
Für Frank Leypoldt

Zentrum für Innere Medizin
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Medizinische Klinik und Poliklinik I
Direktor: Prof. Dr. med. Ansgar Lohse

mRNA-Editing-Komplex: Charakterisierung putativer Proteininteraktionen der
auxiliären Komponenten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Katharina Herberger

aus Schwäbisch-Hall

Hamburg

2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am 06.10.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Greeve

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Rinninger

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Weitzel

Inhaltsverzeichnis

KAPITEL 1	<i>Arbeitshypothese und Zielsetzung</i> 5
KAPITEL 2	<i>Einleitung</i> 6 Atherosklerose 6 Fettstoffwechsel 7 mRNA-Editing 8 Apo B mRNA 10 Apobec-1 10 ASP 12 KSRP 13 Funktionelle Bedeutung des mRNA-Editing 13
KAPITEL 3	<i>Material und Methoden</i> 16 Zellkultur 16 Bakterielle Expression der GST-Proteine 16 Proteinnachweis 19 Herstellung von radioaktiv markiertem ASP und KSRP 19 Far-Western-Analyse 21 GST-Pulldown-Analyse 21 Protein-Protein-Interaktions-Analyse in Yeast-2-Hybrid System 22
KAPITEL 4	<i>Ergebnisse</i> 25 Bakterielle Expression von GST-Apobec-1, GST-ASP, GST-KSRP und GST-Protein 25 Yeast-Two-Hybrid 26 Far Western Analyse 29 GST-Pulldown 31
KAPITEL 5	<i>Diskussion</i> 34 ASP, Apobec-1 und KSRP Interaktionen 35 Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen 37 ASP Dimerisierung 40 ASP, Apobec-1 und KSRP binden nur in Gegenwart der Apo B mRNA 41 Ausblick 41
ANHANG	<i>Zusammenfassung</i> 44 <i>Literaturverzeichnis</i> 46 <i>Abkürzungsverzeichnis</i> 50 <i>Sequenzen</i> 51 <i>Curriculum Vitae</i> 54 <i>Danksagung</i> 55 <i>Erklärung</i> 56

Arbeitshypothese und Zielsetzung

Die Atherosklerose und deren Folgen sind die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Einer der Hauptriskofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose ist die Erhöhung des cholesterinreichen LDL (Low density Lipoprotein) im Blut.

Das in der Leber synthetisierte LDL enthält ApoB100 als Trägerprotein. Das ungefährliche ApoB48, Trägerprotein der Chylomikronen wird beim Menschen ausschließlich im Darm produziert.

Bei manchen Tierarten hingegen wird das ungefährliche Trägerprotein ApoB48 nicht nur im Darm sondern auch in der Leber gebildet. Infolgedessen haben jene Tiere einen geringeren LDL-Spiegel und ein signifikant niedrigeres Risiko für Atherosklerose. ApoB100 und ApoB48 entstammen beide dem selben Gen (Chen et al., 1987; Knott et al., 1986). Durch einen Basenaustausch auf Ebene der mRNA entsteht ein Stoppkodon. Dieses führt zum Translationsabbruch, es wird das kürzere Apo B48 gebildet. Diesen posttranskriptionellen Vorgang nennt man mRNA-Editing. Die Editingreaktion wird durch den Apo B mRNA-Editing-Enzym-Komplex katalysiert, zu dem die Proteine Apobec-1 (apo B editing catalytic component 1), ASP (Apobec-1 stimulierendes Protein) und KSRP (KH-type splicing regulatory protein) gehören (Johnson et al., 1993; Driscoll et al., 1994; Lellek et al., 2000; Teng et al., 1993).

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung einer möglichen Interaktion von Apobec-1, ASP und KSRP. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung sollten diese Interaktionen mit unabhängigen Systemen untersucht werden.

Einleitung

Atherosklerose

Atherosklerose ist die häufigste Todesursache in den westlichen Ländern. So führt die Atherosklerose der Herzkranzarterien zur koronaren Herzkrankheit (KHK) und zum Herzinfarkt, die der hirnversorgenden Arterien zum Apoplex, der Befall von peripheren Gefäßen zu Claudicatio intermittens, im schlimmsten Falle zum Verlust einer Extremität.

Bei der Atherosklerose kommt es zu einer Verdickung der Intima (gr. Sklerosis) mit einer Akkumulation von Fetten (gr. Athere). Durch diese Intimaverdickung kommt es zu einer Stenosierung des Gefäßlumens. Eine solche Stenose behindert den Blutfluß und hat eine mangelnde Sauerstoffversorgung des entsprechenden Versorgungsgebietes zur Folge.

Zu den Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose gehört die Hypercholesterinämie beziehungsweise Dyslipoproteinämie. Andere Faktoren wie Bluthochdruck, Nikotinabusus, Adipositas, Hyperhomocysteinämie, Diabetes mellitus und Hyperfibrinogenämie spielen ebenfalls eine Rolle bei der Genese der Atherosklerose.

Bei der Entstehung einer atherosklerotischen Läsion kommt es zunächst zur Bildung eines sogenannten *fatty streak*. Lipoproteine wandern in die Intima ein, akkumulieren dort und werden enzymatisch glykolisiert oder oxidiert. Die Endothelzellen exprimieren in der Folge eine Reihe von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren, die zu einer Ansammlung von Leukozyten führen. Die Leukozyten differenzieren sich zu Makrophagen, nehmen die Lipoproteine auf und werden so zu lipidbeladenen Schaumzellen. Wachstumsfaktoren und Zytokine, die von den Makrophagen sezerniert werden, stimulieren die Proliferation der glatten Muskelzellen.

Lipoproteine

Lipoproteine haben eine entscheidende Rolle bei der Atherogenese. Man teilt Lipoproteine entsprechend ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit - und damit ihrer Dichte nach - in High density lipoproteins (HDL), Intermediate density lipoproteins (IDL), Low density lipoproteins (LDL) und Very low density lipoproteins (VLDL) ein.

Es handelt sich um Komplexe einer Vielzahl kleiner Lipid- und Proteinmoleküle, die dem Transport von Fetten im Blutplasma dienen. Da Lipide hydrophob sind, wird für ihren Transport im Blut eine hydrophile Hülle benötigt. Im Kern sind das hydrophobe Cholesterin und die Triglyzeride angeordnet, amphiphile Phospholipide sind nach außen gerichtet. An der Oberfläche dieser Lipidtröpfchen sind Proteine aus der Familie der Apoproteine angeordnet. Zu dieser Proteinfamilie gehören Regulatoren des Lipidtransports und des Lipoproteinstoffwechsels.

