

**Neue Interaktionspartner
der MAPKAP-Kinasen 3pK und MK2:
die Polycomb-Proteine HPH2 und Bmi1
sowie der basische Helix-Loop-Helix-
Transkriptionsfaktor E47**

Dissertation

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

**vorgelegt von
Bernd Neufeld
aus Ludwigshafen am Rhein**

Würzburg 2000

INHALTSVERZEICHNIS

1	Summary	4
2	Zusammenfassung	5
3	Einleitung	6
3.1	Intrazelluläre Signaltransduktion als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli	6
3.2	Die mitogene Raf-MEK-ERK-Kinasekaskade.....	7
3.3	Die Streß-aktivierten JNK/SAPK- und CSBP/p38-Proteinkinasekaskaden	8
3.4	Die MAPKAP-Kinase 3pK.....	11
3.5	MAPKAP-Kinase 2 (MK2) und weitere MAPKAP-Kinasen.....	12
3.6	Die Polycomb-Gruppe	13
3.6.1	Das Zellgedächtnis - PcG-Komplexe in der Aufrechterhaltung homöotischer Genexpression	13
3.6.2	Das PcG- und Protoonkoprotein Bmi1	14
3.6.3	Das PcG-Protein HPH2	15
3.6.4	Mechanismus des PcG- <i>silencings</i>	16
3.6.5	Phosphorylierung und Regulation von PcG-Proteinen	17
3.7	Der Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor E47	19
3.7.1	Die Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren.....	19
3.7.2	Einteilung der bHLH-Proteine	19
3.7.3	Funktionen von E-Proteinen	20
3.7.4	Mechanismen für die biologische Spezifität von bHLH-Proteinen	21
3.7.5	Die Rolle der Phosphorylierung in der Kontrolle von bHLH-Proteinen	22
3.7.6	Die Rolle der Phosphorylierung in der Kontrolle von E47.....	22
4	Problemstellung	24
5	Material	25
5.1	Arbeitsmaterial.....	25
5.1.1	Chemikalien	25
5.1.2	Enzyme.....	26
5.1.3	Antikörper.....	26
5.1.4	Bakteriell exprimierte und gereinigte Proteine	26
5.1.5	Reagenziensätze (Kits).....	26
5.1.6	cDNA-Bibliotheken und Plasmide	26
5.1.7	Zelllinien, Hefestämme und Bakterienstämme	29
5.1.8	Geräte.....	29
6	Methoden	30
6.1	Arbeiten mit Bakterien.....	30
6.2	Arbeiten mit DNA	30
6.2.1	Bestimmung der DNA-Konzentration	30
6.2.2	Konstruktion von Vektoren.....	31
6.2.3	Isolation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation).....	32

6.2.4	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	33
6.2.5	Sequenzanalyse von DNA.....	33
6.2.6	Erstellung von Punktmutationen mit Hilfe des <i>Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	
6.3	Arbeiten mit Proteinen	34
6.3.1	Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	34
6.3.2	Bestimmung der Protein-Konzentration	35
6.3.3	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
6.3.4	Immunoblot	36
6.4	Das Hefe <i>two-hybrid</i>-System.....	36
6.4.1	Hefemedien.....	37
6.4.2	<i>Two-hybrid screen</i>	38
6.4.3	Titerbestimmung der cDNA-Bibliotheken	38
6.4.4	Amplifikation von cDNA-Bibliotheken	38
6.4.5	Herstellung von <i>carrier</i> -DNA.....	39
6.4.6	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmiden (<i>small scale</i>).....	39
6.4.7	Direkte <i>two-hybrid</i> -Tests.....	40
6.4.8	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> für <i>two-hybrid</i> cDNA-Bibliothek <i>screens</i>	40
6.4.9	Bestimmung der Transformationseffizienz.....	40
6.4.10	β -Gal-Filterassay.....	41
6.4.11	Quantitatives β -Gal-Assay mit ONPG als Substrat	41
6.4.12	Elimination des <i>bait</i> -Plasmids – Cycloheximid <i>counterselection</i>	42
6.4.13	Plasmidisolierung aus Hefezellen und weitere Schritte bis zur Identifikation sogenannter <i>bona fide</i> Interaktionspartner	42
6.5	Zellkulturarbeiten mit Säuger-Zelllinien	43
6.5.1	Transiente Transfektion von Säugerzellen.....	43
6.5.2	<i>In vitro</i> Coimmunexperimente.....	43
6.5.3	Immunpräzipitationen.....	44
6.5.4	<i>In vitro</i> Kinaseassays.....	44
6.5.5	Luciferase-Test	44
6.5.6	β -Galactosidase-Test	45
6.5.7	Repressionsassay mit der stabil transfizierten U2OS-Zelllinie	45
7	Ergebnisse	46
7.1	Wechselwirkungspartner von 3pK – Ergebnisse der <i>two-hybrid screens</i>	46
7.2	Die Interaktion der MAPKAP-Kinasen mit Proteinen der Polycomb-Gruppe	48
7.2.1	3pK und MK2 binden im Hefe <i>two-hybrid</i> -System <i>in vivo</i> an die Homologie-Domäne II im extremen C-Terminus von HPH2.....	48
7.2.2	HPH2 coimmunpräzipitiert mit 3pK <i>in vivo</i>	50
7.2.3	<i>In vivo</i> Interaktion zwischen Bmi1 und beiden MAPKAP-Kinasen, 3pK und MK2	52
7.2.4	3pK und MK2 phosphorylieren Bmi1 <i>in vitro</i>	53
7.2.5	Nicht aktiviertes, GAL4 DB-fusioniertes 3pK wirkt als transkriptioneller Repressor.....	54
7.3	Die Interaktion der MAPKAP-Kinasen mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor E47.....	56
7.3.1	3pK bindet <i>in vivo</i> an E47 im Hefe <i>two-hybrid</i> -System.....	56

7.3.2	3pK interagiert mit E47 <i>in vivo</i>	57
7.3.3	3pK und MK2 interagieren mit E47 unter hochstringenten Bedingungen.....	57
7.3.4	3pK und MAPKAP-Kinase 2 phosphorylieren E47 <i>in vitro</i>	59
7.3.5	3pK und MK2 reduzieren beide die E47-induzierte transkriptionelle Aktivität	62
8	Diskussion	64
8.1	Die Ergebnisse der <i>two-hybrid screens</i>	64
8.2	Die MAPKAP-Kinasen 3pK und MK2 als neu identifizierte Polycomb-Komplex-assozierte Kinasen und potentielle Regulatoren von PcG-Funktionen.....	65
8.3	Die MAPKAP-Proteine 3pK und MK2 – neu identifizierte E47-Kinasen und Repressoren von E47-Homodimer-abhängiger Transaktivierung.....	69
8.4	Abschließende Überlegungen und Beurteilungen.....	71
9	Anhang	75
9.1	Abkürzungen.....	75
9.2	Informationen zu den 3pK- <i>two-hybrid</i> -Interaktionspartnern.....	77
9.2.1	HPH2 – <i>Human polyhomeotic 2</i>	77
9.2.2	E47– <i>Homo sapiens bHLH-transcriptionfactor</i>	84
9.2.3	PTRF – <i>Homo sapiens Polymerase I- transcript release factor</i>	91
9.2.4	DMPK – <i>Homo sapiens dystrophia myotonica protein kinase</i>	96
9.2.5	PRA1 - <i>Homo sapiens prenylated Rab acceptor 1</i>	99
9.2.6	EPS15R - <i>Homo sapiens epidermal growth factor receptor substrate</i>	101
9.2.7	P88 ^{IPK} - <i>Homo sapiens repressor of interferon-inducible double-stranded RNA protein-kinase (PKR) dependent inhibitor P58, (P58^{IPK} repressor)</i>	106
9.2.8	CSBP1 – <i>Human CSaids binding protein (humane p38)</i>	109
9.2.9	Dynamitin - <i>Homo sapiens dynamitin (dynactin complex 50 kDa subunit)</i>	112
	Literaturverzeichnis	116
	Lebenslauf	124
	Publikationsliste	125
	Erklärung	126

1 SUMMARY

In a search for physiological substrates for the MAPK-activated protein kinases (MAPKAP kinases), 3pK and MAPKAPK-2 (MK2), constituents of a mammalian polycomb complex, HPH2 and the proto-oncoprotein Bmi1 were identified as interaction partners. Polycomb group (PcG) proteins are characterised to form large multimeric, chromatin-associated protein complexes with repressive transcriptional function. PcG complexes have an important role in the regulation of developmental processes and in the control of cellular proliferation. HPH2 binds to either kinase in a yeast two-hybrid assay and both, 3pK and MK2 are shown here to coimmunoprecipitate with HPH2 and Bmi1 or Bmi1 from mammalian cell lysates, respectively. Further, non-activated and DNA-bound 3pK could be identified as a transcriptional repressor of a chromatin-embedded gene in an artificial repression assay similar to the function of Bmi1. This suggests, that non-activated and DNA-bound 3pK, like Bmi1, must be able to recruit other PcG proteins to the target gene to reconstitute a functional repressive complex. Bmi1 is a phosphoprotein and both, 3pK and MK2 were identified in this paper to be *in vitro* Bmi1-kinases. Since the Bmi1 phosphorylation status was shown to be correlated with its dissociation from chromatin, it is likely that the MAPKAP kinases might be regulators of phosphorylation-dependent PcG-complex/chromatin interaction. In summary, the MAPK-activated protein kinases 3pK and MK2 are the first kinases identified to be assembled with members of PcG-protein complexes, suggesting a link of the MAPK signalling network to the regulation of PcG complex function.

Another new interaction partner of both MAPKAP kinases which was identified by means of the two-hybrid system and coimmunoprecipitation experiments is the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor E47. This E2A-encoded protein is known to be involved in the regulation of tissue-specific gene expression and cell differentiation. E47 is a phosphoprotein, and 3pK and MK2 were identified as E47-kinases *in vitro*. Further, expression of either kinase results in a repression of the transcriptional activity of overexpressed E47 in transient reporter gene assays with an E-box containing promoter construct. In summary, the MAPK-activated protein kinases 3pK and MK2 were identified to be assembled with the bHLH transcription factor E47 suggesting that these kinases are regulators of E47 activity and E47 dependent gene expression.

These results provide first evidence for the physiological function of the MAPKAP kinases 3pK and MK2 as transcriptional regulators presumable in differentiation processes.

2 ZUSAMMENFASSUNG

Auf der Suche nach physiologischen Substraten der MAPK-aktivierten Proteinkinasen (MAPKAP-Kinasen), 3pK und MAPKAP-K2 (MK2), wurden Mitglieder eines Säuger-Polycomb-Komplexes, HPH2 und das Protoonkoprotein Bmi1, als Interaktionspartner identifiziert. Proteine aus der Polycomb-Gruppe (PcG) sind dafür bekannt, multimere, Chromatin-assoziierte Proteinkomplexe zu bilden. Diese wirken als transkriptionelle Repressoren und spielen als solche eine wichtige Rolle sowohl in der Regulation von Entwicklungsprozessen als auch in der Kontrolle der zellulären Proliferation. HPH2 bindet im Hefe *two-hybrid*-System sowohl an 3pK als auch an MK2. Die Kinasen coimmunpräzipitieren auch mit den PcG-Proteinen. Weiterhin wurde festgestellt, daß nicht aktivierte und DNA-assoziierte 3pK, ähnlich wie Bmi1, in einem *in vivo* Repressionsassay als transkriptioneller Repressor wirkt. Dies unterstellt, daß 3pK, wie Bmi1, fähig sein muß, andere PcG-Proteine an das Zielgen zu rekrutieren, wo sich dann ein biologisch funktioneller Repressionskomplex rekonstituiert. Bmi1 ist ein Phosphoprotein und beide MAPKAP-Kinasen konnten in dieser Arbeit als *in vitro* Bmi1-Kinasen identifiziert werden. Da der Phosphorylierungsstatus von Bmi1 mit seiner Dissoziation und der anderer PcG-Proteine vom Chromatin korreliert, könnten die MAPKAP-Kinasen Regulatoren einer phosphorylierungs-abhängigen PcG-Komplex/Chromatin-Interaktion sein. 3pK und MK2 wurden hier als die ersten Kinasen identifiziert, die in Assoziation mit Proteinen von PcG-Komplexen vorliegen, was ein funktionelles Zusammenwirken von MAPK-Signaltransduktionsnetzwerk und der Regulation der PcG-Funktion nahe legt.

Ein weiterer durch das *two-hybrid*-System und Coimmunpräzipitationsexperimente identifizierter Interaktionspartner beider hier analysierter MAPKAP-Kinasen ist der basische Helix-Loop-Helix- (bHLH) Transkriptionsfaktor E47. Dieses E2A-kodierte Protein bindet als Homo- bzw. Heterodimer mit gewebespezifischen bHLH-Proteinen an sogenannte E-Box-DNA-Motive und ist so in die Regulation gewebespezifischer Genexpression und Zelldifferenzierung involviert. In dieser Arbeit konnten 3pK und MK2 als *in vitro* Kinasen des in Zellen phosphoryliert vorliegenden Transkriptionsfaktors identifiziert werden. Weiterhin führte die transiente Expression jeder dieser Kinasen in einem Reporterassay mit einem E-Box-Promotorkonstrukt zu einer Repression der transkriptionellen Aktivität von E47. Der bHLH-Transkriptionsfaktor E47 interagiert also mit beiden MAPKAP-Kinasen, 3pK und MK2, was die Kinasen als neu identifizierte Regulatoren der E47-abhängigen Genexpression präsentiert.

Mit dieser Arbeit ist ein erster Aufschluß der physiologischen Aktivität der MAPKAP-Kinasen 3pK und MK2 als transkriptionelle Regulatoren gelungen.

3 EINLEITUNG

3.1 Intrazelluläre Signaltransduktion als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli

Die 'Hauptakteure' dieser Arbeit, 3p-Kinase und MAPKAP-Kinase 2 (MK2), gehören zu den MAPKAP (*mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase*)-Kinasen [1,2]. Kinasen sind als signalübertragende Elemente tätig, indem sie γ -Phosphatgruppen von ATP auf Zielproteine übertragen. Die hier untersuchten Kinasen sind Bestandteile eines komplexen Signaltransduktionsnetzes, welches an vielen intrazellulären Kommunikationsprozessen beteiligt ist und das im folgenden beschrieben werden soll.

Zellen eines vielzelligen Organismus müssen miteinander kommunizieren, um ihre Entwicklung und Organisation zu Geweben zu regulieren, um ihr Wachstum und ihre Teilung zu kontrollieren und um ihre verschiedenartigen Aktivitäten zu koordinieren. Hierzu muß ein extrazelluläres Signal über intrazelluläre Signaltransduktion durch die Zelle in den Zellkern weitergeleitet werden. Dazu gibt es grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen, um dort letztendlich eine Veränderung im Muster der Genexpression zu bewirken. Die durch die Membran hindurch diffundierenden Steroidhormone z.B. können durch ihre Bindung an einen zytoplasmatischen Rezeptor eine Translokation dieses Rezeptor-Liganden-Komplexes in den Zellkern induzieren. Alle wasserlöslichen Signalmoleküle (u.a. Proteinhormone, Wachstumsfaktoren und Immunglobuline) sowie einige lipidlösliche Signalmoleküle führen dagegen durch ihre extrazelluläre Bindung an membranständige Rezeptoren zu deren Konformationsänderung, wodurch das Signal über die intrazellulären Domänen in das Zellinnere gelangt. Für diese Signalumwandlung stehen z.B. katalytische Rezeptoren zur Verfügung, die sich durch die Plasmamembran erstrecken und eine zytoplasmatische Domäne haben, welche Tyrosin-spezifische Proteinkinaseaktivität hat. Solche Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) oligomerisieren durch Ligandenbindung und werden dadurch aktiv. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wiederum aktivieren oder inaktivieren über ein GTP-bindendes Regulator-Protein (G-Protein) ein weiteres (membrangebundenes) Enzym oder einen Ionenkanal, was wiederum oft zur Produktion und/oder Freisetzung sekundärer Signalmoleküle (*second messenger*), wie zyklisches AMP (cAMP) oder Ca^{2+} , führt. Zur Weiterleitung werden Signale häufig über Adaptermoleküle, die keine katalytische Aktivität besitzen, auf Serin/Threonin-Kinasen oder seltener Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen übertragen. Die sogenannten MAP-Kinasen werden über zytoplasmatische Proteinkinasekaskaden aktiviert, die vom Aufbau prinzipiell ähnlich strukturiert sind (Bild 1): dabei phosphoryliert und aktiviert eine Serin/Threonin-Kinase (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK* oder *membrane shuttle kinase*)

eine nachfolgende Kinase (MAPKK, *dual specificity kinase*), die wiederum eine MAP-Kinase (MAPK, *nuclear shuttle kinase*) aktiviert. In dieser Weise gelangt das Signal zu seinen Zielstrukturen, häufig zu anderen Kinasen, die es selbst noch weiter leiten, oder direkt in den Kern, wo dann das Signal über eine differentielle Genexpression eine zelluläre Reaktion auslösen kann.

MAP-Kinasen werden aufgrund dreier gemeinsamer Merkmale in einer Familie zusammengefasst: erstens werden sie durch sogenannte dualspezifische Tyrosin-Serin/Threonin-Kinasen aktiviert (MAPKK), zweitens zeigen sie Sequenzhomologie in der Kinasedomäne und drittens phosphorylieren sie Serin- und Threonin-Aminosäurereste, die zu einem Prolinrest C-terminal benachbart sind (Ser/Thr-Pro). Mindestens drei Gruppen von MAP-Kinasen konnten bislang charakterisiert werden: ERK (*extracellular signal regulated kinase*), JNK/SAPK (*Jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase*; JNK ist das humane, SAPK das murine Homolog) und CSBP/p38 (*CSAIDTM [cytokine suppressive anti-inflammatory drug] binding protein* / Protein von 38 kDa; CSBP ist das humane, p38 das murine Homolog) (Bild 1).

3.2 Die mitogene Raf-MEK-ERK-Kinasekaskade

Signale, die Wachstum und Differenzierung in Zellen auslösen, werden in der Regel über die evolutionär hoch konservierte Mitogen-aktivierte Proteinkinasekaskade mit Raf, MEK (*MAPK/ERK activating kinase*) und ERK als zentrale Elemente weitergeleitet (Bild 1). Diese Proteinkaskade wurde in Säugern zuerst beschrieben und wird deshalb auch als 'klassische zytoplasmatische Kaskade' bezeichnet [3]. Die Bindung von Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF (*epidermal growth factor*) an die komplementäre RTK führt zu deren Oligomerisierung und Autophosphorylierung. Die dadurch entstehenden Phosphotyrosine dienen als Bindestelle für die SH2-Domäne (*Src homology*) des Adapterproteins Grb2, welches wiederum über seine SH3-Domäne an prolinreiche Regionen des GDP-Austauschfaktors Sos (*son of sevenless*) bindet. Sos interagiert mit Ras, das durch den Sos-katalysierten Guaninnukleotidaustausch aktiviert wird [4-7]. Kleine G-Proteine der Ras-Familie stellen molekulare Schalter für Signaltransduktionskaskaden dar [8,9]. Sie können zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen und einer aktiven GTP-gebundenen Form wechseln. In Eukaryoten sind inzwischen drei Ras-Haupttypen identifiziert worden: H-Ras, K-Ras und N-Ras [10]. Ras wird benötigt, um die zytosolische Serin/Threonin Kinase Raf (MAPKKK, *membrane shuttle kinase*), die als onkogenes Produkt des murinen Sarcomvirus 3611 entdeckt wurde [11], an die

Plasmamembran zu rekrutieren [12-15]. Dieser Schritt erlaubt die Aktivierung von Raf durch membranassoziierte Moleküle. Die Ras-Interaktion allein ist aber für eine volle Raf-Aktivierung nicht ausreichend [3,16,17]. Generell sind für die Raf-Regulation positiv wie negativ wirkende Mechanismen und Signalwege bekannt. Aktive Phospholipase C (PLC) γ spaltet das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die *second messenger* Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG), was wiederum über eine Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) zur Raf-Phosphorylierung führen kann [18,19]. Jedoch kommt es auch zu PKC-unabhängiger Raf-Aktivierung [20]. Bei der Raf-Aktivierung spielen darüber hinaus auch Proteine der 14-3-3 Familie eine regulative Rolle [21]. Auch Tyrosinkinase sind als positive Regulatoren bekannt, wohingegen PKA (*protein kinase A*) negativen Einfluss auf die Raf-Aktivität ausübt [17,22-25].

Als erstes Substrat der Raf-Isoenzyme wurde die dualspezifische Kinase MEK (*dual specificity kinase*) charakterisiert [26], die Signale über Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierung eines Thr-X-Tyr-Motivs an die MAP-Kinasen ERK1 (p44) und ERK2 (p42) weiterleitet [27,28]. Die Aktivierung von MEK1 und ERK1 durch Raf kann durch das Gerüstprotein MP1 (*MEK partner 1*) gesteigert werden [29]. Die Phosphorylierung von ERK hat wiederum zweierlei Wirkungen: es aktiviert die katalytische Aktivität von ERK und es ermöglicht deren Eintritt in den Zellkern (*nuclear shuttle kinase*). Im Gegensatz zu Raf und MEK sind für die ERKs eine Vielzahl von Substraten beschrieben worden. Zu ihren Zielproteinen gehören u.a. Serin/Threonin Kinasen (3pK, MK2, RSK1^{p90} (*ribosomal S6 kinase* oder auch MAPKAP-Kinase 1), RSK2), RNA-Polymerase II, Phospholipase A2 und eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (Elk-1, c-Jun) [1, 3, 30-32].

3.3 Die Streß-aktivierten JNK/SAPK- und CSBP/p38-Proteinkinasekaskaden

Während der Raf-MEK-ERK-Signalweg vorwiegend durch mitogene Faktoren stimuliert wird, werden die beiden anderen MAPK-Signalwege (Bild 1) hauptsächlich sowohl durch proinflammatorische Zytokine, u.a. Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1), als auch durch Streßinduktoren aktiviert, wie z.B. ultraviolettes Licht (UV), osmotischen Schock, Hitzeschock und chemische Streßagenzien wie Anisomycin und Arsenit [33, 34]. JNK und p38 werden durch Rac und z.T. durch Ras initiierte Signalwege stimuliert. Rac/cdc42 ist im GTP-gebundenen Zustand in der Lage, PAK (*p21 activated kinase*) sowie MEKK (*MEK kinase*) zu aktivieren [35, 36]. Das Isoenzym MEKK4 induziert vorzugsweise SEK (*SAPK/ERK kinase*), deren humanes Homolog MKK4 (*MAP kinase kinase*) ist, und die beide Homologie zu MEK

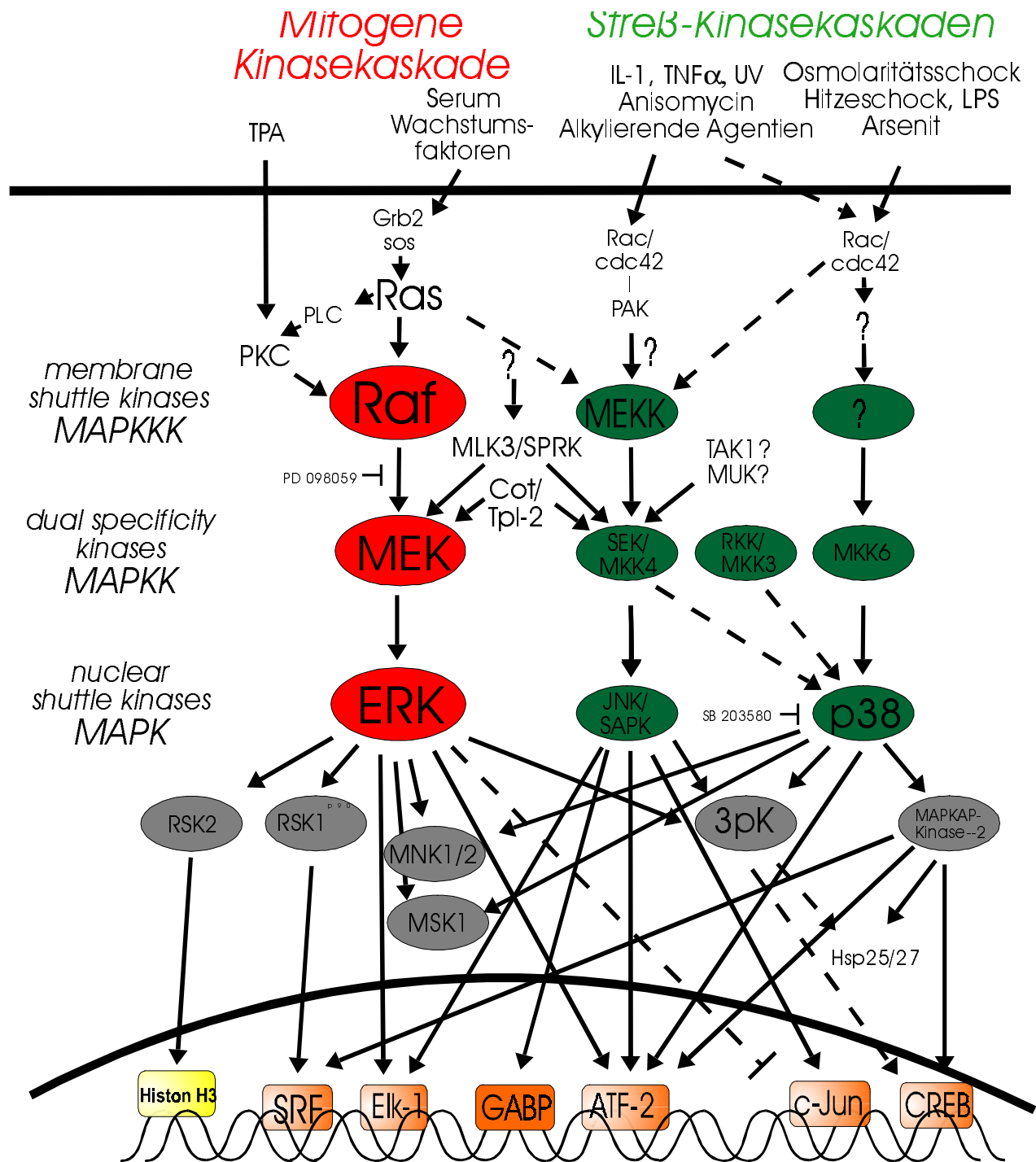


Bild 1: Die MAP-Kinasekaskaden - die mitogene Raf-MEK-ERK-Kinasekaskade und die Streß-aktivierten JNK/SAPK- und CSBP/p38-Proteinkinasekaskaden. Abkürzungen im Text bzw. in 9.1

haben [37]. In den letzten Jahren wurden viele weitere Kinasen identifiziert, die SEK aktivieren können [38], darunter die Proteinkinase Tpl-2 (*tumor progression locus 2*) und dessen humanes Homolog Cot (*cancer osaka thyroid*) [39] oder auch SPRK/MLK3 (*SH3-domain-containing proline-rich kinase/mixed lineage kinase 3*) [40]. SEK ist die direkt aktivierende Kinase für JNK/SAPK. Diese Kinasen werden u. a. durch die Assoziation zu einem Gerüstprotein, JIP-1 (*JNK interaction partner 1*), reguliert, welches noch weitere Kinasen bindet (z.B. MKK7, MLK3) [29,41]. Solche Gerüstproteine, wie auch MP1 für die mitogene MAPK-Kaskade, scheinen wichtig für die Spezifität der verschiedenen Kaskaden zu sein. Bekannte Substrate für JNK sind Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, das durch diese Kinase an den N-terminalen Serin-Resten S63 und S73 phosphoryliert und dadurch aktiviert wird [42]. Die Transkriptionsfaktoren ATF-2 und GABP werden ebenso durch JNK aktiviert wie die Kinase 3pK [31,43,44].

Lipopolysaccharide, Arsenit, Hitze- und osmolarer Schock führen zu einer bevorzugten Aktivierung von p38 bzw. CSBP [45-48]. Das Phosphorylierungsmotiv dieser MAP-Kinase besteht aus einer Thr-Glu-Tyr-Sequenz, die sowohl durch die MAP-Kinase-Kinasen MKK3 und MKK6 wie auch durch SEK phosphoryliert werden kann, wobei MKK6 nach bisherigen Erkenntnissen *in vivo* die entscheidende Rolle zukommt [49]. p38 phosphoryliert wie die anderen beiden MAP-Kinasen 3pK, aber auch dessen Homolog MK2 [31,50]. Der Transkriptionsfaktor ATF2 ist auch ein p38-Substrat [34].

Neuere Untersuchungen legen nahe, daß die Streß- und Mitogen-induzierten Kinasekaskaden an verschiedenen Punkten miteinander verbunden sind. Oft konvergieren die Kaskaden erst auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren, wie z.B. bei Elk-1 oder ATF-2 (Bild 1). Einige Kinasen wie Tpl-2 [51] oder SPRK/MLK3 sind in der Lage, untergeordnete Kinasen von unterschiedlichen Kaskaden zu aktivieren (Bild 1). Kürzlich wurden auch MAPKAP-Kinasen beschrieben, die Signale von verschiedenen MAP-Kinasen erhalten: z.B. 3pK (Bild 1) oder MNK1/2 (*MAPK-interacting kinases 1/2*) und MSK1 (*mitogen- and stress-activated protein kinase-1*), welche von ERK und p38 phosphoryliert und aktiviert werden können (Bild 1).

3.4 Die MAPKAP-Kinase 3pK

Der Name der Serin/Threonin-Kinase 3pK leitet sich von ihrem genetischen Locus auf dem kurzen Arm (p-Region) des humanen Chromosoms 3 ab: Chromosom 3p-Kinase. 1149 Basenpaare kodieren das 43 kDa große Protein, das in humanen Geweben ubiquitär exprimiert wird, in Herz- und Skelettmuskel sowie in T-Zellen aber besonders hoch. 3pK weist eine hohe Sequenzhomologie zu MK2 von 72% auf Nukleotid- und 75% auf Aminosäureebene auf. Die Aminosäuresequenz

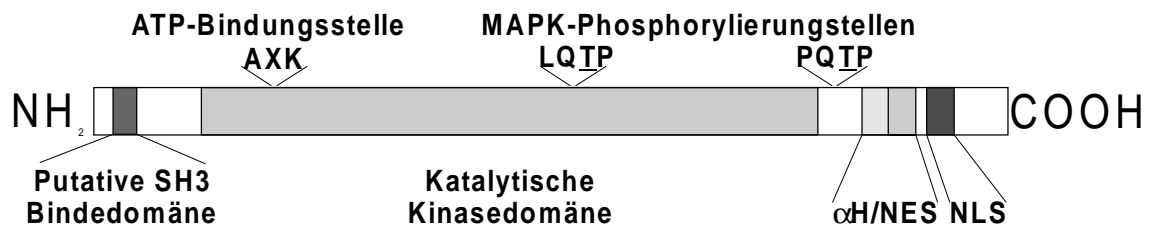


Bild 2: Primärstruktur von 3pK. (α H: α -Helix; NES: *nuclear export signal*; NLS: *nuclear localisation sequence*).

weist einige konservierte Motive auf (Bild 2). Im N-terminalen Bereich befindet sich eine prolinreiche potentielle SH3-Bindedomäne, die für etwaige Interaktionen mit anderen Proteinen wichtig sein könnte. Mehrere Thr-Pro-Motive stellen potentielle MAPK-Phosphorylierungsmotive dar (Thr201 und 313). Im C-terminalen Ende schließlich findet man eine α -Helix, die autoinhibitorische Funktion haben könnte, des weiteren ein putatives Kernexportsignal (NES, *nuclear export signal*) sowie die NLS (*nuclear localisation sequence*) [1,52].

Hinsichtlich der Aktivierung konnte 3pK durch mitogene Stimuli, Raf-abhängig über die klassische mitogene Kinasekaskade aktiviert werden. Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß 3pK aber auch nach Streß-Stimulation aktiv wurde. *In vitro* Studien mit rekombinanten Proteinen demonstrierten, daß zusätzlich zu ERK, auch andere MAP-Kinasen, wie JNK/SAPK und p38 in der Lage waren, 3pK zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Cotransfektionsexperimente mit aktiven bzw. inaktiven *upstream*-Aktivatoren sowie der Einsatz spezifischer Inhibitoren für verschiedene Kinasen zeigten, daß die *in vitro* Aktivatoren auch *in vivo* wirkten. Damit wurde 3pK als erste Kinase identifiziert, die durch drei verschiedene MAPK-Kaskaden aktiviert wird, was wiederum nahe legt, daß 3pK ein neuer Konvergenzpunkt von Streß- und Mitogen-Signalen ist [31]. Über die physiologische Rolle der Kinase bezüglich Substraten und Effektoren ist jedoch bisher nichts bekannt. Lediglich CREB (*cAMP-response element-binding protein*) und HSP27 (*small heat shock protein*) konnten als *in vitro* Substrate gefunden werden. Eine physiologische Relevanz für die Phosphorylierung von HSP27 könnte die Regulation von Aktinfilamenten sein [53], wobei in diesen Experimenten nicht zwischen 3pK und der homologen MK2 diskriminiert wurde.

3.5 MAPKAP-Kinase 2 (MK2) und weitere MAPKAP-Kinasen

Ursprünglich wurde MK2 lediglich nach der zellulären Antwort auf Streß, etwa durch Hitzeschock oder Zytokine wie TNF α , über p38 aktiviert [54,55]. Allerdings sind neben den Hitzeschockproteinen HSP27/25 [54,55] und ATF1 [56], beide durch Streß aktivierbar, nun auch die Transkriptionsfaktoren CREB und SRF (*serum response factor*) als MK2-Substrate identifiziert worden, die durch mitogene Faktoren aktiviert werden können [56,57]. Ähnlich wie in 3pK wurde auch in der Sequenz von MK2 sowohl ein putatives Kernwanderungs- als auch ein Exportsignal entdeckt. Die Phosphorylierung von MK2 sorgt für deren Verlassen des Zellerns und zwar gleichzeitig mit ihrer aktivierenden Kinase p38 [58]. Weiterhin wurde eine Beteiligung von MK2 als Element des p38-Signalweges für die Zytokin-induzierte mRNA-Stabilisierung gefunden [59]. Der Phänotyp der MK2-*knockout*-Maus legt eine Rolle von MK2 in der inflammatorischen Antwort nahe. Demnach reguliert MK2 die Biosynthese von TNF α auf einer posttranskriptionalen Ebene [60].

Neben den beiden bereits beschriebenen Mitgliedern dieser wachsenden MAPK-aktivierten Proteinfamilie sind bereits mehrere andere Homologe bekannt. MAPKAP-K1 (auch RSK1^{p90}), RSK2 und 3 werden durch ERK aktiviert, wodurch mehrere Transkriptionsfaktoren phosphoryliert werden können, u.a. SRF, Fos oder CREB. Vor kurzem konnte das Histon H3 als Zielprotein von RSK2 identifiziert werden [61]. MK4 (ca. 65% identisch zu MK2/3) und MK5 (ca. 45% identisch zu MK2/3/4) wurden als neue Substrate der MAP-Kinasen ERK (MK4) bzw. ERK und p38 (MK5) entdeckt und phosphorylieren ein Peptid der regulatorischen leichten Kette von Myosin II. Sowohl MNK1/2 als auch MSK1 werden von CSBP/p38 als auch von ERK aktiviert [62-64]. PRAK (*p38-regulated/activated protein kinase*) ist ebenfalls in der Lage HSP27 zu phosphorylieren und repräsentiert z.Z. die 'neueste' MAPK-aktivierte Proteinkinase [65].

Letztendlich sind die MAPKAP-Kinasen ein weitgehend neues Forschungsgebiet und die physiologischen Funktionen dieser Kinasen, im Speziellen auch die der 3pK, liegen noch fast gänzlich im Dunkeln.

3.6 Die Polycomb-Gruppe

HPH2 und Bmi1 wurden als Mitglieder einer wichtigen und evolutionär hochkonservierten Gruppe transkriptioneller Repressoren, der sogenannten Polycomb-Gruppe (PcG), gefunden, welche ursprünglich im Kontext entwicklungsbiologischer Prozesse der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde. Gene der PcG sowie die ihrer Gegenspieler, der trithorax-Gruppe (trxG), wurden dabei als Teil eines zellulären Erinnerungssystems charakterisiert, welches inaktive (durch PcG) bzw. aktive (durch trxG) Zustände homöotischer Genexpression für die korrekte Durchführung des Entwicklungsprogramms in *Drosophila* aufrechterhalten. Mittlerweile kennt man auch in Wirbeltieren vergleichbare Proteine, die ihren PcG- und trxG-*Drosophila*-Homologen nicht nur strukturell, sondern auch funktionell entsprechen. Auch weiß man, daß Gene des PcG-Komplexes nicht nur eine wichtige Rolle in der Entwicklung spielen, neueste Erkenntnisse legen ferner nahe, daß sie zumindest auch in die Kontrolle der Zellproliferation involviert sind.

3.6.1 Das Zellgedächtnis - PcG-Komplexe in der Aufrechterhaltung homöotischer Genexpression

In der Embryogenese werden Zellen determiniert, d.h. sie werden für unterschiedliche Funktionen programmiert, um später im Körper bestimmte Funktionen übernehmen zu können. Die molekulare Grundlage dieses Programms bilden meistens Regulationsfaktoren, die auf der Ebene der Transkriptionskontrolle wirken. Spezifisch determinierte Zellen sind durch die Expression eines bestimmten Satzes dieser Regulationsfaktoren charakterisiert. In einer nachfolgenden, als Differenzierung bezeichneten Phase wird dieses am Anfang festgelegte Programm dann implementiert, und die Zellen bilden jene Strukturen und Funktionen aus, die einprogrammiert wurden. Entwicklung besteht aber nicht nur aus einer Spezialisierung von Körperzellen, sondern auch aus Größenwachstum und den damit verbundenen Zellteilungen. Dies bedeutet, daß Zellen fähig sein müssen, das anfänglich festgelegte Programm auf ihre Nachkommen zu übertragen, es also während des Größenwachstums über viele Zellteilungen aufrecht zu halten. Die Fähigkeit, den so determinierten Zustand einer Zelle auf die Tochterzellen zu vererben, wird als 'Zellgedächtnis' bezeichnet.

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sind homöotische Gene (auch Homöobox-Gene oder Hox-Gene genannt) solche wichtigen Regulationsfaktoren, die auf transkriptioneller Ebene die Identität der verschiedenen Körpersegmente entlang der *anterior-posterior*-Achse determinieren [66]. Die Homöobox-Sequenz, welche diese Gene charakterisiert, kodiert eine circa 60 Aminosäuren umfassende Homöo-Domäne, die spezifische DNA-Sequenzmotive

erkennt und an sie bindet [67,68]. Während der frühen embryonalen Entwicklung sind Transkriptionsfaktoren der Segmentierungs-Genfamilie für die Aktivierung dieser homöotischen Gene in den korrekten räumlichen Bereichen verantwortlich. In späteren Differenzierungsprozessen sorgen die aktivierten Hox-Gene dafür, daß korrekte Körperstrukturen am richtigen Ort entstehen. Mutationen des Homöobox-Gens *Antennapedia* z.B. führen dazu, daß anstatt eines Antennenpaares Beine am Kopf der Fruchtfliege gebildet werden. Kurz nach der Gastrulation, nachdem die frühen Hox-Regulatoren verschwunden sind, ist dann die korrekte Expression der Hox-Gene für die weitere Entwicklung des Organismus von Proteinen abhängig, die durch die Pc- und die trx-Gruppe kodiert werden. Dabei sind die Gene von trxG für die Aufrechterhaltung des aktiven Zustandes notwendig, die Gene von PcG dagegen für das Beibehalten reprimierter Expressionszustände [69,70]. Diese beiden Gengruppen wirken also als eine Art Gedächtnisträger, indem sie den Expressionszustand ihrer Zielgene, der schon früh in der Entwicklung festgelegt wurde, in bestimmten Chromatinstrukturen fixieren und diese dann mitotisch von Zelle zu Zelle oder sogar über meiotische Teilungen auf ihre Nachkommen übertragen [69-73].

Außer der Regulation von Hox-Genen sind mittlerweile auch andere Zielgene für PcG-Komplexe bekannt. Schon allein die Existenz von mehr als 100 voneinander verschiedenen PcG-Bindestellen an den Polytän-Chromosomen von *Drosophila*, PREs (*Polycomb-response elements*) genannt, gibt Hinweise auf die Regulation weiterer Faktoren. In Wirbeltieren sprechen vor allem die pleiotropen Phänotypen von PcG-*knockout*-Mäusen dafür, daß diese Gene auch andere Zielgene kontrollieren; u.a. haben *Bmi1*^{-/-}, *Mel18*^{-/-}, *M33*^{-/-} und *Mph1*^{-/-}-Mäuse proliferative Defekte im hämatopoetischen System und sind stark unterentwickelt, sowohl von der Körpergröße als auch vom Körpergewicht her [74-77]. Primäre embryonale Fibroblasten von *Bmi1*^{-/-}, *Mel18*^{-/-} und *M33*^{-/-}-Mäusen zeigen zudem eine eingeschränkte Fähigkeit in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten [76,78]. Diese Resultate sprechen eindeutig dafür, daß zumindest die Kontrolle der Zellproliferation eine zusätzliche, wichtige Aufgabe der PcG-Proteine darstellt. In diesem Zusammenhang ist deshalb auch nicht erstaunlich, daß Säugerhomologe der PcG- und trxG-Gene als potentielle Krebsgene identifiziert wurden.

3.6.2 Das PcG- und Protoonkoprotein Bmi1

Bmi1 (abgeleitet von *B* cell-specific *Mo*-*MLV* *integration site 1*) ist eines der am besten charakterisierten PcG-Mitglieder [79,80]. Ursprünglich wurde *bmi1* als Protoonkogen entdeckt, das in der Kooperation mit *c-myc* zur Entstehung von Lymphomen in μ E-*myc* transgenen Mäusen führt [81,82]. Etwas später wurde *Bmi1* dann als transkriptioneller

Repressor des PcG-Komplexes identifiziert, der in die Regulation homöotischer Gene involviert ist [74,83,84]. Weitere Anhaltspunkte, daß *bmi1* ein Protoonkogen ist, kommen von Analysen transgener Mäuse, in denen überexprimiertes *Bmi1* zu einer Prädisposition für Lymphome führt [85,86]. Umgekehrt führt das Fehlen von *Bmi1* in *knockout*-Mäusen neben neurologischen Störungen zu schweren proliferativen Defekten in lymphoiden Zellen [74,86]. Ferner ist auch eine *hBmi1*-Gen-Amplifikation in bösartigen humanen Geschwüren bekannt [87].

Neueste biochemische und funktionelle Analysen der häufigsten proliferativen Defekte in primären Zellen von *bmi1-knockout*-Mäusen haben ein neues wichtiges Zielgen von *Bmi1* identifiziert: den *INK4a*-Lokus, der die Tumorsuppressoren und Zellzyklus-Inhibitoren *p16* und *p19^{ARF}* kodiert. Beide Proteine, die als *upstream*-Regulatoren des Retinoblastom- und des *p53*-Tumorsuppressor-Signalweges gelten [88], liegen in überexprimierter Form in *bmi1-knockout*-Mäusen vor. Umgekehrt sind sie in *bmi1*-transgenen Mäusen herunterreguliert. Damit bietet sich auch ein Erklärungsmodell für die prädisponierende Rolle von *bmi1* bei der Tumorbildung an.

Diese Resultate verbinden somit die in der Entwicklung wichtigen PcG-Faktoren mit der Kontrolle der zellulären Proliferation. Möglicherweise ist der Verlust des Zellgedächtnisses ein wichtiger auslösender Faktor für ein unkontrolliertes Wachstum, wie es bei Krebs vorliegt.

3.6.3 Das PcG-Protein HPH2

Human polyhomeotic 2 (HPH2) ist ein Homolog von *Drosophila polyhomeotic*. Es gehört zusammen mit den anderen *polyhomeotic*-Wirbeltier-Homologen HPH1, *Mph1/2* (*murine polyhomeotic 1/2*), erstmals 1997 und 1998 beschrieben, ebenfalls zu den transkriptionellen Repressoren der Pc-Gruppe. Außer *Mph1*, das ursprünglich als ein durch das Morphogen Retinsäure induzierbares Protein entdeckt wurde und deshalb auch als *rae-28* bezeichnet wird [89], wurden alle vier *ph*-Homologe meist unabhängig voneinander im *two-hybrid*-System als *Bmi1/Xbmi1* (Maus/Xenopus)-Interaktionspartner entdeckt [90-92]. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, daß die Mitglieder dieser Polycomb-Gruppe wie *Bmi1/BMI1*, *Mph1/2/HPH1/2*, *M33*, *Mpc2/Hpc2* (*murine/humane polycomb* Homologe) und *dinG/RING1B* (*Drosophila/humanes* Homolog) direkt *in vivo* miteinander interagieren. [90-96]. Dem RING-Finger-Motiv von *Bmi1* wird dabei unterstellt, eine Art Gerüst (*scaffold*) für eine Proteinbindungsplattform zur Verfügung zu stellen [92].

Interessanterweise wurde bei den *polyhomeotic*-Homologen, HPH1/2 und *Mph1/2*, ein neues, C-terminales Sequenzmotiv mit α -helikaler Struktur entdeckt, das entweder als Homologie-

Domäne II [91], SEP-Domäne (für das Vorkommen in Hefe-Sterilitäts-, Ets verwandten und PcG-Proteinen) [90] oder SAM-Domäne (*sterile alpha motif*) [97] bezeichnet wurde. Es umfaßt circa 65-70 Aminosäuren und ist, wie durch ihre verschiedenen Bezeichnungen angedeutet, in weiteren eukaryotischen Genen vorhanden. Diese Domäne ist bei den *polyhomeotic*-Homologen sowohl für deren Dimerisierung notwendig als auch ein Teil der Bmi1-Interaktionsdomäne [90,91]. Ihr Vorkommen in den Hefe-Proteinen, byr2 und Ste11, beide gehören zu den MEK-Kinasen, sowie in anderen Proteinen u.a. mit Pleckstrin-Homologie und *Src*-Homologie, legen eine mögliche Partizipation in Signaltransduktionswegen nahe [97]. Als weitere strukturelle Merkmale weisen die *ph*-Homologe gemeinsam ein potentiell Zinkfinger-Motiv auf, eine Glutamin-reiche Region sowie eine weitere Homologie-Domäne (28 Aminosäuren), die besonders hoch konserviert ist und entsprechend auch in *Drosophila* *ph* vorkommt [90,91].

Untersuchungen an *Rae28/mph1*-defizienten Mäusen zeigten eine perinatale Letalität, Skeletttransformationen sowie multiple Entwicklungsdefekte in Augen, Nebenschilddrüsen, Thymus, Herz und Milz. *Hox a-3*, *a-4*, *a-5*, *b-3*, *b-4* und *d-4* wurden dabei als Zielgene identifiziert [77].

3.6.4 Mechanismus des PcG-silencings

Obwohl das PcG-silencing ein evolutionär hochkonservierter Mechanismus der Regulation der Genexpression zu sein scheint, liegen die molekularen Details der Funktionsweise fast gänzlich im Dunkeln. Für den Mechanismus, wie die Etablierung der PcG-Komplexe an ihren Zielgenen vor sich geht, existieren generell zwei Hypothesen: (A) das Rekrutierungsmodell und (B) das Modell der kooperativen Zusammensetzung.

Im ersten Modell, analog zum silencing von Hefe-Telomeren, werden die Zielgene durch ein sequenzspezifisches DNA-Bindeprotein erkannt, welches dann im Anschluß einzelne oder teilweise bereits assoziierte PcG-Proteine rekrutiert. Die Fähigkeit einzelner PcG-Proteine einen funktionellen PcG-silencing-Komplex zusammenzufügen, sobald das jeweilige Protein über eine DNA-Bindedomäne zur DNA gebracht wird, unterstützt diese Hypothese [98]. Im Gegensatz zu einigen *trxG*-Mitgliedern wurde (mit Ausnahme von Mel18, das *in vitro* an bestimmte Oligonukleotide bindet; die *in vivo*-Signifikanz ist noch unklar [99]) bis vor kurzem noch kein PcG-Protein in Maus oder *Drosophila* gefunden, das sequenzspezifisch und mit einer angemessenen Affinität an DNA bindet. Aufgrund dieser fehlenden Hinweise wurde in diesem Modell davon ausgegangen, daß frühere Repressoren wie *hunchback* die PcG-Komplexe zu den Zielgenen rekrutieren. Das würde gleichzeitig eine Erklärung dafür bieten, wieso PcG-silencing nur in solchen Zellen stattfindet, die bereits in früheren Entwicklungsphasen reprimiert

vorlagen. Mit dMi-2 wurde außerdem ein *Drosophila*-Protein identifiziert, das als molekulares Bindeglied zwischen *hunchback*-Repression und PcG-Repression fungieren könnte [100].

Im zweiten Modell, dem Modell der kooperativen Zusammensetzung, wird angenommen, daß PcG-Proteine schwache DNA-Bindeproteine seien, die an PREs mit niedriger Affinität über kooperative Interaktionen untereinander zu einem stabilen *silencing*-Komplex zusammenfinden [72,73].

Allerdings unterstützt die kürzliche Identifikation des *Drosophila* PcG-Proteins *pleiohomeotic* (PHO), ein sequenzspezifisches DNA-Bindeprotein mit Homologie zum Säuger-Transkriptionsfaktor Yin-Yang-1 (YY-1), das Modell, in dem PcG-Proteine ihre Zielgene über spezifische Sequenzen erkennen [101,102]. PHO registriert und bindet dabei an das DNA-Motiv von YY-1. Die Mutation dieser Region im *engrailed*-PRE hebt dessen Funktion auf, was zeigt, daß die Erkennung und Bindung dieser Stelle durch PHO notwendig für die Etablierung eines PcG-Komplexes ist [101]. Der Sequenzvergleich verschiedener PREs brachte übereinstimmend damit ein konserviertes Sequenzmotiv zum Vorschein, das die YY-1-Erkennungssequenz beinhaltet [103]. Außerdem konnten noch weitere konservierte Sequenzen in anderen PREs gefunden werden [101]. Diese Elemente könnten wiederum Ziele für andere sequenzspezifische DNA-Bindeproteine und/oder PcG-Proteine mit niedriger DNA-Bindungsaffinität darstellen, die dann mit dem PHO-Bindeelement (oder ihm analogen Elementen) kooperieren, um einen stabilen PcG-abhängigen *silencing*-Komplex zu formen.

Eine neuere Publikation berichtet außerdem, daß *rae-28*, also murines Mph1, ebenfalls mit signifikanter Affinität an bestimmte Konsensus-Sequenzen bindet (5'-ACCA-3', 5'-ACCCA-3', 5'-CTATCA-3' und 5'-TGCC-3'). Dies wäre ein weiterer Anhaltspunkt, daß sequenzspezifische DNA-Bindeproteine, eventuell die *polyhomeotic*-Homologe, an ihren Zielgenen eine Art *docking*-Protein für einen multimeren PcG-Protein-Komplex darstellen könnten [104].

3.6.5 Phosphorylierung und Regulation von PcG-Proteinen

Neueste Ergebnisse berichten erstmalig von einem Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Dissoziation von PcG-Komplexen vom Chromatin und präsentieren damit zum ersten Mal eine Verbindung zwischen Phosphorylierung und PcG-Regulation [105]. Die PcG-Assoziation und -Dissoziation ist dabei Zellzyklus-abhängig. Kurz vor der Mitose (beim Übergang von S in G2-Phase) nimmt das immunhistochemische BMI1-Signal signifikant ab und erscheint erst nach der Mitose in der frühen G1-Phase wieder. Eine direkte Immunpräzipitation von mit Orthophosphat gekennzeichnetem BMI1 zeigte, daß BMI1 *in vivo* ein Phosphoprotein ist. Hyperphosphoryliertes BMI1 aus Zellen, die in der M-Phase arretiert wurden, migrierte in Protein-Gelen langsamer als BMI1 von G1-arretierten Zellen. Zugabe alkaliner Phosphatase

und die damit verbundene Dephosphorylierung ließ BMI1 wieder genauso schnell laufen wie BMI1 aus G1. Der Einsatz eines Phosphatase-Inhibitors hob die schnellere Migration wiederum auf. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der größte Anteil an hypophosphoryliertem BMI1 (aus G1-arretierten Zellen) Chromatin-gebundenen ist, während hyperphosphoryliertes BMI1 aus der M-Phase meist davon gelöst vorlag. Interessanterweise konnte durch eine Immunpräzipitation mit BMI1-Antikörpern auch Mph in denselben Fraktionen wie BMI1 nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, daß wenigstens einige PcG-Protein-Protein-Interaktionen erhalten bleiben, wenn sich der PcG-Komplex in der G2/M-Phase vom Chromatin löst.

BMI1 liegt also ab der frühen G1-Phase als hypophosphoryliertes Protein vor, was dem Zeitpunkt entspricht, wenn BMI1 immunhistochemisch wieder deutlich als Heterochromatin-assoziiert zu erkennen ist. Diese Signale verschwinden nach der *de novo* DNA-Synthese in der G2-Phase und kommen nach der Mitose erst wieder in der frühen G1-Phase zum Vorschein. In genau diesem Zeitrahmen liegt BMI1 phosphoryliert und überwiegend vom Chromatin dissoziiert vor. Diese Beobachtungen legen nahe, daß die Phosphorylierung vermutlich die PcG-Komplex/Chromatin-Interaktion beenden kann.

Mit sensitiveren Nachweismethoden wurde noch eine limitierte Fraktion BMI1 als feingepunktete Schicht auf Metaphasechromosomen gefunden. Diese geringe, aber biologisch signifikante Menge eines transkriptionellen Repressors, der auch während der Mitose noch an den Chromosomen assoziiert vorliegt, könnte womöglich ausreichend sein, relevante Zielgene für die transkriptionelle Repression in den nachfolgenden Generationen epigenetisch zu markieren.

Weitere Publikationen unterstützen die Bedeutung einer phosphorylierungsabhängigen PcG-Protein/Chromatin-Interaktion. So wurde vor kurzem das Histon H3 als Zielprotein der MAPKAP-Kinase RSK2 nach EGF-Aktivierung identifiziert [61], womit eine potentielle Verbindung zwischen extrazellulären Signalen und Chromatin-Remodellierung hergestellt wäre. Dieses Ergebnis legt erstmals die Möglichkeit nahe, daß Proteinkinasen, wie RSK2 oder auch 3pK bzw. MK2, oder Phosphatasen eine entscheidende Rolle im Kontext der PcG- und trxG-abhängigen Regulation der Genexpression haben könnten.

3.7 Der Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor E47

E47 gehört zu einer Ende der achtziger Jahre entdeckten Gruppe von DNA-bindenden Proteinen, den sogenannten basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren.

3.7.1 Die Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren

Diese bHLH-Proteine sind regulatorische Faktoren, die, wenn sie in einem entsprechenden Zelltyp exprimiert werden, die Expression einer Reihe von Genen induzieren, was wiederum in einem gewebespezifischen Phänotyp resultiert. bHLH-Proteine sind entscheidend an der Regulation vieler entwicklungsspezifischer Prozesse beteiligt. Diese Proteinfamilie ist entwicklungsbiologisch hoch konserviert; sie ist in Hefe, Nematoden, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, Huhn und Säugern zu finden. Die Proteine haben zwei konservierte Regionen gemeinsam, welche es ihnen erlaubt, zum einen an die DNA zu binden und zum anderen miteinander zu interagieren [106]. Für die DNA-Bindung ist eine Region verantwortlich, die hauptsächlich aus basischen Aminosäuren besteht. Die HLH-Domäne, bestehend aus zwei amphipathischen Helices, ist sowohl für die Dimerisierung als auch für die DNA-Bindung wichtig [106,107]. Klasse I bHLH-Proteine (siehe unten) besitzen typischerweise auch zwei separate Transaktivierungsdomänen im N-Terminus [108-110].

