8, 1184-97.
- Wirth, T., Pfisterer, P., Annweiler, A., Zwilling, S., and König, H. (1995). Molecular principles of Oct2-mediated gene activation in B cells, *Immunobiol* 193, 161-170.
- Wirth, T., Priess, A., Annweiler, A., Zwilling, S., and Oeler, B. (1991). Multiple Oct2 isoforms are generated by alternative splicing, *Nucl Acids Res* 19, 43-51.
- Wirth, T., Staudt, L., and Baltimore, D. (1987). An octamer oligonucleotide upstream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity, *Nature* 329, 174-178.
- Xanthoudakis, S., Viola, J. P., Shaw, K. T., Luo, C., Wallace, J. D., Bozza, P. T., Luk, D. C., Curran, T., and Rao, A. (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1, *Science* 272, 892-5.
- Xie, H., and Rothstein, T. L. (1995). Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig, *J Immunol* 154, 1717-23.
- Xiong, W. C., and Montell, C. (1993). tramtrack is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the Drosophila eye, *Genes Dev* 7, 1085-96.

- Yankulov, K., Todorov, I., Romanowski, P., Licatalosi, D., Cilli, K., McCracken, S., Laskey, R., and Bentley, D. L. (1999). MCM proteins are associated with RNA polymerase II holoenzyme, *Mol Cell Biol* *19*, 6154-63.
- Ye, B. H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R. S., *et al.* (1997). The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2- type inflammation, *Nat Genet* *16*, 161-70.
- Yu, X., Wang, L., Luo, Y., and Roeder, R. G. (2001). Identification and characterization of a novel OCA-B isoform. implications for a role in B cell signaling pathways, *Immunity* *14*, 157-67.
- Zhang, J., Guenther, M. G., Carthew, R. W., and Lazar, M. A. (1998a). Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression, *Genes Dev* *12*, 1775-80.
- Zhang, J. J., Zhao, Y., Chait, B. T., Lathem, W. W., Ritzi, M., Knippers, R., and Darnell, J. E., Jr. (1998b). Ser727-dependent recruitment of MCM5 by Stat1alpha in IFN-gamma-induced transcriptional activation, *Embo J* *17*, 6963-71.
- Zhuang, Y., Soriano, P., and Weintraub, H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation, *Cell* *79*, 875-84.
- Zon, L. I., Youssoufian, H., Mather, C., Lodish, H. F., and Orkin, S. H. (1991). Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1, *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 10638-41.
- Zwilling, S., Annweiler, A., and Wirth, T. (1994). The POU domains of the Oct1 and Oct2 transcription factors mediate specific interaction with TBP, *Nucl Acids Res* *22*, 1655-1662.
- Zwilling, S., Dieckmann, A., Pfisterer, P., Angel, P., and Wirth, T. (1997). Inducible expression and phosphorylation of coactivator BOB.1/OBF.1 in T cells, *Science* *277*, 221-225.
- Zwilling, S., König, H., and Wirth, T. (1995). HMG2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors, *EMBO J* *14*, 1198-1208.

7. Lebenslauf

Jannic Böhm

Gartenstraße 44

89275 Thalfingen

geboren am 26.05.72 in Saarbrücken

1978-1982 Grundschule Altensittenbach

1982-1991 Staatl. Paul-Pfinzing-Gymnasium Hersbruck

1991-1996 Biologiestudium (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Thema der Diplomarbeit: Modulation der Hypertrophie neonataler Kardiomyozyten durch 17β -Östradiol

Betreuer: Prof. Dr. Neyses, Medizinische Universitätsklinik

Prof. Dr. Scheller, Biologische Fakultät

1996-2001 Promotionsstudium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ)

Betreuer: Prof. Dr. Wirth (MSZ)

Prof. Dr. Kreft, Biologische Fakultät

8. Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin erkläre ich, daß die vorgelegte Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Außer den dargelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben, noch zu erwerben versucht.

Würzburg, 16.07.01