Außer in ihrer Dichte und ihrer Zusammensetzung unterscheiden sich die Lipoproteine hinsichtlich ihrer Entstehung, ihrem Stoffwechsel und ihrer Verwertung (siehe Abbildung 1).

Fettstoffwechsel

Das mit der Nahrung aufgenommene Fett wird in der Darmmukosa in Chylomikronen

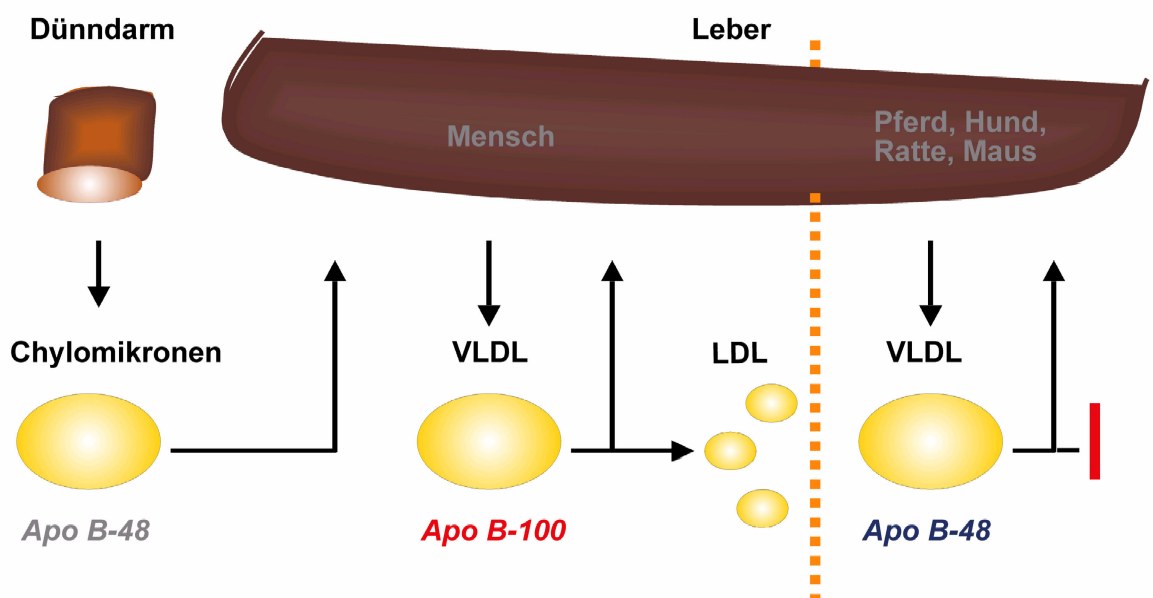


Abbildung 1: Fettstoffwechsel Apo B 48-Synthese findet bei Ratte und Maus auch in der Leber statt. Die über die Nahrung aufgenommenen Fette werden in der Dünndarmmukosa in die Apo B 48 enthaltenden Chylomikronen eingebaut und in die Leber transportiert. Die in der menschlichen Leber synthetisierten VLDL enthalten als Strukturprotein das Apo B 100. Über diese VLDL werden Fette und Cholesterins in die Peripherie transportiert und dort zu LDL verstoffwechselt. In verschiedenen Spezies wie Ratte und Maus enthalten die VLDL Apo B 48 als Strukturprotein, sie können nicht in das atherogene LDL umgewandelt werden.

eingebaut. Bei den Chylomikronen handelt es sich um sehr große und wenig dichte Lipoproteinpartikel, die als Strukturprotein das Apo B48 enthalten und reich an Triglyzeriden sind. Über die Lymphe und das Blut gelangen diese Chylomikronen zu den Organen. Hier befindliche Lipoproteinlipasen bauen die enthaltenen Triglyzeride teilweise ab und stellen sie damit zur Energiegewinnung oder Speicherung bereit. Der Rest der Chylomikronen, die Remnants werden zur Leber transportiert, dort aufgenommen und weiter metabolisiert.

Innerhalb von Minuten nach der Aufnahme einer fettreichen Mahlzeit sind die Chylomikronen aus dem Blut entfernt. Ein Umbau in lang zirkulierende, atherogene Lipoproteine erfolgt nicht (Jäckle et al., 1992).

VLDL werden in der Leber synthetisiert. Sie enthalten das Apo B100 als Strukturprotein und transportieren Triglyzeride sowie Cholesterin. Im Blut wird ein großer Teil des VLDL durch die Lipoproteinlipase zu IDL überführt und wieder von der Leber aufgenommen. Ein Teil jedoch wird unter Mitwirkung der hepatischen Triglyceridlipase (HTGL) in das cholesterinreiche, atherogene LDL umgewandelt. Über den LDL-Rezeptor wird LDL dann in verschiedene Gewebe aufgenommen.

Das HDL, das als Apoprotein unter anderem das Apo A1 besitzt, ist in der Lage, Zellmembranen Cholesterin wieder zu entziehen und dieses zur Leber zurückzutransportieren. Ein erhöhter LDL-Spiegel sowie ein erhöhter Apo B100-Spiegel stellen folglich ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose dar, während ein hoher HDL-Plasmaspiegel anti-atherogene Wirkung hat (Ginsberg et al., 1999).

Apolipoprotein B100 und Apolipoprotein B48

Die Apolipoproteine Apo B 100 als Bestandteil des atherogenen LDL und Apo B 48 als Hauptapoprotein der harmlosen Chylomikronen sind das Genprodukt desselben Gens. Apo B 48 besteht aus den aminoterminalen 48% des Apo B 100 (Chen et al., 1987; Knott et al., 1986). Apo B 100 besitzt eine Lipoproteinbindungsdomäne und eine LDL-Rezeptordomäne, die als Ligand zur Bindung an den LDL-Rezeptor dient (Chester et al., 2000). Sie liegt auf dem Teil des Apo B Genes, das dem Apo B 48 fehlt. Apo B 100 wird in der Leber synthetisiert und ist in den Lipoproteinen VLDL, LDL und IDL vorhanden (siehe Abbildung 1).