Die bHLH-Bindestellen, E-Boxen genannt, wurden ursprünglich als Elemente im *immunoglobulin heavy chain gene enhancer* (μ E) identifiziert. Fünf Konsensussequenzen (CAXXTG), μ E1-5 genannt, sind in diesem Enhancer präsent [111,112]. Im Enhancer des Immunglobulins der leichten Kette (κ E) sind verwandte Stellen vorhanden, die κ E1-3 genannt werden [113]. Die funktionelle Relevanz wurde durch Mutationsanalysen gezeigt: wurden mehrere E-Box-Stellen im μ E kombiniert mutiert, konnte damit die transkriptionelle Aktivität völlig gelöscht werden [113,114]. Die wichtigsten E-Box-Stellen sind die der E2-Box-Klasse (GCAGXTGG/T). Zwei dieser E2-Box-Stellen sind im μ E vorhanden, μ E2 und μ E5, eine auch im κ E, κ E2 [111-113]. Diese E-Boxen finden sich aber auch in regulatorischen Regionen anderer Gene wie dem von Insulin, Amylase IIA, Chemotrypsin (Pankreas-Gene) und sind auch in die Kontrolle vieler muskelspezifischer Gene involviert, z.B. MCK (*muscle creatin-kinase*), Myosin, Desmin, Acetylcholinrezeptor etc. [115].

3.7.2 Einteilung der bHLH-Proteine

bHLH-Proteine werden in mehrere Klassen unterteilt (Tabelle 1): die erste Klasse wird ubiquitär exprimiert und kann sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden. Die Expression

der Klasse II-Proteine ist auf bestimmte Gewebe beschränkt. MyoD, Myogenin und Myf-5, auch MEFs (*myogenic regulatory factors*) genannt, spielen z.B. eine zentrale Rolle bei der Muskelentwicklung [116-119]. Klasse III-bHLH-Proteine beinhalten Myc-verwandte Proteine, die alle in die Wachstumskontrolle der Zelle involviert sind [120]. Mad und Max (Klasse IV) wiederum interagieren mit Myc [121]. Die bHLH-Proteine von Klasse V besitzen keine DNA-Binde-Domäne [122-124]. Sie heterodimerisieren mit anderen bHLH-Proteinen, womit sie deren Homo-/Heterodimerisierung unterbinden und eine entsprechende DNA-Bindung verhindern. Die sechste Klasse ist durch das Vorhandensein eines Prolins in ihrer basischen Region gekennzeichnet [125,126].

Klasse I (E-Proteine): E12 E47 E2-2 HEB daughterless	Klasse II: MyoD Myogenin Myf-5 AS-C (<i>achaete-scute</i>)	Klasse III: TFE-3 TF-EB Myc
Klasse IV: Max Mad	Klasse V: Id Emc (<i>extramacrochaetae</i>)	Klasse VI: Hairy Enhancer of split

Tabelle 1: Unterteilung der Helix-Loop-Helix-Proteine [115].

3.7.3 Funktionen von E-Proteinen

E47 und andere E-Proteine wurden ursprünglich in B-Zellen als Immunglobulin-Enhancer-bindende Transkriptionsfaktoren identifiziert, wo sie als Homodimere binden. Sie werden aber auch in vielen Nicht-B-Zellen als ubiquitär exprimierte Proteine gefunden. In T-Zellen bilden E2A-Proteine zusammen mit HEB Heterodimere [115]. In anderen Nicht-B-Zelllinien bilden sie mit gewebespezifischen Klasse II-Proteinen Heterodimere und sind so an der Expression vieler gewebespezifischer Gene wie auch an Zelldeterminierung und -differenzierung beteiligt. Mit muskelspezifischen MEF-bHLH-Proteinen z.B. regulieren E-Proteine über die Aktivierung entsprechender Gene die Muskeldifferenzierung. Das *Drosophila* Klasse I bHLH-Protein *daughterless* ist zusammen mit *Achaete-scute T4* an der Sexdeterminierung und der Neurogenese von *Drosophila* beteiligt [127,128]. Die essentielle Rolle für E2A in der Generierung von B- aber auch T-Zellen wurde durch die Erzeugung von E2A-defizienten Mäusen entdeckt. In ihnen unterbleibt die B-Zell-Entwicklung komplett [129,130]. Außerdem zeigen diese Mäuse schwere Defekte in der T-Zell-Reifung [131].

E-Proteine weisen im Zusammenhang mit Chromosomentranslokationen ein starkes onkogenes Potential auf. E12 und E47 sind in zwei pädiatrischen, lymphoblastischen Leukämien

transloziert, wobei die HLH-Domäne durch eine fremde DNA-Bindedomäne ersetzt ist [132,133]. In der akuten lymphoblastischen Leukämie in Pro-B-Zellen wird die HLH-Domäne gegen eine von HLF-abstammende DNA-Bindedomäne ausgetauscht [134]; in einer anderen Leukämieart wiederum wird die HLH-Domäne durch eine Homeobox-Domäne von pbx substituiert, wodurch ein Nicht-Aktivator in einen starken transkriptionellen Aktivator verwandelt wird [135]. Weiterhin sind auch an T-Zell-Leukämien involvierte Onkogene bekannt, die HLH-Domänen besitzen (lyl-1 und SCL) [136]. bHLH-Proteine sind also sowohl in zellulärer Differenzierung als auch an der Wachstumskontrolle beteiligt.

3.7.4 Mechanismen für die biologische Spezifität von bHLH-Proteinen

Ein Paradox im Verständnis der Funktion von bHLH-Proteinen ist das Vorhandensein der Erkennungssequenzen in einer ganzen Reihe von Promotoren und Enhancern, welche gewebespezifische Gene regulieren [137]. E47-Homodimere binden *in vitro*, wahrscheinlich auch *in vivo* an E-Boxen des MCK- und Insulin-Enhancers, trotzdem wird keiner dieser Enhancer in B-Zellen aktiviert [115]. Wie wird also die vorhandene große biologische Spezifität der bHLH-Protein-Bindung erzielt? In einigen Fällen bestimmen E-Box-flankierende Sequenzen, welche bHLH-Proteine binden und welche nicht. Ein Thymidin außerhalb des E-Box-Kernmotivs verhindert z.B. das Binden von Myc, nicht aber von Max [138]. Dennoch sind flankierende Regionen um E-Boxen nicht die komplette Erklärung für die biologische Spezifität von bHLH-Proteinen [115]. ETS-Proteine, die benachbart von E-Box-Motiven in Immunglobulin-Enhancern binden, nicht aber in muskelspezifischen Enhancern, waren in der Lage, synergistisch mit E12 und E47 die Transkription zu aktivieren [139,140]. Eine ähnliche kombinierte Kontrolle in B-Zellen wurde bei der Aktivierung des Insulin-Gens durch ein E-Protein (pan-1, das E47-Homolog der Ratte) und ein Homeobox-Protein, LIM, gefunden [141]. Auch in *Drosophila* wurde demonstriert, daß bHLH-Proteine (*twist* bzw. *achaete-scute T4*) kooperativ mit einer anderen Klasse von Transaktivatoren (*dorsal*, aus der Familie der *rel*-Genfamilie) an DNA binden [142]. Die Kombination von entwicklungspezifischen Regulatoren, die kooperativ an DNA binden, könnte also einen generellen Mechanismus für gewebe- und entwicklungspezifische Genexpression darstellen. Der geringe Aktionsradius der Interaktionen zwischen Familien von DNA-bindenden Proteinen könnte sehr gut die biologische Spezifität von relativ unspezifischen DNA-bindenden Proteinen erklären [115].

Auch die Partnerwahl repräsentiert einen wichtigen molekularen Mechanismus für die Kontrolle der gewebespezifischen Genexpression [143] und trägt damit wiederum zur biologischen Spezifität von bHLH-Proteinen bei. Z.B. fungieren Klasse V bHLH-Proteine wie

die Id-Proteine (*inhibitor of differentiation/DNA-binding*) durch ihre Kooperation als negative Regulatoren von E-Proteinen.

3.7.5 Die Rolle der Phosphorylierung in der Kontrolle von bHLH-Proteinen

Ein generell wichtiger Mechanismus, durch den die Aktivitäten einer ganzen Reihe von Transkriptionsfaktoren reguliert werden, ist die Phosphorylierung [144]. Das gilt auch für bHLH-Transkriptionsfaktoren, von deren Regulation durch dieses posttranslationale Ereignis in Hinsicht auf gewebespezifische Genexpression und Zelldifferenzierung bereits öfters berichtet wurde.

Die Dimerisierung von Myogenin mit E2A-Produkten verstärkt z.B. die Phosphorylierung von Myogenin, wobei die transkriptionelle Aktivität von Myogenin reduziert wird, was darauf hindeutet, daß die Phosphorylierung dieses bHLH-Proteins sich negativ auf die muskelspezifische Genexpression auswirkt [145]. Phosphorylierung inhibiert außerdem die DNA-Bindung von MyoD-Homodimeren, nicht aber von MyoD-E12-Heterodimeren, was wiederum die Konkurrenz um Bindestellen durch Homodimere verhindert [146] und somit entscheidend zur biologische Spezifität von bHLH-Proteinen beiträgt. Erhöhte Anteile von cAMP sowie die Überexpression von PKA reprimieren die transkriptionelle Aktivierung von muskelspezifischen Genen durch die Phosphorylierung von Myf-5 und MyoD und unterbinden dadurch die myogene Differenzierung. Phosphorylierung durch PKA *in vitro* hat aber in diesem Fall keinen Effekt auf die DNA-Bindung von Myf-5 oder MyoD, was wiederum darauf hindeutet, daß die durch PKA erzielte Inhibierung auf einer posttranslationalen Ebene stattfindet und wahrscheinlich den der DNA-Bindung folgenden Transaktivierungsprozeß beeinflusst [147]. Johnson *et al.* demonstrierten, daß die Überexpression von CKII (*casein kinase*) die transkriptionelle Aktivität von MRF4 und MyoD *in vivo* vergrößerte, unabhängig von deren Phosphorylierung, allerdings wurde dabei deren Partner E47 durch die Phosphorylierung beeinflusst [143].

3.7.6 Die Rolle der Phosphorylierung in der Kontrolle von E47

Ein direkter Effekt einer E47-Phosphorylierung wurde auch von Sloan *et al.* entdeckt [148]: zwei Serine (Ser514/529) in der sauren Domäne, N-terminal zum HLH-Motiv, lagen in einer Reihe von Nicht-B-Zellen in phosphoryliertem Zustand vor, in B-Zellen dagegen waren sie nicht phosphoryliert [148,149]. Es wurde weiterhin gezeigt, daß die Phosphorylierung dieser Aminosäuren *in vitro* die DNA-Bindung von Homodimeren einer E47-Deletionsmutante, E47 (Δ 1-491) (kurz Δ E47), verhindern konnte, während Heterodimere, wie z.B. Δ E47:MyoD,

immer noch binden konnten. Das spricht für einen Mechanismus, bei dem eine negative Ladung in der Nähe der DNA-Bindedomäne den Kontakt von Homodimeren mit der DNA schwächen könnte [148]. Dies verdeutlicht, wie eine Phosphorylierung zur biologischen Spezifität von bHLH-Proteinen beitragen könnte. Diese Gruppe postuliert ein Modell, in dem eine Hypophosphorylierung die Voraussetzung für die Aktivität von E47-Homodimeren in B-Zellen darstellt und damit für die Differenzierung einer lymphoiden Vorläuferzelle in eine solche Zelllinie verantwortlich ist, wohingegen in Nicht-B-Zellen die spezifische Aktivität von E47 inaktiviert wird, indem die DNA-Bindung von E47-Homodimeren durch diese posttranslationale Modifikation verhindert wird [148].

E47 weist mit allen Serin-, Threonin- und Tyrosinseitenketten über 100 potentielle Phosphorylierungsstellen auf und ist ferner dafür bekannt, sowohl in B-Zellen als auch in Nicht-B-Zellen phosphoryliert zu sein [149]. Phosphoaminosäure-Analysen mit Δ E47 zeigten eine ausschließliche Phosphorylierung von Serin [148]. Allerdings sind die dafür verantwortlichen Kinasen weitgehend unbekannt. Sloan *et al.* fanden, daß Ser514 von aufgereinigter CKII bzw. Ser529 von PKA *in vitro* phosphoryliert werden konnte. Um die DNA-Bindung von Δ E47-Dimeren zu verhindern, war die Phosphorylierung durch beide Kinasen notwendig [148], wohingegen Johnson *et al.* zeigten, daß CKII allein ausreichte [143]. Diese Gruppe konnte weiterhin zeigen, daß die Überexpression der CKII *in vivo* zu einer dramatischen Reduktion der E47-Homodimer-abhängigen Transkription führt und CKII damit als ein positiver Regulator der Myogenese anzusehen ist, indem sie durch Phosphorylieren das Binden von E-Protein-Homodimeren an regulatorische Elemente von muskelspezifischen Genen verhindert [143].

4 PROBLEMSTELLUNG

Das Verstehen der molekularen Zusammenhänge der Signalübermittlung von extrazellulären Signalen bis zu deren Beantwortung im Zellkern erfordert die Identifizierung und Aufklärung eines komplexen Signaltransduktionsprozesses und der daran beteiligten Proteine.

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation neuer Zusammenhänge und Signalwege der MAPK-aktivierten Proteinkinase 3pK zu anderen Proteinen zu finden und diese zu charakterisieren.

MAP-Kinasen sind als wichtige Signalmediatoren in der intrazellulären Kommunikation bekannt. Unter anderem vermitteln sie Signale an Mitglieder der MAPKAP-Kinasen, einer relativ neu entdeckten und stetig wachsenden Proteinfamilie. Die biologischen Funktionen dieser Proteine sind noch größtenteils unbekannt. Die physiologische Rolle der 1996 erstmals beschriebenen MAPKAP-Kinase 3pK [1] sollte deshalb in dieser Arbeit untersucht werden. Die bisherigen Erkenntnisse über diese Serin/Threonin-Kinase umfassen hauptsächlich die Analyse ihrer Aktivierung durch extrazelluläre Signale und deren Weiterleitung über MAP-Kinasekaskaden. Dabei wurde interessanterweise festgestellt, daß die Kinase sowohl von mitogenen Faktoren als auch von Streß-induzierenden Agenzien über alle drei MAP-Kinasekaskaden aktiviert werden konnte [31]. 3pK ist in dieser Hinsicht außergewöhnlich und könnte damit einen Integrationspunkt von mitogenen und Streß-induzierten Signalen darstellen. Aufgrund dieser Besonderheit war die Aufklärung der biologischen Rolle von 3pK, die zu Beginn dieser Arbeit noch völlig unbekannt war, um so wichtiger. Mit der Identifikation neuer Interaktionspartner, die mit Hilfe des *two-hybrid*-Systems zu finden waren, sollten Hinweise und Aufschlüsse auf die physiologische Funktion von 3pK gewonnen werden. Parallel sollten diese neuen Erkenntnisse auf MK2, ein Homolog von 3pK, übertragen und somit verglichen werden.

5 MATERIAL

5.1 Arbeitsmaterial

5.1.1 Chemikalien

Artikel	Firma	Artikel	Firma
[γ - ³² P]dATP	Amersham	Isopropanol	Merck
Aceton	Merck	Kaliumacetat	Merck
Acrylamid (30 %)	Sigma	Kaliumchlorid	Sigma
Adenin	Sigma	Kaliumhydroxid	Merck
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Boehringer	Lachssperma-DNA	Sigma
Agarose, ultra pure	Gibco-BRL	L-Arginin	Sigma
Ammoniumacetat	Merck	Leupeptin	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka	L-Glutamin	Gibco-BRL
Ampicillin	Sigma	L-Histidin	Sigma
Aprotinin	Roth	L-Isoleucin	Sigma
Bacto-Agar	Difco	Lithiumacetat	Sigma
Bacto-Pepton	Difco	Lithiumchlorid	Fluka
Bacto-Trypton	Gibco-BRL	L-Leucin	Sigma
BES	Sigma	L-Lysin	Sigma
Bisacryamid (0,8 %)	Amersham	L-Methionin	Sigma
Bradford-Reagenz	Biorad	L-Phenylalanin	Sigma
Bromphenolblau	Sigma	L-Threonin	Sigma
Calciumchlorid	Sigma	L-Tryptophan	Sigma
Chloroform	Merck	Magnesiumchlorid	Sigma
Circlegrow	Dianova	IPTG	Roth
Cycloheximid	Sigma	PMSF	Fluka
D (+)-Glucose-Monohydrat	Merck	Magnesiumsulfat	Merck
Desoxycholat	Sigma	Manganchlorid	Sigma
Dextransulfat	Sigma	β -Mercaptoethanol	Sigma
Dichlormethan (DCM)	Riedel-de Haen	Methanol	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	Methyl-Methansulfonat (MMS)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma	N, N'-Methylenbisacrylamid	Sigma
D-Luciferin (freie Säure)	Appllichem	N,N-Dimethylformamid	Sigma
DNA-Längenstandardmarker	Sigma	Natriumacetat	Sigma
dNTP	MBI	Natriumarsenit	Sigma
Dulbeccos Modified Eagle Medium	Gibco-BRL	Natriumchlorid	Sigma
EDTA	Sigma	Natriumcitrat	Merck
EGTA	Sigma	Natriumdeoxycholat (DOC)	Merck
Eisessig	Sigma	Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Essigsäure	Appllichem	Natriumhydrogenphosphat	Merck
Essigsäureanhydrid	Merck	Natriumhydroxid	Sigma
Ethanol	Roth	Natrium-Lauroylsarcosin (SLS)	Sigma
Ethidiumbromid	Gibco-BRL	Natriumorthovanadat	Sigma
Fettfreie Trockenmilch	Nestlé	Natriumpyrophosphat	Sigma
Fötale Kälber-Serum	Gibco-BRL	Nitrocellulose	Schleicher&Schüll
Glutathion	Roth	Nonidet P40 (NP40)	Boehringer
Glutathion-Sepharose	Pharmacia	ONPG	Appllichem
Glycerol	Sigma	PBS	Gibco-BRL
β -Glycerophosphat	Sigma	Pefabloc	Roth
Glycin	Roth	Penicillin/Streptomycin	Gibco-BRL
Harnstoff	Sigma	Phenol:Chloroform:Isoamylalkoh.	AppliChem
Hefe-Extrakt	Gibco-BRL	Piperidin	Fluka
Hefe-Stickstoff ohne Aminosäuren	Difco	Pipes	Sigma
HFPFS	Roth	Pleuronic	Gibco-BRL

Artikel	Firma	Artikel	Firma
Polyethylenglykol 4000	Roth	Streptomycin	Sigma
Ponceau S	Sigma	TEMED	Sigma
Propidiumiodid	Sigma	TPA	Sigma
Protein A-Agarose	Boehringer	Trichloressigsäure	Sigma
Protein A-Peroxidase	Amersham	Tris Base	Sigma
Protein-Längenmarker (SDS-7B)	Sigma	Triton X-100	Sigma
rauchende Salzsäure	Merck	Trypanblau	Sigma
Röntgenfilme	Amersham	Tyrosin	Sigma
Roti-Block	Roth	Tyrpsin-EDTA	Gibco
Saccharose	Merck	Uracil	Sigma
SDS ultra pure	Roth	Whatman 3MM Papier	Schleicher&Schüll
Select Agar	Gibco-BRL	X-Gal	Roth
Sorbitol	Sigma	Xylencyanol	Merck

5.1.2 Enzyme

Calf Intestine Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
DNA Polymerase I (Klenow-Fragment)	MBI,
Restriktionsenzyme	Roche
	Eurogentech
	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Proteinase K	Sigma
DNase I	Sigma
RNase A	Roche
Taq-Polymerase	Roche

5.1.3 Antikörper

<u>Antikörper/Antiseren</u>	<u>Antigen</u>	<u>Referenz/Herkunft</u>
Anti-3pK (2362)	3pK (rekombinant)	MSZ, Würzburg
12CA5	Hämagglutinin (HA)-Epitop	MSZ, Würzburg
anti-GST02	Glutathion-S-Transferase	MSZ, Würzburg
anti-E47	humanes E47	Santa Cruz (sc-763x)
Protein-A gekoppelte Peroxidase		Roche
Protein-A gekoppelte Agarose-Kügelchen		Roche

5.1.4 Bakteriell exprimierte und gereinigte Proteine

3pK wt; 3pK K73M; 3pK TT201/313EE	MSZ Würzburg
GST	MSZ Würzburg
GST-E47	diese Arbeit

5.1.5 Reagenziensätze (Kits)

ECL Western blotting detection reagents	Amersham
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAGEN Plasmid Kit (Midi, Maxi)	Qiagen
Quick Change TM Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

5.1.6 cDNA-Bibliotheken und Plasmide

humane Herz-cDNA-Bibliothek in pGAD10	Clontech
humane Jurkat-T-Zell-Bibliothek in pGAD10	T. Wirth, MSZ Würzburg
pPCH	Carsten Hagemann, MSZ, Würzburg
pPCH-3pK wt	diese Arbeit
pPCH-3pK T313E	diese Arbeit
pPCH-3pK TT201/313EE	diese Arbeit
pPCH-3pK K73M	diese Arbeit
pPCH-3pK Nco-	diese Arbeit
pPCH-SAPK β	diese Arbeit
pPCH-ERK	diese Arbeit
pACT2	Clontech
pACT2-3pK wt	diese Arbeit
pAS2.1	Clontech
pAS2.1-3pK wt	diese Arbeit
pAS2.1-3pK K73M	diese Arbeit
pAS2.1-3pK TT201/313EE	diese Arbeit
pAS2.1-3pK T313E	diese Arbeit
pAS2.1-3pK (Kinasedomäne)	diese Arbeit
pAS2.1-3pK (nt Δ 851-Ende)	diese Arbeit
pAS2.1-3pK (nt Δ 1-851)	diese Arbeit
pAS2.1-3pK (NcoI+)	Ludmilla Wixler, MSZ Würzburg
pAS2.1-mu3pK	diese Arbeit
pAS2.1-MK2	diese Arbeit
pGAD10-HPH2 (C-209 aa)	diese Arbeit
pGAD10-HPH2 (C-198 aa)	diese Arbeit
pGAD10-HPH2 (C-145 aa)	diese Arbeit
pGAD10-HPH2 (C-73 aa)	diese Arbeit
pGAD10-HPH2 (C-443 aa)	diese Arbeit
pGAD10-HPH2 (C-298 aa)	diese Arbeit
pGAD10-E47 fl	diese Arbeit
pGAD10-E47 (1-484 aa)	A. Große-Wilde, MSZ Würzburg
pGAD10-E47 (1-372 aa)	A. Große-Wilde, MSZ Würzburg
pGAD10-E47 (1-137 aa)	A. Große-Wilde, MSZ Würzburg
pGAD10-E47 (Δ 18-229 aa)	A. Große-Wilde, MSZ Würzburg
pGAD10-E47 (372-651 aa)	A. Große-Wilde, MSZ Würzburg
pGAD10-E47 (494-651 aa)	A. Große-Wilde, MSZ Würzburg
pGAD GH-P88rIPK (1-488 aa)	M. Gale, Dallas, USA
pGAD10-P88	Oliver Hauss, MSZ Würzburg
pBS KS	MSZ Würzburg
pBS KS-HPH1 (1-695 aa)	A. Otte, Amsterdam
pBS KS-HPH1 (660-1013 aa)	A. Otte, Amsterdam
pBS KS-Xbmi1	A. Otte, Amsterdam
pBS KS-mu3pK	diese Arbeit
pBS KS-mu3pK K75M	diese Arbeit
pBS KS-mu3pK T203E	diese Arbeit
pBS KS-mu3pK TT203/315EE	diese Arbeit
pGEX-KG	Pharmacia
pGEX 4T-1, 2, 3 (drei Leserahmen)	Pharmacia
pGEX 4T2-mu3pK	diese Arbeit
pGEX 4T2-mu3pK	diese Arbeit
pGEX 4T2-mu3pK TT203/315EE	diese Arbeit
pGEX 4T2-mu3pK K75M	diese Arbeit
pGEX 4T2-HPH2 (C-73 aa)	diese Arbeit
pGEX 4T3-HPH2 (C-443 aa)	diese Arbeit
pGEX 4T1-bmi1 (murin)	diese Arbeit
pGEX 4T1-E47	diese Arbeit

pGEX 4T2-PTRF	diese Arbeit
pRSET-His-Ptrf (murin)	I. Grummt, DKFZ Heidelberg
pGEX 4T2-DMPK	diese Arbeit
pGEX 4T2-PRA1	diese Arbeit
pGEX 4T2-EPS15R	diese Arbeit
pGEX 4T3-P88rIPK	Oliver Hauss, MSZ Würzburg
pGEX 4T2-P88rIPK (239-762 aa)	diese Arbeit
pGEX 4T2-Dynamitin	diese Arbeit
pEBG	MSZ Würzburg
pEBG-3pK	diese Arbeit
pEBG-3pK K73M	diese Arbeit
pEBG-3pK ΔC	diese Arbeit
pEBG-TT201/313EE	diese Arbeit
pEBG-3pK (NcoI+)	diese Arbeit
pEBG-3pK (NcoI-)	diese Arbeit
pEBG-mu3pK	diese Arbeit
pEBG-mu3pK K75M	diese Arbeit
pEBG-MK2	diese Arbeit
pEBG-HPH2 (C-73 aa)	diese Arbeit
pEBG-HPH2 (C-209 aa)	diese Arbeit
pEBG-HPH2 (C-443 aa)	diese Arbeit
pEBG-E47	diese Arbeit
pEBG-PTRF	diese Arbeit
pEBG-DMPK	diese Arbeit
pEBG-PRA1	diese Arbeit
pEBG-EPS15R	diese Arbeit
pEBG-P88rIPK (239-762 aa)	diese Arbeit
pEBG-P88rIPK fl	diese Arbeit
pEBG-Dynamitin	diese Arbeit
pEBG-Mph1 (fl)	M. van Lohuizen, Amsterdam
pEBG-SAPKβ	J. Kyriakis, Charlestown
pkRSPA, psRSPA	D. Derse, Frederick, USA
pkRSPA-3pK wt	MSZ, Würzburg
pkRSPA-3pK K73M	MSZ, Würzburg
pkRSPA-3pK TT201/313EE	MSZ, Würzburg
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3 HA1, 2, 3 (drei Leserahmen)	diese Arbeit
pcDNA3 HA1-3pK wt	diese Arbeit
pcDNA3 HA1-3pK K73M	diese Arbeit
pcDNA3 HA1-3pK TT201/313EE	diese Arbeit
pcDNA3-3pK (N-19 aa)	diese Arbeit
pcDNA3-3pK (C-19 aa)	diese Arbeit
pcDNA3 HA1 MK2	diese Arbeit
pcDNA3-3pK wt	diese Arbeit
pcDNA3-HA1-mu3pK wt	diese Arbeit
pcDNA3-HA1-mu3pK TT203/315EE	diese Arbeit
pcDNA3-HA1-mu3pK K75M	diese Arbeit
pMT-HA-bmi1	M. van Lohuizen, Amsterdam
pRSV-β-Gal	T. Wirth, Würzburg
ppuro GAL4 DB wt	M. van Lohuizen, Amsterdam
ppuro GAL4 DB-bmi1 (murin)	M. van Lohuizen, Amsterdam
ppuro GAL4 DB-mPc2 (murin)	M. van Lohuizen, Amsterdam
ppuro GAL4 DB-M33 (murin)	M. van Lohuizen, Amsterdam
ppuro GAL4 DB-3pK	Bruce Jordan, MSZ Würzburg
pGL3	Promega, Madison (pGL3 Basic vector)
pGL3-4xE-Box	diese Arbeit

5.1.7 Zelllinien, Hefestämme und Bakterienstämme

Zelllinien:

- HEK293 humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit Adenovirus; MSZ Würzburg
- COS7 *African green monkey (Cercopithecus aethiops)* –Fibroblasten-ähnliche Nierenzelllinie, etabliert aus CV-1 Zellen (ATCC CCL 70), die mit einem *origin*-defekten Mutanten von SV40 (kodiert das wild-typ T-Antigen) transformiert wurden; MSZ Würzburg
- U2OS/GAL4 TK luc: humane Osteosarkom-Zelllinie, stabil transfiziert mit einem TK-Promotor/Luciferase-Reporter-Konstrukt und fünf GAL4-Bindestellen vor dem TK-Promotor [96]; M. van Lohuizen, Amsterdam

Hefestämme:

- Y190, CG-1945 Clontech

Bakterienstämme:

- DH5 α Bethesda Res. Lab. (BRL)
- BL21 Stratagene

5.1.8 Geräte

- | | |
|------------------------------------|---------------------------|
| Brutschränke, Inkubatoren | Heraeus |
| Elektrophoresekammern | G. Tietsch, Werkstatt MSZ |
| Geltrockner | Biorad |
| Eppendorf Minizentrifugen 5417C, R | Eppendorf |
| Megazentrifugen: Megafuge 1.0R | Heraeus |
| Sovall Zentrifuge RC5B | DuPont |
| Spektral-Photometer | Jouan |
| Thermocycler, GeneAmp PCR System | Perkin Elmer |
| Microlumat | EG&G Berthold |
| Vortex-Gerät | Scientific Industry |

6 METHODEN

Soweit nicht anders vermerkt, sind die nachfolgend aufgeführten Methoden in Anlehnung an die beschriebenen Protokolle von Sambrook *et al.* [150] durchgeführt worden.

6.1 Arbeiten mit Bakterien

Übernachtkulturen: 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium ((10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl in 1 l ddH₂O) oder *Circlegrow* (40 g/l ddH₂O), autoklaviert, danach 100 µg/ml Ampicillin zugefügt) werden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (nicht gerührt).

Glycerindauerkulturen: 0,6 ml Bakteriensuspension werden mit 300 µl 80% Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Herstellung kompetenter Bakterien: *E.coli* DH5α und *E.coli* BL21: 5 ml einer Übernachtskultur werden mit LB-Medium 1:100 verdünnt und bei 37°C solange geschüttelt, bis eine OD bei 550nm von 0,5 erreicht ist. Nach 30 Min. Abkühlung auf Eis werden die Zellen für 10 Min. in sterilen Plastikbechern bei 2.500 rpm und 4°C im vorgekühlten JA14-Rotor abzentrifugiert. Das Pellet wird in 40 ml eiskaltem, sterilem 0,1 M CaCl₂ aufgenommen, 15 Min. auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Die Zellen werden dann in 15 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und bleiben 15 Min. auf Eis stehen. Schließlich wird die Suspension mit 2,5 ml eiskaltem Glycerin versetzt und in 200 µl Aliquots in Mikroreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die so bei -70°C lagerbaren kompetenten Bakterien bestimmt man die Transformationsrate mit verschiedenen Konzentrationen an Plasmid-DNA. Sie sollte bei ca. 10⁷ transformierten Kolonien pro µg DNA liegen.

Transformation von Bakterien: Die bei -70°C gelagerten kompetenten Bakterien läßt man langsam auf Eis auftauen und mischt dann vorsichtig je 100 µl Zellen mit 10 µl Ligationsansatz oder einer entsprechenden Menge Plasmid-DNA. Nach 30 Min. Inkubation auf Eis und anschließendem 90 sekündigem Schock bei 42°C wird 1 ml LB-Medium (s.o.) zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. 200 µl der Bakteriensuspension werden auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten (1,4 % Agar-Agar in LB-Medium, dem nach Autoklavieren und anschließendem Abkühlen bei 56°C 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt wurde) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstehenden Kolonien sind mit einem Plasmid, das das Ampicillin-Resistenzgen enthält, transformiert worden.

6.2 Arbeiten mit DNA

6.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Bestimmt man die optische Dichte (OD) einer verdünnten DNA-Lösung bei 260nm, so kann daraus die Konzentration errechnet werden. Eine optische Dichte von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA von 40 µg/ml.

6.2.2 Konstruktion von Vektoren

Analyse von Nukleinsäuren auf Agarose-Gelen (Agarose-Gelelektrophorese): DNA-Fragmente können je nach ihrer Größe auf 0,7 - 2,5 %-igen Agarose-Gelen voneinander getrennt werden. Durch kurzes Aufkochen in 1xTAE (40 mM Tris-HCl, 40 mM Eisessig, 2 mM EDTA; pH 7,8) wird die Agarose gelöst, nach leichter Abkühlung mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, in ein Gelbett gegossen und ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem die DNA mit 1/10 Vol. Probenpuffer (40% (w/v) Saccharose, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) versetzt wurde, erfolgt die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 20 - 120 V mit 1xTAE als Laufpuffer. Als DNA-Längenmarker wurde 100 ng 1-kb DNA-Längenstandard mit aufgetragen. Bei UV-Bestrahlung wird die DNA aufgrund des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar und kann fotografiert werden.

Reinigung und Fällung von DNA: Zur Reinigung einer DNA-Lösung von Proteinen wird diese mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt. Die Phasentrennung erfolgt durch 10 Min. Zentrifugation bei 14.000 rpm in einer Mikrozentrifuge. Die obere, wässrige Phase wird mit 2,5 Vol. Ethanol und 0,1 Vol. 3M Natriumacetat (pH 4,9) versetzt, 10 Min. auf Trockeneis gefällt und anschließend bei 4°C 15 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird zuerst mit 1 ml 96% Ethanol, dann mit der gleichen Menge 70% Ethanol gewaschen und schließlich getrocknet. Die DNA wird in 10 mM Tris-HCl (pH 8) aufgenommen.

Restriktionsverdau: Für die Spaltung von 1 µg DNA verwendet man in der Regel eine Einheit einer (oder mehrerer) Restriktionsendonuklease(n) (eine Einheit eines Restriktionsenzym ist die Aktivität, die 1µg DNA in 1 h spaltet). Mit dem entsprechenden 10xRestriktionspuffer und ddH₂O wird das Volumen des Ansatzes so eingestellt, daß die Enzymmenge nicht mehr als 1/10 des Gesamtansatzes ausmacht. Grund hierfür ist, daß die Enzymlösung Glycerin enthält, das in zu hoher Konzentration hemmend auf die Reaktion wirken könnte. Der Ansatz wird ein- bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur Trennung der einzelnen DNA-Fragmente wird der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR: Mit Hilfe der PCR (*polymerase chain reaction*) können selektiv bestimmte DNA-Sequenzen vervielfältigt werden. Diese Technik basiert darauf, daß sich DNA-Doppelstränge bei Erhitzen trennen und durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in der Gegenwart komplementärer Primer verdoppelt werden können. Wird dieser Prozeß mehrfach wiederholt, steigt die Anzahl der Kopien exponentiell an. Auf diese Weise kann eine bestimmte Zielsequenz in nur wenigen Zyklen stark amplifiziert werden. Die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase wurde ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert. Für jeden Strang der Doppelhelix werden Primer benötigt, die die Zielsequenz einrahmen. Weitere Schnittstellen, um z.B. ein DNA-Fragment in einen anderen Vektor umklonieren zu können, können durch zusätzliche, der Ziel-DNA nicht homologe Basenpaare an den Primerenden geschaffen werden.

Für die Reaktion wurden pro Ansatz 10 µl 10x Reaktionspuffer der Polymerase, 6 µl MgCl₂ (25 mM-Stock), sofern es nicht bereits im Puffer enthalten war, 2 µl dNTP (10 mM-Stock), jeweils 5 µl der beiden Primer (10 µM-Stock), 70,5 µl (bzw. 76,5 µl) Aqua bidest., 1 µl DNA (50 ng) und 0,5 µl Taq-Polymerase eingesetzt. Die Ziel-DNA wurde bei einer Temperatur von

94°C für 60 Sekunden in der PCR-Maschine denaturiert. Wenn die Temperatur für 60 Sekunden auf 65-55°C sinkt, lagern sich die Primer an homologe Sequenzen der Einzelstrang-DNA an (diese *annealing*-Temperatur richtet sich nach der niedrigsten Schmelztemperatur der beiden Primer und sollte 2-5°C unterhalb dieser liegen). Bei einer Temperatur von 72°C findet die Elongation durch die Taq-Polymerase statt, wobei sich die Elongationszeit nach der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes richtet und ca. 1 Minute pro kb DNA betragen sollte. Dieser Zyklus wurde 35 mal wiederholt.

5 µl der amplifizierten DNA wurde zur Kontrolle der PCR mit 2 µl DNA-Probenpuffer und 3 µl Aqua bidest. vermischt und je nach entstandener Fragmentgröße auf ein entsprechend prozentiges Agarosegel aufgetragen. Sofern die PCR ein Fragment der richtigen Größe amplifiziert hatte, wurde der restliche Ansatz mit Hilfe des PCR-Purification-Kits dem Herstellerprotokoll folgend aufgereinigt und die DNA in 50 µl Aqua bidest. (pH 8,5) aufgenommen.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen: Die DNA-Fragmente können mittels Silikagel-Partikeln aus Agarosegelen isoliert werden. Entsprechend der Beschreibung des Qiaex II Protokolls werden die Agarosestücke in einem Mikroreaktionsgefäß mit drei Volumen Puffer QX1 10 Min. bei 50°C inkubiert. Hohe Salzkonzentrationen sorgen dabei sowohl für die Auflösung der Agarose-Polymere als auch für die Dissoziation DNA-bindender Proteine von dem DNA-Fragment. Gleichzeitig absorbieren die dem Puffer zugesetzten Silikagel-Partikel die DNA-Moleküle. Durch 30 Sek. Zentrifugation in einer Tischzentrifuge können diese Silikagel-Partikel gesammelt werden. Waschen mit dem Puffer PE, der 70% Ethanol enthält, entfernt anschließend Salzverunreinigungen. Nach dem Trocknen der Partikel kann die DNA mit ddH₂O durch 5 Min. Inkubation bei 50°C eluiert werden.

Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden: Die Phosphatgruppe am 5'Ende gespaltener DNA-Moleküle kann mit Calf-Intestine-Phosphatase (CIP) entfernt werden, um bei einer Ligationreaktion den Ringschluß des Vektors zu verhindern. Dazu werden 2,5 µg DNA in 1x CIP-Puffer und 1 µl CIP 30 Min. bei 37°C mit behandelt. Durch Zugabe von 5 mM EDTA und 15 Min. Inkubation bei 65°C wird das Enzym inaktiviert, und die DNA kann nach Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation direkt im Ligationansatz eingesetzt werden.

Ligation: Bei Ligation von *sticky*-DNA-Enden wird ein 3-fach molarer Überschuß, bei *blunt-end*-Ligationen ein 10-fach molarer Überschuß von Insert zu Vektor verwendet. 100 ng DNA wird mit 10 Einheiten T4-DNA-Ligase versetzt und in 1x Ligationpuffer in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei 16°C inkubiert und dann in kompetente Bakterien transformiert.

6.2.3 Isolation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Die Bakterien von 1 ml Übernachtskultur werden durch 20 Sek. Zentrifugation in einer Minifuge bei 14.000 rpm sedimentiert. Das Pellet wird mit 100 µl Puffer I (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 µg/ml RNase A; pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer II (200 mM NaOH, 1% SDS) werden die Bakterien 5 Min. bei RT lysiert. Danach werden 100 µl Puffer III (3M Kaliumacetat, pH 6) zugeben, geschwenkt und 5 Min. bei 4°C inkubiert, wobei ein Großteil der bakteriellen Proteine ausfällt. Die präzipitierten Proteine und die Membranfragmente mit der assoziierten chromosomalen DNA werden für 5 Min. bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wird durch Zugabe von 1 ml Ethanol bei -70°C für 5 Min. gefällt und durch Zentrifugation für 15 Min. bei 14.000 rpm

sedimentiert. Das Präzipitat wird mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen wird die DNA in 20µl ddH₂O aufgenommen und wird mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese analysiert.

Von positiven Klonen werden Glycerolstocks angelegt sowie eine Plasmid-Maxipräparation durchgeführt. Die DNA davon wird zur Kontrolle der Klonierung sequenziert.

6.2.4 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die für Anwendungen, wie Sequenzierung oder Transfektion von Säugerzellen benötigten größeren Mengen an gereinigter Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits isoliert. Das Verfahren entspricht der oben beschriebenen Plasmid-DNA Minipräparation im größeren Maßstab mit anschließender Aufreinigung an einer Ionenaustauschersäule.

50 ml ampicillinhaltiges *Circlegrow*-Medium (4% w/v *Circlegrow* in ddH₂O mit 100 µg/ml Ampicillin) wurden mit rekombinanten Bakterien aus einem Glycerinstock oder mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert, in 10 ml Resuspensionspuffer (P1) aufgenommen und durch Zugabe von Lyse-Puffer (P2) aufgeschlossen. Anschließend wurde eiskalter Neutralisationspuffer (P3) zupipettiert und die dabei präzipitierte bakteriellen Proteine und chromosomalen DNA durch Zentrifugation bei 5000g sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine equilibrierte Qiagen-Anionenaustauscher-Säule aufgetragen. Die Säule wurde nach dem Qiagen-Protokoll gewaschen, um RNA-Fragmente, Proteine und andere Verunreinigungen zu entfernen, und die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 15 ml Hochsalzpuffer eluiert. Aus dem Eluat wurde die DNA mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und bei 3000 g für 30 min abzentrifugiert, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wird dann vorsichtig in 500 µl ddH₂O gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren. Zuvor werden 5 µl der DNA-Lösung für eine Konzentrationsbestimmung abgenommen (s.o.). Die photometrische Messung der DNA-Lösung bei 260 und 280 nm erlaubt eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA, wobei der Quotient aus OD(260nm):OD (280nm) bei hoher DNA-Reinheit zwischen 1,6 und 2 liegen sollte.

6.2.5 Sequenzanalyse von DNA

Sequenzierungsreaktion: Das zur Sequenzierung von DNA verwendete '*Taq cycle sequencing*' basiert auf der klassischen Methode nach Sanger, verwendet jedoch statt der T7-Polymerase die Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*. Dabei wird die zu analysierende DNA ausgehend von dem Sequenzierungsprimer linear amplifiziert, wobei es durch Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) zu Kettenabbrüchen kommt. In den aufeinanderfolgenden Zyklen wird die DNA zunächst thermisch denaturiert, der Sequenzierungsprimer hybridisiert und von diesem ausgehend ein komplementärer Strang synthetisiert, bis es durch den Einbau eines ddNTP zum Abbruch der Reaktion kommt. Diese Methode ermöglicht eine Auflösung komplexer Sekundärstrukturen und benötigt geringere Mengen DNA. Der verwendete '*Dye Terminator-Taq-Sequenzierungskit*' ermöglicht zusätzlich in Verbindung mit dem ABI-373 DNA-Sequencer die Verwendung aller vier ddNTPs in einer Reaktion, da ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP jeweils an einen andersfarbigen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Für jede Reaktion wurden folgende Reagenzien gemischt:

- 8,0 µl Premix (ddNTPs, NTPs, 5xTACS-Puffer und AmpliTaq DNA-Polymerase)
- 1,0 µl DNA *template* (0,5 µg)
- 1,0 µl *Primer* (10 nmol)

10,0 μ l ddH₂O

Die Reaktion erfolgte in 25 Zyklen von 15 Sek. 96°C, 15 Sek. 48°C gefolgt von 4 Min. 60°C. Die nachfolgenden Probenaufbereitung und Probenanalyse wurde von R. Krug (MSZ, Würzburg) durchgeführt.

Probenaufbereitung: Mit 80 μ l ddH₂O wird zunächst die untere wässrige Phase entnommen und zweimal mit Phenol/Wasser/Chloroform (68/18/14) extrahiert, um nicht inkorporierte, an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte ddNTPs abzutrennen, die bei der Analyse stören. Aus der wässrigen Phase werden die Reaktionsprodukte präzipitiert, gewaschen und getrocknet und schließlich in 3 μ l Formamid /50mM EDTA (5:1) resuspendiert.

Probenanalyse: Die Sequenzierungsprodukte werden auf einem 373A DNA-Sequencer in einem 6%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dabei erfolgt eine Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mittels eines Argonlasers, wenn diese die Detektionseinheit passieren, und ihre Sekundärstrahlung wird über einen Filter und einen Photomultiplier aufgezeichnet. Nach Beendigung des Laufs ergibt sich so für jede Spur ein Rohdaten-Gelbild bestehend aus den vier verschiedenen Farben. Mittels der Analysesoftware wird daraus ein Chromatogramm erstellt, aus dem sich die Sequenzabfolge innerhalb der analysierten DNA ermitteln läßt.

6.2.6 Erstellung von Punktmutationen mit Hilfe des *Site-Directed Mutagenesis Kit*

Der *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene ist ein PCR-basierender Kit, mit dessen Hilfe auf einfache Weise Punktmutationen in bekannte, in ein Plasmid hineinklonierte, DNA-Sequenzen eingefügt werden können. Es werden *Primer* generiert, die homolog zu der zu mutierenden DNA-Sequenz sind, zusätzlich aber eine oder mehrere der gewünschten Punktmutationen tragen. In einer PCR-Reaktion wird dann das komplette Plasmid amplifiziert und die Mutation inseriert. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

6.3 Arbeiten mit Proteinen

6.3.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurden Bakterien des Stammes *E.coli* BL21 verwendet. Die für die Expression von GST-Proteinen verwendeten pGEX-Vektoren (Pharmacia) besitzen einen *LacZ*-Promoter, der die Transkription des GST-Fusions-Gens kontrolliert. Die Expression wird durch Lactose oder das Lactose-Analogon IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid) induziert. Die Aufreinigung aus den Bakterienlysaten erfolgte entsprechend dem Protokoll von Pharmacia, wobei die GST-Fusionsproteine durch Bindung an eine Glutathion-Sepharose-Matrix (Glutathion-Sepharose 4B) von den anderen bakteriellen Proteinen separiert und dann von der Matrix durch Zugabe von freiem Glutathion eluiert werden.

100 ml Übernachtskultur werden in 1 l 2-YT-Medium (16g Bacto-Trypton, 10g Hefe-Extrakt, 5g NaCl in 900ml H₂O gelöst, autoklaviert und mit 100ml sterilem 20%iger Glucose-Lösung und 100 μ g/ml Ampicillin versetzt) überführt und bei 37°C und 220 rpm in einem Schüttler bis zu einer OD(600nm) von 0.6 wachsen gelassen. Nach Zugabe von 0,1 mM IPTG werden die Bakterien für weitere 2 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien werden anschließend durch zehnmünütige Zentrifugation bei 5.000 rpm pelletiert und in 50 ml Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8; 120 mM NaCl, 0,5% NP-40, 1mM DTT, 1mM Pefabloc) lysiert, wobei 2 mg/ml Lysozym zugeben wurde und die Suspension bei 4°C rotiert wurde. Alle folgenden Schritte werden bei 4°C ausgeführt. Um die DNA zu verdauen, wird 2,5 mM MgCl₂ und 1 μ l DNaseI zugegeben und für weitere 15 Min. rotiert. Durch 60 Min. Zentrifugation bei 10.000 rpm

werden die Zelltrümmer entfernt. Das im Überstand enthaltene rekombinante Protein bindet im anschließenden Schritt mit seinem GST-Anteil an zugesetzte 1ml Glutathion-Partikel, die zuvor mit dem Lyse-Puffer equilibriert wurden. Nach 1 h Inkubation werden die Glutathion-Partikel dreimal mit Lyse-Puffer gewaschen und dann mit 1 ml Elutionslösung (10 mM Glutathion in 50 mM Tris, pH8) für 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation erhält man im Überstand das Fusionsprotein. Die Elution wird drei bis viermal wiederholt und von den Eluatzen wird der Proteingehalt photometrisch bestimmt. Das Glutathion wird durch Zentrifugation in Zentrifugal-Konzentratoren entfernt, wobei zugleich die Proteine in Kinase-Puffer umgepuffert werden. Die Konzentration der so gereinigten Fusionsproteine wird in einem Bradford-Assay bestimmt und die Integrität der Proteine durch SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung verifiziert. Die Proteine werden durch Zusatz von 10% Glycerol bei -70°C gelagert.

6.3.2 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Proteinkonzentration von Zellextrakten wurde mit einem kommerziell erhältlichen Nachweissystem (Bio-Rad-Assay, Bio-Rad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Nachweis beruht auf einer Interaktion des Farbstoffes Coomassie-Blau mit aromatischen Aminosäuren. 1 bis 10 µl eines Zellextraktes oder Proteinlösung wurden für 10 Min. bei RT mit 1000 µl des 1:5 in H₂O verdünnten Reagenz inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Als Eichprotein wurde BSA eingesetzt.

6.3.3 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Ein denaturierendes Polyacrylamidgel dient der Fraktionierung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts. Es besteht aus einem 5%-igen Sammelgel und einem 6-15%-igen Trenngel mit unterschiedlichen pH-Werten.

a) Trenngel:	1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30%)	2,0-5,0 ml
	10% SDS	0,1 ml
	ddH ₂ O	5,3-2,3 ml
	10% APS	0,1 ml
	TEMED	8,0 µl
b) Sammelgel:	1,0 M Tris pH 6,8	1,25 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30%)	1,7 ml
	10% SDS	0,1 ml
	ddH ₂ O	6,8 ml
	10% APS	0,1 ml
	TEMED	10,0 µl

jeweils für 10 ml

Zunächst wird das Trenngel zwischen die senkrecht stehenden Glasplatten gegossen, bis diese etwa zu 3/4 gefüllt sind, und mit Isopropanol überschichtet, damit die Oberfläche gleichmäßig polymerisiert. Nach der Polymerisierung gießt man das Isopropanol ab, füllt mit Sammelgel auf, führt einen Kamm ein und läßt auch dieses polymerisieren.

Der Laufpuffer enthält Glycin, das bei niedrigem pH-Wert protoniert oder zwitterionig, bei hohem pH-Wert anionisch vorliegt (isoelektrischer Punkt ca. pH 6). Im Sammelgel mit seinem niedrigen pH wandern deshalb die Chlorid-Ionen (Leitonen) schneller als das Glycin (Folgeionen). Durch diese Ladungstrennung kommt es lokal zu erhöhter Spannung. Die Proteine werden beschleunigt und kommen so. unabhängig von ihrer Größe. fast gleichzeitig

am Trenngel an. Durch die pH-Anderung im Trenngel wird das Glycin zum Anion und kann somit genau so schnell wie das Chlorid-Ion im elektrischen Feld wandern. Die Proteine werden nun nach ihrer Größe aufgetrennt. Bis zu 50µg der zu fraktionierenden Proteinextrakte werden mit dem SDS-Ladepuffer (31mM Tris-HCl, pH6,8; 1% SDS, 5% Glycerin, 2,5% Mercaptoethanol, 0,05% Bromphenolblau) gemischt und 5 Min. bei 95°C denaturiert. Nach dem Auftragen erfolgt die Elektrophorese bei 10 V/cm im Laufpuffer (25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% SDS).

6.3.4 Immunoblot

Für den Nachweis bestimmter Proteine durch Antikörper wird das Gel zunächst für 35 Min. in Transferpuffer (39 mM Glycin, 48mM Tris, 0,037% SDS, 10 % Methanol) bei 400 V auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Membran wird getrocknet, die unspezifische Proteinbindung in 5% Milchpulver in PBS mit 0,05% Tween20 für eine Stunde geblockt. Ebenfalls eine Stunde läßt man den ersten spezifischen Antikörper, entsprechend in der Milchlösung verdünnt, einwirken. Nach dreimaligem 10 minütigen Waschen der Membran in PBS mit 0,05 % Tween20 wird ProteinA-gekoppelte Peroxidase verwendet. Nach erneutem Waschen (3x 10 Min.) mit PBS/Tween wird mit dem ECL-System die Antikörper-gebundenen Proteine detektiert. ECL ist eine lichtemittierende, nicht radioaktive Methode zur Detektion immobilisierter Antigene, die direkt oder indirekt an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelte Antikörper bzw. ProteinA gebunden sind. Durch die Peroxidase wird die Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen katalysiert. Nach der Oxidation befindet sich Luminol in einem angeregten Zustand, von dem es unter Lichtemission wieder in den Grundzustand zurückfällt. Das so erzeugte Licht hat eine Wellenlänge von 428 nm und kann durch die Exposition eines Röntgenfilms detektiert werden. Die Membran wird dazu leicht angetrocknet und für eine Minute mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Komponenten inkubiert. Anschließend wird die Membran getrocknet und es wird ein Röntgenfilm aufgelegt.

6.4 Das Hefe *two-hybrid*-System

Dem *two-hybrid-System*, erstmals von Fields und Song beschrieben [151], liegt die Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transaktivierungsdomäne zugrunde, was schließlich zur Expression von Reportergenen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* führt (Bild 3). Das *two-hybrid-System* ist ein hochsensitives *in vivo* Assay, um Protein-Protein-Interaktionen zu detektieren, was zudem den Vorteil hat, die cDNAs der untersuchten Proteine leicht isolieren zu können.

Es gibt allerdings auch einige Nachteile dieses Systems: cDNA-Bibliotheken repräsentieren oft nur Teile von Genen und ergeben dadurch u.U. falsche Resultate. Zudem können unphysiologisch hohe Konzentrationen der Interaktionsproteine exprimiert werden, die normalerweise zu verschiedenen Zeitpunkten entstehen oder in anderen Zellkompartimenten lokalisiert sind und daher normalerweise nie miteinander in Kontakt kommen würden. Weiterhin werden einige posttranslationale Proteinmodifikationen in Hefezellen nicht oder in veränderter Weise durchgeführt [152].

Dennoch bleibt das *two-hybrid-System*, von dem heute die verschiedensten Varianten in Verwendung sind [153-159], ein hervorragendes Testsystem, mit drei Hauptanwendungen: Test bekannter Proteine auf Wechselwirkung, Definition von Domänen oder Aminosäuren, die für eine Interaktion benötigt werden und das *screening* von Bibliotheken für die Suche nach neuen Proteinen, die mit bekannten interagieren [152].

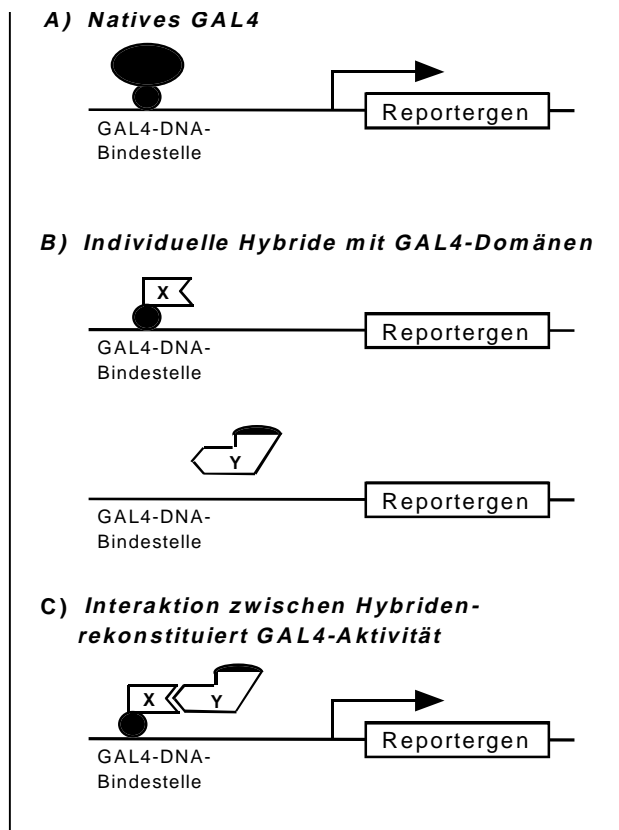


Bild 3: **Das two-hybrid-System.** A) Der native Transkriptionsfaktor GAL4 induziert mit DNA-Bindedomäne und Transaktivierungsdomäne die Transkription des Reporter-gens. B) Sowohl das Hybrid aus GAL4-DNA-Bindedomäne und Protein X, das an die Bindestellen des Reporter-gens bindet, als auch das Hybrid aus GAL4-Transaktivierungsdomäne und Protein Y, können das Reporter-gen nicht aktivieren. C) Die Protein-Protein-Interaktion zwischen X und Y bringt die Aktivierungsdomäne von GAL4 in räumliche Nähe der DNA-Bindedomäne, wodurch der Transkriptionsfaktor rekonstituiert wird, was in seiner transkriptionellen Aktivierung resultiert. Als Reporter-gen werden zumeist das Hefeprotein HIS3, was den Transformanten das Wachsen auf Nährmedien ohne Histidin erlaubt, sowie das E.coli-Gen *lacZ* benutzt [152].

6.4.1 Hefemedien

Aminosäure-dropout-Lösung (100× Stock)

Arginin	0,2 g
Histidin	0,1 g
Isoleucin	0,6 g
Leucin	0,6 g
Lysin	0,4 g
Methionin	0,1 g
Phenylalanin	0,6 g
Threonin	0,5 g
Tryptophan	0,4 g

wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Die in der jeweiligen dropout-Lösung nicht benötigten Aminosäuren wurden weggelassen.

Glucose

20% (w/v) Glucose wurde in Aqua bidest. gelöst und autoklaviert.

Selektionsmedium

8 g Difco Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 55 mg Tyrosin, 55 mg Uracil und 55 mg Adenin wurden in 900 ml Aqua bidest. gelöst, autoklaviert, auf 50-60°C abkühlen gelassen und mit 100 ml 20% Glucose und 10 ml der benötigten Aminosäure-Dropout-Lösung ergänzt.

Für die Herstellung von Kulturplatten wurde vor dem Autoklavieren 24 g Agar eingewogen. Die Platten für die screens mit Y190 wurden nach dem Autoklavieren und vor dem Ausplattieren zusätzlich mit sterilfiltriertem 3-AT (1 M) zu einer Endkonzentration von 30 mM versehen.

Vollmedium (YEED)

11 g Hefe-Extrakt, 22 g Bacto Peptone und 55 mg Adenin wurden in 900 ml Aqua bidest. gelöst, autoklaviert, auf 50-60°C abkühlen gelassen und mit 100 ml 20% Glucose ergänzt. Für die Herstellung von Kulturplatten wurde vor dem Autoklavieren 24 g Agar eingewogen.

6.4.2 Two-hybrid screen

Mit Hilfe des *two-hybrid-System*s ist es möglich, cDNA-Bibliotheken zu *screenen*, um neue Interaktionspartner zu identifizieren. Dazu muß zunächst das *bait* mit der DNA-bindenden GAL4-Domäne mittels *bait*-Plasmid fusioniert werden. Dieses wird in einen *two-hybrid*-Hefestamm, Y190 oder CG-1945, transformiert. Ein erster β -Gal-Assay zeigt, ob das *bait* autonom eine Reporter-genaktivierung hervorruft. Bleibt dieser Test negativ, kann nach der Titerbestimmung und der Amplifikation der Bibliothek der eigentliche *screen* durchgeführt werden. Die mit dem *bait*-Plasmid transformierte Hefe wird mit einer cDNA-Bibliothek (*prey*-Plasmide) transformiert und auf Selektionsmedium ausgebracht. Die wachsenden Klone werden mit dem β -Gal-Filterassay auf Aktivität des β -Galactosidase-Reporters getestet. Anschließend läßt man die positiven Klone das *bait*-Plasmid verlieren. Da es möglich ist, daß das *prey* auch ohne *bait* die Reportergene aktivieren kann, schließt sich nun ein weiterer X-Gal-Test an, bei dem alle blau werdenden Klone aussortiert werden. Aus den restlichen Hefekolonien wird die Plasmid-DNA isoliert und durch Transformation in *E. coli* amplifiziert. Durch eine Retransformation wird in direkten *two-hybrid*-Tests die Interaktion von *bait* und *prey* noch einmal verifiziert, bevor die resultierenden Bibliotheksplasmide durch Sequenzierung identifiziert werden. Danach kann durch Coimmunpräzipitationsexperimente, Kinaseassays oder andere Methoden versucht werden, die physiologische Funktion der identifizierten Wechselwirkung aufzuklären. Die *two-hybrid screens* wurde größtenteils entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt [160].

6.4.3 Titerbestimmung der cDNA-Bibliotheken

Für einen *two-hybrid screen* sollte der Titer $< 10^8$ cfu/ml haben. Zur Titerbestimmung werden zwei Verdünnungen der Originalglycerinkultur der Bibliotheken hergestellt: A) $1 : 10^3$ und B) $1 : 10^6$. 1 μ l der Verdünnung A wird in 50 μ l Medium auf eine vorgewärmte Agarplatte ausgestrichen, als auch 50 bzw. 100 μ l der Verdünnung B. Nach einer Übernachtinkubation bei 37°C wird der Titer (cfu/ml) bestimmt.

Der Titer der Herzbibliothek hatte 9×10^9 cfu/ml bei einer Komplexität von 3×10^6 unabhängigen Klonen; der Titer der Jurkat-Bibliothek hatte ca. 4×10^8 cfu/ml bei einer Komplexität von 2×10^6 unabhängigen Klonen. Beide Bibliotheken lagen als Glyceroldauerkulturen vor, deren Bakterien die *prey*-cDNA in Form von pGAD10-Vektoren kodierten.

6.4.4 Amplifikation von cDNA-Bibliotheken

Eine cDNA-Bibliothek repräsentiert die durch RT-PCR in DNA umgeschriebene und in Expressions-Vektoren klonierte Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle exprimierten mRNAs. Solche Bibliotheken müssen, um genug Material vorliegen zu haben, durch Transformation in *E. coli* amplifiziert werden.

Um 2-3 x die Anzahl der unabhängigen Klone in der Bibliothek zu erhalten, wurde entsprechend dem Titer ein bestimmtes Volumen der Glyceroldauerkulturen so mit *circlegrow*-Medium verdünnt, daß auf jeder der ca. 150 Agarplatten ca. 50000 Kolonien / 150 mm Platte wuchsen (20 h, 37°C). Das Wachsen der Transformanten auf festem statt in flüssigen Medium

soll die ungleichmäßige Amplifikation einzelner Klone minimieren. Pro Platte wurden 2 ml *circlegrow*-Medium zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt. Sie wurden in eisgekühlten Zentrifugenbechern gesammelt. Insgesamt betrug das Volumen der Bakteriensuspension 2 l, welche nach dem Abschaben noch 2 – 4 h bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde eine Plasmid-DNA-Präparation im großen Maßstab durchgeführt, wobei die Volumina der verwendeten Lösungen dem großen Volumen des hier vorliegenden Zellpellets angepaßt wurden. Angelehnt wurde dieses an das MEGA-Plasmid Purification Protocol von Qiagen, welches prinzipiell der Maxipräparation (s. o.) entspricht. Das Bakterienpellet wurde in insgesamt 400 ml P1-Puffer (8 x 50 ml) resuspendiert, in 400 ml lysiert (5 Min., RT) und mit 400 ml P3 neutralisiert. Nach 30 Min. Inkubation auf Eis wurde die Lösung bei 20000 g, 4°C, 15 Min. zentrifugiert. Dem Überstand wurden in einem neuen Becher 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben (DNA-Fällung) und erneut zentrifugiert (30 Min., 20000 g, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die DNA wurde mit Tris (10 mM, pH 8) gelöst und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde verifiziert, daß es sich bei der DNA-Bestimmung um DNA, nicht aber RNA handelte.

6.4.5 Herstellung von *carrier*-DNA

Carrier-DNA wird für Hefetransformationen benötigt. Es handelt sich um unspezifische, einzelsträngige DNA aus Lachs-Sperma, die im Transformationsansatz die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Hefezellen unterstützt.

Lachs-Sperma-DNA (Sigma) wurde in 1 x TE in einer Konzentration von 10 mg/ml unter kräftigem Rühren gelöst. Sie wurde 10 Minuten auf Eis mit dem Sonicator durch Ultraschall, 15 Sekunden mit dem Ultra-Turrax mechanisch und erneut 10 Min. mit dem Sonicator zerkleinert und dann durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Behandlung gereinigt. Dafür wurde das gleiche Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben, kräftig gemischt, 5 Min. bei 3600 g (5000 rpm) zentrifugiert und der Überstand dann auf die gleiche Weise mit Chloroform behandelt. Durch Zugabe von 1/20 Volumen 8 M LiCl und dem doppelten Volumen 100% Ethanol zum Überstand wurde die DNA ausgefällt, durch 10 minütige Zentrifugation bei 3600 g pelletiert und der Niederschlag anschließend getrocknet. Danach wurde er in einer Konzentration von 10 mg/ml in 1 x TE gelöst, 20 Min. bei 100°C gekocht und auf Eis wieder abgekühlt. Aliquots wurden bei -20°C gelagert, eine Probe auf einem Agarose-Gel kontrolliert. Auf dem Gel sollte ein DNA-Schmier sichtbar werden, der den Bereich von wenigen kb bis zu einigen hundert bp abdeckt.

6.4.6 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmiden (*small scale*)

Eine Hefekolonie wurde für eine Übernachtskultur in 50 ml YEPD Medium inokuliert und im Wasserbadschüttler bei 30°C kultiviert. Jeweils 1 ml dieser Zellkultur wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß gegeben und 5 Sekunden in der Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen Rest von 50 - 100 µl abgenommen. Im verbliebenen Medium wurde das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden 2 µl *carrier*-DNA und ca. 1 µg Plasmid-DNA (1-3 µl) hinzugefügt und gut gevortext. Nach den folgenden Zugaben von 0,5 ml Plate-Mixture (45 % sterilisiertes PEG 4000, 1 M Lithiumacetat, 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM EDTA) und von 20 µl DTT wurde immer wieder gemischt. Die Eppendorf-Gefäße wurden anschließend für 6-8 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem 10 minütigen Hitzeschock von 42°C wurden 200 µl Zellen in Bodennähe des Reaktionsgefäßes

entnommen und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 30°C, bis nach ca. 3 Tagen Klone sichtbar wurden.

6.4.7 Direkte *two-hybrid*-Tests

Bait- und *prey*-Plasmide zweier bekannter Proteine wurden gemeinsam in Y190 transformiert. Die Transformanten wurden zunächst auf -Leu/-Trp Kulturplatten herangezogen, bevor sie direkt auf Nitrozellulosefilter, die auf -Leu/-Trp/-His Kulturplatten lagen, ausgestrichen wurden. Die Kulturschalen mit den Filtern wurden über Nacht bei 30°C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag war Wachstum (Protein-Protein-Interaktion) gut von Nichtwachstum (keine Wechselwirkung) unterscheidbar und es wurde zur Absicherung der Ergebnisse ein β -Gal-Assay durchgeführt.

6.4.8 Transformation von *S. cerevisiae* für *two-hybrid* cDNA-Bibliothek screens

Die Transformation des *bait*-Plasmids und der Bibliotheksplasmide erfolgte sequenziell, d.h. daß die Hefe zuerst mit dem 3pK K73M-*bait* (*small scale*), selektierte Transformanten werden dann herangezogen und dann erst mit den *prey*-Plasmiden transformiert wurden.

1 ml Selektionsmedium (SD/-Leu) wurden mit einer Kolonie von *bait*-Plasmid transformierten Hefestämmen Y190 bzw. CG-1945 inokuliert und über Nacht im Schüttler bei 30°C kultiviert. Mit dieser Kultur wurden 150 ml Selektionsmedium (SD/-Leu) angeimpft und erneut über Nacht bis zu der stationären Wachstumsphase ($OD_{600} > 1,5$) wachsen gelassen. Von dieser Kultur wurde soviel zu 1 l Vollmedium gegeben, daß sich eine OD_{600} von 0,2-0,3 einstellte. Nach 3 h Inkubation bei 30°C und 230 rpm im Schüttler wurden die Zellsuspensionen auf insgesamt 4 Zentrifugenbecher verteilt und die Zellen bei 1100 g (2500 rpm) 5 Min. bei Raumtemperatur sedimentiert. Die Zellpellets wurden mit 500 ml H₂O gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in insgesamt 8 ml 1 x LiAc/TE-Mix (frisch angesetzt aus 10 x TE (0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5) und 10 x LiAc (1 M Lithiumacetat, pH 7,5)) resuspendiert und dann 10 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Zu diesen 8 ml wurde 20 mg Carrier-DNA und 500 – 1000 μ g cDNA-Bibliothek-Plasmid gegeben. Nach kurzem Schwenken wurde der Transformationsansatz zu 60 ml 1 x PEG/LiAc-Mix (frisch angesetzt aus 10 x TE (7 ml), 10 x LiAc (7 ml) und 50 % PEG 4000 (56 ml)) gegeben, leicht geschwenkt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurden tropfenweise 7 ml DMSO unter vorsichtigem Schwenken zugegeben, bevor die Zellen für 15 Min. einem Hitzeschock von 42°C im Wasserbad ausgesetzt wurden, wobei sie gelegentlich bewegt wurden. Nach dem Hitzeschock wurde der Ansatz im Wasserbad unter Schwenken auf Eis abgekühlt und dann bei 1100 g für 5 Min. pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml 1 x TE aufgenommen und à 250-350 μ l auf 150 mm Selektions-Kulturplatten (-Leu/ -Trp/-His/ \pm 3-AT) ausplattiert; CG-1945 transformierte Hefe wurde auf Platten ohne 3-AT, Y190-Hefe dagegen auf Selektionsmedium mit 30 mM 3-AT hochgezogen. Kolonien, die mögliche Wechselwirkungen zwischen *bait* und *prey* anzeigen, erschienen nach ca. 5-10 Tagen Inkubation im 30°C Brutschrank.

6.4.9 Bestimmung der Transformationseffizienz

Die sich auf den Selektionskulturplatten entwickelnden Kolonien stellen nur einen Bruchteil der eigentlich vorhandenen Transformanten dar, da Klone, in denen keine Protein-Protein Wechselwirkung zwischen *bait* und *prey* stattfindet, nicht wachsen können. Um die Gesamtzahl der transformierten Hefezellen und die Transformationseffizienz pro μ g eingesetzter DNA bestimmen zu können, müssen also auch Aliquots auf -Leu/-Trp

Mangelmedium ausgebracht werden. Die Auszählung der hier entstehenden Kolonien erlaubt dann einen Rückschluß darauf, ob die Gesamtheit der in der cDNA-Bibliothek vorhandenen unabhängigen cDNAs durch die Anzahl der transformierten Hefezellen komplett abgedeckt wird. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 10 µl, 20 µl und 50 µl Aliquots der transformierten Zellsuspension auf -Leu/-Trp-Platten ausgestrichen und bei 30°C für 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Hefekolonien wurden gezählt und auf das Volumen des Gesamtansatzes sowie auf die Menge der insgesamt eingesetzten cDNA-Bibliotheks-DNA hochgerechnet. Diese Werte geben die Zahl der insgesamt gescreenten Transformanten bzw. die Transformationseffizienz pro µg DNA an.

6.4.10 β-Gal-Filterassay

Auf der Ebene des Histidin-Reportergens kommt es häufig zu falsch-positiven Signalen, da von der Hefezelle nur sehr wenig Histidin für das Überleben benötigt wird und bereits kurzzeitige, schwache Aktivierung dieses Reportergens z.B. durch eine unspezifische transiente Wechselwirkung von *bait*- und *prey*-Protein ausreichend ist, um Hefezellen zu Kolonien heranwachsen zu lassen. Auch Verunreinigungen, z.B. durch abgestorbene Hefezellen, die ihr Histidin in das umgebende Medium freisetzen, können anderen Zellen zum Überleben und Wachstum verhelfen. Daher müssen die gewachsenen Hefekolonien auf die Aktivität des zweiten Reportergens, des *LacZ*-Gens, getestet werden. Dieses geschieht in einem β-Gal Filterassay.

In direkten *two-hybrid*-Tests wurden die Hefekolonien direkt auf Nitrozellulosefilter (Hybond™-C Extra, Amersham) ausgestrichen; bei den *screens* dagegen wurden die Hefen durch Auflegen der Filter von den Platten auf die Membran 'geliftet', um damit den β-Gal-Assay zu machen. Die Filter wurden dazu mit nach oben weisender Kolonieseite in flüssigen Stickstoff getaucht, wodurch die Zellen aufbrachen, und dann bei Raumtemperatur aufgetaut.

In leere Kulturschalen wurden Whatman-Rundfilter mit Z-Puffer/X-Gal-Mix (100 ml Z-Puffer (16.1 g/l Na₂HPO₄ x, 5.5 g/l NaH₂PO₄ x H₂O, 0.75 g/l KCl, 0.246 g/l MgSO₄ x 7H₂O), 0.27 ml β-Mercaptoethanol, 1.67 ml X-Gal-Stocklösung (20 mg/ml X-Gal in DMF)) getränkt, worauf dann die Filter mit den Hefekolonien gelegt wurden. Die Petrischale wurde mit Parafilm abgedichtet und bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Nach mehreren Zeitpunkten wurde die Blaufärbung kontrolliert. Dabei gab der Zeitpunkt des Auftretens einer ersten Blaufärbung einen ersten groben Hinweis auf die Stärke der Wechselwirkung (30 Minuten = starke, 4 h = mittlere und 24 h = schwache Interaktion). Die Filter wurden unter dem Abzug getrocknet. Die Filter wurden entsprechend ihrer Markierungen an die Originalplatten gehalten, womit die β-Gal-produzierenden Kolonien identifiziert und in neues Medium überführt werden konnten.

6.4.11 Quantitatives β-Gal-Assay mit ONPG als Substrat

Diese Experimente wurden wie im Clontech Handbuch beschrieben mit ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid; 4 mg/ml Z-Puffer) als Substrat und dem Y190-Hefestamm durchgeführt [160]. Um Schwankungen zu auszugleichen, wurden je fünf separate Transformanten jeder Cotransformation untersucht, die zunächst in 5 ml Selektionsmedium (SD/-His/-Leu/-Trp) in einer Übernachtskultur herangezogen wurde. 0.5 ml davon wurden zu 8 ml Vollmedium gegeben und solange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ = 0.5 – 0.8 (mittlere log-Phase), die dokumentiert wurde, erreicht wurde. 1 ml davon wurde in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt, um für 10 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert zu werden. Die Pellets wurden gewaschen und in 1 ml Z-Puffer aufgenommen, erneut zentrifugiert, dann in 200 µl aufgenommen, wodurch die Zellen fünf mal konzentriert wurden. 100 µl dieser Suspension wurden in ein

neues Tube transferiert und darin in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die aufgebrochenen Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und mit 700 µl Z-Puffer inkl. β-Mercaptoethanol (27 µl/10 ml) versetzt. Sofort wurden 160 µl ONPG zur Reaktion gegeben und die Zeit genommen. Die Reaktion lief bei RT. Nachdem sich die gelbe Farbe entwickelte, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M Na₂CO₃ und die Zeit gestoppt. Die Suspension wurde durch 10 Min. Zentrifugation von den Zelltrümmern befreit. Danach wurde der Überstand bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen und die β-Gal-Einheiten ausgerechnet, wobei eine Einheit β-Galactosidase definiert ist als die Menge, die 1 µmol ONPG in einer Minute zu o-Nitrophenol und D-Galaktose hydrolysieren kann [161]; die zugehörige Formel lautet: β-Gal-Einheiten = 100 x OD₄₂₀/(t x V x OD₆₀₀), wobei t = gemessene Reaktionszeit; V = 0,1 x Konzentrationsfaktor. X-Gal ist ca. 10⁶ mal sensitiver als ONPG, weshalb schwächere *two-hybrid*-Interaktionen mit ONPG nicht mehr quantifizierbar sind.

6.4.12 Elimination des *bait*-Plasmids – Cycloheximid *counterselection*

Hefestämme wie CG-1945 und Y190 tragen das *cyh*² Mutantenallel und sind damit Cycloheximid resistent. Das Wildtyp-Gen *CYH*^{S2} ist *cyh*² gegenüber dominant. Wenn nun ein solcher Hefestamm mit einem Plasmid wie pAS2.1 transformiert wird, welches das Wildtyp-Gen *CYH*^{S2} kodiert, wird der Stamm Cycloheximid-sensitiv. Somit kann man effektiv solche Hefezellen selektieren, die spontan das *CYH*^{S2}-tragende *bait*-Plasmid verloren, das *prey*-Plasmid aber behalten haben, indem man die Cotransformanten einfach auf Cycloheximid-haltigen Selektionsplatten ohne Leucin ausstreicht [162].

Von jedem zu testenden Cotransformant (*Cyh*^S) wird dazu eine 1-3 mm große Kolonie gepickt und in 200 µl sterilen Wasser resuspendiert. 100 µl davon sowie 100 µl einer 1:100 Verdünnung werden auf SD/-Leu/+Cycloheximid Platten (1 µg/ml für CG-1945; 10 µg/ml für Y190) ausgestrichen. Die Platten werden für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert, bis individuelle *Cyh*^R-Kolonien erscheinen. Von diesen sogenannten *Cyh*^R-Segreganten kann dann das *prey*-Plasmid isoliert werden.

6.4.13 Plasmidisolierung aus Hefezellen [163] und weitere Schritte bis zur Identifikation sogenannter *bona fide* Interaktionspartner

Zur Identifizierung der auf dem *prey*-Plasmid kodierten cDNA wurden diese Vektoren aus Hefezellen isoliert. 1,5 ml einer Hefe-Übernachtskultur wurden 10 Sekunden bei 12.000 g (14.000 rpm) in der Tischzentrifuge sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl STET-Puffer (8 % (w/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8) und 5% (v/v) Triton X-100) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Glasperlen wurde für 5 Min. auf dem Vortex-Gerät geschüttelt, wodurch die Zellwände mechanisch aufgebrochen wurden. Nach erneuter Zugabe von 100 µl STET-Puffer wurde der Ansatz gevortext und dann für 3 Min. bei 100°C gekocht. Nach Abkühlung auf Eis und 10 minütiger Zentrifugation bei 4°C (12.000 g) wurden 100 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt, welches bereits 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat enthielt. Es folgten 30 Min. Inkubation bei -20°C und 10 Min. Zentrifugation (12.000 g) bei 4°C. 100 µl des Überstandes wurden zu 400 µl vorgekühltem 100% Ethanol gegeben, gemischt, 5 Min. auf Eis stehen gelassen und anschließend 10 Min. mit 12.000 g zentrifugiert. Nachdem das DNA-Pellet trocken konnte, wurde es in 20 µl TE gelöst. Zur weiteren Amplifikation wurden ultrakompetenten DH5α mit diesen Hefepiasmiden transformiert. Zur endgültigen Gewinnung der Plasmid-DNA wurden Bakterien Plasmidpräparationen durchgeführt. Diese Plasmide wurden erneut in Hefe retransformiert; zum einen ohne 3pK K73M als *bait*, um falsch-positive Kolonien zu finden, die autonom das *lacZ* Reporter-gen aktivieren konnten, zum anderen mit dem *bait* zusammen, um die vorher

beobachtete Interaktion zu verifizieren. Nur von wirklich wahren Positiven wurde die DNA sequenziert und durch eine computergestützte Datenbanksuche im Internet identifiziert (NCBI Blast Search; www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html).

6.5 Zellkulturarbeiten mit Säuger-Zelllinien

Alle Arbeiten wurden unter Laminarluftfluß mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen, autoklavierten Glaswaren oder mit sterilen Kunststoffmaterialien und Nährmedien durchgeführt. Sämtliche Zelllinien wurden bei 37°C, 6% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit gezüchtet. U2OS, COS7 sowie HEK293 Zellen wurden in DMEM gehalten, wobei den Medien 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Die adhärent wachsenden Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz 1:10 gesplittet. Dazu wurden die Zellen durch 1- bis 5-Min. Behandlung mit einer 0,5 %igen Trypsin-Lösung von der Kulturflasche abgelöst und nach Suspendierung in frischem Medium wieder ausgesät. - Zur Lebendbestimmung wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Lebende Zellen mit intakter Membran sind impermeabel für diesen Stoff, während er in tote Zellen eindringt und diese blau färbt. Unter dem Mikroskop wurde das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen in einem Hämatozytometer ermittelt.

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden die Zellen pelletiert und mit ca. 5x10⁶ Zellen/ml in Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO aufgenommen. 500 µl Aliquots wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Für die Rekultivierung wurden die Zellen rasch aufgetaut, in 10 ml Kulturmedium überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde entfernt und die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen.

Um die Zellen zu stimulieren, wurden verschiedene Reagenzien verwendet: mit 500 µM Natrium-Arsenit bzw. durch gleichzeitige Zugabe von 20% FCS und 100 ng/ml TPA.

6.5.1 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Um Vektor-DNA in die Zellen einzuschleusen, wurden die Zellen zunächst einen Tag vor der Transfektion subkonfluent ausgesät; U2OS und HEK293: 5 x 10⁵ Zellen/10 cm Platte; COS7: 7 x 10⁴/six-well. Es wurde die Calciumpräzipitationsmethode verwendet. Sie beruht darauf, daß die DNA als Kopräzipitat mit Calciumphosphat von den Zellen aufgenommen wird. Dazu wurden die Vektor-DNA mit 500 µl 0,1 M CaCl₂ gemischt und unter ständigem leichtem Schütteln 500 µl 2xBBS (5mM BES, pH 6,7; 280mM NaCl, 1,5mM Na₂HPO₄) hinzugesetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung zu den mit 10 ml Kulturmedium überschichteten Zellen tropfenweise hinzugeführt. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank wurden die Präzipitate von den 293-Zellen mit vorgewärmter PBS Lösung abgewaschen und die Zellen mit 0,3% FCS enthaltendem Medium in Kultur genommen. U2OS und COS7-Zellen wurden über Nacht transformiert, d. h. die Präzipitate wurden nicht nach 6 h gewaschen.

6.5.2 *In vitro* Coimmunexperimente

15 µg rekombinantes GST-E47, das an Glutathion-Sepharose 4B gebunden war, wurde zu TLB-Lysaten (500 µg Gesamtproteingehalt) von untransfizierten bzw. mit HA-3pK oder HA-MK2 transfizierten Zellen zugegeben. Die Lysate wurden vorher 1 h mit GST-gebundener Glutathion-Sepharose (20 µg GST/ 50 µg Glutathion-Sepharose) von Proteinen gereinigt, die an diese Substanzen binden können. Lysate und E47 wurden 6 – 12 h bei 4°C inkubiert, zweimal mit TLB mit hoher Salzkonzentration (0.5 M NaCl, 20 mM Tris [pH 7.4], 50 mM Natrium-β-glycerophosphat, 20 mM Natriumpyrophosphat, 10% [v/v] Glycerin, 1% [v/v] Triton X-100, 2 mM EDTA, 1 mM Pefabloc, 1 mM Natriumorthovanadat, 5 mM

Benzamidin, 5 mg Aprotinin, 5 mg Leupeptin per ml) bzw. hochstringent mit RIPA (137 mM NaCl, 25 mM Tris [pH 8], 10% [v/v] Glycerin, 0.1% SDS, 0.5% Natriumdeoxycholat, 1% NP40, 2 mM EDTA [pH 8], 1 mM Pefabloc, 1 mM Natriumorthovanadat, 5 mM Benzamidin, 5 mg Aprotinin, 5 mg Leupeptin per ml) gewaschen. Nach der SDS-PAGE und dem Blotten wurden die MAPKAP-Kinasen in einem HA-Immunblot detektiert.

6.5.3 Immunpräzipitationen

Die zu erntenden 293-Zellen wurden nach 24 – 36 h Inkubation in DMEM (0,3 % FCS) in PBS gewaschen und dann in TLB-Puffer lysiert, 10 Min. auf Eis inkubiert und schließlich die Lysate von unlöslichen Zelldebris durch 5-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C getrennt. Die Lysate wurden dann mit spezifischen Antikörpern und 25 µl ProteinA-Agarose-Partikel in 1 ml TLB-Puffer 2 h bei 4°C inkubiert. Wurden die immunpräzipitierten Proteine in Coimmunpräzipitationen eingesetzt, wurden die Präzipitate zweimal mit TLB-Puffer gewaschen und direkt in SDS-Ladepuffer (s.o.) aufgenommen. Präzipitate für Immunkomplex-Kinaseassays wurden zweimal in RIPA mit hoher Salzkonzentration (500 mM NaCl) und zweimal in Kinase-Puffer (s.u.) gewaschen.

6.5.4 *In vitro* Kinaseassays

Da Kinasen die γ -Phosphatgruppen von ATP auf ein Substrat übertragen, ist es möglich, ihre Aktivität *in vitro* durch die Zugabe von [γ^{32} P] ATP und eines geeigneten Substrats zu messen. Dazu wurden die Kinasen wie oben beschrieben immunpräzipitiert, gewaschen und mit 5 µCi [γ^{32} P] ATP, 2 bis 5 µg Substrat in 20 µl Kinase-Puffer (10 mM MgCl₂; 25 mM HEPES, pH 7,5; 25 mM Na- β -Glycerophosphat; 5 mM Benzamidin; 1 mM Na-o-Vanadat; 0,5 mM DDT; 1 mM Pefablock; 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin) bei 30°C für 30 Min. unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit SDS-Ladepuffer gestoppt, die Proben bei 95°C 5 Min. erhitzt, die Agarosepartikel pelletiert und der Überstand durch SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie und Immunblot mit spezifischen Antikörpern gegen die immunpräzipitierten Proteine analysiert.

6.5.5 Luciferase-Test

Der Luciferase-Aktivitätstest basiert darauf, daß Luciferase ihr Substrat Luciferin unter Lumineszenzabgabe umsetzt, die quantitativ im Luminometer meßbar ist. Dabei ist die Lumineszenz direkt proportional zur Menge der Luciferase-Aktivität.

Die Zellen wurden mit Luci-Lysepuffer (50mM Na-MES, 50mM Tris-HCl, pH7,8; 10mM DTT, 2% Triton-X100) 30 Min. lysiert, der Zelldebris pelletiert und 30 µg Gesamtproteinextrakt in 50 µl Luci-Lysepuffer zusammen mit 50 µl Assaypuffer (125mM Na-MES; 125mM Tris-HCl, pH7,8; 25mM Mg-Acetat, 2mg/ml ATP) für den Luciferase-assay in weißen 96-Napf-Mikrotiterplatten im Luminometer eingesetzt. 2 Sek. nach Zugabe von 50 µl Luciferin-Lösung (1mM Luciferin in 5mM KH₂PO₄) wurde die Lumineszenz in einem Zeitraum von 5 Sek. gemessen. Die relative Lichtemission wurde entweder auf die Proteinkonzentration oder auf die β -Galactosidase Aktivität im Lysat relativiert.

Von den Ergebnissen aller Experimente, wobei innerhalb eines Experiments jede Transfektion mindestens in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt wurde, wurden die Mittelwerte und Standardabweichung vom Mittelwert berechnet.

6.5.6 β -Galactosidase-Test

Ein künstliches Substrat für das Enzym β -Galactosidase ist ONPG (Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactosid). Bei dessen Spaltung durch das Enzym entsteht ein gelber Farbstoff. Durch Messung der Absorption kann die Transkriptionsaktivität der Zellen in Abhängigkeit von der Promotoraktivität bestimmt werden.

Zu 500 μ l β -Gal-Assay-Puffer (100mM Na-Phosphat-Puffer, pH7,4; 10 mM KCl; 1mM MgSO₄; 3,5 μ l/ml β -Mercaptoethanol) wurden 10-20 μ l Zellextrakt (was ungefähr einer Gesamtproteinmenge von 12 bis 15 μ g entsprach) und 100 μ l ONPG-Lösung (4mg/ml ONPG in 0,5 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0) gegeben. Danach folgte eine Inkubation bei 37°C bis eine deutliche Gelbfärbung der Lösung erkennbar wurde. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 250 μ l Stoppuffer (1M Na₂CO₃) hinzugefügt. Innerhalb der nächsten 30 Min. wurde die Absorption bei Licht der Wellenlänge 420nm gegen die Leerwertkontrolle gemessen.

Gesamtproteinextrakt in 50 μ l Luci-Lysepuffer zusammen mit 50 μ l Assaypuffer (125 mM Na-MES; 125mM Tris-HCl, pH7,8; 25mM Mg-Acetat, 2mg/ml ATP) für den Luciferase-assay in weißen 96-Loch-Mikrotiterplatten im Luminometer eingesetzt. 2 Sek. nach Zugabe von 50 μ l Luciferin-Lösung (1 mM Luciferin in 5 mM KH₂PO₄) wurde die Lumineszenz in einem Zeitraum von 5 Sek. gemessen. Die relative Lichtemission wurde entweder auf die Proteinkonzentration oder auf die β -Galactosidase Aktivität im Lysat relativiert.

Von den Ergebnissen aller Experimente, wobei innerhalb eines Experiments jede Transfektion mindestens in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt wurde, wurden die Mittelwerte und Standardabweichung vom Mittelwert berechnet.

6.5.7 Repressionsassay mit der stabil transfizierten U2OS-Zelllinie

Diese Experimente wurden genauso durchgeführt wie in Alkema *et al.* beschrieben [96]. Die mit dem Promotor-Reporter-gen-Konstrukt GAL4-TKluc stabil transfizierten U2OS/GAL4 TK luc-Zellen wurden in 10 cm-Platten bis zu einer Konfluenz von 40-60 % herangezogen und dann mit der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Jede Platte wurde dazu mit entweder 15 μ g ppuro GAL4 DB (DNA-Bindedomäne), ppuro GAL4 DB-Bmi1, ppuro GAL4 DB-3pK oder pKRSPA zusammen mit 2 μ g RSV/ β -Gal transfiziert. Nach 20 – 24 h wurden die Präzipitate durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt und mit frischen DMEM (inkl. 10 % FCS) ersetzt. 8-10h später wurden dem Medium 10 μ g/ml Puromycin zugegeben, um alle nicht transfizierten Zellen zu eliminieren, was weitere 38-62 h dauerte. Die Zellen, die mit pKRSPA (ohne Puromycin-Resistenz) transfizierte wurden, dienten als Kontrolle für die vollständige Elimination. Die verbliebenen, transfizierten Zellen wurden nach Austausch des Puromycin-Mediums weitere 6 h in DMEM (inkl. 10 % FCS) gehalten, bevor sie den Luciferase- bzw. β -Gal-Tests unterzogen wurden.

7 ERGEBNISSE

7.1 Wechselwirkungspartner von 3pK – Ergebnisse der *two-hybrid screens*

Die physiologische Rolle der MAPKAP-Kinase 3pK war zu Beginn dieser Arbeit völlig unklar. Mit Hilfe der *two-hybrid*-Technik sollten deshalb Interaktionspartner und physiologische Substrate der Kinase identifiziert werden.

Durch anfängliche *two-hybrid*-Experimente konnte festgestellt werden, daß die Wildtyp-Kinase (3pK *wt*) bereits ohne irgendwelche Interaktionspartner eine geringe autonome Fähigkeit zur Transaktivierung der Hefe-Reportergene aufwies (nicht aufgeführte Daten). Daraufhin wurde eine 3pK-Mutante, bei der das Lysin der ATP-Bindestelle durch ein Methionin ersetzt wurde (3pK K73M) und eine kinase-inaktive Isoform ergab, als brauchbarer Köder (*bait*) für die *screens* identifiziert. Außerdem wurde von Zhou *et al.* berichtet, daß in Kinasen eine derartige Substitution in einer stabileren Bindung der Substrate resultiert und dadurch zu einer besseren Transaktivierung der *two-hybrid*-Reportergene führt [164]. Da 3pK vor allem in Skelett- und Herzmuskel sowie in T-Zellen hoch exprimiert vorliegt, wurden eine humane Herz-cDNA- und eine Jurkat-T-Zell-Bibliothek für die Suche nach Interaktionspartner ausgewählt.

Bei der ersten Suche in der Herz-*library* wurde die inaktive 3pK in einen *singlecopy*-Vektor kloniert (pPCH) und damit in den Hefestamm CG-1945 transformiert. Dieser Stamm hat eine relativ schwache β -Gal-Expressionsaktivität, was in einer verringerten Zahl falsch-positiver Klone resultiert [160]. Bei diesem *screen* konnten zwei β -Gal-positive Klone gefunden werden. Weitere Details dazu sind in der Tabelle 2 zu finden.

Da die Ausbeute bei diesem *screen* sehr gering war, wurde für den zweiten und dritten *screen* mit Y190 ein Hefestamm mit starkem β -Gal-Promotor benutzt. Zusätzlich wurde 3pK K73M in das *multicopy*-Plasmid pAS2.1 kloniert. Tatsächlich konnten durch diese Maßnahmen in folgenden *screen* mehr β -Gal-positive Kolonien erhalten werden (Tabelle 2). Im zweiten *screen* wurde wiederholt die Herz-cDNA-Bibliothek eingesetzt, im dritten dagegen die Jurkat-T-Zell-*library*.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die Interaktionspartner HPH2 und E47 intensiv untersucht; weitere Angaben zu den restlichen gefundenen 3pK-Interaktionsproteinen sind im Anhang zu finden.

	1. Screen: humane Herz-Bibliothek	2. Screen: humane Herz-Bibliothek	3. Screen: Jurkat-T-Zell-Bibliothek
Stamm	<i>S. cerevisiae</i> CG-1945	<i>S. cerevisiae</i> Y190	<i>S. cerevisiae</i> Y190
Bibliothek	humane Herz-Bibliothek	humane Herz-Bibliothek	Jurkat-T-Zell-Bibliothek
Vektor (bait Vektor)	pPCH/3pK K73M (<i>singlecopy</i>)	pAS2-1/3pK K73M (<i>multicopy</i>)	pAS2-1/3pK K73M (<i>multicopy</i>)
Transformierungseffizienz	20000 cfu / µg DNA	4500 cfu / µg DNA	1500 cfu / µg DNA
Plasmidkonzentration an Bibliotheksplasmid	500 µg	1000 µg	1125 µg
Anzahl der gescreenten Klone	1 x 10 ⁷	4,5 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶
Faktor, um die Klone der Bibliothek zu screenen	3,3 x	1,5 x	1 x
Anzahl der EU/HIS-positive Klone	Mehrere Hundert (ohne 3-AT)	Mehrere Hundert (3-AT, 30mM)	Mehrere Hundert (3-AT, 30mM)
Anzahl der HIS-positive Klone	2	88	4

Screen	3pK-Interaktionspartner	relative Stärke der two-hybrid-Interaktion	Anzahl der gefundenen Klone	weitere Informationen
Screen	HPH2 - <i>human polyhomeotic 2</i> (C-73 aa)	++++	2	→ 9.2.1
Screen	HPH2 - <i>human polyhomeotic 2</i> (C-73 aa)	++++	6	→ 9.2.1
" -	HPH2 - <i>human polyhomeotic 2</i> (C-145 aa)	++	4	→ 9.2.1
" -	HPH2 - <i>human polyhomeotic 2</i> (C-198 aa)	+++	3	→ 9.2.1
" -	HPH2 - <i>human polyhomeotic 2</i> (C-209 aa)	++	5	→ 9.2.1
" -	E47 - <i>Homo sapiens</i> bHLH Transkriptionsfaktor	++	1	→ 9.2.2
" -	PTRF - <i>Homo sapiens</i> Polymerase I-transcript release factor	+ - +++	29 (11/13/3/2)	→ 9.2.3
" -	DMPK – <i>Homo sapiens</i> dystrophia myotonica protein kinase	++++	23	→ 9.2.4
" -	PRA1 - <i>Homo sapiens</i> prenylated Rab acceptor 1	+	7	→ 9.2.5
" -	EPS15R - <i>Homo sapiens</i> epidermal growth factor receptor substrate	++	5	→ 9.2.6
" -	P88rIPK - <i>Homo sapiens</i> repressor of interferon-inducible double-stranded RNA protein-kinase (PKR) dependent inhibitor P58, (P58IPK repressor)	+	2	→ 9.2.7
" -	Dynamitin - <i>Homo sapiens</i> dynamitin (dynactin complex 50 kDa subunit)	+	1	→ 9.2.9
Screen	CSBP1 – <i>Human</i> CSaids binding protein (humane p38)	++	2	→ 9.2.8
" -	PRA1 - <i>Homo sapiens</i> prenylated Rab acceptor 1	+	2	→ 9.2.5

Abbildung 2: Übersicht über die durchgeführten *two-hybrid screens* und die dabei identifizierten 3pK-Interaktionspartner.

7.2 Die Interaktion der MAPKAP-Kinasen mit Polycomb-Proteinen

7.2.1 3pK und MK2 binden im Hefe *two-hybrid*-System *in vivo* an die Homologie-Domäne II im extremen C-Terminus von HPH2

In beiden *two-hybrid screens* der humanen Herz-cDNA-Bibliothek wurden Fragmente des transkriptionellen Repressors und PcG-Mitglieds HPH2 als *bona fide* 3pK-Interaktionspartner gefunden. In der ersten Suche wurden mit 3pK dem K73M-*bait* in einem *singlecopy*-Plasmid und mit dem Hefestamm CG-1945 zwei identische positive Klone einer 873 bp langen cDNA entdeckt. In der Genbank (NCBI Blast Search) wurden sie als 73 C-terminale Aminosäuren von HPH2 und einem dazugehörigen Teil der 3' untranslatierten Region (3'UTR) identifiziert (Bild 4A). Auch im zweiten *screen*, mit dem Y190-Hefestamm und mit dem *multicopy*-Plasmid pAS2.1, konnte dieses HPH2-Fragment weitere sechs Male gefunden werden. Außerdem wurden in diesem *screen* noch größere 5'-terminale Stücke dieser cDNA entdeckt, wiederum mit Teilen der 3'UTR: vier Klone, die 145 Aminosäuren kodieren, drei, welche 198 und fünf für 209 Aminosäuren (Bild 4A). Neben diesen vier unterschiedlich langen HPH2-Fragmenten wurden von A. Otte (Amsterdam) zwei weitere, größere HPH2-Klone (298 und 443 C-terminale Aminosäuren kodierend) zur Verfügung gestellt, die ihrerseits in einem *two-hybrid screen* mit BMI1 als Köder gefunden wurden. Diese Klone zeigten ebenfalls eine Interaktion mit 3pK im *two-hybrid*-System (Bild 4A). Der längere dieser HPH2-Klone wurde zudem als die vollständige cDNA beschrieben [91]. Interessanterweise überlappt die Sequenz von HPH2, die für die Bindung mit BMI1 bzw. HPH1/2 notwendig ist, mit der Interaktionsdomäne für die 3pK-Bindung. Diese Domäne umfaßt 73 Aminosäuren und beinhaltet die 67 Aminosäuren lange Homologie-Domäne II, die 100% identisch ist mit der entsprechenden Sequenz des Maus-Proteins, Mph2. Sie stimmt weiterhin zu 79% mit der von mph1/Rae28, 77% mit der von HPH1 und noch zu 56% mit der homologen Sequenz des *polyhomeotic*-Homologs von *Drosophila* überein.

Diese insgesamt sechs unterschiedlich langen HPH2-Klone haben auch unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu 3pK. So zeigt der direkte *two-hybrid*-Test mit X-Gal als Substrat, daß die Interaktion zwischen 3pK und dem kleinsten HPH2-Fragment, HPH2 (C-73 aa), zur intensivsten Blaufärbung führt, die sich zudem auch in der kürzesten Zeit, innerhalb von 30 Minuten, entwickelt. Alle anderen Wechselwirkungen von 3pK mit längeren HPH2-cDNAs benötigen mindestens 60 Minuten, um die maximale Intensität der Blaufärbung zu erreichen, die dann aber immer noch sehr deutlich unter der von HPH2 (C-73 aa) liegt (Bild 4B). Um die Bindungsaffinitäten letztendlich quantitativ zu bestimmen, wurden *two-hybrid*-Experimente mit

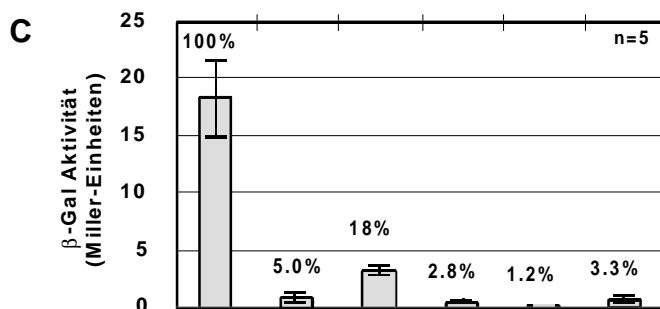
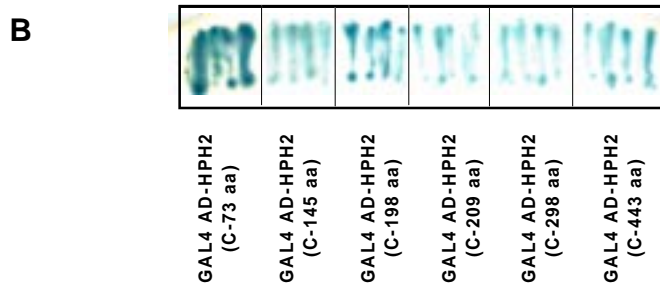
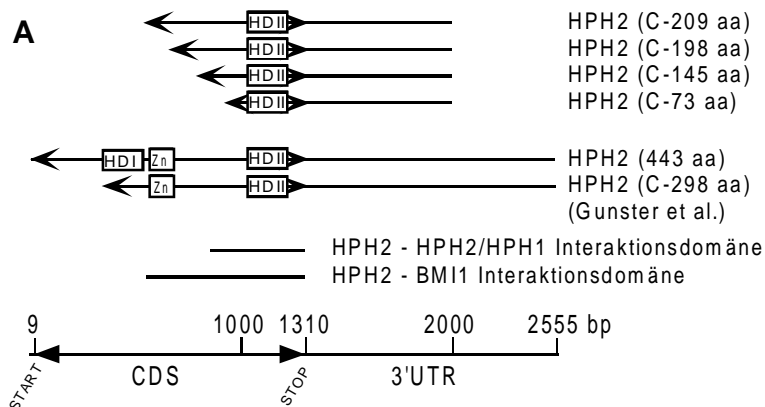


Bild 4: Two-hybrid-Interaktion zwischen 3pK und HPH2. (A) Schematische Repräsentation der HPH2-Klone, die mit 3pK interagieren. In den *two-hybrid-screens* wurden vier verschieden lange HPH2-Klone gefunden: HPH2 (C-73 aa), HPH2 (C-145 aa), HPH2 (C-198 aa), HPH2 (C-209 aa). Eine Interaktion konnte auch mit zwei zuvor identifizierten HPH2-Klonen, HPH2 (C-298 aa) HPH2 (C-443 aa), identifiziert werden; der längste wurde als vollständige HPH2-cDNA beschrieben (91). Homologiedomänen (HDI und HDII) und das Zinkfinger-Motiv (Zn) werden als Boxen gezeigt; die kodierenden Sequenzen sind mit Pfeilen begrenzt; 3'UTR: 3' untranslatierte Region (B) Direkte *two-hybrid*-Tests mit X-Gal: die verschieden langen HPH2-Klone interagieren mit 3pK K73M. (C) Quantitatives β -Gal-Assay mit ONPG. Es wurden dieselben Interaktionen wie in (B) analysiert; gezeigt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je fünf unabhängigen Experimenten, deren β -Gal-Aktivitäten in Miller-Einheiten gemessen wurden [161]. Die Interaktionen wurden zusätzlich prozentual miteinander verglichen (Werte über den Balken), wobei die β -Gal-Aktivität zwischen 3pK K73M und HPH2 (C-73 aa) willkürlich auf 100% gesetzt wurde.

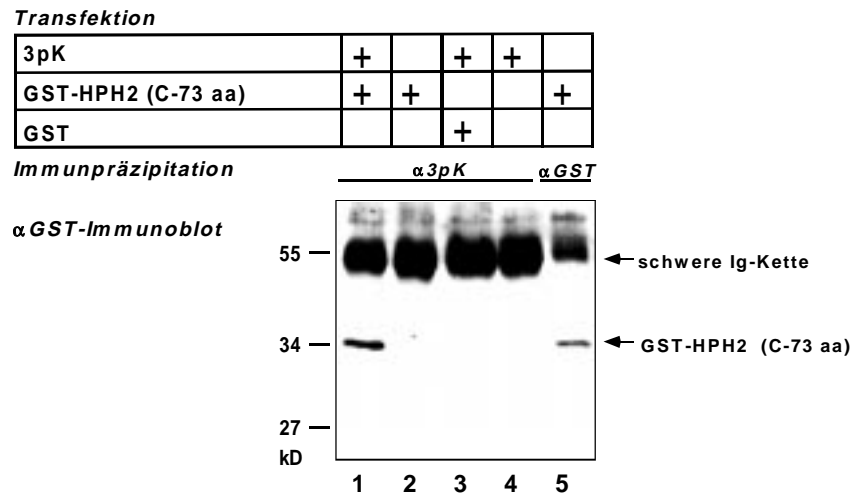
ONPG als Substrat durchgeführt (Bild 4C). Diese Art des Tests ist zwar um den Faktor 10^6 weniger sensitiv als der entsprechende Versuch mit X-Gal [160], stellt aber mit der photometrischen Messung der ONPG-Umsetzung in einen gelben Farbstoff eine Möglichkeit zur Einschätzung der Stärke von *two-hybrid*-Interaktionen dar. Die mit X-Gal erzielten Ergebnisse konnten dabei bestätigt werden: während die 3pK-Interaktion mit HPH2 (C-73 aa) die höchste β -Galactosidase-Aktivität aufwies und deshalb als 100% gesetzt wurde, zeigten die längeren HPH2-Fragmente deutlich geringere Aktivitäten. Die Wechselwirkung von 3pK mit HPH2 (C-145 aa), HPH2 (C-198 aa), HPH2 (C-209 aa) bzw. HPH2 (C-443 aa) ließ sich damit zu 5%, 18%, 2.8% bzw. 3.3% vom Kontrollwert bestimmen (Bild 4C).

Zusätzlich zu 3pK konnte auch beobachtet werden, daß die homologe MK2 mit HPH2 im *two-hybrid*-System interagiert; die Bindung von MK2 mit dem kürzesten Fragment HPH2 (C-73 aa) resultiert in einer ähnlich intensiven blauen Farbe (nicht aufgeführte Daten) wie bei der Reaktion mit 3pK.

7.2.2 HPH2 coimmunpräzipitiert mit 3pK *in vivo*

Um die *two-hybrid*-Daten unabhängig zu verifizieren und um zu analysieren, ob 3pK zusammen mit HPH2 in einem Polycomb-Komplex vorliegt, wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden in einem ersten Experiment HEK293-Zellen mit der DNA des kleinsten HPH2-Fragments (als GST-Fusionsprotein (pEBG/HPH2 (C-73 aa)) sowie mit 3pK cotransfiziert. Als Positivkontrolle für die Immunpräzipitation sowie für den Westernblot wurde ein polyklonales anti-GST-Serum benutzt; das dabei detektierte GST-HPH2 Fusionsprotein lief auf einer Höhe von 34 kDa und entsprach damit dem rechnerisch erwarteten Molekulargewicht (Bild 5A, Spur 5). Für das eigentliche Coimmunpräzipitationsexperiment mit cotransfiziertem HPH2 und 3pK sowie für die Negativkontrollen wurden Lysate transfizierter HEK293-Zellen mit dem polyklonalen anti-3pK-Serum inkubiert. Die resultierenden Immunpräzipitate wurde mit anti-GST-Serum geblottet, wobei nur in der Probe, in welcher beide Proteine coexprimiert vorlagen, das an 3pK gebundene HPH2 detektiert werden konnte (Bild 5A, Spur 1); das GST-HPH2-Fragment konnte weder mit den an Protein-A-Agarose gekoppelten anti-3pK-Antikörpern aus dem Lysat gezogen werden (Bild 5A, Spur 2), noch war das GST-Protein für die Bindung an 3pK verantwortlich (Bild 5A, Spur 3). Eine weitere Kontrolle bestätigte, daß die in Probe 1 detektierte Bande nicht irgendein unspezifisches Protein war, das mit 3pK interagiert und zufälligerweise mit dem anti-3pK-Serum kreuzreagiert (Bild 5A, Spur 4). Weiterhin wurde getestet (Bild 5B), ob auch längere HPH2-Klone coimmunpräzipitiert werden konnten. Dazu wurden vier verschieden lange

A



B Transfektion

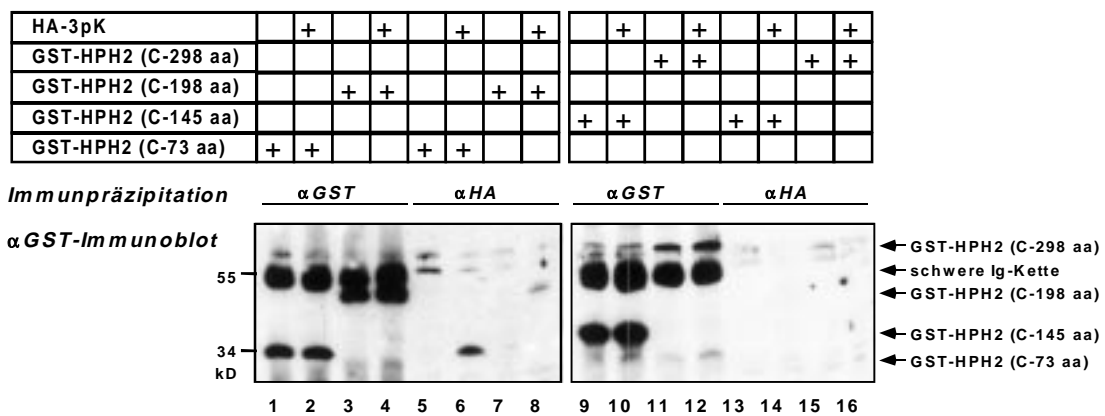


Bild 5: *In vivo* Interaktion zwischen 3pK und HPH2. HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. 3pK wurde entweder als unmarkiertes (A) oder als HA-markiertes Protein exprimiert (B). Die Proteine wurden mit den beschriebenen Antisera immunpräzipitiert, zweimal mit TLB-Puffer gewaschen, in SDS-PAGE-Gelen (10%) aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen geblottet und mit den angegebenen Antisera detektiert. Die Banden bei 55 kDa resultieren aus der Kreuzreaktivität der schweren Ig-Ketten mit den benutzten Antikörpern.

GST-HPH2-Fragmente (C-298 aa, C-198 aa, C-145 aa und C-73 aa) zusammen mit HA-markierter 3pK cotransfiziert. Immunpräzipitationen und Westernblots mit anti-GST-Serum bestätigte die Expression der verschiedenen HPH2-Fusionsproteine (Bild 5B, Spuren 1-4 und 9-12). Coimmunpräzipitationen von HPH2-Klonen mit HA-3pK konnten lediglich bei GST-HPH2 (C-73 aa) (Bild 5B, Spur 6) und GST-HPH2 (C-198 aa) (Bild 5B, Spur 8) beobachtet werden. In keiner der Negativkontrollen (Bild 5B, Spuren 5, 7, 13, 15), sind mitpräzipitierte Banden der entsprechenden Größe zu finden, was bestätigt, daß der anti-HA-Antikörper nicht unspezifisch an die HPH2-Proteine binden kann. GST-HPH2 (C-145 aa) und GST-HPH2 (C-298 aa) konnten nicht detektiert werden, da ihre Bindeaffinitäten zu 3pK wahrscheinlich unter

stimmen damit ziemlich genau mit den in den *two-hybrid*-Tests mit ONPG ermittelten Interaktionsstärken überein (Bild 4C). Diese durchgeführten Coimmunpräzitationsexperimente, in denen zwei verschiedene Antikörper zur Immunpräzitation eingesetzt wurden, indizieren, daß die im *two-hybrid*-System entdeckte Interaktion zwischen der MAPKAP Kinase 3pK und dem PcG-Protein HPH2 auch *in vivo* in Säugerzellen existiert. Diese Resultate unterstützen weiterhin die Hypothese, daß 3pK als Teil eines Polycomb-Komplexes vorliegt, in dem HPH2 präsent ist.

7.2.3 *In vivo* Interaktion zwischen Bmi1 und beiden MAPKAP-Kinasen, 3pK und MK2

Um die Entdeckung weiter zu erhärten, daß die MAPKAP-Kinasen 3pK und MK2 Bestandteile von PcG-Komplexen sind, wurde analysiert, ob die Kinase in der Lage ist, mit einem weiteren PcG-Protein zu copräzipitieren. Das Protoonkogen *bmi1*, dessen Protein mit HPH2 interagiert [91] und das ursprünglich beschrieben wurde, in Zellproliferation und Tumorgenese involviert zu sein [81,82], wurde daraufhin untersucht. Dazu wurde ein HA-Bmi1-Expressionsplasmid mit Vektoren cotransfiziert, die entweder GST-3pK, GST-MK2 oder nur GST kodierten. Die Spuren 1-3 (Bild 6) bestätigen die Expression der GST-fusionierten Kinasen. Beide MAPKAP-Kinasen konnten mit Bmi1 coimmunpräzitiert werden (Bild 6, Spuren 4, 5); der GST-Teil allein, interagierte dagegen nicht mit HA-Bmi1 (Bild 6, Spur 6). Diese Experimente identifizieren Bmi1 als weiteren direkten oder indirekten PcG-Interaktionspartner von 3pK und MK2 und unterstreichen erneut, daß die MAPKAP-Kinasen putative Bestandteile von Polycomb-Komplexen sind.

Transfektion

HA-Bmi1	+	+	+	+	+	+
GST-3pK		+			+	
GST-MK2	+			+		
GST			+			+

Immunpräzitation

GST-Immunoblot

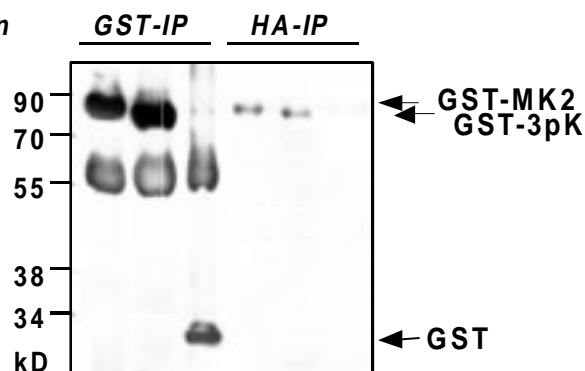


Bild 6: *In vivo* Interaktion zwischen Bmi1 den MAPKAP-Kinasen 3pK und MK2. HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Die Proteine wurden mit den angezeigten Antisera immunpräzitiert und detektiert. GST-3pK und GST-MK2 werden spezifisch mit HA-Bmi1 copräzitiert (Spur 4, 5), GST dagegen nicht (Spur 6). Die Banden bei 55 kDa zeigen die schweren Ig-Ketten.