Apo B48 wird beim Menschen ausschließlich im Dünndarm exprimiert. Es dient der Synthese von triglyceridreichen Chylomikronen. Zur Expression von Apo B 48 kommt es durch einen Basenaustausch auf der Apo B mRNA, wobei ein Stoppkodon entsteht und der carboxyterminale Teil des Gens nicht exprimiert wird. Diesen posttranskriptionellen Vorgang nennt man mRNA-Editing. Beim Menschen wird Apo B 48 nur im Dünndarm exprimiert, Apo B 100 in der Leber. Die Variation des Genproduktes erfolgt ausschließlich durch mRNA-Editing.

mRNA-Editing

Das mRNA-Editing Konzept wurde erstmalig 1986 bei mitochondrialen mRNAs von kinetoplastischen Protozoen beschrieben. Dort findet eine posttranskriptionelle Insertierung

von genomisch nicht kodierten Uridinresten in der mRNA statt (Benne et al., 1986). Dieses Konzept ist in verschiedenen Spezies mit unterschiedlichen Basenveränderungen zu finden (Benne et al., 1986; Scott et al., 1995; Simpson et al., 1996).

Das C zu U Editing der Apo B mRNA war das erste bei Säugern beschriebene Beispiel für die Erhöhung der Gendiversität durch posttranskriptionelles mRNA-Editing. Der Basenaustausch im Exon 26 macht aus einem Glutaminocodon (Aminosäure 2153, Nukleotid 6666-6668, CAA) ein *in frame* Stoppkodon (UAA) (siehe Abbildung 2). Aus diesem Editingereignis resultiert die Produktion von Apo B 48. Es handelt sich dabei um ein intranukleäres Ereignis, für das keine zusätzlichen Kofaktoren wie Nucleotide, ATP oder Guide-RNAs benötigt werden, wie es beim

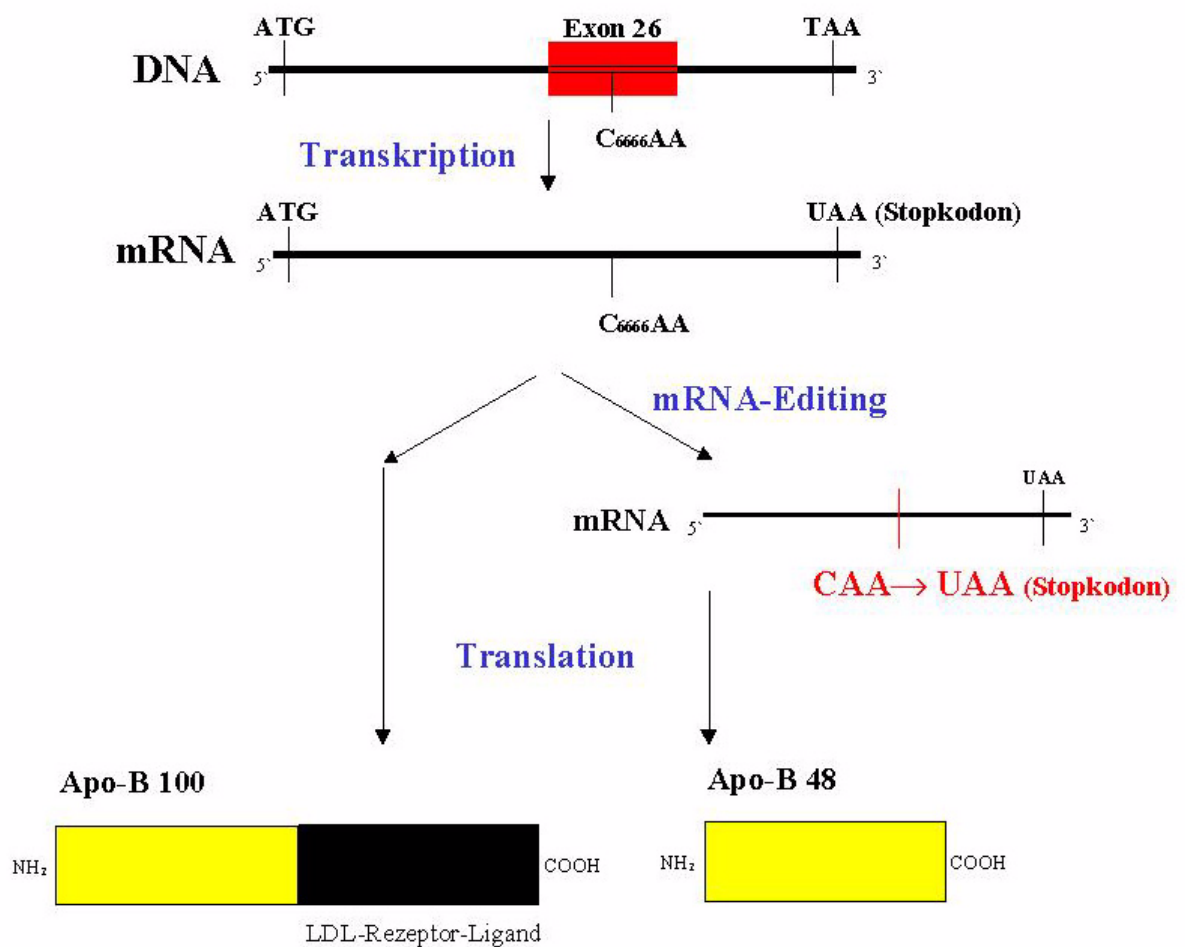


Abbildung 2: Apo B mRNA Editing C zu U Editing führt zur Bildung eines Stoppkodon. Infolgedessen kommt es zum frühzeitigen Translationsabbruch. Statt Apo B 100 wird Apo B 48 gebildet.

Editing in Kinetoplasten-Mitochondrien der Fall ist (Alfonzo et al., 1997; Driscoll et al., 1990; Shah et al., 1991).

Apo B mRNA

Um den Vorgang des Apo B mRNA Editings besser zu verstehen ist es wichtig, sich zunächst die RNA näher zu betrachten, an der der Basenaustausch stattfindet. Für die *in vitro* Editing Reaktion ist ein 26 Nucleotide umfassender Bereich der Apo B RNA (Basenpaar 6662-6687) notwendig (Davies et al., 1989). Bei den restlichen Bereichen wird davon ausgegangen, daß sie für die Effizienz der Reaktion von Bedeutung sind (Shah et al., 1991; Hersberger et al., 1998). Das Editing-Motiv kann in drei Bereiche eingeteilt werden, die 'Mooring' Sequenz, einem sogenannten 'Spacer' Element und einer 'Enhancer' Region (Innerarity et al., 1996; Smith et al., 1996), (siehe Abbildung 3). Die Bindung der katalytischen Einheit des Editing Komplexes findet in einem AU-reichen Bereich der Mooring Sequenz statt, die für die Editing Reaktion essentiell ist (Anant et al. 1995; Navaratnam et al. 1995; Anant et al. 2000). Mutationen in diesem Bereich verhindern beziehungsweise mindern Editing *in vitro* (Shah et al., 1991; Backus et al., 1991; Driscoll et al., 1993; Backus et al., 1992).