7.2.4 3pK und MK2 phosphorylieren Bmi1 *in vitro*

Bmi1 ist als Phosphoprotein beschrieben [90], obwohl die Funktion dieses posttranslationalen Ereignisses nach wie vor unklar ist. Neueste Ergebnisse deuten jedoch auf einen Zusammenhang von Phosphorylierung und der anschließenden Dissoziation von PcG-Komplexen hin [105], was ein erster Anhaltspunkt dafür ist, daß Proteinkinasen eventuell eine wichtige Rolle bei der Regulation von PcG-Proteinen und deren Funktionen spielen können. Die Copräzipitation von 3pK und MK2 mit Bmi1 legt nahe, daß Bmi1 ein Substrat beider MAKPAK-Kinasen sein könnte.

In *in vitro* Kinaseassays wurde getestet, ob aktive 3pK (Bild 7) bzw. MK2 (Bild 8) in der Lage sind, Bmi1 zu phosphorylieren. GST-3pK, GST-MK2 oder HA-Bmi1 wurden dafür getrennt in HEK293-Zellen transfiziert und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern aus den TLB-Lysaten immunpräzipitiert. Um 3pK *in vivo* zu aktivieren, wurden die Zellen vorher entweder mit Serum und TPA bzw. mit Arsenit stimuliert; MK2 ist lediglich Arsenit-responsiv. Die präzipitierten Immunkomplexe wurden mehrmals mit hochstringentem RIPA-Puffer (inkl. 1M NaCl) gewaschen, um kontaminierende Proteine von den Präzipitaten zu entfernen. Die Immunkomplexe von Bmi1 wurden dann mit Immunkomplexen aktiver oder inaktiver Kinasen versetzt, um anschließend in entsprechenden Kinasebuffer mit radioaktiven [γ^{32} P]-ATP inkubiert zu werden.

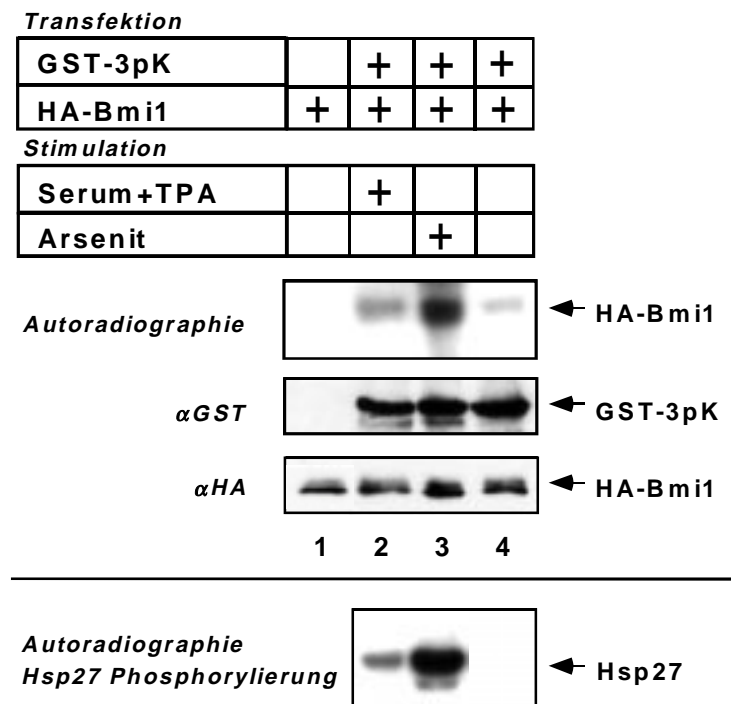


Bild 7: 3pK phosphoryliert das Polycomb- und Protoonkoprotein Bmi1. HEK293-Zellen wurden entweder mit GST-3pK oder mit HA-Bmi1 transfiziert. Die Kinase wurde durch Stimulation mit Arsenit bzw. mit Serum/TPA aktiviert. Die Kinase und das Substrat wurden getrennt mit anti-GST- bzw. mit anti-HA-Antiserum immunpräzipitiert, unter hochstringenten Bedingungen (RIPA-Puffer mit 1M NaCl) zweimal gewaschen und für die *in vitro* Kinasereaktion in Gegenwart von [γ^{32} P]-ATP zusammengeführt. Die Abbildung unterhalb des Trennstriches zeigt die Kontrollreaktion mit dem Hitzeschockprotein HSP27 als Substrat für die immunpräzipitierte 3pK.

Bmi1 wurde in der Abwesenheit von 3pK nicht (Bild 7, Spur 1) und in Anwesenheit von nicht aktiver Kinase nur schwach phosphoryliert (Bild 7, Spur 4). Lag allerdings aktive Kinase vor, war Bmi1 stark phosphoryliert, und zwar in dem Maß wie es der Kinaseaktivierung entsprach, die durch die Phosphorylierung des kleinen Hitzeschockproteins HSP27 demonstriert wurde (Bild 7, Spur 2, 3). Ein entsprechendes Resultat wurde mit MK2 als Bmi1-Kinase erzielt. Bmi1 wurde ausschließlich in Anwesenheit aktiver Kinase stark phosphoryliert (Bild 8, Spur 2).

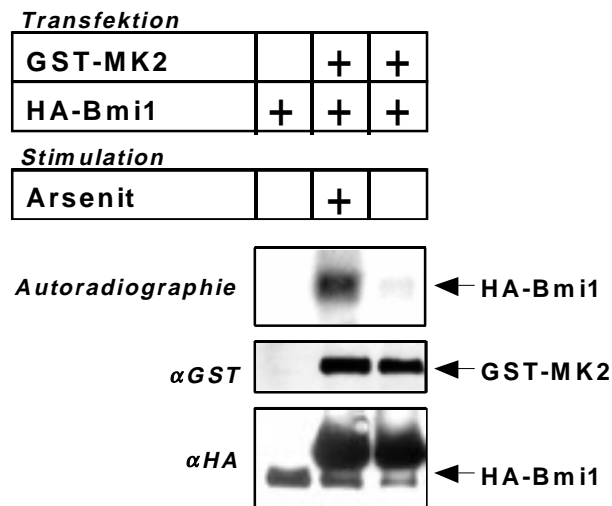


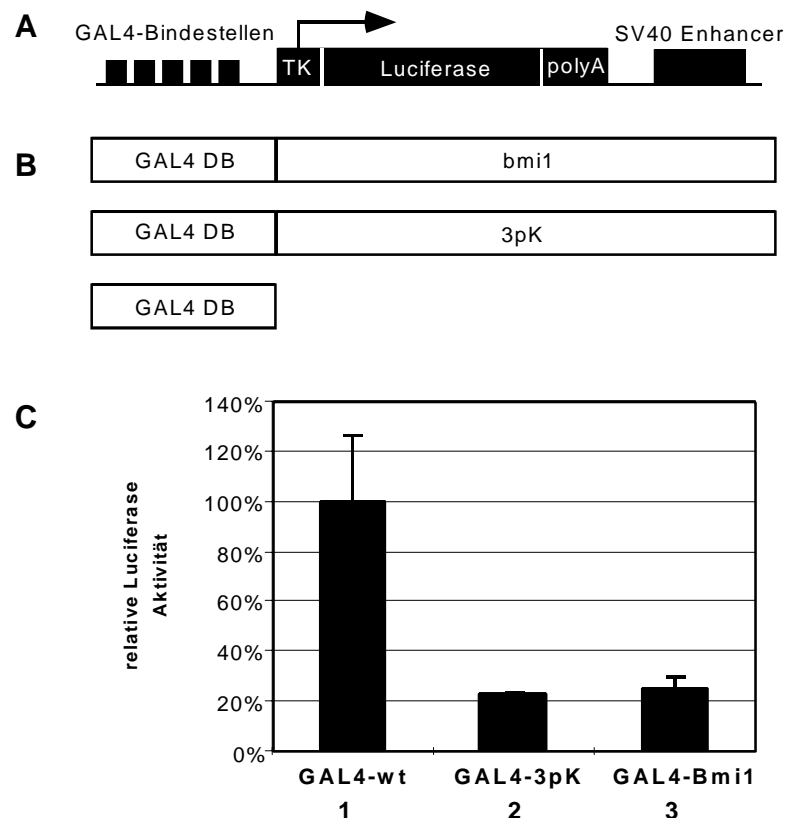
Bild 8: MK2 phosphoryliert das Polycomb- und Protoonkoprotein Bmi1. HEK293-Zellen wurden entweder mit GST-MK2 oder mit HA-Bmi1 transfiziert. Die Kinase wurde durch Stimulation mit Arsenit aktiviert. Die Kinase und das Substrat wurden getrennt mit anti-GST- bzw. mit anti-HA-Antiserum immunpräzipitiert, unter hochstringenten Bedingungen (RIPA-Puffer mit 1M NaCl) zweimal gewaschen und für die *in vitro* Kinasereaktion in Gegenwart von [γ^{32} P]-ATP zusammengeführt.

7.2.5 Nicht aktiviertes, GAL4 DB-fusioniertes 3pK wirkt als transkriptioneller Repressor

Die physiologische Funktion von 3pK ist soweit noch unbekannt. Nachdem 3pK nun nachweislich mit zwei verschiedenen Mitgliedern einer Polycomb-Gruppe interagiert, die als transkriptionelle Repressoren charakterisiert sind, lag es nahe, 3pK ebenfalls auf ihre transkriptionelle Aktivität hin zu überprüfen. Die reprimierende Aktivität von PcG-Proteinen auf die Genexpression wurde bereits direkt in transienten Transfektionsexperimenten in Säugerzellen sowohl für Bmi1 als auch für andere PcG-Proteine gezeigt [165, 166]. Da man aber glaubt, daß PcG-Proteine die Transkription auf Chromatinebene beeinflussen, haben Alkema *et al.* [96] ein Repressionsassay entwickelt, bei dem das Zielgen stabil in das Genom einer humanen Osteosarkom-Zelllinie (U2OS) integriert wurde. Das so eingefügte Luciferase-Reportergen steht unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Thymidinkinase (TK)-Promotors, dem fünf GAL4 DNA-Bindestellen vorangehen. Entsprechend dem Rekrutierungsmodell rekrutieren die transient exprimierten GAL4-PcG-Fusionsproteine über ihre Bindung an die DNA-Bindestellen andere PcG-Mitglieder, um den multimeren, funktionell aktiven *silencing*-Komplex an diesem artifiziellen Promotor zu vervollständigen [96,98].

Bindedomäne (DB)-Bmi1 bzw. GAL4 DB-3pK zusätzlich zu einem Puromycin-Resistenzgen kodieren. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen und sie rechnerisch auszugleichen, wurden zusätzlich β -Galactosidase kodierende Konstrukte cotransfiziert. Alle nicht transfizierten Zellen wurden durch die Zugabe von Puromycin eliminiert. Die Puromycin-Resistenten wurden anschließend in einem Luciferaseassay auf die Transaktivierung des Reportergens untersucht. Der Luciferase-Wert der Zellen, die nur mit dem leeren GAL4 DB-Vektor transfiziert wurden, galt als 100%-Wert. Die Expression von GAL4 DB-Bmi1 diente als Positivkontrolle und zeigte eine Reduktion der Promotoraktivität auf ca. 25 %, wie sie für dieses Assay schon vorher beschrieben wurde [96]. Interessanterweise konnte mit dem GAL4 DB-3pK eine eben solche Repression der Luciferase-Expression (Reduktion auf 21%) erzielt werden. Dies legt nahe, daß auch nicht aktivierte und über die GAL4-DNA-Bindedomäne am Zielgen lokalisierte 3pK in der Lage ist, genau wie für PcG-Proteine bereits beschrieben, andere Mitglieder dieser Gruppe zu diesem in Chromatin-integrierten Promotor zu rekrutieren, um dort einen funktionellen PcG-Repressorkomplex zu bilden.

Bild 9: Transkriptionelle Repression durch GAL4 DB-3pK. (A) Schematische Darstellung des stabil integrierten Reporterkonstruktes (B) Eingesetzte GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4 DB)-Fusionsproteine. (C) Die angegebenen DNAs wurden zus. mit 2 μ g β -Gal in U2OS-Zellen transfiziert. Nach der Elimination untransfizierter Zellen durch Puromycin wurden Luciferase- und β -Gal-Werte bestimmt. Die Luciferase-Aktivität der mit leerem Vektor transfizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Unter Berücksichtigung der Transfektionseffizienz wurde die prozentuale Repression durch Bmi1 und 3pK berechnet. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei parallelen und unabhängigen Experimenten. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Assays.



7.3 Die Interaktion der MAPKAP-Kinasen mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor E47

7.3.1 3pK bindet *in vivo* an E47 im Hefe *two-hybrid*-System

Im zweiten *two-hybrid screen* der humanen Herz-cDNA-Bibliothek konnte der vollständige humane basische HLH-Transkriptionsfaktor E47 als weiterer 3pK-Interaktionspartner identifiziert werden (Bild 10). Um die Interaktionsdomänen einzugrenzen, wurden mehrere Deletionsmutanten von E47 hergestellt, welche dann in direkten *two-hybrid*-Tests mit 3pK K73M eingesetzt wurden (Bild 10). Das Entfernen von 157 Aminosäuren vom C-Terminus von E47 (E47 (1-494)), inklusive des HLH-Motivs und der sauren Domäne, führte interessanterweise bereits zur Aufhebung der Proteininteraktion, was eine wichtige Bedeutung dieser Motive für die Bindung von E47 an 3pK nahelegt. Eine ähnlich große Deletion am N-terminalen E47-Ende (E47 (Δ 18-229)) führte zur Eliminierung der Aktivierungsdomäne 1 (AD1) [108,109], was aber keinen negativen Einfluß auf die Interaktion hatte, während eine weitergehende Deletion des N-Terminus von E47 bis zur Aminosäure 371 wiederum die Bindung verhinderte. Diese Studien zeigen, daß zusätzlich zur Loop-Helix-Transaktivationsdomäne 2 (LH-AD2) [108,110], der sauren Domäne (A) und dem HLH-Motiv (HLH), die alle in der C-terminalen Hälfte lokalisiert sind, noch eine N-terminale Region für das Binden von 3pK wichtig ist.

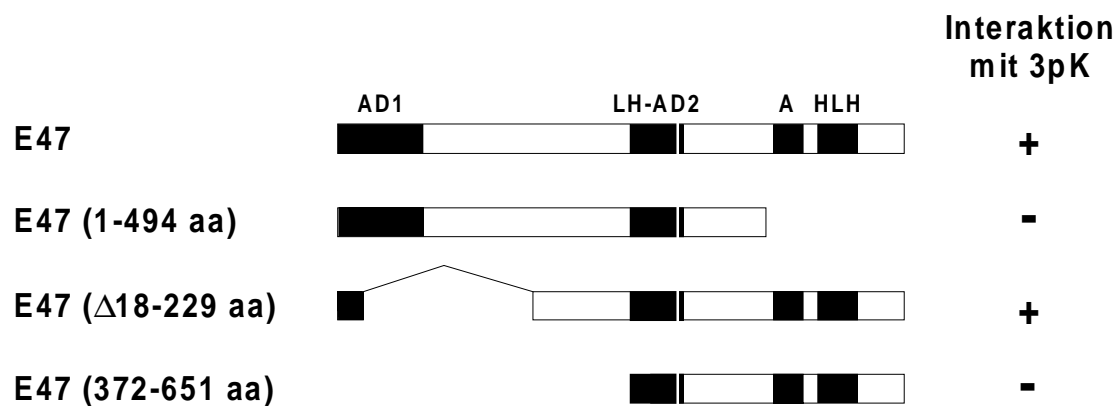


Bild 10 : 3pK und der basische HLH-Transkriptionsfaktor E47 interagieren *in vivo* in Hefezellen. Analyse des vollständigen E47 und verschiedener E47-Deletionsmutanten in direkten Hefe *two-hybrid*-Experimenten mit pAS2.1-3pK K73M als 'Köder'. Aktivierungsdomäne 1 (AD1), Loop-Helix-Transaktivierungsdomäne 2 (LH-AD2), saure (A) und HLH-Domäne (HLH) sind als schwarze Boxen gezeigt und markiert.

7.3.2 3pK interagiert mit E47 *in vivo*

Um die 3pK-E47 *two-hybrid*-Interaktion mit einer davon unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden Coimmunpräzitationsexperimente durchgeführt. HEK293-Zellen wurden dazu mit HA markiertem 3pK und mit E47 cotransfiziert. Als Positivkontrolle wurde E47 mit polyklonalem anti-E47-Serum präzipitiert (Bild 11, Spur 1). HA-3pK wurde mit dem monoklonalen HA-Antikörper (12CA5) präzipitiert. Es konnte gezeigt werden, daß E47 spezifisch mit 3pK copräzipitiert (Bild 11, Spur 4), während in den Kontrollen kein coimmunpräzipitiertes Protein erkennbar war (Bild 11, Spuren 2, 3).

Diese Experimente zusammen mit den *two-hybrid*-Daten demonstrieren, daß 3pK und E47 sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen *in vivo* miteinander interagieren können.

Transfektion

HA-3pK		+		+
E47	+		+	+

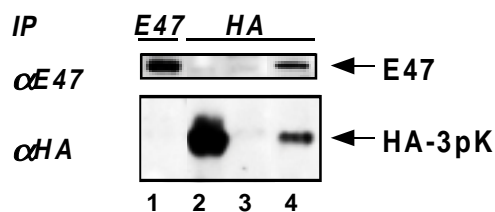


Bild 11: E47 coimmunpräzipitiert mit HA-3pK aus humanen Zelllysaten. HEK293-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. 3pK wurde als HA-markierte Version exprimiert. Die Proteine wurden wie angegeben mit anti-E47 oder anti-HA (12CA5)-Serum immunpräzipitiert, zweimal mit TLB-Puffer gewaschen, mittels SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Filter geblottet. Die Proteine wurden anschließend mit den angegebenen Antisera detektiert.

7.3.3 3pK und MK2 interagieren mit E47 unter hochstringenten Bedingungen

Es wurde ferner analysiert, ob MK2 ebenso wie 3pK in der Lage war, an E47 zu binden. Dazu wurden in den hier durchgeführten 'Pull-down'-Experimenten bakteriell exprimiertes GST-E47 an Glutathion-Sepharose-Kügelchen gebunden und anschließend zu HEK293-Lysaten gegeben. Diese enthielten entweder HA-3pK oder HA-MK2 und waren durch eine Vorinkubation mit GST-beladenen Glutathion-Sepharose-Kügelchen von Proteinen bereinigt worden, die lediglich an GST bzw. an die Kügelchen banden. Nach einer Inkubationsphase (6-12 h) wurden die GST-E47-beladenen Kügelchen zentrifugiert und zweimal gewaschen, entweder unter moderaten (TLB-Puffer mit einem hohen Salzanteil) oder hochstringenten Bedingungen (RIPA). Die an die Sepharose-Kügelchen gebundenen Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und immungeblottet, um die HA-markierten Proteine zu detektieren. Tatsächlich konnte 3pK als auch MK2 unter beiden Experimentalbedingungen nachgewiesen werden (Bild 12, Spuren 2, 6). Dies war nicht der Fall, wenn die Glutathion-Sepharose-Kügelchen nur mit GST beladen waren (Bild 12, Spuren 3, 7) oder wenn Lysate von

3pK und MK2 haben also beide die Fähigkeit, E47 zu binden. Außerdem zeigt die hohe Stringenz, unter der die Proteininteraktionen stabil waren, auf eine hohe Bindungsaffinität beider Kinasen zu E47.

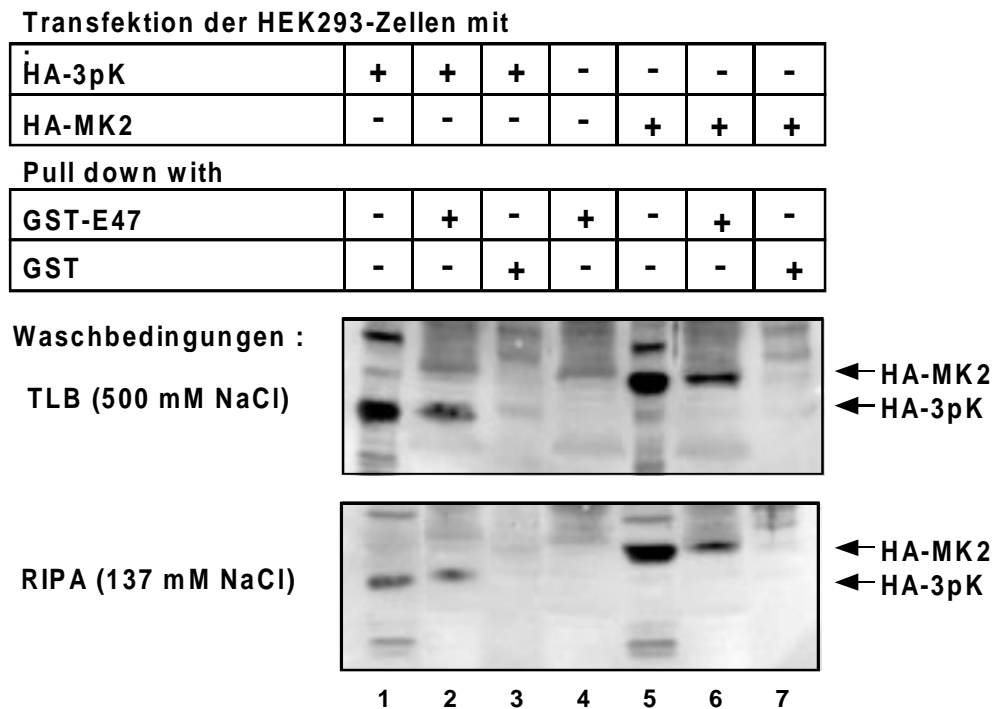


Bild 12 : 3pK und MK2 copräzipitieren mit GST-E47. Rekombinantes GST-E47, das an Glutathion-Sepharose-Kügelchen gebunden war, wurde zu vorgereinigten TLB-Lysaten von transfizierten oder untransfizierten HEK293-Zellen gegeben, 6-12 h inkubiert und anschließend zweimal entweder mit TLB-Puffer (inkl. 0.5 M NaCl) oder mit RIPA-Puffer (137 mM NaCl) gewaschen. Nach SDS-PAGE und dem Transferieren auf Nitrocellulose-Membranen wurden die HA-markierten MAPKAP-Kinasen durch HA-Western detektiert (Spuren 2, 6). Als Negativkontrollen wurden GST-beladene Glutathion-Sepharose-Kügelchen (Spuren 3, 7) bzw. Lysate von untransfizierten HEK293 (Spur 4) verwendet. Die Spuren 1 und 5 sind Positivkontrollen und zeigen die HA-markierten Kinasen aus Lysaten von transfizierten HEK293-Zellen.

7.3.4 3pK und MAPKAP-Kinase 2 phosphorylieren E47 *in vitro*

In vivo liegt E47 an mehreren Stelle phosphoryliert vor [148,149]. In Bezug auf die phosphorylierenden E47-Kinasen ist jedoch nur wenig bekannt. Die hier gezeigte Bindung beider MAPKAP-Kinasen legt nahe, daß E47 ein potentielles Substrat sein könnte. Außerdem finden sich in der Aminosäuresequenz des Transkriptionsfaktors vier potentielle Konsensussequenzen (RXXS) für eine Phosphorylierung durch MAPKAP-Kinasen (Bild 13). Es wurden deshalb in verschiedenen *in vitro* Kinaseassays getestet, ob die Kinasen in der Lage waren, E47 zu phosphorylieren. Die verschiedenen Kinaseassays unterscheiden sich in der Herkunft der Kinasen und E47.

1	MNQPQRM	APV	GTDKELSDLL	DFSMMFPLPV	TNGKGR	PASL	AGAHF	GGSG	EDRPSS	GSWG
61	SGDQSS	SSFD	PSRTF	SEGT	H	F	TESHSS	LSS	STFLGP	GLGG
121	TQAGFL	SGEL	ALNSPG	PLSP	SGMKG	T	SQYY	PSYSG	SSRRR	AADGSL
181	PSSVY	PPSSG	EDYGR	DATAY	PSAKT	P	SSTY	PAPFY	VADGS	LHPSAE
241	GGGSS	PLPLP	PGSGP	VGSSG	SSSTF	G	LHQ	HERMG	YQLHG	AEVNG
301	YGGVSS	SHTPP	VSGAD	SLLGS	RGTTA	G	SSGD	ALGKA	LASIY	SPDHSS
361	QGLAG	T	QWP	RAGAP	GALSP	SYDG	LHGLQ	SKIED	H	LDEA
421	GHGAL	ASGFT	GPMSL	GGRHA	GLVGG	S	HPED	GLAGS	T	SLMH
481	SYSGL	GRAGA	TAAASE	IKRE	EKEDE	E	NTSA	ADHSE	E	EKKE
541	DLRDR	RERRMA	NNARER	VRVR	DINEA	F	RELG	RMCQM	H	LKSD
601	QQVRE	RNLNP	KAAACL	KRREE	EKVS	G	VVGD	QMVLS	A	PHPG
										LSEAH
										NPAGH
										M
										651

Bild 13: E47-Aminosäuresequenz inklusive potentieller MAPKAP-Kinase-Phosphorylierungsstellen (RXXS) und bekannter Sequenzmotive. Potentielle MAPKAP-Kinase-Phosphorylierungsstellen – grün; Aktivierungsdomäne 1 – blaugrün (aa 1-99) [109]; Loop-Domäne – violett (aa 348-394); α -Helix – dunkelrot (aa 395-405); (Loop-Domäne und α -Helix werden zusammen auch als Loop-Helix-Domäne oder als Aktivierungsdomäne 2 bezeichnet (aa 348-405) [108,110]; Saure Domäne – blau (aa 511-540); Helix-Loop-Helix – rot (aa 560-600); Amphipatische Helices – rot unterstrichen (aa 560-572 und 588-600) [127].

In einer ersten Reihe von Experimenten (Bild 14A) wurde HA-markiertes 3pK und E47 benutzt, die zunächst separat in HEK293-Zellen transfiziert, anschließend präzipitiert, gewaschen und dann zusammen zu Kinase-Puffer mit [γ^{32} P]-ATP gegeben wurden. Als Quelle für aktive 3pK wurden Zellen mit Arsenit stimuliert, was zur Aktivierung der 3pK führt, die wiederum an der Autophosphorylierung gesehen werden kann. In Anwesenheit von aktivierter Kinase lag E47 stark phosphoryliert vor (Bild 14A, Spur 3).

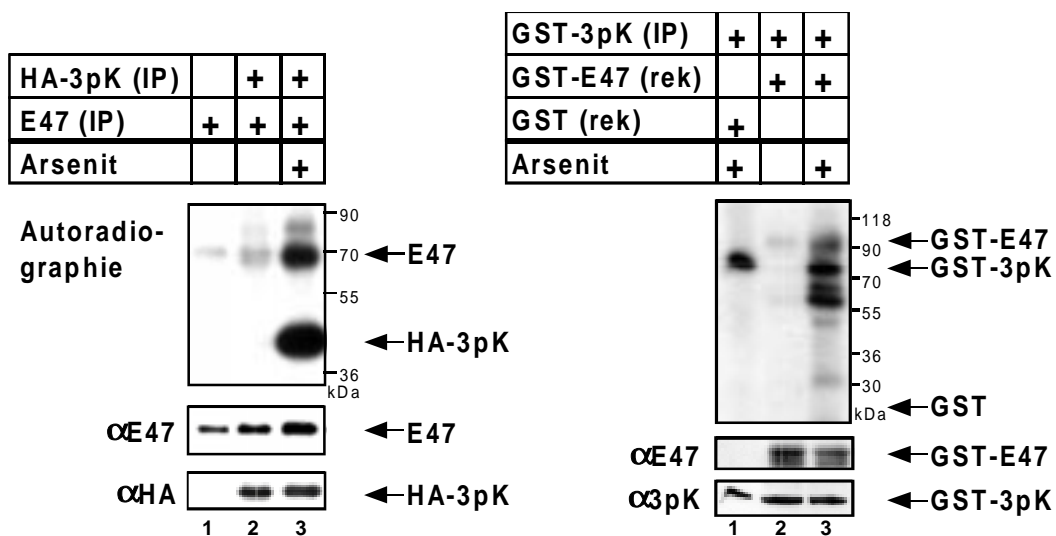
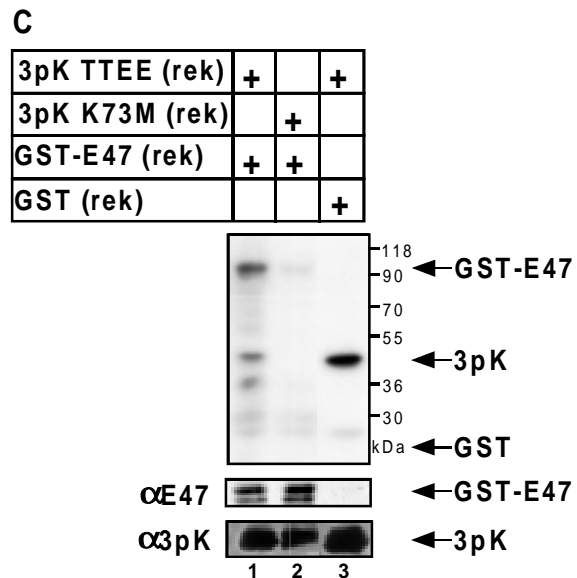


Bild 14: 3pK phosphoryliert *in vitro* den bHLH-Transkriptionsfaktor E47.

(A) HEK293 wurden mit HA-3pK- oder E47-kodierenden Vektoren transfiziert. Die Kinase wurde durch Arsenit-Stimulation aktiviert. Substrat und Kinase wurden beide mit entsprechendem Antiserum immunpräzipitiert (IP). Die Immunkomplexe wurden unter hochstringenten Bedingungen zweimal gewaschen (RIPA-Puffer inkl. 0,5M NaCl) und für die Kinasereaktion in Gegenwart von $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ zusammengeführt (B) Arsenit-aktivierte und immunpräzipitierte GST-3pK wurde zur Kinasereaktion gegeben, in der sich 10 μg rekombinantes, Sepharose-gebundenes GST-E47 bzw. GST befand. (C) Rekombinante, konstitutiv aktive (TTEE (rek)) oder inaktive (K73M (rek)) 3pK wurde mit rekombinatem, Sepharose-gebundenem GST-E47 oder GST getestet.



In weiteren Phosphorylierungsexperimenten mit bakteriell exprimiertem GST-E47 als potentiellm Substrat sowie in humanen Zellen exprimierte, aktivierte wie auch nicht aktivierte GST-3pK konnte erneut die Fähigkeit von aktiver 3pK illustriert werden, E47 spezifisch zu phosphorylieren (Bild 14B, Spur 3). Da die 3pK-Immunpräzipitate u. U. zusätzliche Kinasen hätten enthalten können, die fälschlicherweise zu den beobachteten Effekten führen, wurden Kinaseassays durchgeführt, in denen nur bakteriell exprimierte und gereinigte Proteine benutzt wurden (Bild 14C). E47 wurde als rekombinantes GST-Fusionsprotein (GST-E47) exprimiert und mit konstitutiv aktiver (3pK TTEE) oder inaktiver (3pK K73M) rekombinanter 3pK

inkubiert. Erneut wurde nur GST-E47, mit einem erwarteten Molekulargewicht von ca. 94 kDa, bei Anwesenheit aktiver 3pK phosphoryliert (Bild 14C, Spur 1), während die inaktive Version dazu nicht in der Lage war (Bild 14C, Spur 2). Die Negativkontrolle demonstrierte zudem, daß der GST-Anteil kein unspezifisches Substrat ist. Ferner äußerte sich das Fehlen des Substrates in dieser Probe in einer höheren Autophosphorylierung (Bild 14C, Spur 3).

Neben 3pK wurde außerdem MK2 in ihrer Fähigkeit untersucht, E47 zu phosphorylieren. E47 und HA-markierte MK2 wurden separat in humanen Zellen exprimiert und für die Kinaseassays in Bild 15A miteinander inkubiert. Genau wie im Fall von 3pK, konnte auch hier nur die aktive MK2 E47 phosphorylieren (Bild 15B, Spur 3). Die gleichen Ergebnisse wurde erzielt, wenn immunpräzipitiertes E47 durch bakteriell exprimiertes GST-E47 ersetzt wurde (Bild 15B, Spur 2). Diese Resultate zeigen deutlich die Fähigkeit der MAPKAP-Kinasen 3pK und MK2, den basischen HLH-Transkriptionsfaktor E47 *in vitro* zu phosphorylieren.

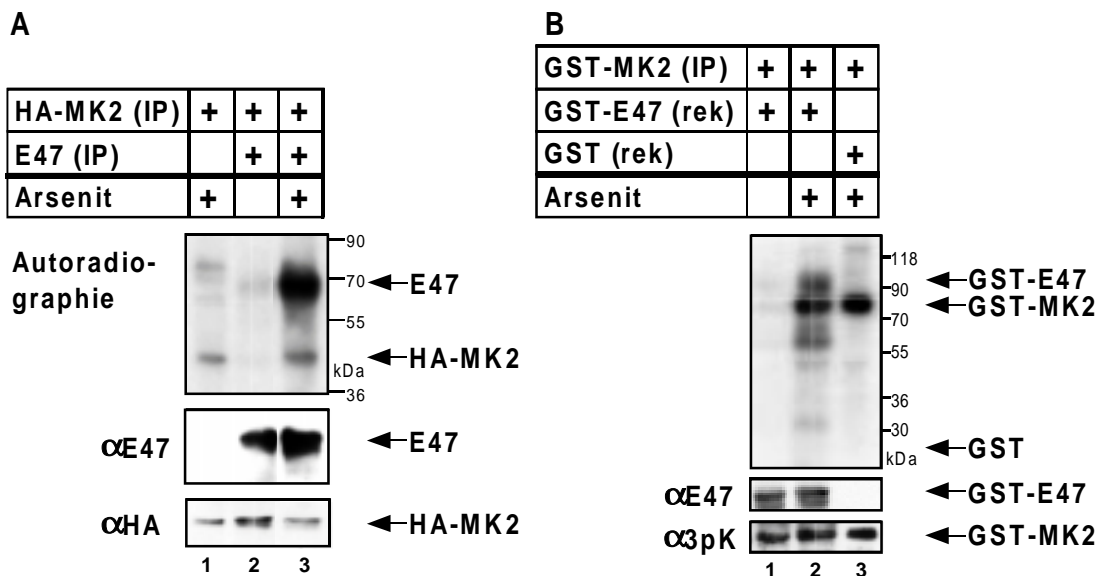


Bild 15: MK2 phosphoryliert *in vitro* den bHLH-Transkriptionsfaktor E47. *In vitro* Kinaseassays mit verschiedenen Quellen von E47. (A) HEK293 wurden mit HA-MK2- oder E47-kodierenden Vektoren transfiziert. Die Kinase wurde durch Arsenit-Stimulation aktiviert. Substrat und Kinase wurden beide mit entsprechendem Antiserum immunpräzipitiert (IP). Die Immunkomplexe wurden unter hochstringenten Bedingungen zweimal gewaschen (RIPA-Puffer inkl. 0,5M NaCl) und für die Kinasereaktion in Gegenwart von [γ^{32} P]-ATP zusammengeführt (B) Arsenit-aktivierte und immunpräzipitierte GST-MK2 wurde zur Kinasereaktion gegeben, in der sich 10 μ g rekombinantes, Sepharose-gebundener GST-E47 bzw. GST befand.

7.3.5 3pK und MK2 reduzieren beide die E47-induzierte transkriptionelle Aktivität

Die Interaktion zwischen den MAPKAP-Kinasen, 3pK und MK2, und dem Transkriptionsfaktor E47 legen nahe, daß die Kinasen in die Regulation der transkriptionellen Aktivität des bHLH-Proteins involviert sein könnten. Beide Proteine werden im Nukleus gefunden (pers. Mitteilung, S. Ludwig) [167], was zur Annahme berechtigt, daß sie zur Modulation der E47-Funktion in der Lage sind.

Um die transkriptionelle Aktivität von E47 zu analysieren, wurde ein Luciferase-Reportergen-Konstrukt mit einem vier E-Boxen enthaltenden Promotor benutzt (4xE-Box, Bild 16), der in der Anwesenheit des Transkriptionsfaktors stark aktiviert wird (Bild 17A, B und C). Mit diesem transienten Transfektionsassay in COS7-Zellen wurde der Effekt von 3pK und MK2 auf die E47-vermittelte Transkription untersucht. Dabei wurden zunehmende Mengen von GST-markierten Versionen der beiden Kinasen cotransfiziert. Um überall gleich viel DNA zu transfizieren, wurde mit einer entsprechenden Menge GST-Expressionsvektor (pEBG) aufgefüllt, was nicht nur transkriptionelle Unterschiede ausgleicht, sondern auch verhindert, daß die erzielten Effekte auf unterschiedliche Mengen translatierten Proteins zurückzuführen sind. Weiterhin wurde durch die Cotransfektion eines β -Galactosidase-Reportergens die Transfektionseffizienz bestimmt und zum rechnerischen Ausgleich benutzt. Da die β -Gal-Werte in allen gemessenen Proben relativ gleich zueinander waren, konnte überdies die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß eventuell apoptotische Ereignisse, die auf das Überladen der Zellen durch die exprimierten Proteine zurückzuführen sind, für das erzielte Ergebnis verantwortlich sind.

Interessanterweise konnte beobachtet werden, daß sowohl 3pK als auch MK2 in der Lage waren, die transkriptionelle Aktivität des überexprimierten E47 auf den 4xE-Box-Promotor in einer Dosis-abhängigen Weise zu reduzieren (Bild 17A und B). Die erzielte Verminderung ging annähernd auf das Niveau der Transaktivierung zurück, das ohne E47 beobachtet wurde. Die Expression der Kinasen allein hatten keinen Effekt auf die Aktivität des 4xE-Box-Promotors (nicht gezeigte Daten), was daraufhin deutet, daß die beobachteten Effekte auf eine kooperative Aktion zwischen den Kinasen und dem Transkriptionsfaktor zurückzuführen ist. Eine Repression des Promotors wurde nicht gefunden, wenn zunehmende Mengen von GST-markierter JNK/SAPK β mit E47 cotransfiziert wurde (Bild 17C), was die Spezifität der Reduktion der Promotoraktivität durch 3pK und MK2 unterstreicht.

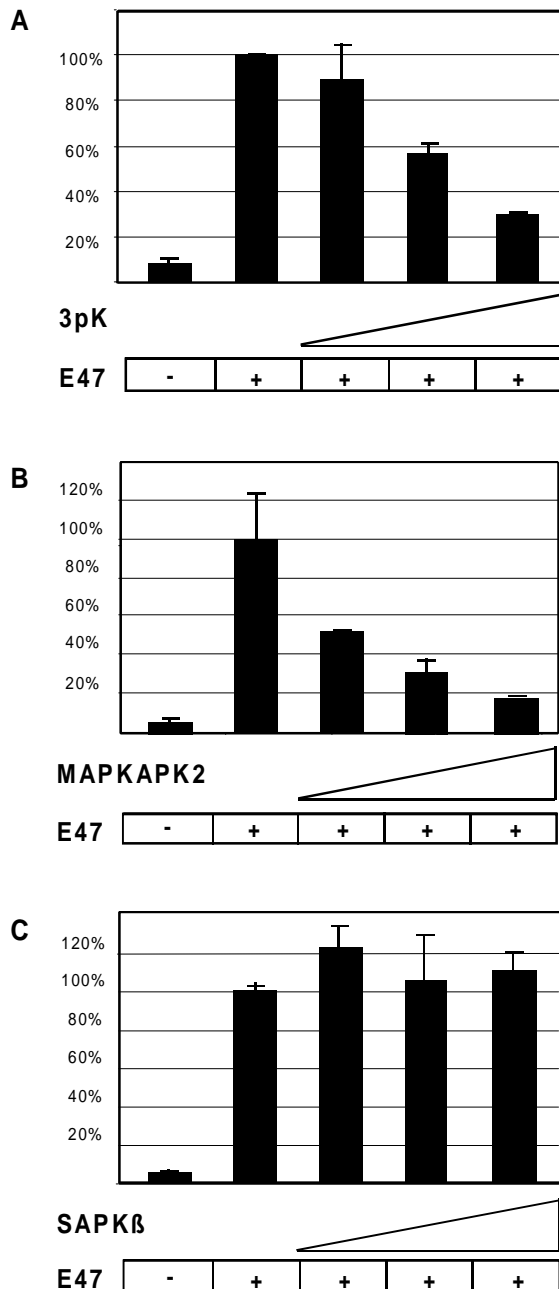
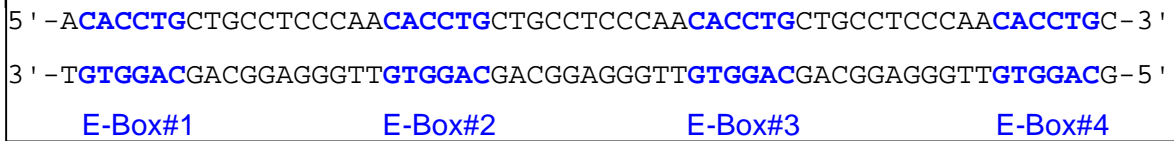


Bild 17: 3pK und MK2 reprimieren die E47-Transaktivierung eines 4xE-Box-Promotors.

Transiente Transfektionsassays in COS7-Zellen mit einem vier E-Boxen enthaltenden Luciferase-Promotor-Konstrukt pGL3-4Eluc (1.25 µg/well). Dieses wurde cotransfiziert mit pcDNA3-E47 (0.75 µg/well), pEBG (GST; 5, 2.5, 1.25, 0 µg/well) und (A) pEBG-3pK (GST-3pK; 0, 1.25, 2.5, 5 µg/well), (B) pEBG-MK2 (GST-MK2; 0, 1.25, 2.5, 5 µg/well) oder (C) pEBG-SAPKβ (GST-SAPKβ; 0, 1.25, 2.5, 5 µg/well). Die Reihenfolge der Balken entspricht der Reihenfolge der Plasmidmengen. Die Luciferase-Aktivitäten wurden mittels der β-Gal-Werte des cotransfizierten β-Gal-Expressionsvektors standardisiert. Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten, die repräsentativ für mindestens drei Assays sind, werden in der Abbildung gezeigt.

8 DISKUSSION

Die bisherigen Erkenntnisse über die MAPKAP-Kinase 3pK umfassen hauptsächlich die Mechanismen der Aktivierung. Hierzu gehörte die Identifizierung der extrazellulären Stimuli, welche zur Aktivierung der Kinase führen sowie die intrazellulären Signalwege, die diese Aktivierung vermitteln [1,31].

Auf der Suche nach der physiologischen Rolle der 3p-Kinase wurden deshalb mittels des *two-hybrid*-Systems neue Interaktionspartner von 3pK gesucht, die Aufschlüsse auf die biologische Funktion der Kinase geben sollten.

8.1 Die Ergebnisse der *two-hybrid screens*

Im Verlauf dieser Arbeit wurden mehrere unabhängige *two-hybrid screens* durchgeführt, die sich in der Wahl der verwendeten cDNA-Bibliothek (Herz- bzw. Jurkat-T-Zell-cDNA-Bibliothek), des benutzten Hefestamms (CG-1945 bzw. Y190) oder in der Art des *bait*-Plasmides (*single-* oder *multicopy*) unterschieden (Tabelle 2). Ein generelles Problem bei *two-hybrid screens* ist das Auftreten sogenannter falsch-positiver Interaktionspartner. Um dieses Problem zu minimieren, wurde im ersten *screen* der Hefestamm CG-1945 mit einer geringeren Expressionsstärke des *lacZ*-Promotors genutzt. Zudem wurde für diese erste Suche in der Herz-Bibliothek ein *singlecopy*-Plasmid zur Expression des *bait*s (pPCH-3pK K73M) eingesetzt. Beide Maßnahmen zusammen führten im ersten *screen* nur zu einer geringen Ausbeute von zwei positiven Klonen, was vermuten ließ, daß aufgrund der schwachen β -Gal-Expression viele Interaktionspartner eventuell nicht gefunden werden konnten. Deshalb wurde in den darauf folgenden *screens* mit Y190 ein Hefestamm mit starkem *LacZ*-Promotor und mit pAS2.1 ein *multicopy*-Vektor verwendet. Diese beiden Änderungen stellten sich als richtige Mittel heraus, da in der zweiten Suche viele neue *bona fide* 3pK-Interaktionspartner identifiziert werden konnten (Tabelle 2). Die geringe Ausbeute im dritten *screen*, läßt sich vermutlich auf die schlechtere Qualität der Jurkat-Bibliothek zurückführen (Tabelle 2). Im Gegensatz zu der erstmalig amplifizierten Herz-cDNA-Bank war die ursprüngliche Herkunft der Jurkat-Bibliothek und die Anzahl ihrer Amplifikationen nicht mehr zu ermitteln, wodurch die gleichmäßige Präsenz aller Klone in dieser cDNA-library nicht mehr unbedingt gewährleistet war.

Eine weitere Maßnahme die Anzahl der falsch-positiven Klone möglichst niedrig zu halten war der Einsatz von 3-AT in den Selektionsplatten. Dieses sollte schwache *two-hybrid*-Interaktionen verhindert, die eventuell durch die nicht ganz abgeschaltete HIS3-Expression

zustände kommen konnten. Viele Interaktionspartner in dieser Arbeit wurden mehrfach gefunden und sind somit gute Kandidaten für 'wahre' Wechselwirkungspartner, auch wenn die Verifikation mit anderen Methoden noch aussteht. Doch auch eine geringe Stückzahl identifizierter *two-hybrid*-Partner widerspricht nicht unbedingt der Existenz der Wechselwirkung, wie einige Beispiele beweisen; so ist von p38 bzw. dem humanen Homolog CSBP1 schon seit längerem bekannt, 3pK zu phosphorylieren und zu aktivieren [31,50], dennoch wurden hier nur zwei CSBP1-Klone gefunden (Tabelle 2). Ebenso konnte die 3pK-E47-Interaktion in dieser Arbeit mit mehreren verschiedenen Methoden bestätigt werden, genau wie die Interaktion mit p88, dem Repressor des PKR (*protein kinase, RNA-dependent*)-Inhibitors (→ 9.2.7), von dem erfolgreich *in vitro* Coimmunpräzipitationsexperimente gemacht wurden (nicht aufgeführte Daten).

8.2 Die MAPKAP-Kinasen 3pK und MK2 als neu identifizierte Polycomb-Komplex-assoziierte Kinasen und potentielle Regulatoren von PcG-Funktionen

Nachdem 3pK auch im Nukleus von Zellen zu finden ist, konnte man erwarten, auch nukleäre Substrate der Kinase zu finden. In zwei *two-hybrid screens* wurden mehrere, unterschiedlich lange cDNA-Klone des Polycomb-Proteins, *human polyhomeotic 2* (HPH2), als 3pK-Interaktionspartner identifiziert (Bild 4A). Proteine des PcG-Komplexes sind als transkriptionelle Repressoren bekannt und dementsprechend nukleär lokalisiert. Die Tatsache, daß HPH2 bereits im ersten *screen* mit dem schwach *lacZ*-exprimierenden CG-1945-Stamm gefunden wurde (Tabelle 2), unterstreicht die Stärke der Interaktion mit 3pK und damit deren Bestehen. 3pK bindet an das designierte vollständige HPH2-Protein HPH2 (C-443 aa), hat aber zum kleinsten Fragment, HPH2 (C-73 aa), mit Abstand die höchste Bindeaffinität (Bild 4B, C). Eine *two-hybrid*-Interaktion mit HPH2 (C-73 aa) wurde außerdem auch für die 3pK-homologe MK2 festgestellt (nicht aufgeführte Daten). Die an die MAPKAP-Kinasen bindende Region mit α -helikaler Struktur ist außerdem für die HPH2-HPH1/2-Hetero- bzw. Homodimerisierung notwendig und auch ein Bestandteil der Interaktionsdomäne für die Bmi1-Assoziation (Bild 4A). Sie beinhaltet zudem die sogenannte HDII/SEP-Domäne. Es ist anzunehmen, daß dieses 73 Aminosäuren-Fragment wahrscheinlich nicht mehr die gesamte HPH-Dimerisierungssequenz umfaßt, wodurch 3pK und MK2 freien Zugang zu HPH2 bekommen. Eine weitere Erklärung könnte sein, daß das Falten des vollständigen HPH2-Proteins die Zugänglichkeit zur HDII/SEP-Domäne erschwert. Dieser Domäne, die auch in verschiedenen eukaryotischen Signalproteinen vorkommt, wurde außerdem eine Partizipation in Signaltransduktionsereig-

nissen unterstellt [97]. Die Interaktion dieses Motivs mit den *signalling*-Kinasen 3pK und MK2, die in mehreren Signaltransduktionsprozessen involviert sind, unterstützen diese Vermutung.

Die unabhängige Verifikation der 3pK-*two-hybrid*-Interaktion mit HPH2 konnte mit *in vivo* Coimmunpräzipitationsexperimenten bestätigt werden (

Bild 5). In unabhängigen Präzipitationen von 3pK mit teilweise unterschiedlichen Antikörpern konnte HPH2, an 3pK assoziiert, aus den Lysaten isoliert werden. Dabei konnten für die verschieden langen HPH2-Fragmente erneut unterschiedliche Bindeaffinitäten zur Kinase festgestellt werden, die mit den quantitativen *two-hybrid*-Experimenten übereinstimmen (Bild 4C).

Die Entdeckung, daß mit dem Protoonkoprotein Bmi1 ein zweites Mitglied der Polycomb-Gruppe mit beiden MAPKAP-Kinasen copräzipitierte, lieferte einen weiteren wichtigen Anhaltspunkt dafür, daß die Kinasen Bestandteile von PcG-Komplexen sind.

Bmi1 wurde schon vor längerem als Phosphoprotein beschrieben [80,90]. Dennoch war bisher keine Bmi1-Kinase bekannt. In dieser Arbeit wurden 3pK und MK2 als die ersten Kinasen identifiziert, die in der Lage waren, Bmi1 *in vitro* zu phosphorylieren, womit auch ein erster Hinweis einer funktionellen Verbindung zwischen den Interaktionspartnern erbracht wurde.

Eine Phosphorylierung von HPH2 ist unbekannt; auch hier gelang keine 3pK- bzw. MK2- *in vitro* Phosphorylierung des längsten Klons (nicht aufgeführte Daten), laut Gunster *et al.* das vollständige HPH2-Protein [91]. Allerdings beschreibt ein neuer Eintrag (1999) in der NCBI Datenbank (NCBI Accession U81491) ein murines *polyhomeotic 2*-Homolog, Mph2, was mit einem offenen Leseraster von 3832 Basenpaare ein 850 Aminosäuren langes Protein kodiert (→ 9.2.1). Das könnte eventuell darauf hindeuten, daß das von Gunster *et al.* beschriebene 432 Aminosäuren umfassende HPH2 eventuell nicht das komplette Protein darstellt, sondern daß HPH2 ähnlich groß wie jenes neu identifizierte Maus-Homolog sein könnte. Auch HPH1 ist mit 1013 Aminosäuren von vergleichbarer Größe wie das entsprechende Maus-Homolog Mph1 [90,91]. Das wiederum könnte die nicht gelungene Phosphorylierung von HPH2 durch die MAPKAP-Kinasen erklären. Tatsächlich finden sich im N-terminalen Ende dieses 850 Aminosäuren langen Mph2-Proteins drei potentielle RXXS-3pK/MK2-Phosphorylierungsstellen.

In einem allgemein akzeptierten Repressionsassay konnte die repressive Funktion vieler PcG-Proteine auf die Genexpression in transienten Transfektionsexperimenten gezeigt werden [165,166,168]. Den Mechanismus der Repression durch individuelle PcG-Mitglieder darf man sich wie im Rekrutierungsmodell beschrieben vorstellen (→ 3.6.4): einzelne PcG-Proteine, die an den Promotor des entsprechenden Zielgens binden, sind danach in der Lage, andere Mitglieder dorthin zu rekrutieren und somit einen funktionellen Repressionskomplex zu bilden.

Da PcG-Proteine höchst wahrscheinlich auf der Ebene der Chromatinstruktur agieren, haben Alkema *et al.* dieses Repressionsassay verbessert, indem sie ein chromosomal integriertes Promotor-Reporter-Gen benutzen [96]. Dieses System kam in dieser Arbeit zur Verwendung, um die potentielle Fähigkeit von nicht aktivierter und DNA-gebundener 3pK als neu identifiziertem PcG-Mitglied zu analysieren, durch das Rekrutieren anderer PcG-Proteine einen funktionellen repressiven PcG-Komplex zu rekonstituierten. Die dabei beobachtete vierfache Repression durch ein Fusionsprotein aus GAL4-DNA-Bindedomäne und 3pK demonstrierte, daß die Kinase, ähnlich wie Bmi1 [96], tatsächlich dazu in der Lage ist, über einen solchen PcG-charakteristischen Mechanismus ein chromatin-integriertes Reporter-gen zu reprimieren (→ 7.2.5). Das bestätigt erneut die Assoziation dieser MAPKAP-Kinase mit dem PcG-Komplex. Darüber hinaus wird aber auch eine potentielle Funktion präsentiert, wonach nicht aktivierte und an die DNA assoziierte 3pK durch die Rekrutierung anderer PcG-Mitglieder auf die Transkription von Zielgenen reprimierend wirkt.

Bisher wurde der Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und PcG-Funktion noch nie untersucht. Die Phosphorylierung einzelner PcG-Proteine könnten allerdings einen Mechanismus darstellen, um die repressive Funktion des Komplexes zu modulieren. Eine erste Studie, die den Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und PcG-Regulation untersuchte, zeigte eine direkte Korrelation zwischen Chromatin-Dissoziation von BMI1 und dessen Phosphorylierungsstatus in einer Zellzyklus-abhängigen Weise. Hypophosphoryliertes BMI1 aus der G1/S-Zellzyklus-Phase wird vor allem spezifisch Chromatin-assoziiert gefunden, während phosphoryliertes BMI1 aus der G2/M-Phase hauptsächlich nicht Chromatin-gebunden vorliegt [105] (→ 3.6.5).

3pK und MK2 wurden im Laufe dieser Arbeit als Komponenten von PcG-Komplexen und als Bmi1-Kinasen identifiziert. Es bietet sich daher die faszinierende Möglichkeit, daß die Kinasen neue Regulatoren dieser phosphorylierungsabhängigen PcG-Komplex/Chromatin-Interaktion sein könnten, womit sie auch in die Kontrolle der PcG-Zielgene involviert wären.

So ist vorstellbar, daß mit der Phosphorylierung nicht ausschließlich eine Zellzyklus-abhängige Dissoziation von PcG-Komplexen von der DNA stattfindet, sondern daß die Phosphorylierung (über MAPKAP-Kinasen) einen generellen Mechanismus darstellt, in dem solche inaktivierten Gene durch die Dissoziation der PcG-Komplexe noch einmal in einen aktiven oder aktivierbaren Zustand überführt würden. In ontogenetischen Prozessen z.B., in denen die PcG-Proteine als Teil des Zellgedächtnisses an Zielgene binden, wäre eine derartige Regulation denkbar.

Im speziellen Fall der Kontrolle des INK4a-Lokus durch das PcG-Protein BMI1 ist das folgende Szenario denkbar: BMI1 reprimiert die Tumorsuppressoren und Zellzyklus-

Inhibitoren p16 und p19^{ARF}. Damit hat BMI1 eine positive Funktion in proliferativen Prozessen, was durch sein onkogenes Potential auch dokumentiert ist [81,82]. Die Phosphorylierung durch ihrerseits phosphorylierte und dadurch aktivierte Kinasen würde, entsprechend der Beobachtung von Voncken *et al.* [105], zur Dissoziation von BMI1 (und dem restlichen PcG-Komplex) von diesen Zielgenen führen. Damit käme die wachstumshemmende Wirkung von p16 und p19^{ARF} zur Geltung. 3pK und MK2 hätten also für diesen Fall eine negative Auswirkung auf das Wachstum, in pathologischen Prozessen, in denen PcG-Proteine involviert sind, eventuell auf die Tumorprogression. Eine Aktivierung von 3pK bzw. von MK2 müßte dementsprechend ähnliche Folgen wie das Fehlen bzw. die Reduktion von BMI1 haben, z.B. zu einem Zellzyklus-Arrest und weiter zur Inhibition des Zellwachstums führen, was eventuell Voraussetzung für Differenzierungsprozesse sein könnte.

Die Beobachtung, daß die Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung von 3pK bzw. MK2 durch *upstream* Kinasen zur Translokation der MAPKAP-Kinasen aus dem Nukleus führt (pers. Mitteilung, S. Ludwig) [167], und damit mit der Dissoziation der PcG-Proteine von der DNA korreliert, würde einen solchen Mechanismus unterstützen.

Für eine Annahme, daß 3pK eine wachstumshemmende Funktion hat, könnte sprechen, daß die Kinase überdurchschnittlich hoch in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, wo auch die dokumentierten proliferativen Defekte in *Bmi1*-defizienten Mäusen beobachtet werden.

Die bisherigen Daten lassen sich zu folgendem Modell zusammenfassen: 3pK oder MK2 binden an DNA-assoziiertes HPH2, das als eine Art *docking protein* für das Rekrutieren des kompletten PcG-Komplexes fungiert, wodurch auch 3pK bzw. MK2 mit BMI1 zusammentreffen. Im inaktivierten Zustand sind sie Bestandteile dieses Komplexes, der die Transkription des Zielgens unterdrückt. Sobald aber die MAPKAP-Kinasen aktiviert werden, führt dies nicht nur zu einer Dissoziation der Kinasen vom PcG-Komplex und einer damit zusammenhängenden Translokation aus dem Kern, sondern auch zur davor stattfindenden Phosphorylierung von BMI1. Damit wäre die Loslösung des PcG-Komplexes vom Chromatin verbunden. Die beiden MAPKAP-Kinasen würden somit einen Teil eines generellen *silencing*-Mechanismus darstellen, in dem eine Phosphorylierung durch die Kinasen die Repression aufheben könnte, während ein nicht aktiviertes Protein umgekehrt die Repression der Zielgene durch PcG-Proteine erlauben würde.

Als integrative Elemente könnten 3pK, die über drei MAP-Kinase-Signaltransduktionswege aktiviert werden kann, und MK2, die nur über p38 aktivierbar ist, erste Verbindungen darstellen, wie PcG-Proteinkomplexe und die damit verbundene Genexpression möglicherweise von extrazellulären Stimuli durch das MAPK-*signalling network* reguliert werden.

8.3 Die MAPKAP-Proteine 3pK und MK2 – neu identifizierte E47-Kinasen und Repressoren von E47-Homodimer-abhängiger Transaktivierung

Mit dem basischen HLH-Transkriptionsfaktor E47 konnte ein weiterer im Zellkern lokalisierter 3pK- bzw. MK2-Interaktionspartner identifiziert werden. Obwohl ursprünglich von diesem E-Protein lediglich ein Klon in den *two-hybrid screens* gefunden wurde, dessen Bindeaffinität im Vergleich zu der mit HPH2 gefundenen dazu noch etwas schwächer ausfiel, konnte die Interaktion mit verschiedenen unabhängigen Methoden dennoch mehrfach verifiziert werden (→ 7.3). Mehrere unabhängig durchgeführte *in vitro* als auch *in vivo* Experimente, u.a. *in vitro* Kinaseassays, bestätigten die Interaktion zwischen 3pK bzw. dessen Homolog MK2 und dem Transkriptionsfaktor.

Tatsächlich ist von vielen bHLH-Proteinen bekannt, daß sie durch posttranslationale Phosphorylierungen reguliert werden, was sich auf DNA-Bindung und Transaktivierung auswirken kann. E47, im Speziellen, hat mit all seinen Tyrosin-, Serin- und Threonin-Aminosäuren mehr als 100 potentielle Phosphorylierungsstellen und liegt auch in vielen Zelltypen phosphoryliert vor [148,149]. Eine N-terminal gekürzte Version von E47 (E47 (Δ 1-491 aa)) ist nur an Serin-Resten phosphoryliert. Bisher weiß man nur wenig über die Identität der E47-Kinasen. E47 wird *in vitro* von PKA und CKII phosphoryliert. Diese Kinasen wurden ursprünglich ausgewählt, weil entsprechende Kinase-spezifische Phosphorylierungsstellen in mehreren Klasse II bHLH-Proteinen wie auch in E47 gefunden wurden [143,146,169]. Erstaunlicherweise können manche PKA-Substrate, wie z.B. der Transkriptionsfaktor CREB, von MAPKAP-Kinasen an PKA-Stellen phosphoryliert werden, was darauf hin deutet, daß diese Kinasen überlappende Präferenzen für Phosphorylierungssequenzen haben.

Doch im Gegensatz zu PKA und CKII wurde 3pK nicht durch eine relativ unsichere Suche nach Phosphorylierungssequenzen, sondern durch eine *in vivo* Interaktion als E47-Kinase identifiziert (Bild 10, Bild 11). Weiterhin konnte neben 3pK auch die homologe MK2 mit E47 unter hoch stringenten Bedingungen aus Zellysaten copräzipitiert werden, was einerseits die Existenz der Interaktion zwischen E47 und Mitgliedern der MAPKAP-Kinasefamilie erneut unterstreicht und weiterhin eine hohe Bindeaffinität demonstriert (Bild 12). Darüber hinaus scheint die Bindung der Kinasen zu E47, funktionelle Relevanz zu haben, denn beide Kinasen waren in verschiedenen Kinaseassays in der Lage, E47 *in vitro* zu phosphorylieren (Bild 14, Bild 15). Die E47-Aminosäuresequenz zeigt vier potentielle Konsensusmotive für eine Phosphorylierung durch MAPKAP-Kinasen, wovon sich drei im extremen N-Terminus befinden. Das vierte Motiv entspricht der von Sloan *et al.* erwähnten Sequenz um Ser529, der designierten PKA-Phosphorylierungsstelle (Bild 13). Die Phosphorylierung dieser Stelle. die

sich in unmittelbarer Nähe zur basischen DNA-Bindedomäne befindet [148], erhöht zusammen mit Ser514 die lokale negative Ladung dieser Region. Damit wird das Binden von E47-Homodimeren in Nicht-B-Zellen verhindert, während die DNA-Bindung von Heterodimeren nach wie vor möglich ist. In B-Zellen dagegen ist diese Stelle nicht phosphoryliert, womit es E47-Homodimeren gestattet ist, an die DNA zu binden und diesbezüglich eine B-Zell-spezifische Genexpression in Gang zu setzen. Ein daraus abgeleitetes Modell fordert eine Hypophosphorylierung von E47 als Voraussetzung, um aus einer lymphoiden Vorläuferzelle eine B-Zelle zu entwickeln [148].

Ähnliche Ergebnisse beobachtete man bei der Regulation der DNA-Bindung von Max-Homodimeren, die durch die Phosphorylierung eines bestimmten Serinrestes in einer entsprechenden Region, wie die in E47, verhindert werden konnte [170]. Dies legt einen wichtigen, generellen Mechanismus nahe, bei dem eine Phosphatmodifikation in der unmittelbaren Nachbarschaft der basischen DNA-Bindestelle die Kontrolle der DNA-Bindung von bHLH-Dimeren und damit letztendlich auch die Regulation ihrer spezifischen Funktionen übernimmt.

Nachdem die Entscheidung, in B- oder T-Zellen zu differenzieren also scheinbar maßgeblich von der Phosphorylierung einer Aminosäuresequenz abhängt, die ein 3pK- bzw. MK2 Phosphorylierungsmotiv enthält, könnte man sich eine entscheidende Beteiligung einer dieser MAPKAP-Kinasen beim Entscheidungsprozeß von lymphoiden Vorläuferzellen in dieser frühen entwicklungsbiologischen Phase vorstellen. Die Aktivität dieser Kinasen würde also eine solche lymphoide Vorläuferzelle dazu bringen, in eine T-Vorläuferzelle zu differenzieren, während die Inaktivierung die Entwicklung zu B-Zellen favorisieren würde.

Generell könnte man vermuten, daß eine Phosphorylierung durch MAPKAP-Kinasen die DNA-Bindung von E47-Heterodimeren bevorzugt, wodurch prinzipiell eine nicht-B-Zell-spezifische Genexpression und –differenzierung gefördert würde, was in dieser Weise auch schon von Johnson postuliert wurde [143]. 3pK und MK2 wären also negative Regulatoren einer E47-Homodimer-abhängigen Genexpression, während sie umgekehrt positive Modifikatoren von E47-Heterodimer-abhängiger Transkription darstellen müssten. Gewebespezifische bHLH-Proteine, wie die MEFs, könnten zusammen mit E47 somit zu zelltypspezifischer Genexpression und –differenzierung führen.

Die Interaktion der beiden MAPKAP-Kinasen mit E47 scheint tatsächlich die Funktion des Transkriptionsfaktors modulieren zu können. In transienten Transfektionsexperimenten mit einem E-Box-gesteuerten Promotor konnte in der Gegenwart von steigenden Mengen der Kinasen eine konzentrationsabhängige Repression der transkriptionellen Aktivität von E47

beobachtet werden (Bild 17). Bei diesen Experimenten wurde davon ausgegangen, daß es durch die extrem hohe Expression des E-Proteins hauptsächlich zur Formation von E47-Homodimeren kommt und eventuell mit endogenen bHLH-Proteinen gebildete Heterodimere vernachlässigbar sind.

Diese Ergebnisse decken sich mit einem früheren Report, bei dem eine Überexpression der Caseinkinase II (CKII) eine dramatische Reduktion der von E47-Homodimeren aktivierten Transkription zur Folge hatte [143].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß 3pK und MK2 als neue E47-Kinasen identifiziert wurden, die den Transkriptionsfaktor mit hoher Affinität binden und dessen, durch Homodimer-vermittelte, transkriptionelle Aktivität reprimieren können. Diese neuen Daten präsentieren eine neue Verbindung zwischen dem bHLH-Protein E47 und den MAP-Kinasen-Signalwegen und legen nahe, daß MAPK-aktivierte Proteinkinasen Regulatoren von E47-kontrollierter Genexpression und –differenzierung darstellen können.

8.4 Abschließende Überlegungen und Beurteilungen

Beide hier untersuchten Kinasen, 3pK und MK2, haben im Hinblick auf diese neuen Interaktionspartner ein überlappendes Substratspektrum. Entweder liegen diese Kinasen also in der Zelle redundant vor, oder aber sie teilen sich diese Aufgaben gewebe- bzw. zelltypspezifisch. Für das letztere spricht, daß 3pK zwar ubiquitär in allen analysierten Geweben und Zelllinien vorkommt, aber in Skelett- und Herzmuskel sowie in T-Zellen hoch exprimiert wird. Man kann also darüber spekulieren, ob 3pK eventuell speziell in muskelspezifischem Gewebe oder in T-Zellen die E47-kontrollierte Genexpression und Differenzierung reprimiert.

Neben dieser räumlichen Trennung ist auch eine zeitliche vorstellbar. Bisher ist über die Expression beider Kinasen in verschiedenen Entwicklungsphasen nur wenig bekannt. Eventuell sind diese Kinasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert und biologisch aktiv. Die vielen Implikationen sowohl von PcG-Proteinen als auch von E47 in entwicklungsbiologische Prozesse, würden für eine solch frühe Expression der einen oder anderen MAPKAP-Kinase in der Ontogenese sprechen.

Die MAPKAP-Kinasen 3pK und MK2 wurden in dieser Arbeit als auf transkriptioneller Ebene wirkende Regulatoren identifiziert: im Zusammenhang mit Proteinen der Polycomb-Gruppe wurde die Phosphorylierung durch die MAPKAP-Kinasen mit der Reaktivierung ausgeschalteter Gene in Verbindung gebracht. Im Fall der Downregulation der von BMI1

kontrollierten Zellzyklus-Inhibitoren und Tumorsuppressoren p16 und p19^{ARF}, hätte die Phosphorylierung durch 3pK bzw. MK2 also einen Proliferations-hemmenden Einfluß, was die Voraussetzung für eine anschließende Differenzierung darstellen würde.

Im Zusammenhang mit dem Interaktionspartner E47 hätte die Phosphorylierung durch die untersuchten MAPKAP-Kinasen eine negative Wirkung auf E47-Homodimer-abhängige Genexpression und umgekehrt eine positive Geltung auf die E47-Heterodimer-gebundene Transkription.

Beide aus den Untersuchungen der Interaktionspartner resultierenden Hypothesen würden also eine Beteiligung der MAPKAP-Kinasen 3pK und MK2 in Differenzierungsprozessen nahelegen.

Neben der Aufklärung neuer Signalwege (Bild 18) ist somit vor allem ein erster Aufschluß über die physiologische Rolle der Kinasen als transkriptionelle Regulatoren vermutlich in Differenzierungsprozessen gelungen.

MAP-Kinasekaskaden

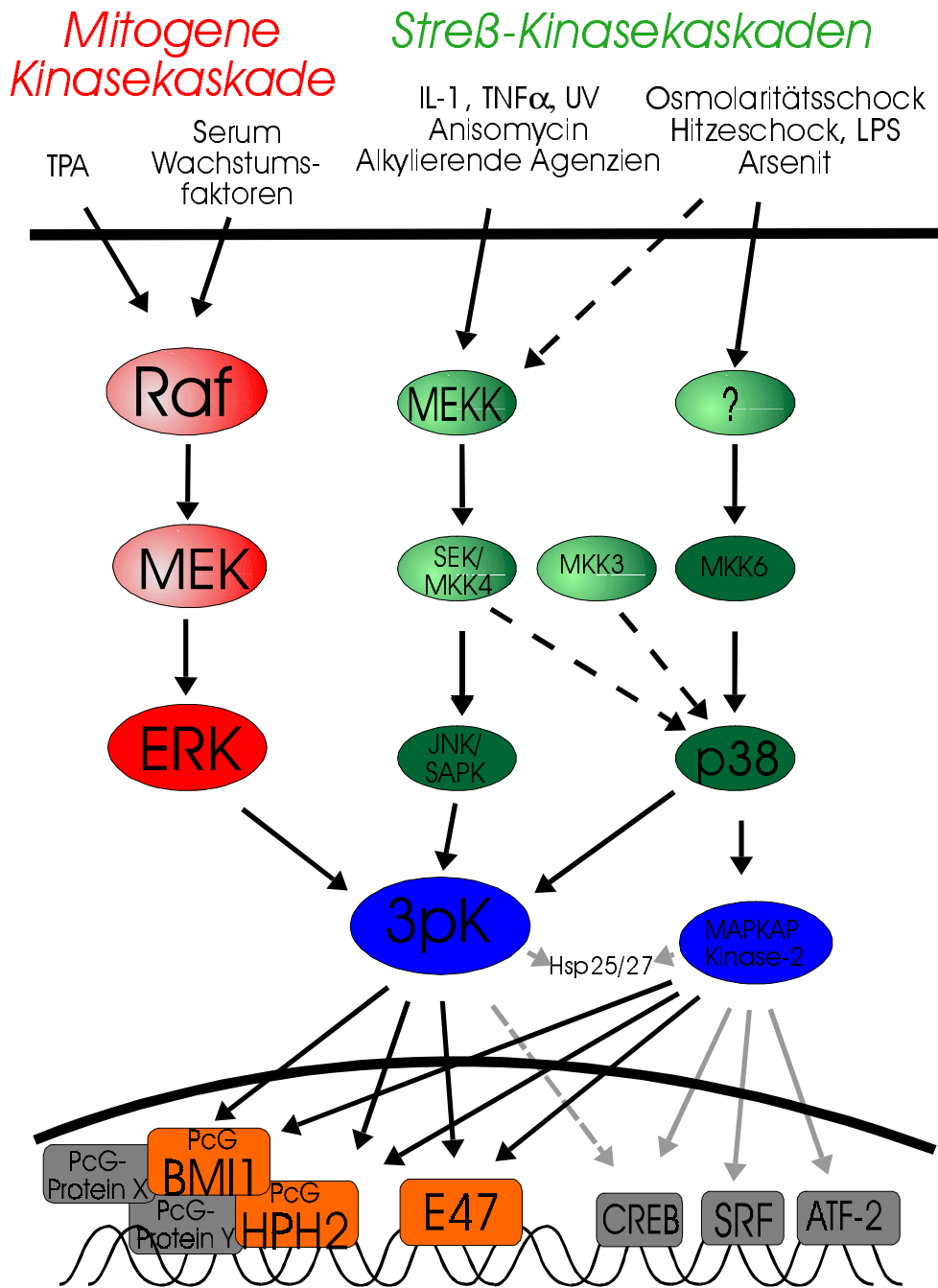


Bild 18: Zusammenfassende Darstellung der 3pK- und MAPKAPK2-aktivierenden MAPK-Kinasekaskaden inklusive der neuen Interaktionen zwischen den MAPKAP-Kinasen und den identifizierten Substraten.

9 ANHANG

9.1 Abkürzungen

β-Gal	β-Galactosidase
μE	μ Enhancer (immunoglobulin heavy chain gene enhancer)
κE	κ Enhancer (immunoglobulin light chain gene enhancer)
3pK	Chromosom 3p-Kinase
3'UTR	3' untranslated region
A. bidest.	Aqua bidestillata
aa	Aminosäuren
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basic helix-loop-helix
Bmi1	<u>B</u> cell-specific <u>M</u> o- <u>M</u> LV <u>i</u> ntegration site <u>1</u> factor
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDS	coding sequence
cfu	colony forming unit
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CKII	Casein kinase II
CR	conserved region
CREB	cAMP-response element-binding protein
CSBP	CSAID™ [cytokine suppressive anti-inflammatory drug] binding protein
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerin
DB	DNA-Bindedomäne
DCM	Dichlormethan
(d)dNTP	(Di)Desoxynukleotidtriphosphat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal regulated kinase
FCS	fetal calf serum
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
HLH	helix-loop-helix
ID	inhibitor of differentiation/DNA-binding
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
JIP	JNK interagierendes Protein
KIT	tyrosin Kinase

kb	Kilobasen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
kompl.	komplett
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKAP-K	MAPK aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPKK Kinase
MCK	muscle creatin-kinase
MEF	myogenic regulatory factor
MEK	MAPK/ERK aktivierende Kinase
MEKK	MAPK/ERK aktivierende Kinase Kinase
MK2	MAPKAP-Kinase 2
MKK	MAP Kinase Kinase
MNK	MAPK-interacting kinase
MSK1	Mitogen- and stress-activated protein kinase-1
MSZ	Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
NP40	Nonidet 40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PcG	Polycomb-Gruppe
PCR	polymerase chain reaction
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRAK	p38-regulated/activated protein kinase
PRE	Polycomb-response element
RBD	Ras Bindedomäne
RK	reaktivierende Kinase
rpm	rounds per minute
RSK	ribosomal S6 kinase
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAPK	Streß-aktivierte Proteinkinase
Ser	Serin
SH	Src Homologie
SLS	Natrium-Lauroylsarcosin
Sos	son of sevenless
TA	transaktivierende Domäne
Trp	Tryptophan
trxG	trithorax-Gruppe
Tyr	Tyrosin
u. U.	unter Umständen
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/Vol	Volumen
w	weight, Gewicht
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

9.2 Informationen zu den 3pK-two-hybrid-Interaktionspartnern

Für jeden two-hybrid-3pK-Interaktionspartner sind die folgenden Informationen dokumentiert:

- die DNA-Sequenz der gefundenen Klone, wobei die kodierende Sequenz dick gedruckt ist;
- die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz;
- das Ergebnis der NCBI-Genbanksuche, u.U. wurden mehrere Sequenzvergleiche dargestellt
- sowie Informationen zu diesen Sequenzen aus der Datenbank.

9.2.1 HPH2 –Human polyhomeotic 2

- **DNA-Sequenz des längsten Klons (HPH2 (C-209 aa))**

```
1 tttgcctata agttcaagcg ttccaagcgc ttctgttcca tggcttgtgc aaagaggtac
61 aacgtgggat gcaccaaacg ggtgggactt ttccactcag accggagcaa gctgcagaag
121 gcaggagctg cgaccacaaa ccgccgtcgg gccagcaaag ccagtctgcc accacttacc
181 aaggatacca agaagcagcc aacaggcact gtgccctttt cggttactgc tgctttgcag
241 ctaacacaca gccaggaaga ctccagccgt tgctcagata actcaagcta tgaggaacct
301 ttgtcaccca tctcagccag ctcatctact tcccgcggc gacaaggcca gcgggacctg
361 gagtccccg acatgcatat gcgggacctg gtgggcatgg gacaccactt cctgccaagt
421 gagcccacca agtgggaatgt agaagacgtc tacgaattca tccgctctct gccaggctgc
481 caggagatag cagaggaatt ccgtgccag gaaatcgacg ggcaagccct gctgctgctc
541 aaggaggacc acctgatgag cgccatgaac atcaagctgg ggcccgcctt gaagatctac
601 gcccgcatac gcatgctcaa ggactcctag ggctggtggc agccaggatt ctggcccagg
661 gcgcctcctc ccgactgagc agagccagac agacattcct gaggggcca gaaatggggc
721 cggttggagg gcaggggctc tccctagggg catagctggt gaggaggtct gggcacctcc
781 tccatggctc tcaggggctt ttcatttctg tgggaggggc agagaggtag gtggcacaga
841 agatggggct ttatgcttgt aaatattgat agcactggct tccctcaaag tcccaatact
901 ctagcccgcg tctcttcccc ttttctgtgc ccccattttc cagggggtat atggtcaggg
961 ctcccacaac tgagttgggt tacttcaagg gcagccagca ggctctggatg gaggcctaga
1021 aagcccttgc ctcccttctt cccacttctt tctccaggcc tggttaactc ttcggttgc
1081 agcttctccc ccttcagcct gtttctgcag cagccagggt tctccccctc acaccctctg
1141 cagggtggaga gagagaagct gggcccagcc ggggtgcctgc tggcacagac gccttaacgc
1201 tgtgtgtatg actgtgtgac tgtgtgggag cctggactga cagataggcc aagggtact
1261 ctctggc
```

- **Aminosäuresequenz**

```
1 FAYKFKRSKR FCSMACAKRY NVGCTKRVLG FHSDRSKLQK AGAATHNRRR ASKASLPPLT
61 KDTKKQPTGT VPLSVTAALQ LTHSQEDSSR CSDNSSYEPP LSPIASASST SRRRQQRDL
121 ELPDMHMRDL VGMGHFLPS EPTKWNVEDV YEFIRSLPGC QEIAEEFRAQ EIDGQALLLL
181 KEDHLMASAMN IKLGPALKIY ARISMLKDS
```

- **Ergebnis der NCBI-Genbank-Suche**

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
A) refNM_004427.1 Homo sapiens early development regulator ...	2309	0.0
B) gbU81491MMU81491 Mus musculus polyhomeotic (mPh2) mRNA, c...	757	0.0

A) refNM_004427.1 Homo sapiens early development regulator 2 (homolog of polyhomeotic2) (EDR2) mRNA >gi|1877500|gb|U89278|HSU89278 Human polyhomeotic 2 homolog (HPH2) mRNA, complete cds
Length = 2555
Score = 2309 bits (1165), Expect = 0.0
Identities = 1251/1268 (98%), Gaps = 10/1268 (0%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1 tttgcctataagttcaagcgttccaagcgttctgttccatggcttgtgcaaaagaggtac 60
|||||
Sbjct: 687 tttgcctataagttcaagcgttccaagcgttctgttccatggcttgtgcaaaagaggtac 746

Query: 61 aacgtgggatgcaccaaacgggtgggacttttccactcagaccggagcaagctgcagaag 120
|||||
Sbjct: 747 aacgtgggatgcaccaaacgggtgggacttttccactcagaccggagcaagctgcagaag 806

Query: 121 gcaggagctgcgaccacaaccgccgtcgggccagcaagccagtctgccaccacttacc 180
|||||
Sbjct: 807 gcaggagctgcgaccacaaccgccgtcgg-cagcaagccagtctgccaccacttacc 865
```

Query: 181 aaggataccaagaagcagccaacaggcactgtgcccccttcgggtactgctgctttgcag 440
Sbjct: 866 aaggataccaagaagcagccaacaggcactgtgcccccttcgggtactgctgctttgcg- 924

Query: 241 ctaacacacagccaggaagactccagccgttgctcagataactcaagctatgaggaacc 300
Sbjct: 925 -taacacacagccaggaagactccagccgttgctcagataactcaagctatgaggaacc 983

Query: 301 ttgtcaccatctcagccagctcatctacttcccgcggcgacaaggccagcgggacctg 360
Sbjct: 984 ttgtcaccatctcagccagctcatctacttcc-gccggcgacaaggccagcgggacctg 1042

Query: 361 gagctccccgacatgcatatgcccggactgggggcatgggacaccacttctgccaagt 420
Sbjct: 1043 gagctccccgacatgcatatgcccggactgggggcatgggacaccacttctgccaagt 1102

Query: 421 gagcccaccaagtggaatgtagaagcgtctacgaattcatccgctctctgccaggctgc 480
Sbjct: 1103 gagcc-accaagtg-aatgtagaagcgtctacgaattcatccgctctctgccaggctgc 1160

Query: 481 caggagatagcagaggaattccgctgccaggaaatcgacgggcaagccctgctgctgctc 540
Sbjct: 1161 caggagatagcagaggaattccgctgccaggaaatcgacgggcaagccctgctgctgctc 1220

Query: 541 aaggaggaccacctgatgagcgccatgaacatcaagctggggccccgacctgaagatctac 600
Sbjct: 1221 aaggaggaccacctgatgagcgttatgaacatcaagctggggccccgacctgaagatctac 1280

Query: 601 gcccgcatcagcatgctcaaggactcctagggctggggcagccaggattctggccagg 660
Sbjct: 1281 gcccgcatcagcatgctcaaggactcctagggctggggcagccaggattctggccagg 1339

Query: 661 gcgcctcctcccgactgagcagagccagacagacattcctgagggggccagaaatggggc 720
Sbjct: 1340 gcgcctcctcccgactgagcagagccagacagacattcctgagggggccagaaatggggc 1399

Query: 721 cggttggagggcaggggctctccctaggggcatagctgggtgaggaggtctgggcacctcc 780
Sbjct: 1400 cg-ttggagggcaggggctctccctaggggcatagctgggtgaggaggtctgggcacctcc 1458

Query: 781 tccatggctctcaggggcttccatttctgtgggaggggagagaggtaggtggcacaga 840
Sbjct: 1459 tccatggctctcaggggcttccatttctgtgggaggggagagaggtaggtggcacaga 1518

Query: 841 agatggggccttatgcttgtaaataattgatagcactggcttctccaaagtccaatact 900
Sbjct: 1519 agatggggccttatgcttgtaaataattgatagcactggcttctccaaagtccaatact 1578

Query: 901 ctagccccgctctcttcccctctttctgtccccatcttccagggggtataggctcagg 960
Sbjct: 1579 ctagccccgctctcttcccctctttctgtccccatcttccagggggtataggctcagg 1638

Query: 961 ctccccaacctgagttgggttacttcaagggcagccagcaggcctggatggaggcctaga 1020
Sbjct: 1639 ctccccaacctgagtt-gggttacttcaagggcagccagcaggcctggatggaggcctaga 1697

Query: 1021 aagcccttgcttctcctcccacttctttctccaggcctgggtaactcttccggtgtc 1080
Sbjct: 1698 aagcccttgcttctcctcccacttctttctccaggcctgggtaactcttccggtgtc 1757

Query: 1081 agcttctcccccttcagcctgtttctgcagcagccaggggttctccccctacaccctctg 1140
Sbjct: 1758 agcttctcccccttcagcctgtttctgcagcagccaggggttctccccctacaccctctg 1817

Query: 1141 cagggtggagagagagaagctggggccagccg-ggtgcctgctggcacagacgccttaacg 1199
Sbjct: 1818 cagggtggagagagagaagctggggccagccg-ggtgcctgctggccaagacgccttaacg 1877

Query: 1200 ctgtgtgtatgactgtgtgactgtgtgggagcctggactgacagataggccaagggctac 1259
Sbjct: 1878 ctgtgtgtatgactgtgtgactgtgtgggagcctggactgacagataggccaagggctac 1937

Query: 1260 tctctggc 1267
Sbjct: 1938 tctctggc 1945

B) gD|U81491|MMU81491 MUS MUSCULUS POLYNEOTIC (MPNZ) mRNA, complete cds
Length = 3832
Score = 757 bits (382), Expect = 0.0
Identities = 568/630 (90%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 tttgcctataagttcaagcgttccaagcgttctgttccatggccttgcaagaggtac 60
|||
Sbjct: 1983 tttgcctacaagttcaagcgttccaagcgttctgttccatggccttgcaagaggtat 2042

Query: 61 aacgtgggatgcaccaaacgggtgggacttttccactcagaccggagcaagctgcagaag 120
|||
Sbjct: 2043 aatgtgggatgcaccaaacgagtgaggacttttccactcagaccgaagcaagctgcagaag 2102

Query: 121 gcaggagctgcgaccacaacgcgcgtcgggcccagcaagccagtctgccaccacttacc 180
|||
Sbjct: 2103 gcagggaccacaaccacaacgcgcgacgggcccagcaagccagtctgccaccactcacc 2162

Query: 181 aaggataccaagaagcagccaacaggcactgtgccctttcggttactgctgctttgcag 240
|||
Sbjct: 2163 aaggacaccaagaagcagccctcaggcactgtaccctttcagttactgccgccttgcag 2222

Query: 241 ctaacacacagccaggaagactccagccggttgcctcagataactcaagctatgaggaacc 300
|||
Sbjct: 2223 ctgggcacacagccagggactccagccggttgcctcagataactccagctatgaggagccc 2282

Query: 301 ttgtcaccatctcagccagctcatctacttccgcccggcgacaaggccagcgggacctg 360
|||
Sbjct: 2283 ttgtcaccatctcagccagctcgtccacctcgcgacggcgcaaggccagagggacctg 2342

Query: 361 gagctccccgacatgcatatgcgggacctggtgggcatgggacaccacttccctgccaagt 420
|||
Sbjct: 2343 gatctccctgacatgacatgagggaccttggggcgtgggacaccacttccctgcccagc 2402

Query: 421 gagccaccaagtggatgtagaagcgtctacgaattcatccgctctctgcccaggctgc 480
|||
Sbjct: 2403 gagccacaaaatggatgtagaggatgtctatgagttcatccgctctctgcccaggctgc 2462

Query: 481 caggagatagcagaggaattccgtgcccaggaaatcgacgggcaagccctgctgctgctc 540
|||
Sbjct: 2463 caggagatcgcggaggagtccgtgcccaggagattgatgggcaagccttgcctgctgctc 2522

Query: 541 aaggaggaccactgatgagcgcctgaacatcaagctggggcccgcctgaagatctac 600
|||
Sbjct: 2523 aaggaggaccactaatgagcgcctgaacatcaagctaggggcccgcctgaagatctac 2582

Query: 601 gcccgcatcagcatgctcaaggactcctag 630
|||
Sbjct: 2583 gcacgcatcagcatgctcaaggactcctag 2612

Score = 307 bits (155), Expect = 4e-81
Identities = 311/359 (86%), Gaps = 8/359 (2%)
Strand = Plus / Plus

Query: 677 gagcagagccagacagacattcctgagggggccagaaatggggccggttgaggggcaggg 736
|||
Sbjct: 2687 gagcagagcctcacggacattcctgaggagccaggaaggccagctggcggggaaggg 2746

Query: 737 gctctccctaggggcatagctggtgaggaggtctgggcacctcctccatggctctcaggg 796
|||
Sbjct: 2747 gctctccctaggggtcagctgg-gaggaggtccgagtacctcttcagtggtctcaggg 2805

Query: 797 gcctttcatttctgtgggaggggagagaggtagggtggcacagaagatggggctttatgc 856
|||
Sbjct: 2806 gcc---atttctgtggaaggggtagag--gtagggtggcacagaagatggggctttgcgc 2859

Query: 857 ttgtaaatattgatagcactggcttccctccaaagtcccaataactctagccccgctctctt 916
|||
Sbjct: 2860 ttgtaaatactgatagcactggcttccctccaaagtcccaacgttctagcaccctctctt 2919

Query: 917 cccctctttctgtccccattttccaggggtatatggtcagggtccccaacctgagtt 976
|||
Sbjct: 2920 ctctttctctgtccccattttccaggggtttatggtcagggtccccaacctgagtt 2979

Query: 977 gggttactt-caagggcagccagcaggcctggatggaggcctagaaagcccttgccttc 1034
|||
Sbjct: 2980 gggctacttccaagggcagccagcaggcctggacagaggtcttgaagcccttgccttc 3038

Score = 103 bits (54), Expect = 1e-19
Identities = 84/93 (90%), Gaps = 5/93 (5%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1133 accctctgcaggtggagagagagaagctgggccagccggg---tgctgctggcacaga 1189
|||||
Sbjct: 3133 accctctgcaggtggagagagagaagctgggccagtttgccatgctgctggcacaga 3192
Query: 1190 cgccttaacgctgtgtgtatgactgtgtgactg 1222
|||||
Sbjct: 3193 cgccttaa--ctgtgtggatgactgtgtgactg 3223
```

Score = 56.0 bits (28), Expect = 3e-05
Identities = 44/48 (91%), Gaps = 1/48 (2%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1056 aggcctgggtaactcttccgttgtcagcttctcccccttcagcctggt 1103
|||||
Sbjct: 3058 aggcctgggtaac-cttccgtttccagcttctcccacttcagcctggt 3104
```

• PubMed-Referenzen zu den gefundenen Sequenzen

A) LOCUS NM_004427 2555 bp mRNA PRI 07-MAY-1999
DEFINITION Homo sapiens early development regulator 2 (homolog of polyhomeotic 2) (EDR2) mRNA.
ACCESSION NM_004427
NID g4758241
VERSION NM_004427.1 GI:4758241
KEYWORDS .
SOURCE human.
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 2555)
AUTHORS Gunster,M.J., Satijn,D.P., Hamer,K.M., den Blaauwen,J.L., de Bruijn,D., Alkema,M.J., van Lohuizen,M., van Driel,R. and Otte,A.P.
TITLE Identification and characterization of interactions between the vertebrate polycomb-group protein BMI1 and human homologs of polyhomeotic
JOURNAL Mol. Cell. Biol. 17 (4), 2326-2335 (1997)
MEDLINE 97220024
REFERENCE 2 (bases 1 to 2555)
AUTHORS Gunster,M.J., Satijn,D.P.E., Hamer,C.M., Den Blaauwen,J.L., De Bruijn,D., Alkema,M.J., Van Driel,R. and Otte,A.P.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (11-FEB-1997) E.C. Slater Institute, Plantage Muidergracht 12, Amsterdam 1018 TV, The Netherlands
COMMENT REFSEQ: This reference sequence was derived from U89278.
PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record that has not yet been subject to human review. The final curated reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..2555
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
gene 1..2555
/gene="EDR2"
/note="HPH2"
/db_xref="MIM:602979"
/db_xref="LocusID:1912"
CDS 9..1310
/gene="EDR2"
/function="interacts with the vertebrate polycomb-group protein BMI1"
/codon_start=1
/db_xref="MIM:602979"
/db_xref="LocusID:1912"
/product="early development regulator 2 (homolog of polyhomeotic 2)"
/protein_id="NP_004418.1"
/db_xref="PID:g4758242"
/db_xref="GI:4758242"
/translation="MCLRGGCSPRAPAAAPQPRPPPALPPRPRAPVPASRPGRPLLTP
ARPCGRMRRGSPGPRLLGGSRGERRRPAGRDPARVGPQGLRRPARPGPAAWTETGGGI
VHALTDLSIPGMTSGNGNSASS IAGTAPQNGENKPPQAIKVPQILTHVIEGFVIQEGA
DVSRWDRLLVGNLKKKYAQGFLEKLPQQDHTTTTDSMEMEPPYLQESKEGAPLKLK
CELCGRVDFAYKFKRSKRFCSMACAKRYNVGCTKRVGLFHSRSLKQKAGAATHNRRR
PAKPVCHHLPRIPRSSQQALCPFRLLLLCVTHSQEDSSRCSDNSSYEEPLSPISASSS
TSAGDKASGTWSSPTCICGTWWAWDTTSCQVSHQVNVEDVYEFIRSLPQCQEIAEEFR
RQFDQALILKEDIMMAMNFKGALFKVADTSMKDS"

BASE COUNT 538 a 190 c 124 g 491 t
ORIGIN

1 ggcgcccgat gtgtctccgc ggcggctgca gccctcgagc gcccgcggcc ggcgcccac
61 cccggccgcc gccgcccctc ccgcccggc ctcgcccgc cgtcccggcc tcgcccggc
121 gccgcccctt gttagcccg gccaggccgt gcggtcggat gcgcccggc agcccgggc
181 cccggctcgg aggtcccgg ggcgagagga ggcggcccgc cggcccggac cccgcccgg
241 tcgcccggc ccaggggctg cgtaggcccg cccggcccag cccagcccgc tggacagaga
301 cagggcaggg cattgttcat gcactgaccg acctcagcat ccccggcatg acctcagggg
361 acggaaactc tgcctccagc atcgcccggc ctgcccccca gaatggtgag aataaaccac
421 cacaggccat tgtgaaacct caaatcctga cgcattgtat cgaagggttt gtgatccagg
481 agggggcgga cgtttcccgg tgggacgctc gtctgctggt ggggaatctc aagaagaagt
541 atgcacaggg gtccctgctt gagaaacttc cacagcagga tcacaccacc accactgact
601 cggagatgga ggagccctat ctgcaagaat ccaaagagga ggggtgctcc ctcaactca
661 agtgtgagct ctgtggccgg tgggactttg cctataagtt caagcgttcc aagcgttct
721 gttccatggc ttgtgcaaa aggtacaacg tgggatgcac caaacgggtg ggacttttcc
781 actcagaccg gagcaagctg cagaaggcag gagctcgcac ccacaaccgc cgtcggccag
841 caaagccagt ctgccaccac ttaccaagga taccaagaag cagccaacag gcactgtgcc
901 cctttcggtt actgctgctt tgcgtaaac acagccagga agactccagc cgttgctcag
961 ataactcaag ctatgaggaa cctttgtcac ccatctcagc cagctcatct acttccgccc
1021 gcgacaaggc cagcgggacc tggagctccc cgcactgcat atgcccggcc tgggtgggcat
1081 gggacaccac ttccctgcaa gtgagccacc aagtgaatgt agaagacgct tcgaaattca
1141 tccgctctct gccaggctgc caggagatag cagagggaatt ccgtgccccag gaaatcgacg
1201 ggaagccctc gctgctgctc aaggaggacc acctgatgag cgttatgaac atcaagctgg
1261 gcccgcctc gaagatctac gcccgcatca gcatgctcaa ggactcctag ggtggtggc
1321 accaggattc tggcccaggc gcctcctcc cgactgagca gagccagaca gacattcctg
1381 aggggcccag aaatggcggc gttggagggc aggggctctc cctaggggca tagctggtga
1441 gagggtctgg gcacctcctc catggctctc aggggccttt catttctgtg ggagggcag
1501 agaggtaggt ggcacagaag atggggcttt atgcttghaa atattgatag cactggcttc
1561 ctccaaagtc ccaatactct agccccgctc tcttcccctc tttctgtccc ccattttcca
1621 ggggtatata ggtcagggct ccccaacctg agttgggtac ttcaagggca gccagcaggc
1681 ctggatggag gcctagaaag cccttgctct ccttcccctc acttctttct ccaggcctgg
1741 ttaactcttc cgttgtcagc ttctcccctc tcagcctggt tctgcagcag ccagggttct
1801 cccccctaca ccctctgcag gtggagagag agaagctggg cccagcccgc gtgctgctg
1861 gcaagacgc cttaacgctg tgtgtatgac tgtgtgactg tgtgggagcc tggactgaca
1921 gataggccaa gggctactct ctggcatctc caggtgtttt gtgcaaaaca gccacttagt
1981 gctttgtcct ggactccact cagcctcagg atggggaata gccaaaatg gcagcctcag
2041 cgcagaggca aggtcagaaa gagacggcgc ttcagagttt cctttccaga caccctccc
2101 cgcactgtga agttcccctg accgcccctc tggttcacia agagcattaa gaaagctgcg
2161 gtggtctgag caacatagcc cagacgtgga gcctcctggc ctgctgccc gccaccctg
2221 ggagtccagt ggtgagctc agagaacttc taaggggaaa gaacagctgg agtttctgtt
2281 gatgtgaaga aggcagctct tggcctcca ctcccacact tctttgcta taaatcttcc
2341 tagcagcaat ttgagctacc tgaggaggag gcagggcaga agggcaaggg cctgctctg
2401 acctgcccgt tcctttgcag gaaggaggta ggcacctttc tgagcttatt ctattccca
2461 cccacacccc caggcagggt tggaaatgaa ggactttttt aacctttggt ttgtttttta
2521 aaaataaatc tgtaaaaatc gaaaaaaaa aaaaa

B) LOCUS MMU81491 3832 bp mkNA R0D 05-JAN-1999

DEFINITION Mus musculus polyhomeotic (mPh2) mRNA, complete cds.

ACCESSION U81491

NID g4098992

VERSION U81491.1 GI:4098992

KEYWORDS .

SOURCE house mouse.

ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 3832)
AUTHORS Howard, T.L., Ingermann, A.R. and Hollenberg, S.M.
TITLE The Basic Helix-Loop-Helix Protein Th1 Interacts with Polycomb-Group Proteins
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 3832)
AUTHORS Howard, T.L., Ingermann, A.R. and Hollenberg, S.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (09-DEC-1996) Vollum Institute, L474, Oregon Health Sciences University, 3181 S.W. Sam Jackson Park Rd., Portland, OR 97201-3098, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..3832
/organism="Mus musculus"
/strain="NIH Swiss"
/db_xref="taxon:10090"
/cell_line="10T1/2"

gene 60..2612
/gene="mPh2"

CDS 60..2612
/gene="mPh2"
/note="polycomb-group homolog"
/codon_start=1
/product="polyhomeotic 2"
/protein_id="AAD00519.1"
/db_xref="PID:g4098993"
/db_xref="GI:4098993"
/translation="MENELPVPHTSNRASVTTNTSGTNSSSGCISSSGGGGSGGRPT
APQISVYSGIPDRQTVQVIQQALHRQPSTAAQYLQQMYAAQQHMLQTAALQQQHLS
SAQLQSLAAVQQASLVANRQGSTPGSSVSSQAPAQSSSLNLAASPAAQLINRAQSVN
SAAASGLAQAVLLGNTSSPALTASQAQMYLRAQMLIFTPTATVATVQPELCTGSPAR
PPTPAQVQNLTTLRTQQTAAAAAGPPPTQPVLPSLALKPTSSSQPLPAPPQGRMAQ
GSPAGAKPSGTDNAPETLKAGDNCNMEGRPGRAVPAVATHPLIAPAYAHLQSHQL
LPQPPAKHPQPQFVAQQQPQPPRPAPQVQSQPQLASVSPSLALQSSPEDHALPLGSVT
QALPLQCSTTHVHKPGNSQQCHLPTLDTGSONGHPEGGSHPPQRRFQHTSAVILQVQF
ASPVTPQQCAPDDWKEVVPAAKSVVVARPGPSPHQQAIIIPAIPGGLPGPKSPNIQQCP
AHETGQGI VHALTDLSSPGMTSNGNSASSIAGTAPQNGENKPPQAIIVKQIILTHVIE
GFVIQEGAEFPFVGRSSLLVGNLKKKYAQGFLEKPPQDHTTTTDSMEEPYLQESK
EEGTPLKLCCELGRVDFAYKFKRSKRFCSMACAKRYNVGCTKRVGLFHSRSLQKA
GTTTHNRRRASKASLPTLTKDTKKQPSGTVPLSVTAALQLAHSQEDSSRCSDNSSYEE
PLSPIASSSSTRRRQQRDLDPMDHMRDLVGVGHHPFPSEPTKWNVEDVYEFIRSL
PGCQEIAEEFRAQEIDGQALLLLKEDHLSAMNIKLGPAIKIYARISMLKDS"

BASE COUNT 832 a 1273 c 1021 g 706 t

ORIGIN

1 cgcagcatcc acctgctctt ctgccacctg agcaccctga ctgtaccacc ccataggcca
61 tggagaatga gctgccagtc ccccacacat ccaaccgggc cagtgtcacc accaacacca
121 gtgggaccaa tagtagcagt ggctgcatca gcagcagcgg cgggtggtgg ggcagcgggtg
181 gccgccccac tgcaccccag atttctgtgt acagtgggat tcctgaccgg cagactgtgc
241 aggtgatcca gcaggccctg cacaggcagc ccagcacggc ggcgcagtac ctgcagcaga
301 tgtatgctgc ccagcaacaa cacctcatgc tgcagacagc ggccttacag cagcagcacc
361 tcagcagcgc gcagctccag agcctggcag cagtgcagca ggcaagcctg gtggccaaca
421 gacaaggaag tactccccgt agcagtgctg cctcacaggc tcctgcccag tcttcttcac
481 tcaatctggc agcctccccg gcagcagccc agcttatcaa cggggcacag agtgtcaatt
541 cagccgcagc ctgcccctt gccagcagc cctgtctctt gggcaacacg tcctccccctg
601 cctgactgca cagccaagca cagatgtacc tcaggggcga gatgctcatc ttcacgcccc
661 cggccaccgt cgctactgtt cagcctgagc tctgactgg ttcccctgct cggcccccta
721 ccctgcccc ggtacagaac ctgacgcttc gcacccagca gacaccagca gcagcagcct
781 cgggccctcc ccccaccag cctgtcctgc ccagctggc cctgaaacct acaccagca
841 gtagccagcc tctgcctgcc ccaccacagg gcaggaccat ggctcagggt tcccctgcgg
901 gtgccaagcc tagtgggact gacaatgcgc cagagacact caaggcagga gatggttaact
961 gcaacatgga gggccggcca gggcctggcc gggcagttcc tgctgtggct actcaccgc
1021 tcattgcacc agcttatgct cacctgcagt cacaccagct cctcccacag ccgcccagca
1081 agcaccaca gccccagttt gtggccaac agcaaccaca gccaccacga cctgcacccc
1141 aagtccagtc ccaaccagc cttgcctcag tctcccagc cctggcccta cagtccagtc
1201 cagaagacca tgccctgct ctaggctcag tgacacagcc cctgcctctc cagtgtctta
1261 ccagcagcgc ccacaagcca gggaaacagc agcagtgatca ccttcccaca ctgacacccg
1321 ggtctcagaa tggacatcct gagggtgggt cccatcccc ccagcgaagg ttccagcaca
1381 cctcagctgt gatcttacag gtgcagcccc cttctccagt tacgccccag cagtgtgctc

1501 cgtccccaca ccagcaagcc atcatccctg ccatacccg tggcttgccct ggacccaaga
1561 gtcccaacat ccagcagtgc ccagctcacg agacagggca gggcattggt catgactga
1621 ccgacctcag cagccccggc atgacctcag ggaacggaaa ctctgcctcc agcatcgccg
1681 gcaactgccc ccagaatggt gagaataaac caccacaggg cattgtgaaa ccccaaatcc
1741 tgacgcatgt tatcgaaggg tttgtgatcc aggagggggc ggagcctttc ccggtgggac
1801 gctcgtccct gctggtaggg aatctcaaaa agaagtatgc acaggggttc ttgctgaga
1861 agcctccaca gcaggaccac accaccacca ccgactcaga gatggaggag ccctacctgc
1921 aagaatccaa agaggagggc actcccctca aactcaagtg tgagctctgt ggacgggtgg
1981 actttgccta caagttcaag cgttccaagc gcttctgttc catggcttgt gcaaaagagt
2041 ataagtggg atgcacaaaa cgagtgggac ttttctactc agaccgaagc aagctgcaga
2101 aggcagggac cacaaccac aacgcggac gggccagcaa ggccagtctg cccacactca
2161 ccaaggacac caagaagcag ccctcaggca ctgtacccct ttcagttact gccgccttgc
2221 agctggcgca cagccaggag gactccagcc ggtgctcaga taactccagc tatgaggagc
2281 ccttgtcacc catctcagc agctcgtcca cctcgcgacg gcgccaaggc cagagggacc
2341 tggatctccc tgacatgcac atgagggacc ttgtggcgct gggacaccac ttcctgccga
2401 gcgagccac aaaatggaat gtagaggatg tctatgagtt catccgctct ctgccaggct
2461 gccaggagat cgcggaggag ttccgtgcgc aggagattga tgggcaagcc ttgtgctgc
2521 tcaaggagga ccacctaag agcgccatga acatcaagct agggcccgcc ctgaagatct
2581 acgcacgcat cagcatgctc aaggactcct agagtctctg ctgctgccc actgcaccac
2641 caggcagcca ggattctaac cccatgcagg caaccgcctc cggatggagc agagcctcac
2701 ggacattcct gaggagccca ggaaagggcc agcttggcgg gaaggggctc tccctagggg
2761 tgacgctggg aggaggtccg agtacctctt cagtggctct caggggccat ttctgtggaa
2821 ggggtagagg taggtggcac agaagatggg gctttgcgct tgtaataact gatagcactg
2881 gcttctcca aagtccaac gttctagcac cccctcttc tccttctct gtccccatt
2941 ttcaggggg tttatggta gggctcccca acctgagttg ggctacttcc aagggcagcc
3001 agcaggcctg gacagaggtc ttgaaagccc ttgccttctc tccccccca cccactagg
3061 cctggttaac ctccgtttc cagcttctcc cacttcagcc tgttcccacg gcaccggggt
3121 ttctactcct gtaccctctg caggtaggaga gagagaagct gggccagtt tggccatgcc
3181 tgctggcaca gacgccttaa ctgtgtggat gactgtgtga ctgggagcct ggaccggctg
3241 acaggccatg agctaccac tgatctctcc aggttttttg tagcaaacag ccacttagtg
3301 ctttgcctg gactccgctc agcctgaggg tggggaatag aaagggcaga cccaagagt
3361 tggagattag aggtcccctc cagatagcaa gaggtttcta gggaaagtcac ctcacagcag
3421 gcttgcaata tgtccagctg gttggcgaac acgaggaagc tgcaaggctg gaccatgtgg
3481 ccaagcctgc gcctcctgtg gcttacctgc ctgcccaccc ttcgcacata caccctgtgg
3541 agggagtggt gaactgaaga ctggctggag gcactgcaga agcagccctt ggctttctac
3601 tcccacactt gcttgtgaaa cgtgtaccag ctacctaaag agggccaagg caggaagggc
3661 cagggcctcc tctgtcctta ccaactctgg gaagtcagct ctgcccggcc gagaggggcg
3721 ggcacttttt cagcttgcta taacccttc ccatacctc caggcagggg tggaaatgaa
3781 ggactttttt aaccttttct tttgttttta aaaaataaat ctgtaaaatt tg

9.2.2 E47– Homo sapiens bHLH-transcriptionsfactor

- DNA-Sequenz des gefundenen Klons

```

1 caggagaatg aaccagccgc agaggatggc gcctgtgggc acagacaagg agctcagtga
61 cctcctggac ttcagcatga tgttcccgct gcctgtcacc aacgggaagg gccggcccgc
121 ctcccctggc gggggcactc tcggagggtc aggtcctttag gaccggccca gtcagggtc
181 ctggggcagc ggcgaccaga gcagctctc ctttgacccc agccggacct tcagggagg
241 caccacttc actgagtcgc acagcagcct ctctcatcc acattcctgg gaccgggact
301 cggaggcaag agcggtgagc gggggccta tgcctccttc gggagagacg caggcgtggg
361 cggcctgact caggctggct tcctgtcagg cgagctggcc ctcaacagcc ccgggccct
421 tgccccttcg ggcaggaagg ggacctcca gtactacccc tcctactccg gcagctcccg
481 gcggagagcg gcagacggca gcctagacac gcagcccaag aaggtccgga aggtcccgcc
541 gggctctcca tcctcgggtg acccaccagc ctcagggtgag gactacggca gggatgccac
601 cgcctaccgg tccgccaaag ccccagcag cacctatccc gcccccttct acgtggcaga
661 tggccagctg caccctcaga ccagcctctg gagtcccccg ggccaggcgg gcttcgggcc
721 catgctgggt gggggctcat ccccgtctgc cctcccggcc ggttagcggc cgggtggcag
781 cagtggaaag agcagcacgt ttggtggcct gcaccagcac gagcgtatgg gctaccagct
841 gcatggagca gaggtgaacg gtgggtctcc atctgcatcc tccttctcct cagccccgg
901 agcccacgtac ggcggcgtct ccagccacac gccgcctgtc agcggggccg acagcctcct
961 gggctcccga gggaccacag ctggcagctc cggggatgcc ctccggcaaag cactggcctc
1021 gatctactcc ccggatcact caagcaataa cttctcgtcc agcccttcta ccccctggg
1081 ctccccccag ggcctggcag gaacgtcaca gtggcctcga gcaggagccc ccggtgcctt
1141 atcgcccagc tacgacgggg gtctccacgg cctgcagagt aagatagaag accacctgga
1201 cgaggccatc cacgtgctcc gcagccacgc cgtgggcaca gccggcgaca tgcaacagct
1261 gctgcctggc cacggggcgc tggcctcagg ttccaccggc cccatgtcac tgggcgggcg
1321 gcacgcagcg ctgggtggag gcagccacc ccagggcagg ctcgcaggca gcaccagct
1381 catgcacaac cacgcggccc tcccagcca gccaggcacc ctccctgacc tgtctcggc
1441 tcccactcct tacagtgggc tagggcgagc aggtgccacg gccggcgcca gcgagatcaa
1501 gggggaggag aaggaggagc aggagaacac gtcacgggct gaccactcgg aggaggagaa
1561 gaaggagctg aaggcccccc gggcccgagc cagcagtagc gacgaggtgc tgtccctgga
1621 ggagaaaagc ctgaggggacc gggagaggcg catggccaat aacgcggcgg agcgggtgcg
1681 cgtgcgggat attaacgagg ccttcgggga gctggggcgc atgtgccaga tgcaacctaa
1741 gtcggacaaa gcgcagacca agctgctcat cctgcagcag gccgtgcagg tcactcctgg
1801 gctggagcag caggtgcgag agcggaacct gaatcccaaa gcagcctgtt tgaacggcg
1861 agaagaggaa aaggtgtcag gtgtggttgg agacccccag atggtgcttt cagctcccca
1921 cccaggcctg agcgaagccc acaacccccg cgggcacatg tgaagggtat gcctccgtgg
1981 gacgagccac ccgcttctcag cctgtgtgctc tggccccaga acggccactc gagacccccg
2041 gcttcatcca catccacacc tcacacacct gttgtcagca tcgagggtcga cgcggccgcg
2101 gtcgacgcgg

```

- Aminosäuresequenz

→ Bild 13, Seite 59

- Ergebnis der NCBI-Genbank-Suche

Sequences producing significant alignments:				Score	E
				(bits)	Value
A)	emb	X52078	HSITF1 Human transcription factor (ITF-1) mRNA, ...	3255	0.0
B)	gb	M31222	HUME12A Human e12 protein (E2A) mRNA, complete cds.	3152	0.0
C)	gb	M31523	HUMTFAA Human transcription factor (E2A) mRNA, co...	3136	0.0
D)	gb	M95586	HUME2AHLF Human E2A/HLA fusion protein (E2A/HLF) ...	2851	0.0
E)	gb	M24405	HUMIMENBPA Homo sapiens (clone E12) kappa-E2-bind...	1820	0.0
F)	gb	M65214	HUME2A Human (HeLa) helix-loop-helix protein HE47...	1086	0.0
G)	gb	M24404	HUMIMENBP Homo sapiens (clone E47) kappa-E2-bindi...	789	0.0

C) gb|M31523|HUMTFAA Human transcription factor (E2A) mRNA, complete cds., Length = 4396
Score = 3136 bits (1582), Expect = 0.0
Identities = 1591/1594 (99%)
Strand = Plus / Plus

```

Query: 1 caggagaatgaaccagccgcagaggatggcgcctgtgggcacagacaaggagctcagtga 60
|||
Sbjct: 24 caggagaatgaaccagccgcagaggatggcgcctgtgggcacagacaaggagctcagtga 83