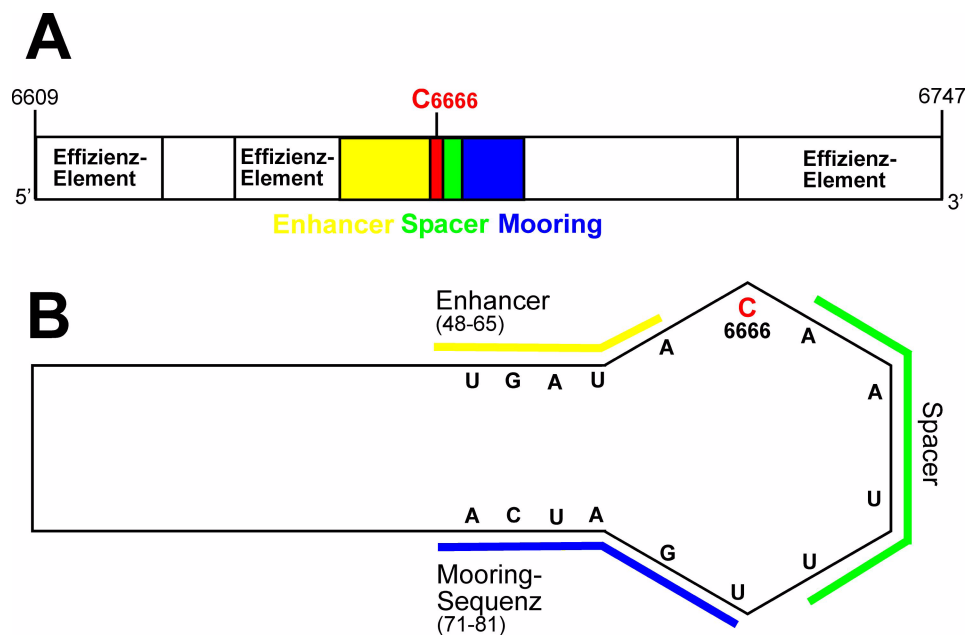


Abbildung 3: Apo B mRNA A: Das Editingmotiv besteht aus der Enhancer-Region, dem Spacer-Element und der Mooring-Sequenz, mit dem in diesem Bereich liegenden C6666. Flankiert wird das Editingmotiv von drei Effizienzelementen. **B:** Komplementäre Nukleotide im Bereich der Enhancer-Region und der Mooring-Sequenz bilden eine sogenannte Haarnadel (Hairpin).

Apobec-1

Als erstes Protein, das als Enzym an der Deaminierung von C⁶⁶⁶⁶ der Apo B mRNA beteiligt ist, wurde Apobec-1 (apo B editing catalytic component 1) 1993 von Teng et al. beschrieben (Teng et al. 1993; Driscoll et al., 1994; Johnson et al., 1993).

Es handelt sich um ein 27 kDa Protein, das zur Familie der Cytidineaminasen gehört, die durch den Besitz einer Deaminase-Domäne gekennzeichnet sind (Navaratnam et al., 1995). Diese Cytidineaminase-Domäne komplexiert ein Zinkmolekül, weshalb man auch von einem Zinkfinger spricht. Zusätzlich besteht sie aus einem Glutamatrest, der als Protonendonator dient und einem Prolin, das die Ammoniumgruppe des Cytidin⁶⁶⁶ bindet (Gerber et al., 1999). Carboxyterminal befindet sich ein RNA-Bindungsmotiv, das an der RG-reichen Region der Mooring Sequenz der Apo B mRNA bindet. Ebenfalls am carboxyterminalen Ende ist ein cytosolisches Retentionssignal/nukleäres Exportsignal lokalisiert (Yang et al., 1997; Navaratnam et al., 1995).

Die Erklärung für das ausschließliche Vorkommen des Proteins beim Menschen im Dünndarm und die fehlende Expression in anderen Geweben, wie sie bei anderen Spezies (u.a. bei Maus, Ratte) stattfindet, ist ebenfalls in seiner Struktur zu suchen. Apobec-1 besitzt bei Maus, Ratte und Mensch einen TATA-losen Promoter in der 5' flankierenden Region vor dem ersten kodierenden Exon, der für die dünndarmspezifische Expression verantwortlich ist. Dieser Promoter ist durch ein sogenanntes MED-1 Motiv gekennzeichnet (Ince et al., 1995). Maus und Ratte jedoch verfügen über einen weiteren Promoter, der in der 5' flankierenden Region

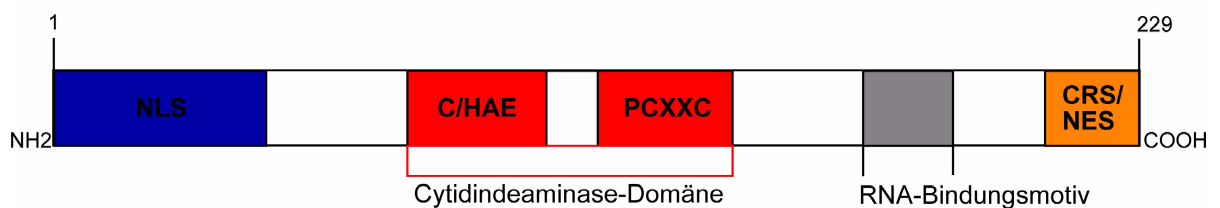


Abbildung 4: Apobec-1 Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Apobec-1. Aminoterminal befindet sich ein zweiteiliges nukleäres Retentionssignal (NLS: Nuclear Localisation Signal). Korrespondierend dazu liegt am carboxyterminalen Ende ein cytoplasmatisches Retentionssignal (CRS: Cytoplasmatic Retention Signal; NES: Nuclear Export Signal). Die Cytidineaminasedomäne besteht aus zwei durch 30 Aminosäuren getrennte Bereiche, C/HAE und PCXXC.

eines zusätzlichen Exons lokalisiert ist und für die Expression von Apobec-1 in Leber, Lunge, Milz, Skelettmuskel und Herz sorgt (Greeve et al., 1998). Apobec-1 bildet Homodimere, was vermutlich eine Voraussetzung für die Editingaktivität ist (Navaratnam et al., 1995). So zeigten Versuche mit einer Apobec-1 Mutante eine Verminderung der Editingaktivität. Diese Mutante bindet zwar Apobec-1, jedoch hat sie nicht die Fähigkeit, Editing auszulösen (Oka et al., 1997).

Dieses Protein alleine ist nicht in der Lage *in vitro* Editing auszulösen, jedoch findet die Reaktion unter Zugabe von Hühner- und HeLa Zellextrakten ohne intrinsische Apobec-1 Aktivität statt (Teng et al., 1992; Navaratnam et al., 1995). Diese Versuche machen deutlich, daß es weitere Faktoren für die mRNA-Editing Reaktion geben muß. Die Expression von

Apobec-1 findet beim Menschen nur im Dünndarm statt, bei Nagern auch in der Leber und anderen Geweben, die keine Apo B mRNA exprimieren (Niere, Milz, Gonaden, Gehirn) (Greeve et al., 1993). Aus diesem Grund scheint auch eine weitere Funktion von Apobec-1 möglich.

ASP

Apobec-1 alleine zeigt keine *in vitro* Editingaktivität, es werden also noch weitere auxiliäre Komponenten benötigt. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem mRNA-Editing-Enzym-Komplex. Der Charakterisierung dieses Komplexes kam man mit der Aufreinigung von ASP (Apobec stimulierendes Protein) aus nukleären Rattenleberzellextrakten einen großen Schritt näher (Lellek et al., 2000). Parallel zur Beschreibung durch *Lellek et al.*, wurde ACF (Apobec-1 complementation factor) von *Mehta et al.* beschrieben, das bis auf das Fehlen einer acht Aminosäuren umfassenden Insertion die gleiche Sequenz besitzt (Mehta et al., 2000). Bei den Isoformen des Proteines handelt es sich vermutlich um alternative Splicevarianten. ASP und Apobec-1 bilden die kleinste *in vitro* Editing Einheit. ASP bindet an die Mooring Sequenz der Apo B mRNA. Es gehört zur hnRNP R Familie, einer Gruppe RNA bindender Proteine. Es enthält drei nicht identische RNA Bindungsdomänen, sogenannte RNA

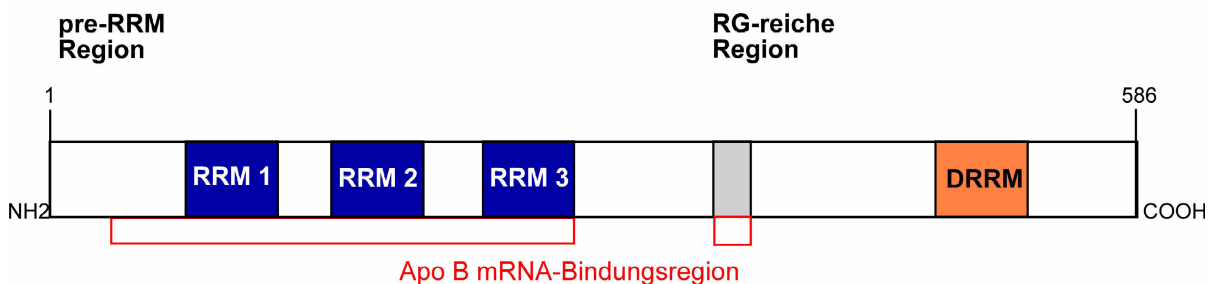


Abbildung 5: ASP Schematische Darstellung der Proteinstruktur von ASP. Aminoterminal befinden sich die drei RNA- Bindungsmotive (RRM: RNA Recognition Motives). Diese bilden die Apo B mRNA Bindungsregion zusammen mit der RG-reichen-Region. Weiter carboxyterminal findet sich ein Doppelstrang RNA Bindungsmotiv (DRRM: Double stranded RNA Recognition Motif).

Recognition Motivs (RRM) und eine DNA Bindungsdomäne (siehe Abbildung 5). Auch GRY-RBP, ein verwandtes Protein aus dieser Proteinfamilie, mit dem ASP große Sequenzhomologien aufweist (Mehta et al., 2000), besitzt drei solcher RNA-Bindungsdomänen.

Außerdem besitzt es eine carboxyterminal lokalisierte, auxiliäre Domäne. Die drei RRMs alleine sind nicht in der Lage, die Bindung an die Apo B mRNA zu vermitteln, dafür sind zusätzliche Aminosäuren in der Pre-RRM Region und die auxiliäre Domäne notwendig (Blanc

et al., 2001; Mehta et al., 2002) (Abbildung 5). ASP kommt nicht nur in Geweben vor, in denen auch Apobec-1 beziehungsweise die Apo B mRNA vorhanden ist, was einen Hinweis darauf gibt, daß auch dieses Protein noch weitere Funktionen haben könnte. So wurde auch das Vorkommen von ASP und der ApoB mRNA in bestimmten Geweben nachgewiesen, ohne gleichzeitiges Vorhandensein von Apobec-1 (Mehta et al., 2002).

GRY-RBP, ein weiteres Familienmitglied der hnRNP R Familie, das 50% Sequenzhomologien gegenüber ASP aufweist, bindet sowohl an ASP, an Apobec-1 als auch an die Apo B mRNA, inhibiert jedoch die Bindung von ASP an die mRNA wie auch die Editingreaktion (Blanc et al., 2001).

KSRP

Bei der Aufreinigung von ASP aus Rattenleberzellextrakten fand sich ein weiteres Protein mit einem Molekulargewicht von 75 kDa, KSRP (KH-type Splicing Regulatory Protein), das ursprünglich als Splicing regulierender Faktor in der Literatur bekannt war. Es besitzt vier RNA-Bindungsdomänen vom KH-Typ (Burd et al., 1994). Weiterhin bindet das Protein an die Apo B mRNA. KSRP zeigte *in vitro* keine Erhöhung der Editing Aktivität, *in vivo* in Hefen konnte jedoch gezeigt werden, dass es in Anwesenheit von KSRP zu einer Erhöhung der Editingaktivität kommt. KSRP ist möglicherweise ein stabilisierender Faktor der Editingreaktion und somit ein weiteres Mitglied des Editing-Enzym-Komplexes (Lellek et al., 2000; Lellek et al., 2002).

Funktionelle Bedeutung des mRNA-Editing

Im Menschen kommt mRNA-Editing von Apo B nur im Dünndarm vor. In anderen Spezies wie Ratten, Mäusen, Pferden und Hunden findet man auch in der Leber Editingaktivität, was sich in einer niedrigen Plasmakonzentration von VLDL und LDL, den Apo B100 enthaltenden Lipoproteinen, widerspiegelt (siehe Abbildung 1) (Greeve et al., 1993). Diese Tiere haben ein geringeres Risiko für Atherosklerose. Diese Tatsache läßt erahnen, von welcher Bedeutung die Möglichkeit wäre, Apobec mRNA Editing auch beim Menschen in der Leber hervorzurufen. Eine Vorstellung davon gibt das genetische Syndrom der familiären Hypobetalipoproteinämie. Bei dieser Krankheit handelt es sich um eine Punktmutation auf dem Apo B Gen, es entsteht ein Non-Sense Kodon, dadurch kommt es zu einem vorzeitigen Strangabbruch bei der Translation (Young et al., 1987). In Folge dessen haben Individuen mit

Hypobetalipoproteinämie stark erniedrigte Spiegel von atherogenem LDL im Blut und damit ein niedriges Risiko für die Entstehung von Atherosklerose (Linton et al., 1993).