Query: 61 cctcctggacttcagcatgatgttcccgctgcctgtcaccaacgggaagggccggcccgc 120
|||
Sbjct: 84 cctcctggacttcagcatgatgttcccgctgcctgtcaccaacgggaagggccggcccgc 143

Query: 121 ctcccctggccggggcgcacttcggaggttcaggctctttaggaccggcccagctcaggctc 180
|||
Sbjct: 144 ctcccctggccggggcgcagttcggaggttcaggctctttaggaccggcccagctcaggctc 203

```

Query: 181 ctggggcagcggcgaccagagcagctcctcctttgaccccagccggaccttcagcgaggg 440
 |||||||||
 Sbjct: 204 ctggggcagcggcgaccagagcagctcctcctttgaccccagccggaccttcagcgaggg 263

Query: 241 caccacttcaactgagtcgcacagcagcctctcttcatccacattcctgggaccgggact 300
 |||||||||
 Sbjct: 264 caccacttcaactgagtcgcacagcagcctctcttcatccacattcctgggaccgggact 323

Query: 301 cggaggcaagagcgggtgagcggggcgccctatgcctccttcgggagagacgcagggcgtggg 360
 |||||||||
 Sbjct: 324 cggaggcaagagcgggtgagcggggcgccctatgcctccttcgggagagacgcagggcgtggg 383

Query: 361 cggcctgactcaggctggcctcctgtcaggcagctggccctcaacagcccgggcccct 420
 |||||||||
 Sbjct: 384 cggcctgactcaggctggcctcctgtcaggcagctggccctcaacagcccgggcccct 443

Query: 421 gtccccttcgggcatgaaggggacctcccagtaactaccctcctactccggcagctcccg 480
 |||||||||
 Sbjct: 444 gtccccttcgggcatgaaggggacctcccagtaactaccctcctactccggcagctcccg 503

Query: 481 gcggagagcggcagacggcagcctagacacgcagcccaagaaggctccggaaggctcccgcc 540
 |||||||||
 Sbjct: 504 gcggagagcggcagacggcagcctagacacgcagcccaagaaggctccggaaggctcccgcc 563

Query: 541 gggctctccatcctcgggtgtaaccaccagctcaggtaggactacggcagggatgccac 600
 |||||||||
 Sbjct: 564 gggctctccatcctcgggtgtaaccaccagctcaggtaggactacggcagggatgccac 623

Query: 601 cgcctaccctcggcgaagacccccagcagcacctatcccggccccttctactggtggcaga 660
 |||||||||
 Sbjct: 624 cgcctaccctcggcgaagacccccagcagcacctatcccggccccttctactggtggcaga 683

Query: 661 tggcagcctgcaccctcagccagcctctggagctccccgggcccaggcgggcttcggggcc 720
 |||||||||
 Sbjct: 684 tggcagcctgcaccctcagccagcctctggagctccccgggcccaggcgggcttcggggcc 743

Query: 721 catgctgggtgggggctcatccccgctgcccctcccggccggtagcggcccgggtgggcag 780
 |||||||||
 Sbjct: 744 catgctgggtgggggctcatccccgctgcccctcccggccggtagcggcccgggtgggcag 803

Query: 781 cagtggaagcagcagcacgtttgggtggcctgcaccagcagcagcgtatgggctaccagct 840
 |||||||||
 Sbjct: 804 cagtggaagcagcagcacgtttgggtggcctgcaccagcagcagcgtatgggctaccagct 863

Query: 841 gcatggagcagaggtgaacgggtgggctcccatctgcatcctccttctcctcagcccccg 900
 |||||||||
 Sbjct: 864 gcatggagcagaggtgaacgggtgggctcccatctgcatcctccttctcctcagcccccg 923

Query: 901 agccacgtacggcggcgtctccagccacacgcgcctgtcagcggggccgacagcctcct 960
 |||||||||
 Sbjct: 924 agccacgtacggcggcgtctccagccacacgcgcctgtcagcggggccgacagcctcct 983

Query: 961 gggctcccaggggaccacagctggcagctccggggatgccctcggcaaaagcactggcctc 1020
 |||||||||
 Sbjct: 984 gggctcccaggggaccacagctggcagctccggggatgccctcggcaaaagcactggcctc 1043

Query: 1021 gatctactccccggatcactcaagcaataacttctcgtccagcccttctacccccgtggg 1080
 |||||||||
 Sbjct: 1044 gatctactccccggatcactcaagcaataacttctcgtccagcccttctacccccgtggg 1103

Query: 1081 ctccccccaggcctggcaggaacgtcacagtggcctcgagcaggagccccgggtgcctt 1140
 |||||||||
 Sbjct: 1104 ctccccccaggcctggcaggaacgtcacagtggcctcgagcaggagccccgggtgcctt 1163

Query: 1141 atcgcccagctacgacgggggtctccacggcctgcagagtaagatagaagaccacctgga 1200
 |||||||||
 Sbjct: 1164 atcgcccagctacgacgggggtctccacggcctgcagagtaagatagaagaccacctgga 1223

Query: 1201 cgaggccatccacgtgctccgcagccacgcctgggacacagccggcgacatgcacacgct 1260
 |||||||||
 Sbjct: 1224 cgaggccatccacgtgctccgcagccacgcctgggacacagccggcgacatgcacacgct 1283

Query: 1261 gctgctggccacggggcgctggcctcaggtttcaccggccccatgtcactggggggcg 1320
 |||||||||
 Sbjct: 1284 gctgctggccacggggcgctggcctcaggtttcaccggccccatgtcactggggggcg 1343

Query: 1321 gcacgcaggcctgggtggaggcagccaccccaggacggcctcgaggcagcaccagcct 1380
 |||||||||

Query: 1381 catgcacaaccacgcggccctccccagccagccaggcacccctccctgacctgtctcggcc 1440
 |||
 Sbjct: 1404 catgcacaaccacgcggccctccccagccagccaggcacccctccctgacctgtctcggcc 1463

Query: 1441 tcccgactcctacagtgggctagggcgagcaggtgccacggcggcccgccagcgagatcaa 1500
 |||
 Sbjct: 1464 tcccgactcctacagtgggctagggcgagcaggtgccacggcggcccgccagcgagatcaa 1523

Query: 1501 gcgggaggagaaggaggacgaggagaacacgtcagcggctgaccactcggaggaggagaa 1560
 |||
 Sbjct: 1524 gcgggaggagaaggaggacgaggagaacacgtcagcggctgaccactcggaggaggagaa 1583

Query: 1561 gaaggagctgaaggccccccggcccgaccagc 1594
 |||
 Sbjct: 1584 gaaggagctgaaggccccccggcccgaccagc 1617

Score = 573 bits (289), Expect = e-161
 Identities = 397/433 (91%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 1653 tggccaataacgcgcgggagcgggtgcgcgtgcgggatattaacgaggccttcggggagc 1712
 |||
 Sbjct: 1685 tggccaataacgcgcgggagcgggtgcgcgtgacatcaacgaggcctttaaggagc 1744

Query: 1713 tggggcgcatgtgccagatgcacctcaagtcggacaaagcgcagaccaagctgctcatcc 1772
 |||
 Sbjct: 1745 tggggcgcatgtgccaaactgcacctcaacagcgagaagccccagaccaaactgctcatcc 1804

Query: 1773 tgcagcaggccgtgcaggctatcctggggctggagcagcaggtgcgagagcggaacctga 1832
 |||
 Sbjct: 1805 tgcaccaggctgtctcggctatcctgaacttggagcagcaagtgcgagagcggaacctga 1864

Query: 1833 atcccaagcagcctgtttgaaacggcgagaagaggaaaaggtgtcaggtgtggttgag 1892
 |||
 Sbjct: 1865 atcccaagcagcctgtttgaaacggcgagaagaggaaaaggtgtcaggtgtggttgag 1924

Query: 1893 acccccagatggtgctttcagctccccaccaggcctgagcgaagccacacccccgagc 1952
 |||
 Sbjct: 1925 acccccagatggtgctttcagctccccaccaggcctgagcgaagccacacccccgagc 1984

Query: 1953 ggcacatgtgaaaggtatgcctccgtgggacgagccaccgctttcagccctgtgctctg 2012
 |||
 Sbjct: 1985 ggcacatgtgaaaggtatgcctccgtgggacgagccaccgctttcagccctgtgctctg 2044

Query: 2013 gccccagaacggccactcgagacccccgggcttcacacatccacacctcacacacctgt 2072
 |||
 Sbjct: 2045 gccccagaacgggactcgagacccccgggcttcacacatccacacctcacacacctgt 2104

Query: 2073 tgtcagcatcgag 2085
 |||
 Sbjct: 2105 tgtcagcatcgag 2117

F) gb|M65214|HUME2A Human (HeLa) helix-loop-helix protein HE47 (E2A) mRNA, 3' end
 Length = 1074
 Score = 1086 bits (548), Expect = 0.0
 Identities = 548/548 (100%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 1538 gctgaccactcggaggaggagaagaaggagctgaaggccccccggcccgaccagcagt 1597
 |||
 Sbjct: 1 gctgaccactcggaggaggagaagaaggagctgaaggccccccggcccgaccagcagt 60

Query: 1598 acggacgaggtgctgtccctggaggagaaagacctgagggaccgggagaggcgcagatggcc 1657
 |||
 Sbjct: 61 acggacgaggtgctgtccctggaggagaaagacctgagggaccgggagaggcgcagatggcc 120

Query: 1658 aataacgcgcgggagcgggtgcgcgtgcgggatattaacgaggccttcgggagctgggg 1717
 |||
 Sbjct: 121 aataacgcgcgggagcgggtgcgcgtgcgggatattaacgaggccttcgggagctgggg 180

Query: 1718 cgcattgtgccagatgcacctcaagtcggacaaagcgcagaccaagctgctcatcctgcag 1777
 |||
 Sbjct: 181 cgcattgtgccagatgcacctcaagtcggacaaagcgcagaccaagctgctcatcctgcag 240

Query: 1778 caggccgtgcaggctatcctggggctggagcagcaggtgcgagagcggaacctgaatccc 1837
 |||

```

Query: 1838 aaagcagcctgtttgaaacggcgagaagaggaaaaggtgtcaggtgtggttgagacccc 1897
          |||
Sbjct: 301 aaagcagcctgtttgaaacggcgagaagaggaaaaggtgtcaggtgtggttgagacccc 360

Query: 1898 cagatggtgctttcagctccccacccaggcctgagcgaagcccacaaccccgccgggcac 1957
          |||
Sbjct: 361 cagatggtgctttcagctccccacccaggcctgagcgaagcccacaaccccgccgggcac 420

Query: 1958 atgtgaaaggtatgcctccgtgggacgagccacccgctttcagccctgtgctctggcccc 2017
          |||
Sbjct: 421 atgtgaaaggtatgcctccgtgggacgagccacccgctttcagccctgtgctctggcccc 480

Query: 2018 agaacggccactcgagacccccgggcttcatccacatccacacctcacacacctggtgtca 2077
          |||
Sbjct: 481 agaacggccactcgagacccccgggcttcatccacatccacacctcacacacctggtgtca 540

Query: 2078 gcatcgag 2085
          |||
Sbjct: 541 gcatcgag 548

```

G) gb|M24404|HUMIMENBP Homo sapiens (clone E47) kappa-E2-binding factor mRNA, partial cds.
 Length = 398
 Score = 789 bits (398), Expect = 0.0
 Identities = 398/398 (100%)
 Strand = Plus / Plus

```

Query: 1433 tctcggcctcccgactcctacagtgggctagggcgagcaggtgccacggcgccgccagc 1492
          |||
Sbjct: 1 tctcggcctcccgactcctacagtgggctagggcgagcaggtgccacggcgccgccagc 60

Query: 1493 gagatcaagcgggagagagaaggaggacgaggagaaacacgtcagcggctgaccactcggag 1552
          |||
Sbjct: 61 gagatcaagcgggagagagaaggaggacgaggagaaacacgtcagcggctgaccactcggag 120

Query: 1553 gaggagaagaaggagctgaaggccccccgggcccggaccagcagtcaggacgaggtgctg 1612
          |||
Sbjct: 121 gaggagaagaaggagctgaaggccccccgggcccggaccagcagtcaggacgaggtgctg 180

Query: 1613 tccctggaggagaaagacctgagggaccgggagaggcgcatggccaataacgcgcccggag 1672
          |||
Sbjct: 181 tccctggaggagaaagacctgagggaccgggagaggcgcatggccaataacgcgcccggag 240

Query: 1673 cgggtgcgctgcccggatattaacgagggccttccgggagctggggcgcatgtgccagatg 1732
          |||
Sbjct: 241 cgggtgcgctgcccggatattaacgagggccttccgggagctggggcgcatgtgccagatg 300

Query: 1733 cacctcaagtcggacaaagcgcagaccaagctgctcatcctgcagcaggccgtgcaggtc 1792
          |||
Sbjct: 301 cacctcaagtcggacaaagcgcagaccaagctgctcatcctgcagcaggccgtgcaggtc 360

Query: 1793 atcctggggctggagcagcaggtgcgagagcggaacct 1830
          |||
Sbjct: 361 atcctggggctggagcagcaggtgcgagagcggaacct 398

```


• PubMed-Referenzen zu den gefundenen Sequenzen

C) LOCUS HUMTFAA 4396 bp mRNA PRI 14-JAN-1995
 DEFINITION Human transcription factor (E2A) mRNA, complete cds.
 ACCESSION M31523
 NID g339477
 VERSION M31523.1 GI:339477
 KEYWORDS transcription factor.
 SOURCE Human mature B cell line BJAB, cDNA to mRNA.
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 4396)
 AUTHORS Kamps,M.P., Murre,C., Sun,X.H. and Baltimore,D.
 TITLE A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the
 t(1;19) translocation protein in pre-B ALL
 JOURNAL Cell 60 (4), 547-555 (1990)
 MEDLINE 90150282
 COMMENT Draft entry and computer-readable sequence for [Cell (1990) In
 press] kindly submitted
 by M.P.Kamps 22-JAN-1990.

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..4396
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /map="19p13.3"
 gene 31..1995
 /gene="TCF3"
 CDS 31..1995
 /gene="TCF3"
 /note="transcription factor E2A"
 /codon_start=1
 /db_xref="GDB:G00-118-881"
 /protein_id="AAA61146.1"
 /db_xref="PID:g339478"
 /translation="MNQPQRMAPVGTDKELSDLLDFSMFPLPVTNGKGRPASLAGAQ
 FGGSGLEDRPSSSGSWGSDQSSSFDPSRTFSEGFTHFTESHSSLSSTFLGPGLGKKS
 GERGAYASFGRDAGVGGTQAGFLSGELALNSPGPLSPSGMKGTSQYYPSYSGSSRRR
 AADGSLDTQPKKVRKVPPLPSSVYPPSSGEDYGRDATAYPSAKTPSSSTYPAPFYVAD
 GSLHPSAELWSPPGQAGFGPMLGGSSPLPLPPGSGPVGSSGSSSTFGGLHQHERMGY
 QLHGAEVNGLPSASSFSSAPGATYGGVSSHTPPVSGADSLLSRGTAGSSGDALGK
 ALASIYSPDHSSNNFSSPSTPVGSPQGLAGTSQWPRAGAPGALSPSYDGGHLGLQSK
 IEDHLDEAIHVLRSHAVGTAGDMHTLLPGHGALASGFTGPMSLGGRHAGLVGGSHPED
 GLAGSTSLMHNHAALPSQPGLTLPDLRSRPPDSYSLGRAGATAAASEIKREKEDEENT
 SAADHSEEEKELKAPRARTSPDEDEDLLPPEQKAEREKERRVANNARERLRVRDIN
 EAFKELGRMCQLHLNSEKPKTKLLILHQAVSVILNLEQQVRERNLNPKAACLKRREEE
 KVSGVVGDPQMVLSAPHPGLSEAHNPAGHM"

BASE COUNT 869 a 1424 c 1255 g 848 t

ORIGIN

1 gctgaggtg cccgccctgg cccagagaga atgaaccagc cgcagaggat ggcgctgtg
 61 ggcacagaca aggagctcag tgacctctg gacttcagca tgatgttccc gctgctgtc
 121 accaacggga agggccggcc cgcctcctg gccggggcgc agttcggagg ttcaggtctt
 181 gaggaccggc ccagctcagg ctccctgggc agcggcgacc agagcagctc ctcccttgac
 241 cccagccgga ccttcagcga gggcaccac ttcactgagt cgcacagcag cctctcttca
 301 tccacattcc tgggaccggg actcggaggc aagagcggtg agcggggcgc ctatgctcc
 361 ttccggagag acgcaggcgt gggcggcctg actcaggctg gcttctctgtc aggcgagctg
 421 gcctcaaca gccccgggcc cctgtccctc tgggcatga aggggacctc ccagctactc
 481 cctcctact ccggcagctc ccggcggaga gcggcagacg gcagcctaga caccagccc
 541 aagaaggtcc ggaaggtccc gccgggtcct ccatcctcgg tgtaccacc cagctcaggt
 601 gaggactacg gcagggatgc caccgcctac ccgtccgcc agacccccag cagcacctat
 661 cccgccccct tctacgtggc agatggcagc ctgcaccct cagccgagct ctggagtccc
 721 ccgggccagg cgggcttcgg gcccatgctg ggtgggggct catccccgct gccctcccg
 781 cccggtagcg gcccggtggg cagcagtgga agcagcagca cgtttgggtg cctgcaccag
 841 cagcagcgtg tgggctacca gctgcatgga gcagaggtga acgggtggct cccatctgca
 901 tctccttct cctcagcccc cgggaccacg tacggcggcg tctccagcca caccgcccct
 961 gtccagcggg ccgacagcct cctgggctcc cgagggacca cagctggcag ctccggggat
 1021 gcctcggca aagcactggc ctgatctac tccccggatc actcaagcaa taacttctcg
 1081 tccagccctt ctacccccgt gggctcccc cagggcctg caggaacgtc acagtggcct
 1141 cgagcaggag cccccgtgct cttatcgccc agctacgacg ggggtctcca cggcctgcag
 1201 agtaagatag aagaccact ggacgagggc atcccagctg tcccagcca cgcggtgggc
 1261 acagccggcg acatgcacac gctgctgctt ggccacgggg cgctggcctc aggtttcacc
 1321 ggcctcctgt cgtcgggtgg gcggcagcga ggcctggtt gaggcagcca ccccgaggac
 1381 ggcctcgcag gcagcaccag cctcatgcac aaccacgagg ccctccccag ccagccaggc
 1441 accctccctg acctgtctcg gctcccgcac tcctacagtg ggctagggcg agcaggtgcc
 1501 acggcggccg ccagcgagat caagcgggag gagaaggagg acgaggagaa cacgtcagcg
 1561 gctgaccact cggaggagga gaagaaggag ctgaaggccc cccgggccc gaccagccc
 1621 gacgaggacg aggacgacct tctccccca gagcagaagg ccgagcggga gaaggagcgc
 1681 ggcctcctgg cctcagggggg ggggggggct ggcctcctga cctcagccc ggcctcctgg

```

1741 gagctggggc gcatgtgcca actgcacctc aacagcgaga agccccagac caaactgctc
1801 atcctgcacc aggctgtctc ggtcatcctg aacttggagc agcaagtgcg agagcgggaa
1861 ctgaatccca aagcagcctg tttgaaacgg cgagaagagg aaaaggtgtc aggtgtgggt
1921 ggagaccccc agatgggtgt ttcagctccc caccagggcc tgagcgaagc ccacaacccc
1981 gccgggcaca tgtgaaaggt atgcctccgt gggacagacc acccgctttc agccctgtgc
2041 tctggcccca gaagccggac tcgagacccc gggcttcatc cacatccaca cctcacacac
2101 ctgttgtcag catcgagcca acaccaacct gacaagggtc ggagtgtatg gggcgcccaa
2161 ggtgacactg ggtccaggag ctocctgggg ccctggccta ccactcactg gcctcgctcc
2221 ccctgtcccc gaatctcagc caccgtgtca ctctgtgacc tgtcccattg atcctgaaac
2281 tgcatcttgg ccctgttggc tgggctgaca ggagcatttt ttttttttcc agtaaacaaa
2341 acctgaaagc aagcaacaaa acatacactt tgtcagagaa gaaaaaaatg ccttaactat
2401 aaaaagcggg gaaatggaaa catatcactc aagggggatg ctgtgggaaac ctggcttatt
2461 cttctaaagc caccagcaaa ttgtgcctaa gcgaaatatt ttttttaagg aaaaataaaa
2521 cattagttagc aagatttttt ttttcttaag gtagatgaaa attagcaagg atgctgcctt
2581 tggctctctg tttttttaag ctttttttgc atatgttttg taagcaacaa atttttttgt
2641 ataaaagtcc cgtgtctctc gctatttctg ctgctgttcc tagactgagc attgcatttc
2701 ttgatcaacc agatgattaa acgtgttatt aaaaagacc cgtgtaaac tgagcccccc
2761 ccgtcccccc ccccggaagc cactgcacac agacagacgg ggacagggcg cgggtctttt
2821 gtttttttga tgttgggggt tctcttgggt ttgtcatgtg gaaagtgtat cgtggggcgt
2881 cctgtgatga ggcacctggg ggcttccctg cgcctcctc tcccctcagg aaggggactg
2941 acctggggtt gggggaaggg acgtcagcaa ggtggctctg accctcccag gtgactctgc
3001 caagcagctg tggccccagc ggtaccctac acaacgcctc ccccaggccc ccctaagctg
3061 ctctcccttg gaacctgcac agctctctga aatggggcat tttgttggga ccagtgacct
3121 ctggcctggg gaccacaccc tggagcccgg tgctggggac ctccctggaca ccctgtcctt
3181 cactccttgc cccagggacc caggctcatg ctctgaactc tggctgagag gagtctgctc
3241 aggagccagc acaggacacc ccccacccca ccccacatg tcccattac accagagggc
3301 catcgtgacg tagacaggat gccagggggc tgaccagcct cccaatgct ggggagcatc
3361 cctggcctgg ggccacacct gctgccctcc ctctgtgtgg tccaagggca agatgtgctg
3421 gagccggggg actgtgctgg tctgagcccc acgaaggcct tgggctgtgg ctccgacctt
3481 gctgcagaac cagcagggtg tcccctcggg cccatctgtg tcccatgtcc cagcaaccag
3541 gcctctctcc aggtctcctt ttotgttctt ttgccatgag ggtaaccagc tctcccagc
3601 tggctgggac tgtcttgggt ttaaaactgc aagtctccta ccctgggatc ccattccagt
3661 ccacacgaac tagggcagtg gtcactgtgg caccaggtg tgggctggc tagctggggg
3721 ccttcatgtg cccttcatgc ccctccctgc attgaggcct tgtggacccc tgggctggct
3781 gtgttcatcc ccgtgacagg tggggcgtct cccccgtgc cactcctgag actccacctt
3841 tacccccagg agatcctgga ctgcctgact cccctcccca gactggcttg ggagcctggg
3901 ccccatggtg gatgcaaggg aaacctcaag gccagctcaa tgctgggtat ctgccccagc
3961 tccagggcag gcggagggga ggggctgtcc ggctgcctct cccttctcgg ttgcttccc
4021 tgcgccctgg gagtttgatc tcttaagggg acttgcctct ccctcttgtt ttgctcctgc
4081 cctgccccct ggtctgggtg gcagtggccc catagcctct ggaactgtgc gttctgcata
4141 gaattcaaac gagattcacc cagcgcgagg aggaagaaac agcagttcct ggaaccaca
4201 attatggggg gtgggggggt tgatctgagt gcctcaagat ggttttcaaa aaattttttt
4261 taagaaaaat aattgtatc gtgtcaacac agctggctgg atgattggga ctttaaaacg
4321 accctcttcc aggtggattc agagacctgt cctgtatata acagcactgt agcaataaac
4381 gtgacatttt ataaaag

```

```

F) LOCUS HUME2A 1074 bp mRNA PRI 07-NOV-1994
DEFINITION Human (HeLa) helix-loop-helix protein HE47 (E2A) mRNA, 3' end.
ACCESSION M65214
NID g181909
VERSION M65214.1 GI:181909
KEYWORDS helix-loop-helix protein HE47; transcription factor.
SOURCE Homo sapiens cDNA to mRNA.
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1074)
AUTHORS Zhang,Y. and Bina,M.
TITLE Sequence of a HeLa cDNA provides the DNA binding domain and carboxy
terminus of HE47: a human helix-loop-helix protein related to the
enhancer binding factor E47
JOURNAL DNA Seq. 2 (3), 197-202 (1991)
MEDLINE 92297964
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1074
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/cell_line="HeLa"
/map="19p13.3"
gene 1..426
/gene="TCF3"
CDS <1..426
/gene="TCF3"
/codon_start=1
/db_xref="GDB:G00-118-881"
/product="helix-loop-helix protein HE47"
/protein_id="AAC41693.1"

```

/ translation= "ADHSEEEKELKAPKARTSSTDEVLSLEEKDLRDRERRMANNARERVRVDINEAFRELGRMCQMHLSKDKAQTKLLILQQAVQVILGLEQQVRRERNLNPKA
 ERVRVDINEAFRELGRMCQMHLSKDKAQTKLLILQQAVQVILGLEQQVRRERNLNPKA
 ACLKRREEEKVSGVVGDPQMVLSAPHPGLSEAHNPAGHM"

BASE COUNT 275 a 283 c 290 g 226 t
 ORIGIN

```

1 gctgaccact cggaggagga gaagaaggag ctgaaggccc cccgggcccg gaccagcagt
61 acggacgagg tgctgtccct ggaggagaaa gacctgaggg accgggagag ggcgatggcc
121 aataacgcgc gggagcgggt gcgcgtgcgg gatattaacg aggccttccg ggagctgggg
181 cgcattgtcc agatgcacct caagtgcgac aaagcgcaga ccaagctgct catcctgcag
241 caggccgtgc aggtcatcct ggggctggag cagcaggtgc gagagcggaa cctgaatccc
301 aaagcagcct gtttgaaacg gcgagaagag gaaaagggtg caggtgtggt tggagacccc
361 cagatgggtg tttcagctcc ccacccaggc ctgagcgaag cccacaaccc cgccggggac
421 atgtgaaagc tatgcctccg tgggacgagc caccgccttt cagccctgtg ctctggcccc
481 agaacggcca ctcgagaccc cgggcttcat ccacatccc acctcacaca cctgtgtgca
541 gcacgcagcc aacaccaacc tgacaagggt cggagtgatg ggggaggcca aggtgacact
601 gggtcacaga gctccctggg gccctggcct accactcact ggcctcgtc cccctgtccc
661 cgaatctcag ccaccgtgct actctgtgac ctgtcccctg gatcctgaaa ctgcatcttg
721 gccctgtgtg ctgggctgac aggagcattt tttttttcca gtaaacaata cctgaaagca
781 agaacaataa catacacttt gtcagagaag aaaaaaatgc cttaactata aaaagcggag
841 aaatggaac atatacactca agggggatgc tgtggaacac tggcttattc ttctaaagcc
901 accaggaat tgtgcctaag cgaaaatatt tttttaagga aaataaaaaac attagttaca
961 agatTTTTTT tttcttaatg tagatgaaaa ttagcaagga tgctgccttt ggtctctggt
1021 ttttttaagc tttttttgca tatgttttgt aagcaacaaa tttttttgta taaa
  
```

G) LOCUS HUMIMENBP 398 bp mRNA PRI 06-DEC-1994
 DEFINITION Homo sapiens (clone E47) kappa-E2-binding factor mRNA, partial cds.
 ACCESSION M24404
 NID g598176
 VERSION M24404.1 GI:598176
 KEYWORDS immunoglobulin enhancer-binding protein; kappa-E2-binding factor.
 SOURCE Homo sapiens (clone cDNA-Bank : lambda-gt11) lymphoma cDNA to mRNA.
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 398)
 AUTHORS Murre,C., McCaw,P.S. and Baltimore,D.
 TITLE A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer
 binding, daughterless, MyoD, and myc proteins
 JOURNAL Cell 56 (5), 777-783 (1989)
 MEDLINE 89168418
 COMMENT On Dec 7, 1994 this sequence version replaced gi:341165.
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..398
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /cell_line="BJAB"
 /cell_type="B cell"
 /clone="E47"
 /clone_lib="lambda-gt11"
 /tissue_type="lymphoma"
 CDS <1..>398
 /codon_start=1
 /product="kappa-E2-binding factor"
 /protein_id="AAA56829.1"
 /db_xref="PID:g598177"
 /translation="SRPPDSYSGLGRAGATAAASEIKREEKEDEENTSAADHSEEEK
 ELKAPRARTSSTDEVLSLEEKDLRDRERRMANNARERVRVDINEAFRELGRMCQMH
 KSDKAQTKLLILQQAVQVILGLEQQVRRERNL"

BASE COUNT 90 a 109 c 154 g 45 t
 ORIGIN

```

1 tctcggcctc ccgactccta cagtgggcta gggcgcagc gtgccaccggc ggccgcccagc
61 gagatcaagc gggaggagaa ggaggacgag gagaacacgt cagcggctga ccaactcggag
121 gaggagaaga aggagctgaa ggcccccccg gcccgaccga gcagtacgga cgaggtgctg
181 tcctcggagg agaaagacct gagggaccgg gagaggcgca tggccaataa cgcgcggggag
241 cgggtgcgcg tgcgggatat taacgaggcc ttccgggagc tggggcgcac gtgccagatg
301 cacctcaagt cggacaaagc gcagaccaag ctgctcatcc tgcagcagcc cgtgcaggtc
361 atcctggggc tggagcagca ggtgcgagag cggaaacct
  
```

9.2.3 PTRF –Homo sapiens Polymerase I- transcript release factor

- Sequenz des längsten Klons

```

1 ctgctctccg ctctegcccg ctagctctcc tcccttcgcg tccctgctct ctccgggtct
61 cccgctccag ctccagcccc acccgcccgg tcccgcacgg ctccgggtag ccatggagga
121 ccccacgctc tatattgtcg agcggccgct tccccgggtac cccgacgcgg aggccccgga
181 gccttcctcc gctgggggctc aggcagcgga ggagccgctc ggggccggct cagaagagct
241 gatcaagtcg gaccagggtga acggcggtct ggtgctgagc ctccctggaca aaatcatcgg
301 ggccgtagac cagatccagc tgactcaagc acagctggag gagcggcagg cggagatgga
361 gggcgcagtg cagagcatcc agggcgagct gagcaagctg ggcaaggcgc acgcccaccac
421 gagcaatcag gtgagcaagc tgctggagaa ggtgcgcaag gtcagcgtca acgtgaagac
481 cgtgcgcggc agcctggagc gccaggcggg gcagatcaag aagctggagg tcaacgaggc
541 cgagctgctg cggcgccgca actttaaagt catgatctac caggatgaag tgaagctgcc
601 ggccaaactg agcatcagca aatcgtctaa agagtccggg ggcgtgccag agaaggaggg
661 ggaggagctg ggcgagggag agcggccgga ggaggacgca gcggcctgg agcttctcgtc
721 ggacgaggcg gtggagggtg aggaggttat tgaggagtcc cgcgcagagc gtatcaagcg
781 cagcggcctg cggcgcgctg acgacttcaa gaagccttc tccaaggaga agatggagaa
841 gaccaaggtg cgtacccgcg agaactgga gaagacgcbc ctcaagacca aggaaaacct
901 ggagaagcgc cggcacaccg tgggaagcgc catgaacaag ctgggcacgc gcctggtgcc
961 cgccgagcgg cgcgagaaac tgaagacgtc gcgggacaag ttgcgcaaat ccttcacgcc
1021 cgaccacgtg gtgtacgcgc gctccaagac cgcggtctac aagtgccac ccttcacctt
1081 ccaggtcaag aagatcccgcg agggccaggt ggaagtgtct aaggccaccg agatggtgga
1141 ggtgggccc gacgacgagc agggcggcgc ggagcgcggg gaggccggcg acctgcccgcg
1201 cgggagcagc cccgacgtgc acggcgctgct ggagatcacc gaggagtccg acgcccgtgct
1261 ggtggacaag agcgacagcg actgaaccgc ccccgtgccc acccacccca ttccctgctc
1321 cttcccgaact tctctttctc cattctctct cggctcgagc tggctgagat ttttctaaat
1381 tgaaaaacag cccccctccc cacacctcca ggaactccac tcccagtctt agagctgтта
1441 ggaccgatg gggaggcagc ccccgcatg gacagccccc gcttgacac agtccgagtг
1501 gaatgggaag ggaatggtca atccctgtcc tggttgcca agtcgggatc tcagaggaaa
1561 gtgcatgat tccacggtta gccccctcg ggggggctc cttcccctca gcctctccc
1621 acaccacca cccagctgct gtcattcgc tcaactgagct cttcttatt ctcacctga
1681 tccctggggg actcaaagcc aaaactgccc aaagaggaaa gattgaatcc taaggggat
1741 ccttgcccc atgggaggcc cctactaga aggacgtgaa agcagctttt gggggaaact
1801 gaggcagtg ggaagacaga gcagaatgag ccctcacct ggcctggggg
1861 ctgtatctgc agaggtccc agaggaacgc tggagccaag agaagcctg ggaaggaggг
1921 gtggggaacg acatgatgt gagggatggc acactgatgt gtttatgcac ctgtacacag
1981 gagcgcagtg ccatggcttt ggaagggaga atggaaaaat agaagaaggt cggccggct
2041 tgggtgctta agcctgtaac cccagcactt tgggaggccg aggtggggcg atcacctgag
2101 gtcaggagtt cgggaccagc ctggcaaaca ccccatctct actaagcgaa aaccatctc
2161 tactaaaatt acaaaaatta gctgggcagc gttgcgatg cctgtaatcc cagctacttt
2221 ggaggctgag gtggggagaa ttgcttgaac ctgggagggt gaggttgag tgagccaaagg
2281 tcgcgacact gcactccagc ctgggtgaca gaggtagact ccatctcaac agaaggaaaa
2341 aaaagggaaa taggagaagg tggaaatggg tgaagagaga agtcccctca ctagctgat
2401 gagaaatcta tcttactgtg gttctccatg ggcagcagga ccatttttca gaatcaagag
2461 ggaggacagt gtgagaaggc gatgatccaa agaagacaga g

```

- Aminosäuresequenz

```

1 MEDPTLYIVE RPLPGYPDAE APEPSSAGA QAAEPPSGAGS EELIKSDQVN GVLVLSLLDK
61 IIGAVDQIQL TQAQLEERQA EMEGAVQSIQ GELSKLGAH ATTSNTVSKL LEKVRKVS VN
121 VKTVRGSLE R QAGQIKKLEV NEAELLRRRN FKVMYQDEV KLPKLSISK SLKESEALPE
181 KEGEELGEGE R PEEDAAALE LSSDEAVEVE EVIEESRAER IKRSGLRVD DFKKAFSKEK
241 MEKTKVTRT NLEKTRLTK ENLEKTRHTL EKRMNKLGR LVPARREKL KTSRDLKRS
301 FTPDHVVYAR S KTAVYKVP FTFHVKKIRE QOVEVLKATE MVEVGADDE GGAERGEAGD
361 LRRGSSPDVH ALLEITEESD AVLVDKSDSD .

```

- Ergebnis der NCBI-Genbank-Suche

			Score	E
			(bits)	Value
Sequences producing significant alignments:				
A) gb AF036249 AF036249	Mus musculus polymerase I-transcript r...	1524	0.0	
B) gb AF000421 AF000421	Homo sapiens TTF-I interacting peptide...	1366	0.0	

```

A) gb|AF036249|AF036249 Mus musculus polymerase I-transcript release factor mRNA, complete
  cds; Length = 1416
  Score = 1524 bits (769), Expect = 0.0
  Identities = 1003/1081 (92%)
  Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 207  cggaggagccgctcgggggcccggctcagaagagctgatcaagtcggaccaggtgaacggcg 266
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 207  cggaggagccgctcgggggaccggctccgacgagctgatcaagtcggaccaggtgaacggtg 266

```

```

Query: 267  tgctgggtgctgagcctcctggacaaaatcatcggggccgtagaccagatccagctgactc 326
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 267  tgctgggtgctgagcctcctggacaaaatcatcggggccgtagaccagatccagctgactc 326

```


B) gD|AF000421|AF000421 HOMO sapiens TIR-1 interacting peptide 14 mRNA, partial cds; Length = 689
Score = 1366 bits (689), Expect = 0.0
Identities = 689/689 (100%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 671  ggcgagggcgagcggcccgaggaggacgcagcggcgctggagctttcgtcggacgaggcg 730
          |||
Sbjct: 1    ggcgagggcgagcggcccgaggaggacgcagcggcgctggagctttcgtcggacgaggcg 60

Query: 731  gtggaggttgaggagttattgaggagtcctcgcagagcgtatcaagcgcagcggcctg 790
          |||
Sbjct: 61  gtggaggttgaggagttattgaggagtcctcgcagagcgtatcaagcgcagcggcctg 120

Query: 791  cggcgcgtggacgacttcaagaaggccttctccaaggagaagatggagaagaccaagtg 850
          |||
Sbjct: 121 cggcgcgtggacgacttcaagaaggccttctccaaggagaagatggagaagaccaagtg 180

Query: 851  cgtaccgcgagaacctggagaagacgcgcctcaagaccaaggaaaacctggagaagacg 910
          |||
Sbjct: 181 cgtaccgcgagaacctggagaagacgcgcctcaagaccaaggaaaacctggagaagacg 240

Query: 911  cggcacaccctggagaagcgcgatgaacaagctgggcacgcgcctggtgcccgccgagcgg 970
          |||
Sbjct: 241 cggcacaccctggagaagcgcgatgaacaagctgggcacgcgcctggtgcccgccgagcgg 300

Query: 971  cgcgagaaactgaagacgtcgcgggacaagttgcgcaaatccttcacgcccaccacgtg 1030
          |||
Sbjct: 301 cgcgagaaactgaagacgtcgcgggacaagttgcgcaaatccttcacgcccaccacgtg 360

Query: 1031 gtgtacgcgcgctccaagaccgctctacaagggtgccacccttcacctccacgtcaag 1090
          |||
Sbjct: 361 gtgtacgcgcgctccaagaccgctctacaagggtgccacccttcacctccacgtcaag 420

Query: 1091 aagatccgcgagggccaggtggaagtgctcaaggccaccgagatggtggaggtgggcgcc 1150
          |||
Sbjct: 421 aagatccgcgagggccaggtggaagtgctcaaggccaccgagatggtggaggtgggcgcc 480

Query: 1151 gacgacgacgagggcgggcggagcgcggggaggccggcgacctgcggcgcgggagcagc 1210
          |||
Sbjct: 481 gacgacgacgagggcgggcggagcgcggggaggccggcgacctgcggcgcgggagcagc 540

Query: 1211 cccgacgtgacgcgctgctggagatcacaggaggatcggacgcctgctggtggacaag 1270
          |||
Sbjct: 541 cccgacgtgacgcgctgctggagatcacaggaggatcggacgcctgctggtggacaag 600

Query: 1271 agcgacagcactgagccgcccccgctgccaccacccattcctcgtccttccgaact 1330
          |||
Sbjct: 601 agcgacagcactgagccgcccccgctgccaccacccattcctcgtccttccgaact 660

Query: 1331 tcctctttcgcattctctctcggctcgag 1359
          |||
Sbjct: 661 tcctctttcgcattctctctcggctcgag 689
```

• PubMed-Referenzen zu den gefundenen Sequenzen

A) LOCUS AAC53588 392 aa ROD 12-JUN-1998
 DEFINITION polymerase I-transcript release factor; PTRF.
 ACCESSION AAC53588
 PID g2674195
 VERSION AAC53588.1 GI:2674195
 DBSOURCE locus AF036249 accession AF036249.1
 KEYWORDS .
 SOURCE house mouse.
 ORGANISM Mus musculus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
 Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
 REFERENCE 1 (residues 1 to 392)
 AUTHORS Jansa,P., Mason,S.W., Hoffmann-Rohrer,U. and Grummt,I.
 TITLE Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein
 which induces dissociation of paused ternary transcription
 complexes
 JOURNAL EMBO J. 17 (10), 2855-2864 (1998)
 MEDLINE 98250657
 REFERENCE 2 (residues 1 to 392)
 AUTHORS Jansa,P. and Hunziker,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (30-NOV-1997) Molecular Biology of the Cell II, German
 Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, Heidelberg 69120,
 Germany
 COMMENT Method: conceptual translation.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..392
 /organism="Mus musculus"
 /db_xref="taxon:10090"
 /cell_line="NIH-3T3"
 Protein 1..392
 /product="polymerase I-transcript release factor"
 /note="PTRF"
 CDS 1..392
 /coded_by="AF036249.1:107..1285"
 /note="similar to Homo sapiens TTF-I interacting peptide
 12 and to Gallus gallus leucine zipper protein encoded by
 the sequences presented in GenBank Accession Numbers
 AF000421 and D26315 respectively"
 ORIGIN
 1 medvtlhive rpysgfpdas segpeptgqe arateepsgt gsdeliks dq vngvlvlsll
 61 dkiigavdqi qltqaqleer qaemegavqs iggelsklgk ahattsntvs kklekvrkvs
 121 vnvktvrgsl erqagqikkl evneaellrr rnfkvmiyqd evklpaklsv skslkeseal
 181 pekedgelge gerpeddtaa ielssdeave veevieesra erikrsglrr vddfkkafsk
 241 ekmektkvrt renlektrlk tkenlektrh tlekrmnklg trlpvverre klktsrdklr
 301 ksftpdhvvy arsktavykv ppftfhvkki regevevlka temvevgped devgaergea
 361 tdllrgsspd vhtlleitee sdavlvdksd sd

B) LOCUS AF000421 689 bp mRNA PRI 08-OCT-1998
 DEFINITION Homo sapiens TTF-I interacting peptide 12 mRNA, partial cds.
 ACCESSION AF000421
 NID g2183080
 VERSION AF000421.1 GI:2183080
 KEYWORDS .
 SOURCE human.
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 689)
 AUTHORS Jansa,P., Mason,S.W., Hoffmann-Rohrer,U. and Grummt,I.
 TITLE Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein
 which induces dissociation of paused ternary transcription
 complexes
 JOURNAL EMBO J. 17 (10), 2855-2864 (1998)
 MEDLINE 98250657
 REFERENCE 2 (bases 1 to 689)
 AUTHORS Jansa,P. and Grummt,I.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (20-APR-1997) Molecular Biology of the Cell II, German
 Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 280, Heidelberg
 D-69120, Germany

```

FEATURES
    source                Location/Qualifiers
                          1..689
                          /organism="Homo sapiens"
                          /db_xref="taxon:9606"
                          /tissue_type="lung"
                          /cell_type="fibroblast"
                          /cell_line="WI-38"
                          /note="isolated by yeast two-hybrid system"
    CDS                   <1..615
                          /note="TIP12; similar to G. gallus leucine zipper protein
                          encoded by GenBank Accession Number D26315"
                          /codon_start=1
                          /product="TTF-I interacting peptide 12"
                          /protein_id="AAC63404.1"
                          /db_xref="PID:g2183081"
                          /db_xref="GI:2183081"
                          /translation="GEGERPEEDAAALELSSDEAVEVEEVIEESRAERIKRSGLRVVD
                          DFKKAFSKEKMEKTKVVRTRENLEKTRLKTKENLEKTRHTLEKRMNKLGTRLVPAERRE
                          KLKTSRDKLRKSFTPDHVYARSKTAVYKVPFPTFHVKKIREGQVEVLKATEMVEVGA
                          DDDEGGAERGEAGDLRRGSSPDVHALLEITEESDAVLVDKSDSD"
BASE COUNT              145 a    212 c    244 g    88 t
ORIGIN
    1  ggcgagggcg  agcggcccga  ggaggacgca  gcggcgctgg  agctttcgtc  ggacgagggc
   61  gtggaggttg  aggaggttat  tgaggagtcc  cgcgcagagc  gtatcaagcg  cagcggcctg
  121  cggcgcgtgg  acgacttcaa  gaaggccttc  tccaaggaga  agatggagaa  gaccaaggtg
  181  cgtacccgcg  agaacctgga  gaagacgcgc  ctcaagacca  aggaaaacct  ggagaagacg
  241  cggcacaccc  tggagaagcg  catgaacaag  ctgggcacgc  gcctggtgcc  cgccgagcgg
  301  cgcgagaaac  tgaagacgtc  gcgggacaag  ttgcgcaaat  ccttcacgcc  cgaccacgtg
  361  gtgtacgcgc  gctccaagac  cgcggtctac  aaggtgccac  ccttcacctt  ccacgtcaag
  421  aagatccgcg  agggccaggt  ggaagtgtc  aaggccaccg  agatggtgga  ggtggggcgc
  481  gacgacgacg  agggcgcgcg  ggagcgcggg  gaggccggcg  acctgcggcg  cgggagcagc
  541  cccgacgtgc  acgcgtgct  ggagatcacc  gaggagtccg  acgccgtgct  ggtggacaag
  601  agcgacagcg  actgagccgc  ccccgctgcc  acccacccca  ttcctcgctc  cttccgaact
  661  tcctctttcg  cattctctct  cggctcgag

```


9.2.4 DMPK – *Homo sapiens dystrophia myotonica protein kinase*

- **DNA-Sequenz des längsten Klons**

```
1 cagggacagg cagacatgca gccagggctc cagggcctgg acaggggctg ccagggcctg
61 tgacaggagg accccnagcc cccggcccg ggaggggcca tgggtgtgcc tgtccaacat
121 gtcagccgag gtgcccgtga ggcggctcca gcagctgggtg ttggaccgg gcttcctggg
181 gctggagccc ctgctcgacc ttctcctggg cgtccaccaa gaagctgggc gcctccgaac
241 tggcccagga caagtacgtg gccgacttct tgcantgggc ggaagcccat cttggtgagg
301 cttaaggang tccgactgct cagggacaac ttctagattc tgaaggtgat ctgacncggg
361 gcgttcancg anngtttcgg tantnaagat taaancntac nggcccactg ttatgccatt
421 aagatcatta ncaatggga cntgcttaat aaggccaag tttctttct tcccttnaag
481 aaaaggacnt tttgtgaatn gggaaccgc ggttgatcac tcaacctgcc cttnccttt
541 ccaggaatga agaactacc ttgtncctg gttccttgg aatnnttacc ttgggc....
```

Die DMPK-Klone wurden lediglich ansequenziert, weshalb hier nicht die vollständige Länge gezeigt wird.

- **Aminosäuresequenz**

→ Medline-Report

- **Ergebnis der NCBI-Genbank-Suche**

```
Sequences producing significant alignments:
Score      E
(bits)     Value

ref|NM_004409.1|| Homo sapiens dystrophia myotonica protein.. 618    e-175

ref|NM_004409.1 Homo sapiens dystrophia myotonica protein kinase (DMPK), mRNA; Length =
3407
Score = 618 bits (312), Expect = e-175
Identities = 357/371 (96%), Gaps = 2/371 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1 cagggacaggcagacatgcagccagggctccagggcctggacaggggctgccagggcctg 60
      |||
Sbjct: 659 cagggacaggcagacatgcagccagggctccagggcctggacaggggctgccagggcctg 718

Query: 61 tgacaggaggaccccnagccccggccggggaggggcatggtgctgcctgtccaacat 120
      |||
Sbjct: 719 tgacaggaggaccccnagccccggccggggaggggcatggtgctgcctgtccaacat 778

Query: 121 gtcagccgaggtgcccgtgagggcctccagcagctggtgtggaccgggcttcctggg 180
      |||
Sbjct: 779 gtcagccgaggtgcccgtgagggcctccagcagctggtgtggaccgggcttcctggg 838

Query: 181 gctggagccccctgctcgaccttctcctgggctccaccaagaagctgggcccctccgaac 240
      |||
Sbjct: 839 gctggagccccctgctcgaccttctcctgggctccacc-aggagctgggcccctccgaac 897

Query: 241 tggcccaggacaagtacgtggccgacttcttgcantgggcggaagcccatcttgggtgagg 300
      |||
Sbjct: 898 tggcccaggacaagtacgtggccgacttcttgcantgggcggaagcccatcttgggtgagg 956

Query: 301 cttaaggangtccgactgctcagggacaacttctagattctgaaggtgatctgacncggg 360
      |||
Sbjct: 957 cttaaggaggtccgactgctcagggacgacttctgagattctgaaggtgatcggacgcggg 1016

Query: 361 gcgttcancga 371
      |||
Sbjct: 1017 gcgttcagcga 1027
```

• PubMed-Referenz zur gefundenen Sequenz

A) LOCUS NM_004409 3407 bp mRNA PRI 03-DEC-1999
DEFINITION Homo sapiens dystrophia myotonica protein kinase (DMPK), mRNA.
ACCESSION NM_004409
NID g4758173
VERSION NM_004409.1 GI:4758173
KEYWORDS .
SOURCE human.
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 3407)
AUTHORS Harley HG, Walsh KV, Rundle S, Brook JD, Sarfarazi M, Koch MC,
Floyd JL, Harper PS and Shaw DJ.
TITLE Localisation of the myotonic dystrophy locus to 19q13.2-19q13.3 and
its relationship to twelve polymorphic loci on 19q
JOURNAL Hum. Genet. 87 (1), 73-80 (1991)
MEDLINE 91244288
REFERENCE 2 (bases 1 to 3407)
AUTHORS Shaw DJ, McCurrach M, Rundle SA, Harley HG, Crow SR, Sohn R,
Thirion JP, Hamshere MG, Buckler AJ, Harper PS and et al.
TITLE Genomic organization and transcriptional units at the myotonic
dystrophy locus
JOURNAL Genomics 18 (3), 673-679 (1993)
MEDLINE 94140369
REFERENCE 3 (bases 1 to 3407)
AUTHORS Mahadevan,M.S., Amemiya,C.T., Jansen,G., Sabourin,L., Baird,S.,
Neville,C.E., Wormskamp,N., Segers,B., Lamerdin,J., de Jong,P.,
Wieringa,B. and Korneluk,R.G.
TITLE Structure and genomic sequence of the myotonic dystrophy (DM
kinase) gene
JOURNAL Hum. Mol. Genet. 2, 299-304 (1993)
MEDLINE 93271990
COMMENT REFSEQ: This reference sequence was derived from L08835.1.
PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
that has not yet been subject to human review. The final curated
reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..3407
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="19"
/map="19q13.3"
gene 1..3407
/gene="DMPK"
/note="DM; DMK"
/db_xref="LocusID:1760"
/db_xref="MIM:160900"
CDS 777..2666
/gene="DMPK"
/EC_number="2.7.1.-"
/note="CDS using longer exon 8b"
/codon_start=1
/db_xref="LocusID:1760"
/db_xref="MIM:160900"
/product="dystrophia myotonica protein kinase"
/protein_id="NP_004400.2"
/db_xref="PID:g5685851"
/db_xref="GI:5685851"
/translation="MSAEVRLRRLQQLVLDPGFLGLEPLDLLLGGVHQELGASELAQD
KYVADFLQWAEPIVVRLEKVRLEKQDDFEILKVIKRGAFSEVAVVKMKQTQGVYAMKIM
NKWDMLKRGEVSCFREERDVLVNGDRRITQLHFAFDENYLYLVMEYVGGDLLTL
SKFGERIPAEMARFYLAIEIVMAIDSVHRLGYVHRDIKPDNILLDRCGHIRLADFGLSCL
KLRADGTVRSVAVGTPDYLSPEILQAVGGPGTGSYGPECDWWALGVFAYEMFYGQT
PFYADSTAETYGKIVHYKEHLSLPLVDEGVPEEARDFIQRLLCPPETRLGRGGAGDFR
THPFFFGLDWDGLRDSVPPFPPTDFEGATDTCNFDLVEDGLTAMVSGGGGETLSDIREGA
PLGVHLPFVGYSYSCMALRDSEVPGPTPMEVEAEQLLEPHVQAPSLEPSVSPQDETAE
VAVPAAVPAEAEAEVTLRELQEALEEEVLRQSLSRMEAIIRDNDQNFASQLREAEA
RNRDLEAHVRQLQERMELLQAEAGATAVTGVPSPRATDPPSHLDGPPAVAVGQCPLVGP
GPMHRRHLLLPARVPRPGLSEALSLLLFAVVLRSAAALGCIGLVAHAGQLTAVWRRPG
AARAP"
mutation 2890
/gene="DMPK"
/note="Polymorphic trinucleotiderepeat ranging from 5 to
30 in normal population. In DM individuals, repeat is
unstable with copy number ranging from 50 to more than
2000"

```

polyA_signal      /repiace="ctg"
                  3385..3390
                  /gene="DMPK"
                  /note="putative"

```

```

BASE COUNT      593 a   1073 c   1104 g   637 t
ORIGIN

```

```

1  cagggagggc  ttggctccac  cactttcctc  ccccagcctt  tgggcagcag  gtcaccctcg
61  ttcaggtctt  gagggtgccc  cctcctggtc  ctgtcctcac  cacccttcc  ccactcctcg
121  ggaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaagctg  gtttaaagca  gagagcctga  gggctaaatt
181  taactgtccg  agtcggaatc  catctctgag  tcaccaaga  agctgccctg  gcctccctc
241  cccttccag  gcctcaacc  ctttctocca  cccagccca  accccagcc  ctcaaccct
301  agccccagt  tctggagctt  gtcgggagca  agggggtggt  tgctactggg  tctactcagc
361  tcaattggcc  ctgttcagca  atgggcaggt  tcttctgaa  attcatcaca  cctgtggctt
421  cctctgtgct  ctacctttt  attggggtga  cagtgtgaca  gctgagattc  tccatgcatt
481  ccccctactc  tagcactgaa  ggggtctgaa  gggcctgga  aggagggagc  ttggggggct
541  ggcttgtgag  ggggtaaggc  tgggagggcg  gaggggggct  ggaccaaggg  gtggggagaa
601  ggggaggagg  cctcggcccg  ccgcaagagag  aagtggccag  agaggccca  gggacagcca
661  gggacaggca  gacatgcagc  cagggctcca  gggcctggac  aggggctgcc  aggcctgtg
721  acaggaggac  cccgagcccc  cggcccgggg  aggggccatg  gtgctgcctg  tccaacatgt
781  cagccgaggt  gcggctgagg  cggctccagc  agctgggtgt  ggaccggggc  ttctggggc
841  tggagccct  gctcgacctt  ctctggggcg  tccaccagga  gctggggcgc  tccgaactgg
901  cccaggacaa  gtactgtggc  gacttcttgc  agtgggcgga  gcccatcctg  gtgaggctta
961  aggaggtccg  actgcagagg  gacgacttcc  agattctgaa  ggtgatcgga  cgcggggcgt
1021  tcagcgaggt  agcggtagtg  aagatgaagc  agacgggcca  ggtgtatgcc  atgaagatca
1081  tgaacaagtg  ggacatgctg  aagaggggcg  aggtgtcgtg  cttccgtgag  gagagggacg
1141  tgttgtgtaa  tggggaccgg  cgggtgatca  cgcagctgca  cttcgccttc  caggatgaga
1201  actacctgta  cctggtcatg  gagtattacg  tgggcgggga  cctgctgaca  ctgctgagca
1261  agtttgggga  gcggattccg  gccgagatgg  cgcgcttcta  cctggcggag  attgtcatgg
1321  ccatagactc  ggtgcaccgg  cttggctacg  tgcaacggga  catcaaacc  gacaacatcc
1381  tgctggaccg  ctgtggccac  atccgcctgg  ccgacttcgg  ctcttgccct  aagctgcggg
1441  tggacgaagg  ggtgcggctg  ctgggtgctg  tgggcacccc  agactacctg  tcccccgaga
1501  tcctgcagcg  tgtgggcggt  gggcctggga  caggcagcta  cgggcccag  tgtgactggt
1561  gggcgctggg  tgtattcgcc  tatgaaatgt  tctatgggca  gacgcccctc  tacgcggtat
1621  ccacggcgga  gacctatggc  aagatcgtcc  actacaagga  gcacctctct  ctgcccctgg
1681  tggacgaagg  ggtccctgag  gaggctcgag  acttcattca  gcggttctg  tgtccccgg
1741  agacacggct  gggccggggg  ggagcaggcg  acttccggac  acatcccctc  ttctttggcc
1801  tcgactggga  tggcttccgg  gacagcgtgc  ccccctttac  accggatttc  gaaggtgcca
1861  ccgacacatg  caacttcgac  ttgggtgagg  acgggctcac  tgccatggtg  agcggggcg
1921  gggagacact  gtccgacatt  cgggaagggt  cgccgctagg  ggtccacctg  ccttttggg
1981  gctactccta  ctccctgatg  gccctcaggg  acagtgaggt  cccaggcccc  acaccatgg
2041  aagtggaggc  cgagcagctg  cttgagccac  acgtgcaagc  gccagcctg  gagccctcgg
2101  tgtcccaca  ggatgaaaca  ctgaaagtgg  cagttccagc  ggtgtccct  gggcagagg
2161  ctgaggccga  ggtgacgctg  cgggagctcc  aggaagccct  ggaggaggag  gtgctcacc
2221  ggcagagcct  gagccgggag  atggaggcca  tccgcacgga  caaccagaac  ttccagctc
2281  aactacgca  ggcagaggct  cggaaaccgg  acctagaggc  acacgtccgg  cagtgcagg
2341  agcggatgga  gttgctgcag  gcagagggag  ccacagctgt  cacgggggtc  cccagtcacc
2401  gggccacgga  tccaccttcc  catctagatg  gcccccggc  cgtggctgtg  ggccagtgcc
2461  cgctgggtgg  gccaggcccc  atgcaccgcc  gccacctgct  gctccctgcc  aggttccta
2521  ggctcggcct  atcggaggcg  ctttccctgc  tcctgttcgc  cgttgttctg  tctcgtccg
2581  ccgccctggg  ctgcattggg  ttggtggccc  acgcccggca  actcaccgca  gtctggcgcc
2641  gcccaggagc  cgccccgct  ccctgaacc  tagaactgtc  ttgactccg  gggccccgtt
2701  ggaagactga  gtgcccggg  cagggcacag  aagcccgccc  caccgctgc  cagttcaca
2761  cgctccgag  cgtgggtctc  cgcccagctc  cagtctgtg  taccggggcc  gccccctagc
2821  ggccggggag  ggaggggccg  ggtcccgccc  cggcgaacgg  ggctcgaagg  gtocctgtag
2881  ccgggaatgc  tgctgtgct  gctgtgctg  ctgtgctgct  tggggggatc  acagaccatt
2941  tctttcttcc  ggccaggctg  aggcctgac  gtggatggg  aaactgcagg  cctgggaagg
3001  cagcaagccg  ggcctccgt  gttccatcct  ccacgcacc  ccacctatcg  ttggttcgca
3061  aagtgcaaa  ctttcttgg  catgacgccc  tgctctgggg  agcgtctggc  gcgatctctg
3121  cctgcttact  cgggaaatth  gcttttgcca  aaccgcttt  ttggggatc  ccgcgcccc
3181  ctccctactt  gcgctgctct  cggagcccc  gccggctccg  cccgcttcgg  cgtttggat
3241  atttattgac  ctgctcctcc  gactcgtgta  caggctacag  gaccoccaac  aaccoccatc
3301  cacgttttgg  atgcactgag  accccgacat  tcctcggtat  ttattgtctg  tccccacctc
3361  ggacccccac  ccccagccct  cgcgaataaa  aggcctcca  tctgccc

```

9.2.5 PRA1 - *Homo sapiens* prenylated Rab acceptor 1

- DNA-Sequenz des längsten Klons

```
1 ggggtcttca ggggtaccggg ctggttacag cagctctacc cctcacgacg cagacatggc
61 agcgcagaag gaccagcaga aagatgccga ggcggaaggg ctgagcggca cgacctgtct
121 gccgaagctg attccctccg gtgcaggccg ggagtggctg gagcggcgcc gcgcgacat
181 ccggccctgg agcaccttcg tggaccagca gcgcttctca cggccccgca acctggggaga
241 gctgtgccag cgcctcgtac gcaacgtgga gtactaccag agcaactatg tgttcgtgtt
301 cctgggcctc atcctgtact gtgtgggtgac gtcccctatg ttgctgggtg ctctggctgt
361 ctttttcggc gcctgttaca ttctctatct gcgcaccttg gagtccaagc ttgtgctctt
421 tggccgagag gtgagcccag cgcctcagta tgctctggct ggaggcatct cctcccctt
481 cttctggctg gctggtgctg gctcggccgt cttctgggtg ctgggagcca cctgggtgtt
541 catcggctcc cactgtgcct tccaccagat tgaggctgtg gacggggagg agctgcagat
601 ggaaccctgg tgaggtgttt tttgggacct gccggcctcc cgggccagct gccccaccc
661 tgcccatgcc tgtcctgcac ggttttctg xttgggccc cagcgcctc ccatcacaag
721 cccggggagg gatcccgctc ttgaaaaata agctgttatg ggtgtcattc agggaaaaaa
781 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaataaa aaaaaa
```

- Aminosäuresequenz

```
1 MAAQKDKQKD AEAEGLSGTT LLPKLIPSGA GREWLERRRA TIRPWSTFVD QQRFSRPRNL
61 GELCQRLVRN VEYYQSNYVF VFLGLILYCV VTSPMLLVAL AVFFGACYIL YLRTLESKLV
121 LFGREVSFAH QYALAGGISF PFFWLAGAGS AVFWVLGATL VVIGSHAAPH QIEAVDGEEL
181 QMEPV.
```

- Ergebnis der NCBI-Genbank-Suche

```
Sequences producing significant alignments:
A) ref|NM_006423.1 Homo sapiens prenylated Rab acceptor 1 (P...      1413 0.0
B) gb|AF112202.1 AF112202 Homo sapiens prenylated rab acceptor... 1362 0.0
Score      E
(bits) Value

A) ref|NM_006423.1 Homo sapiens prenylated Rab acceptor 1 (PRA1) mRNA
gi|4877284|emb|AJ133534.1|HSA133534 Homo sapiens mRNA for prenylated Rab acceptor 1
Length = 770, Score = 1413 bits (713), Expect = 0.0
Identities = 738/745 (99%), Gaps = 1/745 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 29  agcagctctaccctcacgacgcagacatggcagcgcagaaggaccagcagaaagatgcc 88
          |||
Sbjct: 4   agcagctctaccctcacgacgcagacatggcagcgcagaaggaccagcagaaagatgcc 63

Query: 89  gagggcgaagggctgagcggcacgacctgctgccgaagctgattccctccggtgcaggc 148
          |||
Sbjct: 64  gagggcgaagggctgagcggcacgacctgctgccgaagctgattccctccggtgcaggc 123

Query: 149  cgggagtggtggagcggcgccgcgcgaccatccggccctggagcaccttcgtggaccag 208
          |||
Sbjct: 124  cgggagtggtggagcggcgccgcgcgaccatccggccctggagcaccttcgtggaccag 183

Query: 209  cagcgccttctcacggccccgcaacctgggagagctgtgccagcgcctcgtacgcaactg 268
          |||
Sbjct: 184  cagcgccttctcacggccccgcaacctgggagagctgtgccagcgcctcgtacgcaactg 243

Query: 269  gagtactaccagagcaactatgtgttcgtgttcctggcctcatcctgtactgtgtgtg 328
          |||
Sbjct: 244  gagtactaccagagcaactatgtgttcgtgttcctggcctcatcctgtactgtgtgtg 303

Query: 329  acgtcccctatgttgctggtgctctggctgtcttttcggcgcctgttacattctctat 388
          |||
Sbjct: 304  acgtcccctatgttgctggtgctctggctgtcttttcggcgcctgttacattctctat 363

Query: 389  ctgcgcaccttgaggtccaagcttgctctttggccgagaggtgagccagcgcacatcag 448
          |||
Sbjct: 364  ctgcgcaccttgaggtccaagcttgctctttggccgagaggtgagccagcgcacatcag 423

Query: 449  tatgctctggctggaggcatctccttcccctctctctggctggctggtgcgggctcggcc 508
          |||
Sbjct: 424  tatgctctggctggaggcatctccttcccctctctctggctggctggtgcgggctcggcc 483

Query: 509  gtcttctgggtgctgggagccacctgggtggtcatcggctcccacgctgccttccaccag 568
          |||
Sbjct: 484  gtcttctgggtgctgggagccacctgggtggtcatcggctcccacgctgccttccaccag 543

Query: 569  attgaggctgtggacggggaggagctgcagatggaaccctgtgaggtgtttttgggac 628
          |||
Sbjct: 544  attgaaactatagacaaagaaactacaatgaaaccctatataaatatcttctaaac 603
```

```

Query: 629 ctgccgacctcccgggagcagctgccccacccctgcccatgcctgctcctgcacggctttgc 688
      |||||
Sbjct: 604 ctgccgacctcccgggagcagctgccccacccctgcccatgcctgctcctgcacggcttctgc 663

Query: 689 tg-ttgggccccacagcgccgtcccatcacaagccccgggaggatccccgcctttgaaaat 747
      || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 664 tgctcgggccccacagcgccgtcccatcacaagccccgggaggatccccgcctttgaaaat 723

Query: 748 aaagctgttatgggtgtcattcagg 772
      |||||
Sbjct: 724 aaagctgttatgggtgtcattcagg 748

```

• PubMed-Referenz zur gefundenen Sequenz

A) LOCUS NM_006423 770 bp mRNA PRI 13-JUL-1999
DEFINITION Homo sapiens prenylated Rab acceptor 1 (PRAL) mRNA.
ACCESSION NM_006423
NID g5453959
VERSION NM_006423.1 GI:5453959
KEYWORDS .
SOURCE human.
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE 1 (bases 1 to 770)
AUTHORS Bucci C, Chiariello M, Lattero D, Maiorano M and Bruni CB.
TITLE Interaction cloning and characterization of the cDNA encoding the
human prenylated rab acceptor (PRAL)
JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3), 657-662 (1999)
MEDLINE 99262153
REFERENCE 2 (bases 1 to 770)
AUTHORS Bucci,C., Chiariello,M., Lattero,D., Maiorano,M. and Bruni,C.B.
TITLE Interaction Cloning and Characterization of the cDNA Encoding the
Human Prenylated Rab acceptor (PRAL)
JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 258, 657-662 (1999)
COMMENT REFSEQ: This reference sequence was derived from AJ133534.1.
PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
that has not yet been subject to human review. The final curated
reference sequence record may be somewhat different from this one.

FEATURES
source Location/Qualifiers
1..770
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
gene 1..770
/gene="PRAL"
CDS 31..588
/gene="PRAL"
/function="interacts with Rab proteins"
/codon_start=1
/db_xref="LocusID:10567"
/evidence=experimental
/product="prenylated Rab acceptor 1"
/db_xref="PID:g5453960"
/translation="MAAQKQQKDAEAEGLSGTTLPLKIPSGAGREWLERRATIRP
WSTFVDQQRFSRPRNLGELCQRLVRNVEYYQSNYVFLGLILYCVVTPMLLVALAV
FFGACYILYLRTLESKLVLFGREVSPHEQYALAGGISFFFFWLAGAGSAVFVWVGATL
VVIGSHAAFHQIEAVDGEELQMEPV"

BASE COUNT 137 a 240 c 236 g 157 t
ORIGIN
1 cggagcagct ctaccctca cgacgcagac atggcagcgc agaaggacca gcagaaagat
61 gccgagggcg aagggctgag cggcacgacc ctgctgccga agctgattcc ctccggctgca
121 ggccgggagt ggctggagcg gcgccgcgcg accatccggc cctggagcac ctctgtggac
181 cagcagcgt tctcacggcc cgcgaacctg ggagagctgt gccagcgct cgtacgcaac
241 gtggagtact accagagcaa ctatgtgttc gtgtcctctg gccctcatcct gtactgtgtg
301 gtgacgtccc ctatgttctt ggtggctctg gctgtctttt tcggcgcctg ttacattctc
361 tatctgcgca ccttgagtc caagcttgct ctctttggcc gagaggtag cccagagcat
421 cagtatgctc tggctggagg catctccttc ccctctctct ggctggctgg tgcgggctcg
481 gccgtcttct ggggtgctgg agcccacctg gtggtcatcg gctcccacgc tgccttccac
541 cagattgagg ctgtggacgg ggaggagctg cagatggaac ccgtgtgagg tgtcttctg
601 gacctgccgg cctcccgggc cagctgcccc acccctgccc atgcctgttc tgcacggctc
661 tgctgctcgg gccacagcg ccgtcccatc acaagcccgg ggagggatcc cgcccttgaa
721 aataaagctg ttatgggtgt cattcaggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

9.2.6 EPS15R - *Homo sapiens* epidermal growth factor receptor substrate

- DNA-Sequenz des längsten Klons

```

1 cctgggcagg gtctgggacc tcagtgcacat tgacaaggat gggcacttgg atcgagatga
61 gttcgtctgt gccatgcact tgggtgtaccg agccctggag aaggagcccg tgccctccgc
121 cctgcccccg tccctcatcc caccctccaa gagaagaag actgtgttcc ctggcgccgt
181 cccgctcctg cctgccagcc ccccacaaa agacagcctc cgctccacgc cgtcccacgg
241 cagcgtcagc agcctcaaca gcacagggag cctgtccccc aagcacagcc tcaagcaaac
301 acagccaaca gtgaactggg tgggtgcccg ggacagacaag atgctgattg atgagatatt
361 cctgaagacc gacctggacc tggatggcta cgtgagtggc caggagggtga aggagatctt
421 catgcaactg ggcctcacc agaaccttct agcacacata tgggccctgg ccgatacagag
481 gcaaacgggg aagttaagca aagaccaatt cgcgttagct atgtatttca ttcagcagaa
541 ggtcagtaaa ggcacgcacc ctcctcaagt cctctcgcgc gacatgggtcc cgccttcgga
601 gagaggcacg cccggcccgg acagttcagg ctctctcggc tccggggagt ttactggcgt
661 gaaggagctt caggaatcga gtcaagagat tgcccagtta caaagagaga aatattcact
721 ggaacaagac attcgagaaa aggaagaggc aatcagacag aaaaccagcg aggtgcagga
841 ggatgctcaa gaccgcctgg acgagatgga ccagcagaag gccaaactcc gagacatgct
901 gagcgacgtc cggcagaagt gccaggatga gactcagatg atctcatcac tgaaaacgca
961 aatccaatct caggaatctg acttaagtc ccaggaagac gatctgaacc gagccaagt
1021 ggagctgaac cgattgcagc agggagaaa ccagctggag cagagcattc aggtggggcg
1081 agtccagctg gaaacatca tcaagtccct gaagtcaacg caagacgaaa tcaaccaggc
1141 aaggagcaaa ctttcccagc tgcagtgaag ccgccaggag gccacagga gcctggagca
1201 gtaatgaccg gtgctcagat gagcccatgg tgccagctgg accgacctgg ccaacctgag
1261 cgaaggcgtc tccttgccag agagggcgag ttttggagcc atggatgatc ctttcaaaaa
1321 taaagccttg ttatttagca acaacacgca agagttgcat ccggatcctt tccagacaga
1381 agacccttc aaatctgacc catttaaagg agctgacctt tcaaaaggcg acccgttcca
1441 gaatgacccc tttgcagaac agcagacaac ttcaacagat ccatttggag gggacctttt
1501 caaagaaagt gacccattcc gtggctctgc cactgacgac ttcttcaaga aacagacaaa
1561 gaatgaccca tttacctcgg atccattcac gaaaaaccct tccttacctt cgaagctcga
1621 ccoctttgaa tccagtgatc ccttttcate ctccagtgtc tcctcaaaag gatcagatcc
1681 ctttggaaac tttagatccct tcggaagtgg gtccttcaat agtctgaaag gctttgcca
1741 cttcagccag atgtccaagc ccccaccttc tggccctttc acctcctcct tgggaggggc
1801 aggtattcct gatgacccc ttaaaagtaa acaggacact cctgctctgc ctccgaagaa
1861 acctgctcct ccacggccta aaccgcccag cgaagcaatg gctgaacaga aaaattctgc
1921 attgtactcg ctgctgggtg gtaaaagtac acctgtaagc cagcttgggt ccgcagattt
1981 cccgaggccc ccgatccatt ccagccattg ggggctgaca gccgagacc gttccaaagt
2041 aaaaaggggg ttgggggacc gttagtgga aaagacctat ttgtcccctc ctctgcagct
2101 aaaccttcta aggcctctgc ctccggcttt gcagacttca cctctgtaag ttgagtcctc
2161 cgctccggg ccaccccact cccttcgct tgcagcttcc ctgggatttt tgtctcctt
2221 taaaggcaaa cctcccagct tcttagcct cttggtacct cacactctct gtccctcgcg
2281 ttatttattc tacactgcca cttctgtaag aaaaacagtt tctcaataaa aaaaaaaga
2341 gccgcaaaaa aaaaaaaaaa

```

- Aminosäuresequenz

```

1 LGRVWDLSDI DKDGHLDLDRDE FAVAMHLVYR ALEKEPVPSPA LPPSLIPPSK RKKTVFPGAV
61 PVLPAASPPP DSLRSTPSHG SVSSLNSTGS LSPKHSILKQT QPTVNWVVPV ADKMRFDEIF
121 LKTDLDDLDGY VSGQEVKEIF MHSGLTQNL AHIALADTR QTGKLSKDQF ALAMYFIIQK
181 VSKGIDPPQV LSPDMVPPSE RGTGPDSSG SLGSGEFTGV KELDDISQEI AQLQREKYSL
241 EQDIREKEEA IRQKTSEVQE LQNDLDRETS SLQELEAQKQ DAQDRLDEMD QQKAKLRDML
301 SDVRQKQDE TQMISLKTQ IQSQESDLKS QEDDLNRAKS ELNRLQEEET QLEQSIQAGR
361 VQLETIIKSL KSTQDEINQA RSKLSQLHES RQEAHRSLEQ YDQVLDGAHG ASLTDLANLS
421 EGVSLAERGS FGAMDDPFKN KALLFSNNTQ ELHPDPFQTE DPFKSDPFKG ADPFKGDPFQ
481 NDPFAEQQT STDPFGGDPF KESDPFRGSA TDDFFKKQTK NDPFTSDPFT KNPSLPSKLD
541 PFESSDPFSS SSVSSKGSDF FGTLDPFSG SFNSAEGFAD FSQMSKPPPS GPFTSSLGGA
601 GFSDDPFKSK QDTPALPPKK PAPPKPKPPS EAMAEQKNSA LYSLLGGKST PVSQLGSAF
661 PRPPIHSSHW GLTAATRISKV KRGLGTRLVE KTHLSPPLQL NLLRPLPRAL QTSPL.

```

- Ergebnis der NCBI-Genbank-Suche

Sequences producing significant alignments:	Score	E
	(bits)	Value
A) gb AF110265.1 AF110265 Homo sapiens epidermal growth factor...	3751	0.0

```

gb|AF110265.1|AF110265 Homo sapiens epidermal growth factor receptor substrate EPS15R mRNA,
complete cds, Length = 2595
Score = 3751 bits (1892), Expect = 0.0
Identities = 1892/1892 (100%)
Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 1 cctgggcagggtctgggacctcagtgcattgacaaggatgggacacttggatcgagatga 60
|
Sbjct: 489 cctgggcagggtctgggacctcagtgcattgacaaggatgggacacttggatcgagatga 548
|
Query: 61 gttcgtctgtgccatgcacttgggtgtaccgaccctggagaaggagcccgctccctccgc 120
|

```

```

Query: 141 cctgccccgctccctcatcccaccctccaagagaaagaagactgtgttccctggcgccgt 180
|||||||||
Sbjct: 609 cctgccccgctccctcatcccaccctccaagagaaagaagactgtgttccctggcgccgt 668

Query: 181 ccccgctcctgctgcccagccccaccaaaaagacagcctccgctccacgcccgtccacagg 240
|||||||||
Sbjct: 669 ccccgctcctgctgcccagccccaccaaaaagacagcctccgctccacgcccgtccacagg 728

Query: 241 cagcgtcagcagcctcaacagcacagggagcctgtcccccaagcacagcctcaagcaaac 300
|||||||||
Sbjct: 729 cagcgtcagcagcctcaacagcacagggagcctgtcccccaagcacagcctcaagcaaac 788

Query: 301 acagccaacagtgaaactgggtggcgcccgaggagcagaagatgagatttgatgagatatt 360
|||||||||
Sbjct: 789 acagccaacagtgaaactgggtggcgcccgaggagcagaagatgagatttgatgagatatt 848

Query: 361 cctgaagaccgacctggacctggatggctacgtgagtgccaggaggatgaaggagatcct 420
|||||||||
Sbjct: 849 cctgaagaccgacctggacctggatggctacgtgagtgccaggaggatgaaggagatcct 908

Query: 421 catgcaactcgggcctcaccagaaccttctagcacacatattgggcctggccgatacagag 480
|||||||||
Sbjct: 909 catgcaactcgggcctcaccagaaccttctagcacacatattgggcctggccgatacagag 968

Query: 481 gcaaacggggaaagttaaagcaaaccaattcgcggttagctatgtatttcatcagcagaa 540
|||||||||
Sbjct: 969 gcaaacggggaaagttaaagcaaaccaattcgcggttagctatgtatttcatcagcagaa 1028

Query: 541 ggtcagtaaaaggcatcgaccctcctcaagtcctctcgccggacatggtcccgccttcgga 600
|||||||||
Sbjct: 1029 ggtcagtaaaaggcatcgaccctcctcaagtcctctcgccggacatggtcccgccttcgga 1088

Query: 601 gagaggcacgcccggccggacagttcaggctcctcgggctccggggagtttactggcg 660
|||||||||
Sbjct: 1089 gagaggcacgcccggccggacagttcaggctcctcgggctccggggagtttactggcg 1148

Query: 661 gaaggagcttgatgacatcagtcaagagattgccagttacaagagagaaatattcact 720
|||||||||
Sbjct: 1149 gaaggagcttgatgacatcagtcaagagattgccagttacaagagagaaatattcact 1208

Query: 721 ggaacaagacattcgagaaaaggaagaggcaatcagacagaaaaccagcgaggtgcagga 780
|||||||||
Sbjct: 1209 ggaacaagacattcgagaaaaggaagaggcaatcagacagaaaaccagcgaggtgcagga 1268

Query: 781 attacaaaatgacctagaccgggaaacaagcagtttgcaggagctcagggtcagaaaca 840
|||||||||
Sbjct: 1269 attacaaaatgacctagaccgggaaacaagcagtttgcaggagctcagggtcagaaaca 1328

Query: 841 ggatgctcaagaccgctggacgagatggaccagcagaaggccaagctccgagacatgct 900
|||||||||
Sbjct: 1329 ggatgctcaagaccgctggacgagatggaccagcagaaggccaagctccgagacatgct 1388

Query: 901 gagcgcagtccggcagaagtgccaggatgagactcagatgatctcatcactgaaaacgca 960
|||||||||
Sbjct: 1389 gagcgcagtccggcagaagtgccaggatgagactcagatgatctcatcactgaaaacgca 1448

Query: 961 aatccaatctcaggaatctgacttaaagtccaggaagacgatctgaaccgagccaagt 1020
|||||||||
Sbjct: 1449 aatccaatctcaggaatctgacttaaagtccaggaagacgatctgaaccgagccaagt 1508

Query: 1021 ggagctgaaccgattgacagcaggagaaaccagctggagcagagcattcaggctgggcg 1080
|||||||||
Sbjct: 1509 ggagctgaaccgattgacagcaggagaaaccagctggagcagagcattcaggctgggcg 1568

Query: 1081 agtccagctggaaacctcatcaagtccctgaagtcaacgcaagacgaaatcaaccaggc 1140
|||||||||
Sbjct: 1569 agtccagctggaaacctcatcaagtccctgaagtcaacgcaagacgaaatcaaccaggc 1628

Query: 1141 aaggagcaaaactttccagctgcatgaaagccgccaggaggcccacaggagcctggagca 1200
|||||||||
Sbjct: 1629 aaggagcaaaactttccagctgcatgaaagccgccaggaggcccacaggagcctggagca 1688

Query: 1201 gtatgaccagtgctcgatggagcccatggtgccagcctgaccgacctggccaacctgag 1260
|||||||||
Sbjct: 1689 gtatgaccagtgctcgatggagcccatggtgccagcctgaccgacctggccaacctgag 1748

Query: 1261 cgaaggcgctcctcgccagagagggcagttttggagccatggatgatcctttcaaaa 1320
|||||||||

```

Query: 1321 taaagccttgattattagcaacaacacgcaagagttgcatccggatcctttccagacaga 1380
 |||
 Sbjct: 1809 taaagccttgattattagcaacaacacgcaagagttgcatccggatcctttccagacaga 1868

Query: 1381 agacccttcaaatctgacccatttaaggagctgacccttcaaaggcgaccggtcca 1440
 |||
 Sbjct: 1869 agacccttcaaatctgacccatttaaggagctgacccttcaaaggcgaccggtcca 1928

Query: 1441 gaatgaccctttgcagaacagcagacaacttcaacagatccatttggaggggacccttt 1500
 |||
 Sbjct: 1929 gaatgaccctttgcagaacagcagacaacttcaacagatccatttggaggggacccttt 1988

Query: 1501 caaagaaagtgaccattccgtggctctgccactgacgacttcttcaagaaacagacaaa 1560
 |||
 Sbjct: 1989 caaagaaagtgaccattccgtggctctgccactgacgacttcttcaagaaacagacaaa 2048

Query: 1561 gaatgaccatttacctcggatccattcacgaaaaacccttcttaccttcgaagctcga 1620
 |||
 Sbjct: 2049 gaatgaccatttacctcggatccattcacgaaaaacccttcttaccttcgaagctcga 2108

Query: 1621 cccctttgaatccagtgatcccttttcatcctccagtgtctcctcaaaggatcagatcc 1680
 |||
 Sbjct: 2109 cccctttgaatccagtgatcccttttcatcctccagtgtctcctcaaaggatcagatcc 2168

Query: 1681 ctttggaaaccttagatcccttcggaagtgggtccttcaatagtgtgaaggctttgccga 1740
 |||
 Sbjct: 2169 ctttggaaaccttagatcccttcggaagtgggtccttcaatagtgtgaaggctttgccga 2228

Query: 1741 cttcagccagatgtccaagccccaccttctggccctttcacctcctccttgggaggggc 1800
 |||
 Sbjct: 2229 cttcagccagatgtccaagccccaccttctggccctttcacctcctccttgggaggggc 2288

Query: 1801 aggattctcagatgacccctttaaagtaaacaggacactcctgctctgcctccgaagaa 1860
 |||
 Sbjct: 2289 aggattctcagatgacccctttaaagtaaacaggacactcctgctctgcctccgaagaa 2348

Query: 1861 acctgctcctccacggcctaaaccgcccagcg 1892
 |||
 Sbjct: 2349 acctgctcctccacggcctaaaccgcccagcg 2380

Score = 396 bits (200), Expect = e-107
 Identities = 213/216 (98%), Gaps = 1/216 (0%)
 Strand = Plus / Plus

Query: 1940 ggtaaaagtacacctgtaagccagcttgggtccgcaga-tttcccaggcccccgatcca 1998
 |||
 Sbjct: 2380 ggtaaaagtacacctgtaagccagcttgggtccgcagactttcccaggcccccgatcca 2439

Query: 1999 ttccagccattgggggctgacagcgcgaccggttccaaagtaaaaaggggtttggggac 2058
 |||
 Sbjct: 2440 ttccagccactcggggctgacagcgcgaccggttccaaagtaaaaaggggtttggggac 2499

Query: 2059 ccgtttagtggaagaaagaccatttgtcccctcctctgcagctaaaccttctaaggcctct 2118
 |||
 Sbjct: 2500 ccgtttagtggaagaaagaccatttgtcccctcctctgcagctaaaccttctaaggcctct 2559

Query: 2119 gcctcgggctttgcagacttcacctctgtaagttga 2154
 |||
 Sbjct: 2560 gcctcgggctttgcagacttcacctctgtaagttga 2595

• PubMed-Referenz zur gefundenen Sequenz

LOCUS AF110265 2595 bp mRNA PRI 01-JAN-2000
 DEFINITION Homo sapiens epidermal growth factor receptor substrate EPS15R mRNA, complete cds.
 ACCESSION AF110265
 NID g6650598
 VERSION AF110265.1 GI:6650598
 KEYWORDS .
 SOURCE human.
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2595)
 AUTHORS Nakashima,S., Morinaka,K., Ikeda,M., Kishida,S., Koyama,S. and Kikuchi,A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (01-DEC-1998) Biochemistry, Hiroshima University School of Medicine, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..2595
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /tissue_type="brain"
 CDS 1..2595
 /codon_start=1
 /product="epidermal growth factor receptor substrate EPS15R"
 /protein_id="AAF21930.1"
 /db_xref="PID:g6650599"
 /db_xref="GI:6650599"
 /translation="MAAPLIPLSQIPTGNSLYESYYKQVDPAYTRVGVASEAALFLK KSGLSDIILGKIWDLADPEGKGFLLDKQGFYVALRLVACAQSGHEVTLNLSMPPPK FHTSSPLMVTPPSAEAHWAVRVEEKAKFDGIFESLLP INGLLSGDKVKPVLNMSKLP LDVLRVWDLSDIDKDGHLDRDEFAMHMLVYRALEKEPVPSALPPSLIPPSKRKKT VFGAVPVLPA SPKPSLRSTPSHGVSSSLNSTGSLSPKHSKQTPVNWVVPVADK MRFDEIFLKTDLDLGYSVSGQEVKEIFMHSGLTQNLLAHIWALADTRQTGKLSKDQFA LAMYFIQQKVKSGIDPPQVLS PDMVPPSERGTPGPDSSGSLGSGEFTGVKELDDISQE IAQLQREKYSLEQDIREKEEAI RQKTSEVQELQNDLDRETSSIQELEAQKQDAQDRLD EMDQQAKLRDMLSDVRQKQDE TQMISSLKTQIQSQESDLKSEQEDDLNRAKSELNRL QQEETQLEQSIQAGRVQLETI IKS LKSTQDEINQARSKLSQLHESRQEAHRSLEQYDQ VLDGAHGASLTDLANLSEGVSLA ERGSFGAMDDPFKNKALLFSNNTQELHPDPFQTED PFKSDPFKGDAPFKGDPFQND PFAEQQTSTDPFGGDPFKESDPFRGSATDDDFKKQT KNDPFTSDPFTKNPSLPSKLD PFESSDPFSSSVSSKSGSDPFGLDPFGSGSFSNSAEG FADFSQMSKPPSPGPFSSLGGAG FSDPFKSKQDTPALPPKPPAPPRKPPSGKSTP VSQLGSADFPPEADPFQPLGAD SGGDPFQSKKGFDDPFSGKDPFVSSAAKPSKASASG FADFTSVS"

BASE COUNT 673 a 745 c 661 g 516 t
 ORIGIN

```

1 atggcggcgc cgctcatccc cctctcccag cagattccca ctggaaattc gttgtatgaa
61 tcttattaca agcaggtcga tccggcatac acagggaggg tggggcgag tgaagctgcy
121 ctttttctaa agaagtctgg cctctcggac attatccttg ggaagatatg ggacttggcc
181 gatccagaag gtaaagggtt cttggacaaa cagggtttct atgttgcact gagactgggt
241 gcctgtgcac agagtggcca tgaagttacc ttgagcaatc tgaatttgag catgccaccg
301 cctaaatttc acgacaccag cagccctctg atggtcacac cgccctctgc agaggccac
361 tgggctgtga gggtggaaga aaaggcmeta tttgatggga tttttgaaag cctcttgccc
421 atcaatggtt tgctctctgg agacaaagtc aagccagtc tcatgaactc aaagctgcct
481 ctgtatgtcc tgggcagggt ctgggacctc agtgacattg acaaggatgg gcaactggat
541 cgagatgagt tcgctgtggc catgcacttg gtgtaccgag ccctggagaa ggagcccgtg
601 ccctccgccc tgcccccgtc cctcatccca ccctccaaga gaaagaagac tgtgttccct
661 ggcgcgctcc ccgtcctgcc tgccagcccc ccacmetaag acagcctccg ctccacgccc
721 tcccacggca gcgtcagcag cctcaacagc acagggagcc tgtcccccac gcacagcctc
781 aagcaaacac agccaacagt gaactgggtg gtgcccgtgg cagacaagat gcgatttgat
841 gagatattcc tgaagaccga cctggacctg gatggctacg tgagtggcca ggaggtgaag
901 gagatcttca tgcactcggg cctcaccag aaccttctag cacacatatg ggccctggcc
961 gatcagaggc aaacggggaa gtaagmeta gaccaattcg cgttagctat gtatttcatt
1021 cagcagaagg tcagtaaagg catcgacctc cctcaagtcc tctcgcggga catggtcccc
1081 ccttcggaga gaggcacgcc cggcccggac agttcaggct ctctcggctc cggggagttt
1141 actggcgtga aggagcttga tgacatcagt caagagattg cccagttaca aagagagaaa
1201 tattcactgg aacaagacat tcgagmetaa gaagaggcaa tcagacagaa aaccagcgag
1261 gtgcaggaat tacmetaatga cctagaccgg gaaacaagca gtttgcagga gctcagggct
1321 cagmetaacag atgctcaaga ccgctggacc gagatggacc agcagaaaggc caagctccga
1381 gacatgctga gcgacgtccg gcagaagtgc caggatgaga ctcagatgat ctcatcactg
1441 metaacgmeta tccaatctca ggaatctgac ttaagtccc aggaagacga tctgaaccga
1501 gccagctcgg agctgaaccg attgcagcag gagmetaacc agctggagca gacattcag
1561 gctgggcygag tccagctgga aaccatcctc aagtcctctg agtcaacgca agacgmeta
1621 aaccagcmeta ggagmetaact tcccagctg catgmetaag gccagggagc ccacagggc
1681 atggcggcgc cgctcatccc cctctcccag cagattccca ctggaaattc gttgtatgaa

```

1741 aacctgagcg aaggcgtctc cctggcagag aggggcagtt ttggagccat ggatgatcct
1801 ttcaaaaata aagccttggt atttagcaac aacacgcaag agttgcatcc ggatcctttc
1861 cagacagaag accccttcaa atctgaccca tttaaaggag ctgaccctt caaaggcgac
1921 cgttccaga atgaccctt tgcagaacag cagacaactt caacagatcc atttggaggg
1981 gaccctttca aagaaagtga ccattccgt ggctctgcca ctgacgactt cttcaagaaa
2041 cagacaaaga atgaccatt tacctcggat ccattcacga aaaacccttc cttaccttcg
2101 aagctcgacc ctttgaatc cagtgatccc ttttcatcct ccagtgtctc ctcaaaagga
2161 tcagatccct ttggaacctt agatcccttc ggaagtgggt cttcaatag tgctgaaggc
2221 ttgcccact tcagccagat gtccaagccc ccaccttctg gccctttcac ctctccttg
2281 ggagggcgag gattctcaga tgacccttt aaaagtaaac aggacactcc tgctctgct
2341 ccgaagaaac ctgctcctcc acggcctaaa ccgccagcg gtaaaagtac acctgtaagc
2401 cagcttggtt ccgcagactt tcccgaggcc cccgatccat tccagccact cggggctgac
2461 agcggcgacc cgttccaaag taaaaagggg tttggggacc cgtttagtgg aaaagacca
2521 tttgtccct cctctgcagc taaaccttct aaggcctctg cctcgggctt tgcagacttc
2581 acctctgtaa gttga

9.2.7 P88^{riPK} - Homo sapiens repressor of interferon-inducible double-stranded RNA protein-kinase (PKR) dependent inhibitor P58, (P58^{PK} repressor)

• DNA-Sequenz des längsten Klons

```

1 ccagaaggtc tctttactcc agataacttt caggcactgc tggagtgtcg gataaattct
61 ggTgaagagg ttctgagaaa gcggtttgag acaacagcag ttaacacgtt gttttgttca
121 aaaacacagc agaggcagat gctagagatc tgtgagagct gtattcgaga agaaactctc
181 aggggaagtga gagactcaca cttcttttcc attatcactg acgatgtagt ggacatagca
241 ggggaagagc acctacctgt gttggtgagg tttggtgatg aatctcataa cctaagagag
301 gaatttatag gcttcctgcc ttatgaagcc gatgcagaaa ttttggtctg gaaatttcac
361 actatgataa ctgagaagtg gggattaaat atggagtatt gtcgtggcca ggcttacatt
421 gtctctagtg gattttcttc caaaaatgaaa gttggtgctt ctgacttttt agagaaaatc
481 ccccaagcta tctacacact ctgctcttcc tgtgccttaa atatgtgggt ggcaaaatca
541 gtacctgtta tgggagtatc ttttgcatca ggaacaattg aggaagtttg ttcttttttc
601 catcgatcac cacaactgct tttagaactt gacaacgtaa tttctgttct ttttcagaac
661 agtaaagaaa ggggtaaaga actgaaggaa atctgccatt ctcagtggac aggcaggcat
721 gatgcttttg aaattttagt ggaactctcg caagcacttg ttttatgttt agatggtata
781 aatagtgaca caaatattag atggaataac tatatagctg gccgagcatt tgtactctgc
841 agtgcagtgt cagattttga tttcattggt actatgtgtg ttcttaaaaa tgtcctatct
901 tttacaagag cctttgggaa aaacctccag gggcaaacct ctgatgtctt ctttgcggtc
961 ggtagcttga ctgagctact gccttcactc aacgaagtga tggaaaatat tgaagtttat
1021 catgaatttt ggtttgagga agccacaaaat ttggcaacca aacttgatata tcaaatgaaa
1081 ctccctggga aattccgcag agctcaccag ggtaacttgg aatctcagct aacctctgag
1141 agttactata aagaaaacct aagtgtccca acagtggagc acattattca ggaacttaaa
1201 gatattttct cagaacagca cctcaagctc cttaaatgct tatctctggt accctcagtc
1261 atgggacaac tcaaatcaa tacgtcggag gaacaccatg ctgacatgta tagaagtgac
1321 ttaccacaatc ctgacacgct gtcagctgag cttcattggt ggagaatcaa atggaaacac
1381 agggggaaag atatagagct tccgtccacc atctatgaag ccctccacct gcctgacatc
1441 aagttttttc ctaatgtgta tgcattgctg aaggtcctgt gtattcttcc tgtgatgaag
1501 gttgagaatg agcggatga aaatggacga aagcgtctta aagcatatth gaggaacact
1561 ttgacagacc aaaggtcaag taacttggct ttgcttaaca taaatthtga tataaaacac
1621 gactggatt taatggtgga cacatatatt aaactctata caagtaagtc agagcttctc
1681 acagataaatt ccgaaaactgt ggaaaataacc taagagactt ttaaaaatag gctttcttat
1741 atttgatatt tggagaagaaa agccgtaagg tgtatgtaga ccacttaatc actaaatatac
1801 tttgcctata ggactccatt gaatacatta gccattgata atctacctgt ttaaatggcc
1861 cctggttgaa cctcaagct ttgaagacct acctgttctt ccagaagaga acgttgaag
1921 tgccatgttt ccttttgctg gatctctggt gatggcactc tggaaattgt tcagtttaag
1981 catttttagac atagcattta ttatcactgt ggatctctac ttgttgggtg ttatgaattc
2041 tttgaagaaa tatattttga agagggtggt gaggaaggaa tacatthtat aaaaatgtgt
2101 agtgaagccc acaattgacc tttgactaat aggttthta agtatgthta aaatctatac
2161 tggacagtta caagaaatta ccggagaaaa gcttgtgagc tcaccaaaaca aggatttcag
2221 tgtagattht gtctttcttg aacttaaaga acaaaatgac aaagtttgaa tggaaaagcc
2281 tgctgtgtgt ccacatctcg ttgctgtthta cattcctttg tggagcctac atcttctaa
2341 gctthtttagc aggtatatgt tgaacacttc tgtthcatgg ttgagacaga atcagagcc
2401 atggatactg acaactgatt tgtctgttht tthtctctgt cthtttccat gactcttata
2461 tactgcctca tcttgattta taagcaaaac ctggaaaacc tacaaaataa gtgttgtgtg
2521 ttatctagaa aaatatggaa aatatgtctg ttatthtttg tgaagaaaat caatthttga
2581 tagthttatth caatctaaat aaaatgtgaa thttgtthta agcttaggca cattatthtt
2641 tgtgggtgca aaacatctct gtgtaaatth tctthaaacat ttgataaaca gcttcacaat
2701 ttaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

• Aminosäuresequenz

```

1 PEGLFTPDNF QALLECRINS GEEVLRKRF TAVNTLFCST KTQQRQMLEI CESCIREETL
61 REVRDShFFS IITDDVVDIA GEEHLPVLRV FVDESHNLRE EFIGFLPYEA DAEILAVKfH
121 TMITEKWGLN MEYCRGQAYI VSSGFSSKMK VVASRLLEKY PQAIYTLCS CALNMWLAKS
181 VPVMGVSVAL GTIEEVCSFF HRSPQLLLEL DNVISVLFQN SKERgKELKE ICHSQWTGRH
241 DAFEILVELL QALVLCldGI NSDTNIRWNN YIAGRAFVLC SAVSDFDFIV TIVVLKNVLS
301 FTRAFgKNLQ QGTSDFVFAA GSLTAVLHSL NEVMENIEVY HEFWFEEATN LATKLDIQMK
361 LPgKFRRAHQ GNLESQlTSE SYKETSLSVP TVEHIQELK DIFSEQHLKA LKCLSLVPSV
421 MGQLKFNTSE EHHADMYRSD LPNPDTLSAE LHCWRIKWKH RGKDIElPST IYEALHLpDI
481 KFFPNVYALL KVLClLPVMK VENERYENGR KRLKAYLRNT LTDQRSSNLA LLNINFDIKH
541 DLDLMVDTYI KLYTSKSElP TDNSETVENT .

```

• **Ergebnis der NCBI-Genbank-Suche**

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
A) emb AL049970.1 HSM800317 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564B1...	5095	0.0
B) ref NM_004705.1 Homo sapiens protein-kinase, interferon-i...	1768	0.0

B) ref|NM_004705.1| Homo sapiens protein-kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repressor), (PRKRIR) mRNA gi 2822276 gb AF007393 AF007393 Homo sapiens P52rIPK mRNA, complete cds
 Length = 1479
 Score = 1768 bits (892), Expect = 0.0
 Identities = 892/892 (100%)
 Strand = Plus / Plus

```

Query: 1      ccagaaggtctctttactccagataactttcaggcactgctggagtgtcggataaattct 60
             |||
Sbjct: 574    ccagaaggtctctttactccagataactttcaggcactgctggagtgtcggataaattct 633

Query: 61      ggtgaagaggttctgagaaagcgggttgagacaacacagcagttaacacgttgtttgttca 120
             |||
Sbjct: 634    ggtgaagaggttctgagaaagcgggttgagacaacacagcagttaacacgttgtttgttca 693

Query: 121     aaaacacagcagaggcagatgctagagatctgtgagagctgtattcgagaagaaactctc 180
             |||
Sbjct: 694     aaaacacagcagaggcagatgctagagatctgtgagagctgtattcgagaagaaactctc 753

Query: 181     agggaagtggagagactcacacttctttccattatcactgacgatgtagtgacatagca 240
             |||
Sbjct: 754     agggaagtggagagactcacacttctttccattatcactgacgatgtagtgacatagca 813

Query: 241     ggggaagagcacctacctgtgttggtgaggttggttgatgaatctcataacctaagagag 300
             |||
Sbjct: 814     ggggaagagcacctacctgtgttggtgaggttggttgatgaatctcataacctaagagag 873

Query: 301     gaatttataggcttctctgccttatgaagccgatgcagaaatgttggtgtgaaatttcac 360
             |||
Sbjct: 874     gaatttataggcttctctgccttatgaagccgatgcagaaatgttggtgtgaaatttcac 933

Query: 361     actatgataactgagaagtggggattaataatggagtagtgcgtggccaggcttacatt 420
             |||
Sbjct: 934     actatgataactgagaagtggggattaataatggagtagtgcgtggccaggcttacatt 993

Query: 421     gtctctagtggattttcttccaaaatgaaagtgtgtgcttctagacttttagagaaatat 480
             |||
Sbjct: 994     gtctctagtggattttcttccaaaatgaaagtgtgtgcttctagacttttagagaaatat 1053

Query: 481     cccaagctatctacacactctgctcttctctgtgccttaaataatgtggttgccaaaatca 540
             |||
Sbjct: 1054    cccaagctatctacacactctgctcttctctgtgccttaaataatgtggttgccaaaatca 1113

Query: 541     gtacctgttatgggagtagtctgttgcattaggaacaattgaggaagttgttcttttttc 600
             |||
Sbjct: 1114    gtacctgttatgggagtagtctgttgcattaggaacaattgaggaagttgttcttttttc 1173

Query: 601     catcgatcaccacaactgcttttagaacttgacaacgtaatttctgttctttttcagaac 660
             |||
Sbjct: 1174    catcgatcaccacaactgcttttagaacttgacaacgtaatttctgttctttttcagaac 1233

Query: 661     agtaaagaaaggggtaaagaactgaaggaaatctgccattctcagtgacaggcaggcat 720
             |||
Sbjct: 1234    agtaaagaaaggggtaaagaactgaaggaaatctgccattctcagtgacaggcaggcat 1293

Query: 721     gatgcttttgaatatttagtgaactcctgcaagcactgttttatgtttagatgggata 780
             |||
Sbjct: 1294    gatgcttttgaatatttagtgaactcctgcaagcactgttttatgtttagatgggata 1353

Query: 781     aatagtgacacaaatattagatggaataactatatactggccgagcatttgtactctgc 840
             |||
Sbjct: 1354    aatagtgacacaaatattagatggaataactatatactggccgagcatttgtactctgc 1413

Query: 841     agtgcagtgtcagattttgatcttcatgttactattgttcttataaaatg 892
             |||
Sbjct: 1414    agtgcagtgtcagattttgatcttcatgttactattgttcttataaaatg 1465
  
```

• **PubMed-Referenz zur gefundenen Sequenz**

```

LOCUS       NM_004705      1479 bp      mRNA           PRI           19-JUL-1999
DEFINITION  Homo sapiens protein-kinase, interferon-inducible double stranded
            RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repressor) (PRKRIR) mRNA.
ACCESSION  NM_004705
NID        g4758871
VERSION    NM_004705.1  GI:4758871
SOURCE     human.
ORGANISM   Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1479)
AUTHORS    Gale,M. Jr., Blakely,C.M., Hopkins,D.A., Melville,M.W., Wambach,M.,
            Romano,P.R. and Katze,M.G.
TITLE      Regulation of interferon-induced protein kinase PKR: modulation of
            P58IPK inhibitory function by a novel protein, P52rIPK
JOURNAL    Mol. Cell. Biol. 18 (2), 859-871 (1998); MEDLINE 98107671
COMMENT    REFSEQ: This reference sequence was derived from AF007393.1.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..1479
                        /organism="Homo sapiens"
                        /db_xref="taxon:9606"
                        /map="11q13.5"
                        /cell_line="HeLa"
            gene           1..1479
                        /gene="PRKRIR"
                        /note="P52RIPK"
            CDS            1..1479
                        /function="repressor of p58IPK protein kinase inhibitor"
                        /function="upstream regulator of interferon induced
                        protein kinase PKR"
                        /note="52 kDa"
                        /product="protein-kinase, interferon-inducible double
                        stranded RNA dependent inhibitor, repressor of (P58 repressor)"
                        /protein_id="NP_004696.1"
                        /db_xref="PID:g4758872"
                        /translation="MPNFCAAPNCTRKSTQSDLAFFRFRDPRARCQKWWENCRRADLE
                        DKTPDQLNKHYRLCAKHFETSMICRTSPYRTVLRDNIPTIFDLTSHLNNPHSRHRKR
                        IKELSEDEIRTLKQKKIDETSEQEQKHKETNNSNAQNPSEEEGEGQDEDILPLTLEEK
                        ENKEYLKSLEIFILILMGKQNIPLDGHEADEIPEGLFTPDNPFQALLECRINSGEVLRK
                        RFETTAVNTLFCSKTQQRQMLEICESCIREEITLREVRDSSHFFSIITDDVVDIAGEEHL
                        PVLVRFVDESHNLREEFIGFLPYEADAEILAVKFHTMITEKWGLNMEYCRGQAIYVSS
                        GFSSKMKVVASRLLEKYPQAIYTLCSICALNMWLAKSPVPMGVSVALGTIEEVCSFFH
                        RSPQLLLELDNIVSVLQNSKERGKELKEICHSQWTRGRDAFEILVELLQALVLCCLDG
                        INSDTNIRWNNYIAGRAVFLCSAVSDFDFIVTIVVLKNEIKI"
BASE COUNT 477 a      272 c      328 g      402 t
ORIGIN      1 atgccgaact tctgcgctgc ccccaactgc acgcggaaga gcacgcagtc cgacttggcc
            61 ttcttcaggt tcccgcggga ccttgccaga tgccagaagt gggtgagaa ctgtaggaga
            121 cgacacttag aagataaaac acctgatcag ctaaataaac attatcgatt atgtgccaaa
            181 ctttttgaga cctctatgat ctgtagaact agtccctata ggacagtctc tcgagataat
            241 gcaataccaa caatatttga tcttaccagt catttgaaca acccacatag tagacacaga
            301 aaacgaataa aagaactgag tgaagatgaa atcaggacac tgaaacagaa aaaaattgat
            361 gaaacttctg agcaggaaca aaaacataaa gaaaccaaca atagcaatgc tcagaacccc
            421 agcgaagaag aggggtgaag gcaagatgag gacattttac ctctaaccct tgaagagaag
            481 gaaaacaaag aatacctaaa atctctatct gaaatcttga ttctgatggg aaagcaaaac
            541 atacctctgg atggacatga ggctgatgaa atcccagaag gtctctttac tccagataac
            601 tttcaggcac tgctggagtg tcggataaat tctggtgaag aggttctgag aaagcggttt
            661 gagacaacag cagttaacac gttgttttgt tcaaaaacac agcagaggca gatgctagag
            721 atctgtgaga gctgtattcg agaagaaact ctcagggaag tgagagactc acacttcttt
            781 tccattatca ctgacgatgt agtggacata gcagggaag agcacctacc tgtgttggtg
            841 aggtttgttg atgaatctca taacctaaaga gaggaattta taggcttctc gccttatgaa
            901 gccgatgcag aaattttggc tgtgaaatct cacactatga taactgagaa gtggggatta
            961 aatatggagt attgtctggt ccaggcttac attgtctcta gtggattttc ttccaaaatg
            1021 aaagttgttg cttctagact tttagagaaa tatcccgaag ctatctacac actctgctct
            1081 tcctgtgcct taaatatgtg gttggcaaaa tcagtacctg ttatgggagt atctgttgca
            1141 ttaggaacaa ttgaggaagt ttgttctttt ttccatcgat caccacaact gcttttagaa
            1201 cttgacaacg taatttctgt tctttttcag aacagtaaag aaaggggtaa agaactgaag
            1261 gaaattctcc attctcagtg gacaggcagg catgatgctt ttgaaatttt agtggaaactc
            1321 ctgcaagcac ttgttttatg tttagatggt ataaatagtg acacaaatat tagatggaat
            1381 aactatatag ctggccgagc atttgtactc tgcagtgcag tgctcagatt tgatttcatt
            1441 gttactattg ttgttcttaa aatgaaatc aaaatctga

```

9.2.8 CSBP1 – Human CSaids binding protein (humane p38)

- DNA-Sequenz des längsten Klon

```
1 cactggagcc ttagcggggc caccanctgg aacnggagta ctgcgacgca ntccggaatc
61 tgccttgtn cggcnaangt gcatggnat cccggcnggc gcaatcttna ccgccggaac
121 ncntccctgc cctnaacngg gctngccccc gtctncaagg gcacatccat ccgctncngg
181 tngaaaanac cctgcnccct ggaantcntg gggntcngc canccantac nttgtccngg
241 cnaenttant cnatgtcccc cccctggntt nggctgggca cntantgtgc cncggntana
301 aggtinctgt ntncatgnta ggggcccccc ctcaggctcc ntntctctcc cncgtttnc
361 atnccctgta nnnatttttt nnnntnanaa agttccccct ttntctnttc tntnccgtn
421 antttancnt aatcntanat tctcngnaaa ggtttncnt attccttttn tcttcaaaa
481 tctntttntc ccnttttnag gctctcngn ntnctctate nntcctctc ttttttactc
541 cccntatta aaatctnatt naccggmnt ntatnctttt tttccactgt aaagaaanac
601 tcnncoccca annctttttt cattcttta nttccctct cttttnnmt gnaaanctnn
661 ctcaatatnc tcnctttttt ncttct...
```

Die Klone von CSPB wurden lediglich ansequenziert.

- Aminosäuresequenz

Es wurde lediglich die 5'UTR ansequenziert, nicht aber die CDS (→ PubMed-Report).

- Ergebnis der NCBI-Genbank-Suche

```
Sequences producing significant alignments:                      Score      E
gb|L35263|HUMCSBP1 Human CSaids binding protein (CSBP1) m... 561    1.0e-38

gb|L35263|HUMCSBP1 Human CSaids binding protein (CSBP1) mRNA, complete cds. Length = 3757
Plus Strand HSPs:
Score = 561 (155.0 bits), Expect = 1.0e-38, Sum P(2) = 1.0e-38
Identities = 127/153 (83%), Positives = 127/153 (83%), Strand = Plus / Plus

query:      1 cactggagccttagcggggcgaccanctggaacnggagtagtgcgacgcantccggaatc 60
             ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
sbjct:      12 cactggagccttagcggggcgagcagctggaacnggagtagtgcgacgcagcccggagtc 71

query:      61 tgccttgtnccggcnaangtgcattggnatcccggcngggcgaatcttnaccgccggaac 120
             ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
sbjct:      72 ggccttgtaggggcaaggtgcaggagatcgcgggcgggcgagctcttgagcgcggagtc 131

query:      121 ncntccctgcccctnaacngggctngcccccgtc 153
             | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
sbjct:      132 gcgtccctgccccttagcggggccttgcccagtc 164
```

- PubMed-Referenz zur gefundenen Sequenz

```
LOCUS      HUMCSBP1      3757 bp      mRNA      PRI      22-DEC-1994
DEFINITION Human CSaids binding protein (CSBP1) mRNA, complete cds.
ACCESSION  L35263
NID        g603916
VERSION    L35263.1  GI:603916
KEYWORDS   CSaids binding protein; protein kinase.
SOURCE     Homo sapiens (tissue cDNA-Bank : lambda ZAP) peripheral blood cDNA to
           mRNA.
ORGANISM   Homo sapiens
           Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
           Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE  1 (bases 1 to 3757)
AUTHORS    Lee,J.C., Laydon,J.T., McDonnell,P.C., Gallagher,T.F., Kumar,S.,
           Green,D.W., McNulty,D., Blumenthal,M.J., Heys,R.J.,
           Landvatter,S.W., Strickler,J.E., McLaughlin,M.M., Siemens,I.,
           Fisher,S.H., Livi,G.P., White,J.R., Adams,J.L. and Young,P.R.
TITLE      Identification and characterization of a novel protein kinase
           involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis
JOURNAL    Nature 372, 739-746 (1994)
MEDLINE    95089812
FEATURES   Location/Qualifiers
           source          1..3757
                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /cell_type="GM-CSF stimulated monocyte"
                    /tissue_type="peripheral blood"
                    /tissue_lib="lambda ZAP"
           mRNA            1..3757
                    /gene="CSBP1"
```

```

/gene="CSBP1"
gene 1..3757
/gene="CSBP1"
CDS 363..1445
/gene="CSBP1"
/codon_start=1
/function="regulation of inflammatory cytokine biosynthesis"
/product="CSaids binding protein"
/protein_id="AAA57455.1"
/db_xref="PID:g603917"
/db_xref="GI:603917"
/translation="MSQERPTFYRQELNKTIWEVPERYQNLSPVSGAYGSVCAAFD
KTGLRVAVKLSRPFQSIHAKRTYRELRLKHKHENVIGLLDVFTPARSLEFNDV
YLVTHLMGADLNNIVKCQKLTDDHVQFLIYQILRGLKYIHSADI IHRDLKPSNLAVNE
DCELKILDFGLARHTDDEMTGYVATRWYRAPEIMLNWMHYNQTVDIWSVGCIMAE LLT
GRTLFPGETDHIHQQLQIMRLTGTTPPAYLINRMP SHEARNYIQSLTQMPKMNFAVNF IG
ANPLAVDLLEKMLVLDSDKRITAAQALAHAYFAQYHDPDDEPVADPYDQSFESRDL LI
DEWKS LTYDEVISFVPPPLDQEEMES"
3'UTR 1446..3757
/gene="CSBP1"
polyA_signal 2854..2859
/gene="CSBP1"
polyA_site 2874
/gene="CSBP1"
polyA_signal 3735..3740
/gene="CSBP1"
polyA_site 3757
/gene="CSBP1"

```