Diesem Ansatz folgend, wurden Untersuchungen an transgenen Mäusen und Kaninchen durchgeführt. Bei adenovirus-vermittelter, hepatischer Überexpression von Apobec-1 werden bei den Kaninchen, die zuvor über keine Apo B48 Expression in der Leber verfügen, stark erniedrigte LDL-Spiegel gemessen (Yamanaka et al., 1995). Die Mäuse, deren Editing-Rate zuvor bei 80 % lag, zeigen nach dem virusvermittelten Gentransfer eine Rate von 100 % Editierung und damit kommt es zur fast vollständigen Elimination von LDL aus dem Blut (Hughes et al., 1996). Gleichzeitig werden bei Tieren mit hepatischer Überexpression von Apobec-1 die Bildung von Leberdysplasien und hepatocelluläre Carcinome beobachtet. Diese Beobachtung zeigt, daß überexprimiertes Apobec-1 seine Spezifität verliert. Es kommt zur Deaminierung anderer Cytosine auf RNAs mit ähnlichen Motivsequenzen. Dieses Phänomen wird Hyperediting genannt (Yamanaka et al., 1995). Man kann es dadurch erklären, daß jene Genprodukte durch das mRNA-Editing modifiziert werden, die für das Wachstum und die Differenzierung von Leberzellen zuständig sind, sogenannte Protoonkogene. Durch diesen Vorgang werden sie zu Onkogenen. Ein Kandidatengen ist NAT-1 (novel Apobec target no.1), dessen RNA in den Tumoren stark editiert war. Es handelt sich dabei um ein Translationssuppressor, dessen Funktionsverlust durch die Editierung zur Tumorbildung führen könnte (Yamanaka et al., 1997). Es wurden allerdings natürlich entstandene Tumore aufgrund dieser Beobachtungen untersucht. Dabei fand man keinerlei Hinweise auf Hyperediting, im Gegenteil, in diesen Geweben war Apobec-1 assoziiertes Editing herunterreguliert. In den untersuchten Tumoren fand man ein Fehlen von Apobec-1 oder der auxiliären Komponenten, so daß eine Tumorigenese durch einen Editing-Vorgang ausgeschlossen werden konnte (Greeve et al., 1999). Die Dysplasien der transgenen Tiere sind demnach auf die artifizielle Überexpression von Apobec-1 zurückzuführen. Daß das Einbringen von Apobec-1 in die Leber zum Herabsetzen des LDL-Spiegels noch immer ein vielversprechender Ansatz ist, zeigen die Ergebnisse von Yang et al. Apobec-1 wurde an einen TAT-Promoter fusioniert und gelangte so in primäre Hepatozyten. Dadurch wurde eine transiente Erhöhung von Apo B mRNA Editing mit einer Erhöhung der Synthese und Sekretion von Apo B48 enthaltenem VLDL hervorgerufen. Durch die direkte Gabe von Apobec-1 läßt sich ein steuerbarer Wirkspiegel in physiologischen Dosen erzielen, wodurch die negativen Effekte des Hyperediting umgangen werden können (Yang et al., 2002).

Das letzte Beispiel läßt auf die Möglichkeit einer therapeutischen Anwendung bei Hypercholesterinämie hoffen, dennoch zeigen diese beiden Beispiele, daß die therapeutische Anwendung des Apo B mRNA Editing ein genaueres Verständnis dieses Vorganges bedarf. So ist das Zusammenspiel der bisher bekannten auxiliären Komponenten auf molekularer Ebene bisher nicht vollständig geklärt.

Material und Methoden

Zellkultur

Puffer und Medien

Puffer A

Hepes pH 9,5	20 mM
KCl	100 mM
EDTA	0,2 mM
Glycerol	20%
DTT	1,5 mM
PMSF	0,5 mM
Bezamidin	0,5 mM

Puffer B

wie Puffer A zusätzlich	
MgCl ₂	2,5 mM
Milchpulver	0,5%
Bovines Serumalbumin	2%
Tween 20	0,1%

Puffer C

wie Puffer A zusätzlich	
MgCl ₂	2,5 mM
Tween 20	0,1%

YPD

Peptone (Difco)	20 g/l
Yeast Extract	10 g/l
	auf pH 6,5

Bakterielle Expression der GST-Proteine

Verwendete Klone

Als erster Schritt erfolgte die Klonierung von GST, GST-Apobec-1, GST-ASP und GST-KSRP jeweils in den pGex-2T-Vektor (Amersham Pharmacia), der den Promoter tac-35 besitzt. Die Klonierung wurde mit den Restriktionsenzymen BamH1 und EcoR1 vorgenommen. Zur Überprüfung wurden die Klone sequenziert.

Proteinexpression in *E. coli* BL-21 Bakterien

Für die Proteingewinnung wurden *E. coli* BL-21 Zellen verwendet, da diese eine effektivere Proteinsynthese ermöglichen. Vor der Transformation der Vektoren in *E. coli* BL 21 wurden die Klone in *E. coli* XL 1-blue transformiert, eine Minipräparation durchgeführt und durch einen Restriktionsenzymverdau mit *Eco* RI auf ihre Richtigkeit überprüft.