```

BASE COUNT 947 a 832 c 945 g 1033 t
ORIGIN

```

```

1 ggaaccgcga ccactggagc cttagcgggc gcagcagctg gaacgggagt actgcgacgc
61 agcccggagt cggccttgta ggggcgaagg tgcagggaga tcgcggcggg cgcagtcttg
121 agcgccggag cgcgtccctg cccttagcgg ggcttgcccc agtcgcaggg gcacatccag
181 ccgctgcggc tgacagcagc cgcgcgcgcg ggagtctgcg gggctcggcg agccgcacct
241 gcgcgggcga ccagcgcgca gtcctccgcc ggctggggcg gcagcaaggg ccggggagag
301 ggtgcgggta caggcggggg cccacacagg ccaccttctt gcccggcggc tgcgctgga
361 aaatgtctca ggagaggccc acgttctacc ggcaggagct gaacaagaca atctgggagg
421 tgcccagcgc ttaccagaac ctgtctccag tgggctctgg cgcctatggc tctgtgtgtg
481 ctgcttttga cacaaaaacg gggttacgtg tggcagtgaa gaagctctcc agaccatttc
541 agtccatcat tcatgcgaaa agaacctaca gagaactgcg gttacttaaa catatgaaac
601 atgaaaaatg gattggtctg ttggagcttt ttacacctgc aaggtctctg gaggaattca
661 atgatgtgta tctgggtgac catctcatgg gggcagatct gaacaacatt gtgaaatgtc
721 agaagcttac agatgacctt gttcagttcc ttatctacca aattctccga ggtctaaagt
781 atatacattc agctgacata attcacaggg acctaaaaacc tagtaatcta gctgtgaatg
841 aagactgtga gctgaagatt ctggattttg gactggctcg gcacacagat gatgaaatga
901 caggctacgt ggccactagg tggtagcagg ctccctgagat catgctgaac tggatgcatt
961 acaaccagac agttgatatt tggtagctgg gatgcataat ggccgagctg ttgactggaa
1021 gaacattggt tccctgtaca gaccatatta accagcttca gcagattatg cgtctgacag
1081 gaacaccccc cgcttatctc attaacagga tgccaagcca tgaggcaaga aactatattc
1141 agtctttgac tcagatgccg aagatgaact ttgcgaatgt atttattggt gccaatcccc
1201 tggctgtgca ctgctggagg aagatgcttg tattggactc agataagaga attacagcgg
1261 cccaagcctt tgcacatgcc tactttgctc agtaccacga tcctgatgat gaaccagtgg
1321 ccgatccctt tgatcagtc cttgaaagca gggacctcct tatagatgag tggaaaagcc
1381 tgacctatga tgaagtcac agctttgtgc caccaccctt tgaccaagaa gagatggagt
1441 cctgagcacc tggtttctgt tctgttgatc ccacttcact gtgaggggaa ggccttttca
1501 cgggaactct ccaaatatta ttcaagtgcc tcttgttgca gagatttctt ccatggtgga
1561 aggggggtgt cgtgcgtgtg cgtgcgtggt agtgtgtgtg catgtgtgtg tctgtctttg
1621 tgggagggta agacaatatg aacaaactat gatcacagtg actttacagg aggttgtgga
1681 tgctccaggg cagcctccac cttgctcttc tttctgagag ttggctcagg cagacaagag
1741 ctgctgtcct ttttaggaata tgttcaatgc aaagtaaaaa aatatgaatt gtccccaatc
1801 ccggtcatgc ttttgccact ttggcttctc ctgtgacccc acctgacgg tggggcgtag
1861 acttgacaac atcccacagt ggcacggaga gaaggcccat acctctggt tgcttcagac
1921 ctgacaccgt ccctcagtg tacgtacagc caaaaaggac caactggctt ctgtgcacta
1981 gcctgtgatt aacttgctta gtatggttct cagatcttga cagatatttt gaaactgtaa
2041 atatgtttgt gccttaaaag gagagaagaa agtgtagata gttaaaagac tgcagctgct
2101 gaagttctga gccgggcaag tgcgaggggc tghtggacag ctgcttgtgg gcccgagta
2161 atcaggcagc cttcataggc ggtcatgtgt gcatgtgagc acatgcgtat atgtgctctc
2221 ctctttctcc ctccacccca ggtgttgcca tttctctgct tacccttcac ctttgggtga
2281 gaggtttctt gaatatctgc cccagtagtc agaagcagg tcttgatgct atgtacttcc
2341 tgtgtactct ttatttctag cagagtgagg atgtgttttg cacgtcttgc tatttgagca
2401 tgacacagct cttgtctctg tctcttcagg aggcctgggt gtcaggcagg tttgcccagt
2461 aagacttctt gggtagttaa gatcccattg cacctcagct gatattatgg caagtgatat
2521 cactctctt cagcccctag tgetattctg tgttgaacac aattgatact tcaggtgctt
2581 ttgatgtgaa aatcatgaaa agaggaacag gtggatgtat agcattttta ttcattgcat
2641 ctgttttcaa ccaactattt ttgaggaatt atcatgggaa aagaccaggg cttttccag
2701 gaaatoccaa aacttcggaa acaagttatt ctcttcactc ccaataacta atgctaagaa
2761 atgctgaaaa tcaaagtaaa aaattaaagc ccataaggcc agaaactcct tttgctgtct

```

2881 gaaaagggtc ttcttggcag cttaacattg acttcttggg ttggggagaa ataaattttg
2941 tttcagaatt ttgtatattg taggaatccc tttgagaatg tgattccttt tgatggggag
3001 aaagggcaaa ttattttaat attttgtatt ttcaacttta taaagataaa atacctcag
3061 gggggagaa gtgtcgtttt cataacttgc tgaatttcag gcattttggt ctacatgagg
3121 actcatatat ttaagccttt tgtgtaataa gaaagtataa agtcacttcc agtgttggct
3181 gtgtgacaga atcttgtatt tggggcaagg tgtttccatt tctcaatcag tgcagtgata
3241 catgtactcc agagggacag ggtggacccc ctgagtcaac tggagcaaga aggaaggagg
3301 cagactgatg gcgattccct ctacccggg actctcccc tttcaaggaa agtgaacctt
3361 taaagtaaag gcctcatctc ctttattgca gttcaaatcc tcaccatcca cagcaagatg
3421 aattttatca gccatgtttg gttgtaaatag ctctgtgat ttcctacaga aatactgctc
3481 tgaatatttt gtaataaagg tctttgcaca tgtgaccaca tacgtgttag gaggctgcat
3541 gctctggaag cctggactct aagctggagc tcttggaga gctcttcggt ttctgagcat
3601 aatgctcca tctcctgatt tctctgaaca gaaaacaaaa gagagaatga gggaaattgc
3661 tattttattt gtattcatga acttggctgt aatcagttat gccgtatagg atgtcagaca
3721 ataccactgg ttaaaataaa gcctattttt caaat

9.2.9 Dynamitin - *Homo sapiens* dynamitin (dynactin complex 50 kDa subunit)

- DNA-Sequenz des längsten Klons

```

1 gcctctcccc tacccgaaca cgggccccgg ctcccaccgag gcccgggtcc cccagcccg
61 ctgcgcgcgc ccatggcgga ccctaataac gccgaccttc cgggcattgc caggaatgag
121 ccagatgttt atgaaactag cgacctacct gaggatgatc aagcggaggt cgaatgcgtt
181 gcacaagagc tggaggagct gacaagcaca agtgtggaac acatcattgt caatccta
241 gctgcctatg acaagttcaa ggacaagaga gtggggacaa agggacttga tttctcag
301 cgtattggaa aaaccaagag gacaggatat gaatctggag aatatgagat gcttgagag
361 ggtctgggag tgaaggagac accccagcaa aagtagcagc gcctactgca tgaggtccaa
421 gacctgacaa ctgaagtga aaaaatcaag acgacagtga aggagtgcag cacagaggag
481 aagctgaccc ctgtgttggc ggctaaacag ctggcagccc tgaagcagca gctgggtgct
541 tcccacctgg agaagctgct gggaccagat gctgcaatca acctaccga ccccgatggc
601 gccctgggta agcgcctact actgcagctg gaagcaacaa agaacagcaa aggggatcca
661 gacgggaaaa ccactgggac cccccagat agcagccttg tcacttatga actacattct
721 cggcctgagc aggacaagtt ctctcaagct gccaaagtgc cagaacttga aaagcgcctg
781 acagagctgg agacagctgt acgttgtgat caggatgctc agaatcccc tttcgcaggt
841 ctacagggag cctgtctcat ggagactgta gagctgttgc aagcaagggt gagcgccta
901 gaccttgata ctttggatca agtggaggct cggctacaga gttctctggg aaaggtgaa
961 gagattgcca agcataaagc ctctgtagaa gatgtagata cacaaagcaa ggtgcaccag
1021 ctatatgaaa ctatacagcg ctggagcccc attgcctcca cctccctga gctgggtgag
1081 agacttgta ccatcaagca gctgcacgag caagccatgc agtttggta gctcctgaca
1141 cacttgata ccaccagca gatgattgct aattccttga aggacaatac caccctcttg
1201 acccaggtgc agacaacat gcgtgaaaac ctggccacag ttgaggggaa ctttgccagc
1261 attgatgaac ggatgaagaa gctgggaaaag tgagcacatt tgggagctgg agaacagggg
1321 ttatccctac ccctgtgaac tctgttaaca gtttacatag gttttcccct ttactataac
1381 tctagcatcc ccatcccatt tgacactggg gccaaagggtt cttcttgcat gttgggttta
1441 taaccctccc ctgatgaata cagagtggta gctaggggtt ggttatcatc agaaggtgg
1501 ctcccctcag gcctggggga taaggactgc ggcccagcca catgccaact catgtccaat
1561 actgctttgc ctggtgtggg gaaggattgg gtcttgtccc ccaacacagc tttctggct
1621 gactgtaata ctgtacaact gtttctgacc attaaatgct gttgtactct gaaaaaaaa
1681 aaaaaaaaa aaaaaaa

```

- Aminosäuresequenz

```

1 ASPLPEHRPR LHRPGPPAR LAAAMADPKY ADLPGIARNE PDVYETSDLP EDDQAEFADF
61 AQELEELTST SVEHIIVNPV AAYDKFKDKR VGTKGLDFSD RIGTKRTGY ESGEYEMLGE
121 GLGVKETPQQ KYQRLLEHVQ ELTTEVEKIK TTVKESATEE KLTPVLLAQ LAALKQQLVA
181 SHLEKLLGPD AAINLTDPDG ALAKRLLLQL EATKNSKGGG GPKTTGTPPD SSLVTYELHS
241 RPEQDKFSQA AKVAELEKRL TELETAVRCD QDAQNPLSAG LQACLMEV ELLQAKVSAL
301 DLAVLDQVEA RLQSVLQVNV EIAKHKASVE DADTQSKVHQ LYETIQRWSP IASTLPELVQ
361 RLVTIKQLHE QAMQFQQLT HLDTTQQMIA NSLKDNTTLL TQVQTMREN LATVEGNFAS
421 IDERMKGLKG .

```

- Ergebnis der NCBI-Genbank-Suche

```

Sequences producing significant alignments:

ref|NM_006400.1| Homo sapiens dynamitin (dynactin complex ... 3271 0.0
Score E
(bits) Value

```

```

ref|NM_006400.1| Homo sapiens dynamitin (dynactin complex 50 kD subunit) (DCTN-50)
mRNA >gi|1255187|gb|U50733|HSU50733 Human dynamitin mRNA,
complete cds; Length = 1721
Score = 3271 bits (1650), Expect = 0.0
Identities = 1664/1671 (99%)
Strand = Plus / Plus

```

```

Query: 1 gcctctcccctaccggaacaccggccccggctccaccgaggcccggtccccagcccg 60
|||||
Sbjct: 7 gcctctcccctaccggaacaccggccccggctccaccgaggcccggtccccagcccg 66

Query: 61 ctgcgcgcgc ccatggcgga ccctaataac gccgaccttc cgggcattgc caggaatgag 120
|||||
Sbjct: 67 ctgcgcgcgc ccatggcgga ccctaataac gccgaccttc cgggcattgc caggaatgag 126

Query: 121 ccagatgtttatgaaactagcgacctactgaggatgatcaagcggagttcgatgcgttt 180
|||||
Sbjct: 127 ccagatgtttatgaaactagcgacctactgaggatgatcaagcggagttcgatgcgttt 186

Query: 181 gcacaagagctggaggagctgacaagcacaagtgtggaacacatcattgtcaatccta 240
|||||
Sbjct: 187 gcacaagagctggaggagctgacaagcacaagtgtggaacacatcattgtcaatccta 246

Query: 241 gctgcctatgacaagttcaaggacaagagagtggggacaaagggacttgatttctcagat 300
|||||
Sbjct: 247 gctgcctatgacaagttcaaggacaagagagtggggacaaagggacttgatttctcagat 306

```

Query: 301 cgtattggaaaaccaagaggacaggatatgaaatctggagaatatgagatgcttggagag 301
 |||||
 Sbjct: 307 cgtattggaaaaccaagaggacaggatatgaaatctggagaatatgagatgcttggagag 366

 Query: 361 ggtctgggagtgaaggagacaccccagcaaaagttaccagcgctactgcatgaggtcca 420
 |||||
 Sbjct: 367 ggtctgggagtgaaggagacaccccagcaaaagttaccagcgctactgcatgaggtcca 426

 Query: 421 gagctgacaactgaagttgaaaaatcaagacgacagtgaaggagttagccacagaggag 480
 |||||
 Sbjct: 427 gagctgacaactgaagttgaaaaatcaagacgacagtgaaggagttagccacagaggag 486

 Query: 481 aagctgaccctgtgttgctggctaaacagctggcagccctgaagcagcagctgggtgct 540
 |||||
 Sbjct: 487 aagctgaccctgtgttgctggctaaacagctggcagccctgaagcagcagctgggtgct 546

 Query: 541 tccacctgggagaagctgctgggaccagatgctgcaatcaaccttaccgaccccgatggc 600
 |||||
 Sbjct: 547 tccacctgggagaagctgctgggaccagatgctgcaatcaaccttaccgaccccgatggc 606

 Query: 601 gccctggctaagcgcctactactgacgctggaagcaacaaagaacagcaaaagggggatca 660
 |||||
 Sbjct: 607 gccctggctaagcgcctactactgacgctggaagcaacaaagaacagcaaaagggggatca 666

 Query: 661 ggggaaaaccactgggannnnnnnagatagcagccttgtcacttatgaactacattct 720
 |||||
 Sbjct: 667 ggggaaaaccactgggacccccagatagcagccttgtcacttatgaactacattct 726

 Query: 721 cggcctgagcaggacaagttctctcaagctgccaagtcgagaacttgaaaagcgcctg 780
 |||||
 Sbjct: 727 cggcctgagcaggacaagttctctcaagctgccaagtcgagaacttgaaaagcgcctg 786

 Query: 781 acagagctggagacagctgtacgttggatcaggatgctcagaatcccctttctgcaggt 840
 |||||
 Sbjct: 787 acagagctggagacagctgtacgttggatcaggatgctcagaatcccctttctgcaggt 846

 Query: 841 ctacagggagcctgtctcatggagactgtagagctgttgcaagcaaaaggtgagcgccta 900
 |||||
 Sbjct: 847 ctacagggagcctgtctcatggagactgtagagctgttgcaagcaaaaggtgagcgccta 906

 Query: 901 gacctgacagtttgatcaagtgaggctcggctacagagtgtcctgggaaaggtgaac 960
 |||||
 Sbjct: 907 gacctgacagtttgatcaagtgaggctcggctacagagtgtcctgggaaaggtgaac 966

 Query: 961 gagattgccaagcataaaagcctctgtagaagatgcagatacacaaagcaaggtgcaccag 1020
 |||||
 Sbjct: 967 gagattgccaagcataaaagcctctgtagaagatgcagatacacaaagcaaggtgcaccag 1026

 Query: 1021 ctatatgaaactatacagcgtggagccccattgcctccaccctccctgagctgggtgcag 1080
 |||||
 Sbjct: 1027 ctatatgaaactatacagcgtggagccccattgcctccaccctccctgagctgggtgcag 1086

 Query: 1081 agacttgtcaccatcaagcagctgcacgagcaagccatgcagtttggtcagctcctgaca 1140
 |||||
 Sbjct: 1087 agacttgtcaccatcaagcagctgcacgagcaagccatgcagtttggtcagctcctgaca 1146

 Query: 1141 cacttggataccaccagcagatgattgctaattccttgaggacaataaccacccctctg 1200
 |||||
 Sbjct: 1147 cacttggataccaccagcagatgattgctaattccttgaggacaataaccacccctctg 1206

 Query: 1201 acccaggtgcagacaaccatgctgaaaacctggccacagttgaggggaactttgcccagc 1260
 |||||
 Sbjct: 1207 acccaggtgcagacaaccatgctgaaaacctggccacagttgaggggaactttgcccagc 1266

 Query: 1261 attgatgaacggatgaagaagctgggaaagttagcacaatttgggagctgggaaacagggg 1320
 |||||
 Sbjct: 1267 attgatgaacggatgaagaagctgggaaagttagcacaatttgggagctgggaaacagggg 1326

 Query: 1321 ttatccctaccctgtgaaactctgttaacagcttacatagggtttccctttactataac 1380
 |||||
 Sbjct: 1327 ttatccctaccctgtgaaactctgttaacagcttacatagggtttccctttactataac 1386

 Query: 1381 tctagcatcccacccatttgacactgggggaagggttcttcttgatgtggggttta 1440
 |||||
 Sbjct: 1387 tctagcatcccacccatttgacactgggggaagggttcttcttgatgtggggttta 1446

 Query: 1441 taccctccctgatgaatacagagtggttagctagggttgggttatcatcagaaggtggt 1500
 |||||

```

Query: 1501 ctccccctcaggcctgggggataaggacgtggggccagccacatgccaactcatgtccaat 1500
|||||
Sbjct: 1507 ctccccctcaggcctgggggataaggacgtggggccagccacatgccaactcatgtccaat 1566

Query: 1561 actgctttgctgggtggtggggaaggattgggtcttgtcccccaacacagcttctgtggct 1620
|||||
Sbjct: 1567 actgctttgctgggtggtggggaaggattgggtcttgtcccccaacacagcttctgtggct 1626

Query: 1621 gactgtaatactgtacaactgtttctgaccattaaatgctgttgactctg 1671
|||||
Sbjct: 1627 gactgtaatactgtacaactgtttctgaccattaaatgctgttgactctg 1677

```

• **PubMed-Referenz zur gefundenen Sequenz**

```

LOCUS       NM_006400      1721 bp      mRNA           PRI           13-JUL-1999
DEFINITION Homo sapiens dynamitin (dynactin complex 50 kD subunit) (DCTN-50)
            mRNA.
ACCESSION  NM_006400
NID        g5453628
VERSION    NM_006400.1  GI:5453628
KEYWORDS   .
SOURCE     human.
ORGANISM   Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1721)
AUTHORS    Echeverri,C.J., Paschal,B.M., Vaughan,K.T. and Vallee,R.B.
TITLE      Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals
            function for the complex in chromosome alignment and spindle
            organization during mitosis
JOURNAL    J. Cell Biol. 132 (4), 617-633 (1996)
MEDLINE    96178072
COMMENT    REFSEQ: This reference sequence was derived from U50733.1.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..1721
                        /organism="Homo sapiens"
                        /db_xref="taxon:9606"
            gene            1..1721
                        /gene="DCTN-50"
                        /note="DCTN-50"
                        /db_xref="LocusID:10540"
            CDS             79..1299
                        /note="similar to GenBank EST Accession Number T08494; p50
                        subunit of dynactin complex"
                        /codon_start=1
                        /product="dynamitin (dynactin complex 50 kD subunit)"
                        /protein_id="NP_006391.1"
                        /db_xref="PID:g5453629"
                        /db_xref="GI:5453629"
                        /translation="MADPKYADLPGIARNEPDVYETSDLPEDDQAEFDFAQEELEELT
                        STSVEHIIVNPNAAYDKFKDKRVGTKGLDFSDRIGKTKRTGYESGEYEMLGEGLGVKE
                        TPQQKYQRLLEHVQELTTEVEKIKTTVKESATEEKLTPVLLAKQLAALKQQLVASHLE
                        KLLGPDAAINLTDPDGALAKRLLQLLEATKNSKGGSGGKTTGTPDSSLVTYELHRSR
                        EQDKFSQAAKVAELEKRLTELETAVRCDQDAQNPLSAGLQGACLMETVELLQARVSAL
                        DLAVLDQVEARLQSVLGVKNEIAKHKASVEDADTQSKVHQLYETIQRWSPFIASLPEL
                        VQRLVTIKQLHEQAMQFGQLLTHLDTTQMIANSLSKDNNTLLTQVQT'TMRENLATVEG
                        NFASIDERMKKGK"

```

```

BASE COUNT      473 a      445 c      453 g      350 t
ORIGIN

```

```

1  aacccagcct  ctccccctacc  cgaacaccgg  ccccggctcc  accgaggccc  gggcccccca
61  gcccgctctg  cgcgcccat  ggccgacct  aaatacgccg  accttcccgg  cattgccagg
121  aatgagccag  atgtttatga  aactagcgac  ctacctgagg  atgatcaagc  ggagtctgat
181  cgttttgac  aagagctgga  ggagctgaca  agcacaagtg  tggaaacacat  cattgtcaat
241  cctaagtctg  cctatgacaa  gttcaaggac  aagagagtgg  ggacaaaggg  acttgatttc
301  tcagatcgta  ttggaaaac  caagaggaca  ggatatgaat  ctggagaata  tgagatgctt
361  ggagagggtc  tgggagtgaa  ggagacaccc  cagcaaaagt  accagcgcct  actgcatgag
421  gtccaagagc  tgacaactga  agttgaaaaa  atcaagacga  cagtgaagga  gtcagccaca
481  gaggagaagc  tgaccctctg  gttgctggct  aaacagctgg  cagccctgaa  gcagcagctg
541  gttgcttccc  acctggagaa  gctgctggga  ccagatgctg  caatcaacct  taccgacccc
601  gatggcgccc  tggctaagcg  cctactactg  cagctggaag  caacaagaa  cagcaaggg
661  ggatcagggg  gaaaaaccac  tgggaccccc  ccagatagca  gccttgctcac  ttatgaacta
721  cattctcggc  ctgagcagga  caagttctct  caagctgcca  aagtcgcaga  acttgaaag
781  cgctgacag  agctggagac  agctgtacgt  tgtgatcagg  atgctcagaa  tcccccttct
841  gcaggcttac  agggagcctg  tctcatggag  actgtagagc  tgttgcaagc  aaagtgagc
901  ggcctgagcc  tggcctttt  ggcctgagcc  ggcctgagcc  tggcctttt  ggcctgagcc

```

961 gtgaacgaga ttgccaagca taaagcctct gtagaagatg cagatacaca aagcaaggctg
1021 caccagctat atgaaactat acagcgctgg agccccattg cctccaccct ccctgagctg
1081 gtgcagagac ttgtcaccaat caagcagctg cacgagcaag ccatgcagtt tggtcagctc
1141 ctgacacact tggataccac ccagcagatg attgctaatt ccttgaagga caataccacc
1201 ctcttgacc aggtgcagac aacctgcgt gaaaacctgg ccacagttga ggggaacttt
1261 gccagcattg atgaacggat gaagaagctg ggaaagtgag cacatttggg agctggagaa
1321 caggggttat ccctaccct gtgaactctg ttaacagctt acataggggt tcccccttac
1381 tataactcta gcatcccat cccattgac actgggggca agggttcttc ttgcatgtg
1441 ggtttatacc cctccctga tgaatacaga gtggtagcta ggggttggtt atcatcagaa
1501 ggtggtctcc cctcaggcct gggggataag gacgtgggcc cagccacatg ccaactcatg
1561 tccaatactg ctttgctgg tgtggggaag gattgggtct tgtccccaa cacagcttct
1621 gtggctgact gtaatactgt acaactgttt ctgaccatta aatgctggtg tactctgaaa
1681 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaattcctgc ggccgcaagc t

10 LITERATURVERZEICHNIS

1. Sithanandam, G., Latif, F., Duh, F. M., Bernal, R., Smola, U., Li, H., Kuzmin, I., Wixler, V., Geil, L., and Shrestha, S. (1996) 3pK, a new mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase located in the small cell lung cancer tumor suppressor gene region [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1996 Apr;16(4):1880]. *Mol Cell Biol* **16**(3), 868-76
2. Stokoe, D., Campbell, D. G., Nakielny, S., Hidaka, H., Leever, S. J., Marshall, C., and Cohen, P. (1992) MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *Embo J* **11**(11), 3985-94
3. Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H. W., Troppmair, J., and Rapp, U. R. (1994) The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* **19**(11), 474-80
4. Bonfini, L., Karlovich, C. A., Dasgupta, C., and Banerjee, U. (1992) The Son of sevenless gene product: a putative activator of Ras. *Science* **255**(5044), 603-6
5. Buday, L., and Downward, J. (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**(3), 611-20
6. Koretzky, G. A. (1997) The role of Grb2-associated proteins in T-cell activation. *Immunol Today* **18**(8), 401-6
7. Schlessinger, J. (1993) How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* **18**(8), 273-5
8. Katz, M. E., and McCormick, F. (1997) Signal transduction from multiple Ras effectors. *Curr Opin Genet Dev* **7**(1), 75-9
9. Koide, H., Satoh, T., Nakafuku, M., and Kaziro, Y. (1993) GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18), 8683-6
10. Fabry, S. (1995) Kleine G-Proteine: Universelle Schalter und Regler im Zellgeschehen. *Biologie in unserer Zeit* **1**, 44-50
11. Rapp, U. R., Goldsborough, M. D., Mark, G. E., Bonner, T. I., Groffen, J., Reynolds, F. H., Jr., and Stephenson, J. R. (1983) Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(14), 4218-22
12. Avruch, J., Zhang, X. F., and Kyriakis, J. M. (1994) Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* **19**(7), 279-83
13. Leever, S. J., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* **369**(6479), 411-4
14. Roy, S., Lane, A., Yan, J., McPherson, R., and Hancock, J. F. (1997) Activity of plasma membrane-recruited Raf-1 is regulated by Ras via the Raf zinc finger. *J Biol Chem* **272**(32), 20139-45
15. Stokoe, D., Macdonald, S. G., Cadwallader, K., Symons, M., and Hancock, J. F. (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane [see comments]. *Science* **264**(5164), 1463-7
16. Dent, P., Reardon, D. B., Morrison, D. K., and Sturgill, T. W. (1995) Regulation of Raf-1 and Raf-1 mutants by Ras-dependent and Ras-independent mechanisms in vitro. *Mol Cell Biol* **15**(8), 4125-35
17. Hafner, S., Adler, H. S., Mischak, H., Janosch, P., Heidecker, G., Wolfman, A., Pippig, S., Lohse, M., Ueffing, M., and Kolch, W. (1994) Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol Cell Biol* **14**(10), 6696-703
18. Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., Rapp, U., and Cooper, G. M. (1997) Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isoforms in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol Cell Biol* **17**(2), 732-41
19. Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., and Rapp, U. R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**(6434), 249-52
20. Crespo, P., Xu, N., Daniotti, J. L., Troppmair, J., Rapp, U. R., and Gutkind, J. S. (1994) Signaling through transforming G protein-coupled receptors in NIH 3T3 cells involves c-Raf activation. Evidence for a protein kinase C-independent pathway. *J Biol Chem* **269**(33), 21103-9
21. Marshall, C. J. (1996) Cell signalling. Raf gets it together [news; comment]. *Nature* **383**(6596), 127-8
22. Morrison, D. K., Kaplan, D. R., Escobedo, J. A., Rapp, U. R., Roberts, T. M., and Williams, L. T. (1989) Direct activation of the serine/threonine kinase activity of Raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF beta-receptor. *Cell* **58**(4), 649-57
23. Morrison, D. K., and Cutler, R. E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**(2),

24. Cook, S. J., and McCormick, F. (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf [see comments].*Science* **262**(5136), 1069-72
25. Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M. J., and Sturgill, T. W. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate [see comments].*Science* **262**(5136), 1065-9
26. Macdonald, S. G., Crews, C. M., Wu, L., Driller, J., Clark, R., Erikson, R. L., and McCormick, F. (1993) Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro [published erratum appears in Mol Cell Biol 1994 Mar;14(3):2223-4].*Mol Cell Biol* **13**(11), 6615-20
27. Boulton, T. G., Nye, S. H., Robbins, D. J., Ip, N. Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S. D., DePinho, R. A., Panayotatos, N., Cobb, M. H., and Yancopoulos, G. D. (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF.*Cell* **65**(4), 663-75
28. Thomas, G. (1992) MAP kinase by any other name smells just as sweet.*Cell* **68**(1), 3-6
29. Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., and Davis, R. J. (1998) A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation [see comments].*Science* **281**(5383), 1671-4
30. Blenis, J. (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK.*Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13), 5889-92
31. Ludwig, S., Engel, K., Hoffmeyer, A., Sithanandam, G., Neufeld, B., Palm, D., Gaestel, M., and Rapp, U. R. (1996) 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways.*Mol Cell Biol* **16**(12), 6687-97
32. Hill, C. S., and Treisman, R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity.*Cell* **80**(2), 199-211
33. Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J., and Woodgett, J. R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases.*Nature* **369**(6476), 156-60
34. Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., and Davis, R. J. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen- activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine.*J Biol Chem* **270**(13), 7420-6
35. Minden, A., Lin, A., Claret, F. X., Abo, A., and Karin, M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs.*Cell* **81**(7), 1147-57
36. Zhang, S., Han, J., Sells, M. A., Chernoff, J., Knaus, U. G., Ulevitch, R. J., and Bokoch, G. M. (1995) Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1.*J Biol Chem* **270**(41), 23934-6
37. Sanchez, I., Hughes, R. T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J. R., Avruch, J., Kyriakis, J. M., and Zon, L. I. (1994) Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun.*Nature* **372**(6508), 794-8
38. Fanger, G. R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. (1997) MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c- Jun amino-terminal kinases?*Curr Opin Genet Dev* **7**(1), 67-74
39. Hagemann, D., Troppmair, J., and Rapp, U. R. (1999) Cot protooncoprotein activates the dual specificity kinases MEK-1 and SEK-1 and induces differentiation of PC12 cells.*Oncogene* **18**(7), 1391-400
40. Rana, A., Gallo, K., Godowski, P., Hirai, S., Ohno, S., Zon, L., Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1996) The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress- activated protein kinase activator, SEK-1.*J Biol Chem* **271**(32), 19025-8
41. Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals.*Trends Biochem Sci* **23**(12), 481-5
42. Minden, A., Lin, A., Smeal, T., Derijard, B., Cobb, M., Davis, R., and Karin, M. (1994) c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the Jnk subgroup but not the Erk subgroup of mitogen-activated protein kinases.*Mol Cell Biol* **14**(10), 6683-8
43. van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P., and Angel, P. (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents.*EMBO J* **14**(8), 1798-811

44. Livingstone, C., Patel, G., and Jones, N. (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain.*EMBO J* **14**(8), 1785-97
45. Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells.*Science* **265**(5173), 808-11
46. Kumar, S., McDonnell, P. C., Gum, R. J., Hand, A. T., Lee, J. C., and Young, P. R. (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles.*Biochem Biophys Res Commun* **235**(3), 533-8
47. Wang, G., Horsley, D., Ma, A., Otte, A. P., Hutchings, A., Butcher, G. W., and Singh, P. B. (1997) M33, a mammalian homologue of Drosophila Polycomb localises to euchromatin within interphase nuclei but is enriched within the centromeric heterochromatin of metaphase chromosomes.*Cytogenet Cell Genet* **78**(1), 50-5
48. Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., and et al. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.*Nature* **372**(6508), 739-46
49. Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R. J. (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen- activated protein kinase signal transduction pathway.*Mol Cell Biol* **16**(3), 1247-55
50. McLaughlin, M. M., Kumar, S., McDonnell, P. C., Van Horn, S., Lee, J. C., Livi, G. P., and Young, P. R. (1996) Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase.*J Biol Chem* **271**(14), 8488-92
51. Salmeron, A., Ahmad, T. B., Carlile, G. W., Pappin, D., Narsimhan, R. P., and Ley, S. C. (1996) Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase.*EMBO J* **15**(4), 817-26
52. Keramas, G. (1999) Untersuchungen zur Aktivierung und intrazellulären Lokalisation der Kinase 3pK.*Diplomarbeit, Universität Würzburg*
53. Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R. G., Shah, G. M., and Landry, J. (1998) SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis.*J Cell Biol* **143**(5), 1361-73
54. Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins.*Cell* **78**(6), 1027-37
55. Engel, K., Ahlers, A., Brach, M. A., Herrmann, F., and Gaestel, M. (1995) MAPKAP kinase 2 is activated by heat shock and TNF-alpha: in vivo phosphorylation of small heat shock protein results from stimulation of the MAP kinase cascade.*J Cell Biochem* **57**(2), 321-30
56. Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P., and Comb, M. J. (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2.*EMBO J* **15**(17), 4629-42
57. Heidenreich, O., Neining, A., Schrott, G., Zinck, R., Cahill, M. A., Engel, K., Kotlyarov, A., Kraft, R., Kostka, S., Gaestel, M., and Nordheim, A. (1999) MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo.*J Biol Chem* **274**(20), 14434-43
58. Ben-Levy, R., Hooper, S., Wilson, R., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2.*Curr Biol* **8**(19), 1049-57
59. Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C. Y., Shyu, A. B., M, M. I., Gaestel, M., Resch, K., and Holtmann, H. (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism.*EMBO J* **18**(18), 4969-4980
60. Kotlyarov, A., Neining, A., Schubert, C., Eckert, R., Birchmeier, C., Volk, H. D., and Gaestel, M. (1999) MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis [see comments].*Nat Cell Biol* **1**(2), 94-7
61. Sassone-Corsi, P., Mizzen, C. A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A., and Allis, C. D. (1999) Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3.*Science* **285**(5429), 886-91
62. Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., and Cooper, J. A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2.*EMBO J* **16**(8), 1909-20

63. Fukunaga, R., and Hunter, T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates.*EMBO J* **16**(8), 1921-33
64. Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M., and Alessi, D. R. (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB.*EMBO J* **17**(15), 4426-41
65. New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L. J., Kato, Y., Parry, G. C., and Han, J. (1998) PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase.*EMBO J* **17**(12), 3372-84
66. McGinnis, W., and Krumlauf, R. (1992) Homeobox genes and axial patterning.*Cell* **68**(2), 283-302
67. Desplan, C., Theis, J., and PH, O. F. (1988) The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction.*Cell* **54**(7), 1081-90
68. Gehring, W. J. (1987) Homeo boxes in the study of development.*Science* **236**(4806), 1245-52
69. Paro, R. (1995) Propagating memory of transcriptional states.*Trends Genet* **11**(8), 295-7
70. Pirrotta, V. (1998) Polycomb-ing the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing.*Cell* **93**(3), 333-6
71. Simon, J. (1995) Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during Drosophila development.*Curr Opin Cell Biol* **7**(3), 376-85
72. Pirrotta, V. (1997) Chromatin-silencing mechanisms in Drosophila maintain patterns of gene expression.*Trends Genet* **13**(8), 314-8
73. Pirrotta, V. (1997) PcG complexes and chromatin silencing.*Curr Opin Genet Dev* **7**(2), 249-58
74. van der Lugt, N. M., Domen, J., Linders, K., van Roon, M., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M., van Lohuizen, M., and et al. (1994) Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene.*Genes Dev* **8**(7), 757-69
75. Akasaka, T., Tsuji, K., Kawahira, H., Kanno, M., Harigaya, K., Hu, L., Ebihara, Y., Nakahata, T., Tetsu, O., Taniguchi, M., and Koseki, H. (1997) The role of mel-18, a mammalian Polycomb group gene, during IL-7- dependent proliferation of lymphocyte precursors.*Immunity* **7**(1), 135-46
76. Core, N., Bel, S., Gaunt, S. J., Aurrand-Lions, M., Pearce, J., Fisher, A., and Djabali, M. (1997) Altered cellular proliferation and mesoderm patterning in Polycomb-M33- deficient mice.*Development* **124**(3), 721-9
77. Takihara, Y., Tomotsune, D., Shirai, M., Katoh-Fukui, Y., Nishii, K., Motaleb, M. A., Nomura, M., Tsuchiya, R., Fujita, Y., Shibata, Y., Higashinakagawa, T., and Shimada, K. (1997) Targeted disruption of the mouse homologue of the Drosophila polyhomeotic gene leads to altered anteroposterior patterning and neural crest defects.*Development* **124**(19), 3673-82
78. Jacobs, J. J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A., and van Lohuizen, M. (1999) The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus.*Nature* **397**(6715), 164-8
79. Brunk, B. P., Martin, E. C., and Adler, P. N. (1991) Drosophila genes Posterior Sex Combs and Suppressor two of zeste encode proteins with homology to the murine bmi-1 oncogene.*Nature* **353**(6342), 351-3
80. van Lohuizen, M., Frasnich, M., Wientjens, E., and Berns, A. (1991) Sequence similarity between the mammalian bmi-1 proto-oncogene and the Drosophila regulatory genes Psc and Su(z)2.*Nature* **353**(6342), 353-5
81. van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H., and Berns, A. (1991) Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging [see comments].*Cell* **65**(5), 737-52
82. Haupt, Y., Alexander, W. S., Barri, G., Klinken, S. P., and Adams, J. M. (1991) Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice [see comments].*Cell* **65**(5), 753-63
83. van der Lugt, N. M., Alkema, M., Berns, A., and Deschamps, J. (1996) The Polycomb-group homolog Bmi-1 is a regulator of murine Hox gene expression.*Mech Dev* **58**(1-2), 153-64
84. Alkema, M. J., van der Lugt, N. M., Bobeldijk, R. C., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1995) Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice.*Nature* **374**(6524), 724-7
85. Haupt, Y., Bath, M. L., Harris, A. W., and Adams, J. M. (1993) bmi-1 transgene induces lymphomas and collaborates with myc in tumorigenesis.*Oncogene* **8**(11), 3161-4

86. Alkema, M. J., Jacobs, H., van Lohuizen, M., and Berns, A. (1997) Perturbation of B and T cell development and predisposition to lymphomagenesis in Emu Bmi1 transgenic mice require the Bmi1 RING finger. *Oncogene* **15**(8), 899-910
87. Bea, S., Ribas, M., Hernandez, J. M., Bosch, F., Pinyol, M., Hernandez, L., Garcia, J. L., Flores, T., Gonzalez, M., Lopez-Guillermo, A., Piris, M. A., Cardesa, A., Montserrat, E., Miro, R., and Campo, E. (1999) Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* **93**(12), 4365-74
88. Sharpless, N. E., and DePinho, R. A. (1999) The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* **9**(1), 22-30
89. Nomura, M., Takihara, Y., and Shimada, K. (1994) Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: one of the early inducible clones encodes a novel protein sharing several highly homologous regions with a Drosophila polyhomeotic protein. *Differentiation* **57**(1), 39-50
90. Alkema, M. J., Bronk, M., Verhoeven, E., Otte, A., van't Veer, L. J., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1997) Identification of Bmi1-interacting proteins as constituents of a multimeric mammalian polycomb complex. *Genes Dev* **11**(2), 226-40
91. Gunster, M. J., Satijn, D. P., Hamer, K. M., den Blaauwen, J. L., de Bruijn, D., Alkema, M. J., van Lohuizen, M., van Driel, R., and Otte, A. P. (1997) Identification and characterization of interactions between the vertebrate polycomb-group protein BMI1 and human homologs of polyhomeotic. *Mol Cell Biol* **17**(4), 2326-35
92. Hemenway, C. S., Halligan, B. W., and Levy, L. S. (1998) The Bmi-1 oncoprotein interacts with dinG and MPH2: the role of RING finger domains. *Oncogene* **16**(19), 2541-7
93. Reijnen, M. J., Hamer, K. M., den Blaauwen, J. L., Lambrechts, C., Schoneveld, I., van Driel, R., and Otte, A. P. (1995) Polycomb and bmi-1 homologs are expressed in overlapping patterns in Xenopus embryos and are able to interact with each other. *Mech Dev* **53**(1), 35-46
94. Satijn, D. P., Olson, D. J., van der Vlag, J., Hamer, K. M., Lambrechts, C., Masselink, H., Gunster, M. J., Sewalt, R. G., van Driel, R., and Otte, A. P. (1997) Interference with the expression of a novel human polycomb protein, hPc2, results in cellular transformation and apoptosis. *Mol Cell Biol* **17**(10), 6076-86
95. Satijn, D. P., Gunster, M. J., van der Vlag, J., Hamer, K. M., Schul, W., Alkema, M. J., Saurin, A. J., Freemont, P. S., van Driel, R., and Otte, A. P. (1997) RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* **17**(7), 4105-13
96. Alkema, M. J., Jacobs, J., Voncken, J. W., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Satijn, D. P., Otte, A. P., Berns, A., and van Lohuizen, M. (1997) MPc2, a new murine homolog of the Drosophila polycomb protein is a member of the mouse polycomb transcriptional repressor complex. *J Mol Biol* **273**(5), 993-1003
97. Ponting, C. P. (1995) SAM: a novel motif in yeast sterile and Drosophila polyhomeotic proteins. *Protein Sci* **4**(9), 1928-30
98. Muller, J., Gaunt, S., and Lawrence, P. A. (1995) Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development* **121**(9), 2847-52
99. Kanno, M., Hasegawa, M., Ishida, A., Isono, K., and Taniguchi, M. (1995) mel-18, a Polycomb group-related mammalian gene, encodes a transcriptional negative regulator with tumor suppressive activity. *EMBO J* **14**(22), 5672-8
100. Kehle, J., Beuchle, D., Treuheit, S., Christen, B., Kennison, J. A., Bienz, M., and Muller, J. (1998) dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science* **282**(5395), 1897-900
101. Brown, J. L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M. L., and Kassis, J. A. (1998) The Drosophila Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1 [see comments]. *Mol Cell* **1**(7), 1057-64
102. Shi, Y., Lee, J. S., and Galvin, K. M. (1997) Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1..... *Biochim Biophys Acta* **1332**(2), F49-66
103. Mihaly, J., Mishra, R. K., and Karch, F. (1998) A conserved sequence motif in Polycomb-response elements [letter; comment]. *Mol Cell* **1**(7), 1065-6
104. Nomura, M., Takihara, Y., Abdul Motaleb, M., Horie, K., Higashinakagawa, T., and Shimada, K. (1998) Sequence-specific DNA binding activity in the RAE28 protein, a mouse homologue of the Drosophila polyhomeotic protein. *Biochem Mol Biol Int* **46**(5), 905-12

105. Voncken, J. W., Schweizer, D., Aagaard, L., Sattler, L., Jantsch, M. F., and van Lohuizen, M. (2000) Chromatin-association of the Polycomb group protein BMI1 is cell cycle-regulated and correlates with its phosphorylation status.*submitted*
106. Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., and et al. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence.*Cell* **58**(3), 537-44
107. Davis, R. L., Cheng, P. F., Lassar, A. B., and Weintraub, H. (1990) The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle- specific gene activation.*Cell* **60**(5), 733-46
108. Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A., and Walker, M. D. (1993) The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains.*Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17), 8063-7
109. Massari, M. E., Jennings, P. A., and Murre, C. (1996) The AD1 transactivation domain of E2A contains a highly conserved helix which is required for its activity in both *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells.*Mol Cell Biol* **16**(1), 121-9
110. Quong, M. W., Massari, M. E., Zwart, R., and Murre, C. (1993) A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix- loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells.*Mol Cell Biol* **13**(2), 792-800
111. Church, G. M., Ephrussi, A., Gilbert, W., and Tonegawa, S. (1985) Cell-type-specific contacts to immunoglobulin enhancers in nuclei.*Nature* **313**(6005), 798-801
112. Ephrussi, A., Church, G. M., Tonegawa, S., and Gilbert, W. (1985) B lineage--specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo.*Science* **227**(4683), 134-40
113. Lenardo, M., Pierce, J. W., and Baltimore, D. (1987) Protein-binding sites in Ig gene enhancers determine transcriptional activity and inducibility.*Science* **236**(4808), 1573-7
114. Kiledjian, M., Su, L. K., and Kadesch, T. (1988) Identification and characterization of two functional domains within the murine heavy-chain enhancer.*Mol Cell Biol* **8**(1), 145-52
115. Murre, C., Bain, G., van Dijk, M. A., Engel, I., Furnari, B. A., Massari, M. E., Matthews, J. R., Quong, M. W., Rivera, R. R., and Stuver, M. H. (1994) Structure and function of helix-loop-helix proteins.*Biochim Biophys Acta* **1218**(2), 129-35
116. Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts.*Cell* **51**(6), 987-1000
117. Brennan, T. J., and Olson, E. N. (1990) Myogenin resides in the nucleus and acquires high affinity for a conserved enhancer element on heterodimerization.*Genes Dev* **4**(4), 582-95
118. Wright, W. E., Sassoon, D. A., and Lin, V. K. (1989) Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD.*Cell* **56**(4), 607-17
119. Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., and Arnold, H. H. (1989) A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts.*Embo J* **8**(3), 701-9
120. Alt, F. W., DePinho, R., Zimmerman, K., Legouy, E., Hatton, K., Ferrier, P., Tesfaye, A., Yancopoulos, G., and Nisen, P. (1986) The human myc gene family.*Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 2**, 931-41
121. Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc.*Science* **251**(4998), 1211-7
122. Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L., and Weintraub, H. (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins.*Cell* **61**(1), 49-59
123. Garrell, J., and Modolell, J. (1990) The *Drosophila* extramacrochaetae locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein.*Cell* **61**(1), 39-48
124. Ellis, H. M., Spann, D. R., and Posakony, J. W. (1990) extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins.*Cell* **61**(1), 27-38
125. Rushlow, C. A., Hogan, A., Pinchin, S. M., Howe, K. M., Lardelli, M., and Ish-Horowicz, D. (1989) The *Drosophila* hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to N-myc.*Embo J* **8**(10), 3095-103
126. Klambt, C., Knust, E., Tietze, K., and Campos-Ortega, J. A. (1989) Closely related transcripts encoded by the neurogenic gene complex enhancer of split of *Drosophila melanogaster*.*Embo J* **8**(1), 203-10
127. Murre, C., McCaw, P. S., and Baltimore, D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding. daughterless. MvoD. and myc proteins.*Cell* **56**(5), 777-83

128. Torres, M., and Sanchez, L. (1989) The scute (T4) gene acts as a numerator element of the X:a signal that determines the state of activity of sex-lethal in *Drosophila*. *Embo J* **8**(10), 3079-86
129. Zhuang, Y., Soriano, P., and Weintraub, H. (1994) The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* **79**(5), 875-84
130. Bain, G., 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., and et al. (1994) E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements [see comments]. *Cell* **79**(5), 885-92
131. Bain, G., Engel, I., Robanus Maandag, E. C., te Riele, H. P., Volland, J. R., Sharp, L. L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D., and Murre, C. (1997) E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* **17**(8), 4782-91
132. Kamps, M. P., Murre, C., Sun, X. H., and Baltimore, D. (1990) A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* **60**(4), 547-55
133. Nourse, J., Mellentin, J. D., Galili, N., Wilkinson, J., Stanbridge, E., Smith, S. D., and Cleary, M. L. (1990) Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* **60**(4), 535-45
134. Inaba, T., Roberts, W. M., Shapiro, L. H., Jolly, K. W., Raimondi, S. C., Smith, S. D., and Look, A. T. (1992) Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B- lineage leukemia. *Science* **257**(5069), 531-4
135. Van Dijk, M. A., Voorhoeve, P. M., and Murre, C. (1993) Pbx1 is converted into a transcriptional activator upon acquiring the N- terminal region of E2A in pre-B-cell acute lymphoblastoid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13), 6061-5
136. Mellentin, J. D., Smith, S. D., and Cleary, M. L. (1989) lyl-1, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix Dna binding motif. *Cell* **58**(1), 77-83
137. Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T. K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., and et al. (1991) The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**(4995), 761-6
138. Fisher, D. E., Parent, L. A., and Sharp, P. A. (1993) High affinity DNA-binding Myc analogs: recognition by an alpha helix. *Cell* **72**(3), 467-76
139. Rivera, R. R., Stuver, M. H., Steenbergen, R., and Murre, C. (1993) Ets proteins: new factors that regulate immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Mol Cell Biol* **13**(11), 7163-9
140. Nelson, C., Shen, L. P., Meister, A., Fodor, E., and Rutter, W. J. (1990) Pan: a transcriptional regulator that binds chymotrypsin, insulin, and AP-4 enhancer motifs. *Genes Dev* **4**(6), 1035-43
141. German, M. S., Wang, J., Chadwick, R. B., and Rutter, W. J. (1992) Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev* **6**(11), 2165-76
142. Jiang, J., and Levine, M. (1993) Binding affinities and cooperative interactions with bHLH activators delimit threshold responses to the dorsal gradient morphogen. *Cell* **72**(5), 741-52
143. Johnson, S. E., Wang, X., Hardy, S., Taparowsky, E. J., and Konieczny, S. F. (1996) Casein kinase II increases the transcriptional activities of MRF4 and MyoD independently of their direct phosphorylation. *Mol Cell Biol* **16**(4), 1604-13
144. Karin, M. (1994) Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* **6**(3), 415-24
145. Zhou, J., and Olson, E. N. (1994) Dimerization through the helix-loop-helix motif enhances phosphorylation of the transcription activation domains of myogenin. *Mol Cell Biol* **14**(9), 6232-43
146. Mitsui, K., Shirakata, M., and Paterson, B. M. (1993) Phosphorylation inhibits the DNA-binding activity of MyoD homodimers but not MyoD-E12 heterodimers. *J Biol Chem* **268**(32), 24415-20
147. Winter, B., Braun, T., and Arnold, H. H. (1993) cAMP-dependent protein kinase represses myogenic differentiation and the activity of the muscle-specific helix-loop-helix transcription factors Myf-5 and MyoD. *J Biol Chem* **268**(13), 9869-78
148. 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**(12), 6900-8
149. Shen, C. P., and Kadesch, T. (1995) B-cell-specific DNA binding by an E47 homodimer. *Mol Cell Biol* **15**(8), 4518-24

150. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
151. Fields, S., and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**(6230), 245-6
152. Fields, S., and Sternglanz, R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* **10**(8), 286-92
153. Broder, Y. C., Katz, S., and Aronheim, A. (1998) The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Curr Biol* **8**(20), 1121-4
154. Licitra, E. J., and Liu, J. O. (1996) A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(23), 12817-21
155. Leanna, C. A., and Hannink, M. (1996) The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. *Nucleic Acids Res* **24**(17), 3341-7
156. Shih, H. M., Goldman, P. S., DeMaggio, A. J., Hollenberg, S. M., Goodman, R. H., and Hoekstra, M. F. (1996) A positive genetic selection for disrupting protein-protein interactions: identification of CREB mutations that prevent association with the coactivator CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24), 13896-901
157. Vidal, M., Braun, P., Chen, E., Boeke, J. D., and Harlow, E. (1996) Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(19), 10321-6
158. Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E., and Boeke, J. D. (1996) Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(19), 10315-20
159. Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., and Cooper, J. A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**(1), 205-14
160. Clontech. MATCHMAKER Library User Manual (PT1020-1) Version PR62562
161. Miller, J. H. (ed) (1972) . *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
162. Clontech. *Yeast Protocols Handbook* (PT3024-1)
163. Robzyk, K., and Kassir, Y. (1992) A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* **20**(14), 3790
164. Zhou, G., Bao, Z. Q., and Dixon, J. E. (1995) Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **270**(21), 12665-9
165. Bunker, C. A., and Kingston, R. E. (1994) Transcriptional repression by Drosophila and mammalian Polycomb group proteins in transfected mammalian cells. *Mol Cell Biol* **14**(3), 1721-32
166. Cohen, K. J., Hanna, J. S., Prescott, J. E., and Dang, C. V. (1996) Transformation by the Bmi-1 oncoprotein correlates with its subnuclear localization but not its transcriptional suppression activity. *Mol Cell Biol* **16**(10), 5527-35
167. Engel, K., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (1998) Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J* **17**(12), 3363-71
168. Sewalt, R. G., van der Vlag, J., Gunster, M. J., Hamer, K. M., den Blaauwen, J. L., Satijn, D. P., Hendrix, T., van Driel, R., and Otte, A. P. (1998) Characterization of interactions between the mammalian polycomb-group proteins Enx1/EZH2 and EED suggests the existence of different mammalian polycomb-group protein complexes. *Mol Cell Biol* **18**(6), 3586-95
169. Hardy, S., Kong, Y., and Konieczny, S. F. (1993) Fibroblast growth factor inhibits MRF4 activity independently of the phosphorylation status of a conserved threonine residue within the DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* **13**(10), 5943-56
170. Berberich, S. J., and Cole, M. D. (1992) Casein kinase II inhibits the DNA-binding activity of Max homodimers but not Myc/Max heterodimers. *Genes Dev* **6**(2), 166-76

LEBENS LAUF

Name: Neufeld
Vorname: Bernd
Geburtsdatum: 18.10.1967
Geburtsort: Ludwigshafen am Rhein
Nationalität: deutsch
Wohnort: Untere Heerbergstr. 49
D-97078 Würzburg
Tel.: 0931/22458
e-mail: imsd034@mail.uni-wuerzburg.de
B.Neufeld@gmx.de

- 1974 – 1978 Grundschule Rödersheim-Gronau
- 1978 – 1987 Staatliches Gymnasium Schifferstadt
- 1987 Abitur
- 1987 – 1989 Wehr- und Zivildienst
- 1989 – 1991 Universität Kaiserslautern – Grundstudium und Vordiplom in Biologie
- 1991 – 1992 University of Bristol, England – Second Year Course 'Cellular Biochemistry'
Fächer: 'Molecular Genetics', 'Cellular and Molecular Pathology', 'Cellular Biochemistry'
- 1992 – 1994 Universität Kaiserslautern – Hauptstudium
Schwerpunkte: Molekularbiologie, Zytologie, Biochemie
- 1994 – 1995 Diplomarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg
'Untersuchungen zur TNF- und S-Adenosylhomocystein-induzierten apoptotischen Signaltransduktion in verschiedenen Tumorzellen'
Forschungsschwerpunkt Tumorummunologie, Abteilung Immunchemie
Betreuer: PD Dr. V. Lehmann
- 1995 Biologie-Diplom, Universität Kaiserslautern
- 1995 – 2000 Promotion am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
Neue Interaktionspartner der MAPKAP-Kinasen 3pK und MAPKAP-Kinase 2: die Polycomb-Proteine HPH2 und BMI1 sowie der basische Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor E47'
Betreuer: Prof. Dr. U. R. Rapp und Dr. Stephan Ludwig

PUBLIKATIONSLISTE

- **Neufeld, B.**, Grosse-Wilde, A., Hoffmeyer, A., Jordan, B., Chen, P., Dinev, D., Ludwig, S. and Rapp, U. R. (2000) The serine/threonine kinases 3pK and MAPKAP kinase 2 interact with the basic HLH transcription factor E47 and regulate its transcriptional activity. *Eingereicht bei J Biol Chem*.
- **Neufeld, B.**, Voncken, J. W., van Lohuizen, M., Ludwig, S. and Rapp, U. R. (2000) The serine/threonine kinase 3pK acts as transcriptional repressor in a mammalian Polycomb complex. *In Vorbereitung*.
- Hoffmeyer, A., Grosse-Wilde, A., Flory, E., **Neufeld, B.**, Kunz, M., Rapp, U.R. and Ludwig, S. (1999) Different mitogen-activated protein kinase signaling pathways cooperate to regulate tumor necrosis factor alpha gene expression in T lymphocytes. *J Biol Chem*, **274**, 4319-27.
- Ludwig, S., Hoffmeyer, A., Goebeler, M., Kilian, K., Hafner, H., **Neufeld, B.**, Han, J. and Rapp, U.R. (1998) The stress inducer arsenite activates mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 via a MAPK kinase 6/p38- dependent pathway. *J Biol Chem*, **273**, 1917-22.
- Ludwig, S., Engel, K., Hoffmeyer, A., Sithanandam, G., **Neufeld, B.**, Palm, D., Gaestel, M. and Rapp, U.R. (1996) 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol Cell Biol*, **16**, 6687-97.
- Wunder, A., Stehle, G., Sinn, H., Schrenk, H.H., **Neufeld, B.**, Dempfle, C.E., Dresel, H.A., Freidrich, E., Harenberg, J., Maier-Borst, W. and Heene, D.L. (1995) The injection of heparin prolongs the plasma clearance of oxidized low density lipoprotein in the rat. *Thromb Res*, **78**, 139-49.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 28.1.2000

Bernd Neufeld