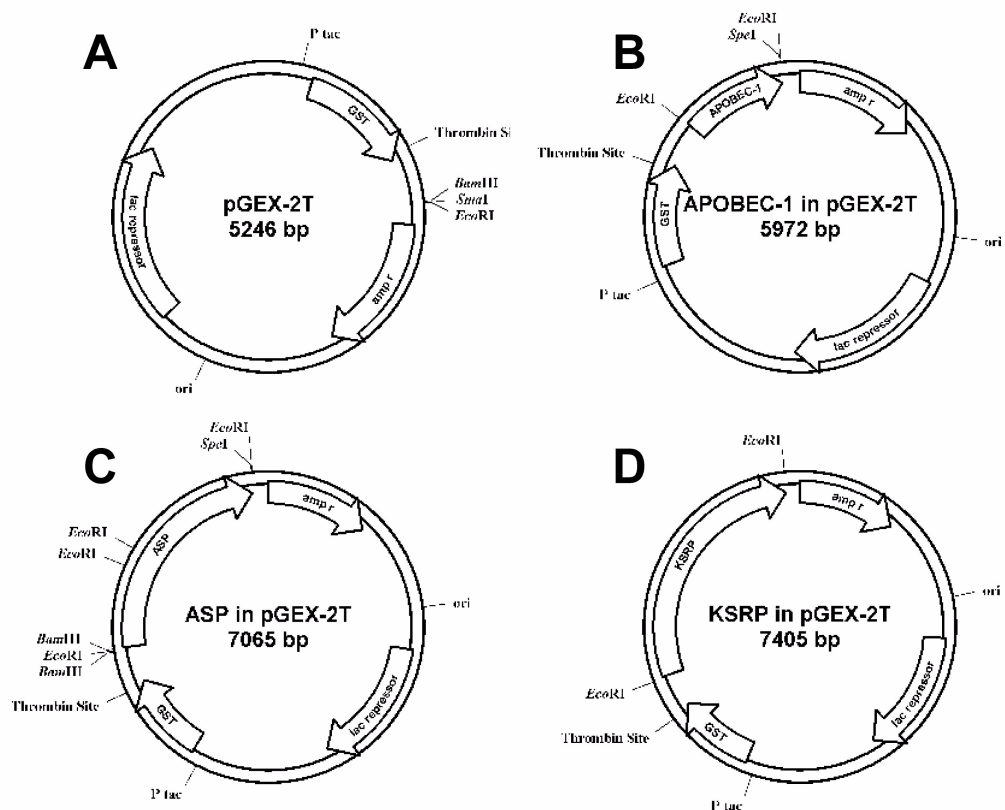


Abbildung 6: Konstrukte im pGex2T Expressionsvektor. A pGex2T Vektor mit Detaildarstellung. **B** Apobec-1 in pGex2T. **C** ASP in pGex2T. **D** KSRP in pGex2T. amp r Beta-Lactamase-Ampicillinresistenz; GST Gluthation-S-Transferase; P tac Promotor-tac, lac repressor lac Repressor Protein; Thrombin Si Thrombin Erkennungs Sequenz; ori Replikationsstart in *E.coli*. Restriktionsenzyme der Klonierungsregion.

Herstellung kompetenter *E. coli* BL-21 Zellen

Es wurde eine Primärkultur mit BL-21 Zellen und 25 ml LB-Medium angesetzt, welche bei 37°C über Nacht wachsen sollte. Zwei ml dieser Vorkultur wurden in 10 ml LB-Medium gegeben und weiter inkubiert, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5. Diese war nach circa drei Stunden erreicht. Daraufhin wurde die Kultur zentrifugiert (10 min, 4°C, 4.000 rpm), das Zellpellet in 10 ml eiskalter, steriler CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 10 min auf Eis belassen. Dann wurde erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 4.000 rpm), der Überstand abgenommen und zwei ml eiskalte, sterile CaCl₂ Lösung hinzugefügt. Für die folgenden Transformationen wurden jeweils 200 µl der kompetenten Zellen verwendet, der Rest konnte durch Schockgefrieren bei -80°C aufbewahrt werden.

Transformation der Plasmide in *E. coli* BL-21

Zunächst wurde jeweils 100 ng der Plasmid-DNA mit 200 µl der kompetent gemachten CaCl₂ BL-21 Bakterienzellen für 30 min inkubiert und auf Eis gelegt. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C und danach 2 min auf Eis, wurden die Bakterien in 800µl LB-Medium für 45 min bei 37°C angezüchtet. Anschließend wurde zentrifugiert (JA 14-Rotor Fa.Beckman, 5000

rpm). Das Pellet wurde in 100 µl Überstand aufgelöst und auf einer LB-Ampicillin-Agarose-Platte ausgestrichen. Diese wurde über Nacht bei 37°C kultiviert.

Proteinexpression

Eine 100 ml Vorkultur wurde im *E. coli* Stamm BL-21 in LB-Medium mit Ampicillin angezchtet (über Nacht bei 37°C), um dann auf zwei Liter mit 2x YTA-Medium (750 ml Medium, 37,5 ml Vorkultur, Ampicillin (Verdünnung 1000:1)) verdünnt zu werden.

Die Kultur wuchs bei 30°C bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5. Dann wurde 0.1 mM IPTG (Isopropyl-3-Dthiogalactopyranoside, Biotech) dazugegeben, um die Induktion hervorzurufen.

Proteingewinnung

Nach weiteren vier Stunden Wachstum wurden die Bakterien pelletiert, mit 100 ml PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gewaschen und daraufhin in 100 ml PBS aufgenommen. Die Zellösung wurde für 3 x 10 s bei 60 Watt Ausgangsleistung mit Ultraschall behandelt, wodurch die Bakterienwände zerstört wurden. Mit dem Detergenz Triton X-100 (Sigma) 20% wurde auf eine Endkonzentration von 1% equilibriert. Es folgte das Rollen des Lysates bei 4°C für eine halbe Stunde. Im Anschluß daran wurde es mit dem JA20-Rotor (Beckmann) bei 15.000 rpm (15 min, 4°C) zentrifugiert.

Aufreinigung der Proteine über eine Säule

Mit Hilfe einer GST^{rap} FF Säule (Amersham Pharmacia) ist es möglich, den GST-Teil der Proteine zu binden, dadurch werden diese vom restlichen Lysat getrennt. Durch einen Elutionspuffer wird die GST-Bindung kompetitiv gelöst, dadurch ist es möglich, die GST-Proteine von der Säulenmatrix zu lösen und sie aufzufangen. Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, bei 4°C zu arbeiten, um eine Proteolyse zu verhindern.

Die Reinigung des Lysates über die Säule lief folgendermaßen ab: Der Überstand wurde auf eine GST^{rap} FF 1 ml Säule (Amersham Pharmacia) geladen, die zuvor mit PBS plus 1% Triton X-100 (Sigma) equilibriert wurde. Die Säule mit dem Lysat wurde zunächst mit 20 ml PBS plus 1% Triton X-100, dann mit 10 ml PBS gewaschen. Die dann folgende Elution wurde mit Elutionspuffer (50 mM Tris, pH 8,10 mM Gluthatione) in 1 ml Fraktionen durchgeführt. Die Konzentration der Fraktionen wurde gemessen, die Peakfraktionen gepoolt und mit Hilfe von Centricon 10 Filtern (Amicon) konzentriert. Die Analyse erfolgte durch SDS-Page mit einer Coomassiefärbung und mit der Antikörperfärbung eines Westernblotts. Es wurden die Antikörper GST (Ziege-Anti-GST-Antikörper, Amersham) und Anti-P1019-ASP

(peptidgeeignet, Tier 2923 g, BioGenes GmbH) verwendet. Für das Coomassie-Gel wurden 20 µg, für den Westernblott 10 µg Protein eingesetzt.

Um die Proteine aufbewahren zu können, wurden sie in einer 25% Glycerollösung plus 1 mM DTT (D2-Dithiothreitol, Sigma) bei -80°C gelagert.

Proteinnachweis

Proteinelektrophorese

Bei der Proteinelektrophorese erfolgt eine Auftrennung der Proteine nach Größe und Ladung im elektrischen Feld auf einem Polyacrylamidgel (SDS-Gel) als Laufmedium. Hierzu wurde ein Untergel (10% SDS) mit einem darüberliegenden Obergel (5% SDS) zur Anwendung gebracht. Als Laufpuffer diente eine 1% SDS-Puffer (120 g Tris-Base (Fa. Sigma), 576 g Glycine, 40 g SDS mit ddH₂O auf 4 l aufgefüllt, pH 8,8).

Herstellung eines SDS-Geles

5% Obergel: 10 ml Acrylamid bis; 5 ml 1,5 M Tris HCl pH 6,8; 11,4 ml ddH₂O; 0,2 ml 10% SDS (Fa. Biorad); 0,3 ml 10% Amoniumpersulfat; 10 µl TEMED (Fa. Biorad).

10% Untergel: 10 ml Acrylamid bis; 7,5 ml 1.5 M Tris HCl pH 8,8; 11,8 ml ddH₂O; 0,6 ml 10% SDS; 0,2 ml 10% Amoniumpersulfat; 10 µl TEMED.

Coomassie-Färbung

Das SDS-Gel wurde 30 min fixiert (Fixing Solution: 25% Methanol; 10% Essigsäure), dann 3 min gewaschen (Destain-Solution: 25% Ethanol; 8% Essigsäure), 90 min mit 0,02% Coomassie Blue gefärbt (30% Ethanol; 8% Essigsäure; 4% Glycerol). Zum Schluß erfolgten vier Waschschrte (1x15 min, 1x45 min., 2x120 min) mit Destain-Solution.

Herstellung von radioaktiv markiertem ASP und KSRP

Klonierung von pGEM-Teasy-ASP und pGEM-Teasy-KSRP

ASP wurde mit *EcoRI* und *SpeI* in den Vektor pGEM-Teasy kloniert. KSRP wurde zunächst aus zwei Fragmenten mit *BamH1/SpeI* zum Volle-Länge-Protein fusioniert, um dann mit *EcoRI* und *SallI* in den Vektor pGEM-Teasy kloniert zu werden.

Vor der Verwendung wurden sie zunächst durch PCR amplifiziert und anschließend sequenziert, um ihre Richtigkeit zu überprüfen.

Invitro Transkription und Translation von ³⁵S-Methionin markiertem ASP und KSRP

Die Synthese der radioaktiv markierten Proteine erfolgte nach dem Kitprotokoll TNT Quick Coupled Transcription/ Translation Systems (Promega), unter Einsatz von Residue (³⁵S) Methionin (Amersham).

Aufreinigung und Überprüfung der radioaktiven Proteine

Um das

Retikulozytenlysat und die DNA der Reaktion von den Proteinen zu trennen, wurden die Reaktionsansätze gepoolt und über eine pd-10 Säule (Amersham) gegeben, die zuvor mit 25 ml HEPES-Puffer equilibriert wurde. Dann wurde mit 3,5 ml HEPES-Puffer eluiert, wobei sich die Proteinfraktion in der Fraktion von 2,5 bis 3,5 ml des Eluates befand. Es wurde weiterhin eine Konzentration der Fraktion mit Hilfe eines Centricon 10 Filters (Amicon) durchgeführt. Die Überprüfung der Proteine wurde mit SDS-Page vorgenommen, das Gel wurde getrocknet und autoradiographiert. Die Menge der Radioaktivität wurde durch Szintillationsmessung bestimmt und dann wurde die Menge des eingebauten Schwefels berechnet. Diese entsprach etwa der gemessenen Radioaktivitätsmenge nach dem Filtrervorgang, was den Erfolg dessen bestätigte.

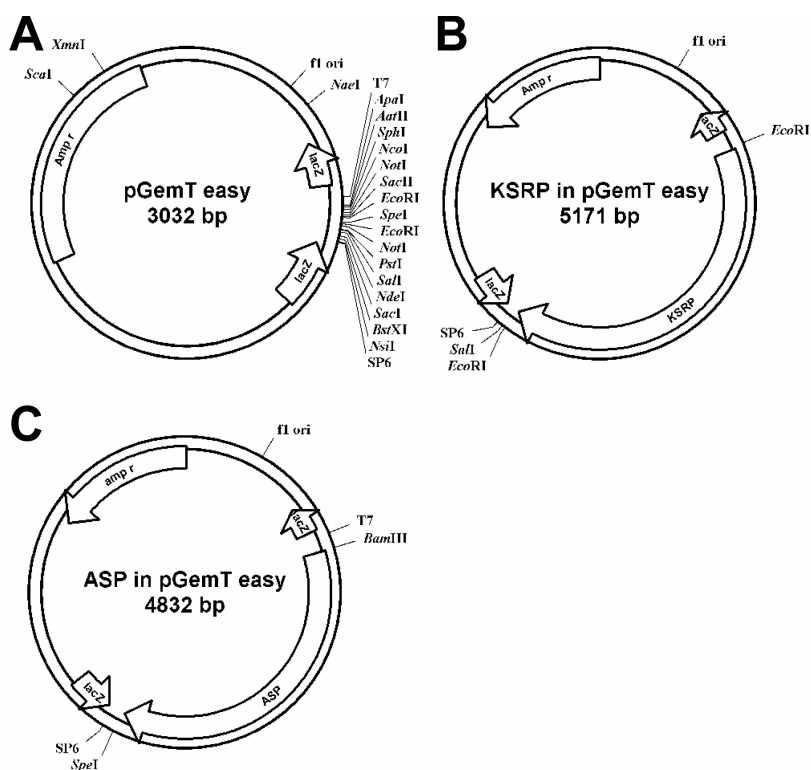


Abbildung 7: A pGem-Teasy Vektor mit Detaildarstellung der Klonierungsstelle. B KSRP in pGem-Teasy. C ASP in pGem-Teasy. T7, SP6 Phagenpromotorsequenzen; Amp^r Beta-Lactamase-Ampicillinresistenz; lacZ Beta-Galactosidase Gen; f1 ori Replikationssequenz des f1 Phagen; ori Replikationsstart in *E.coli*.

Far-Western-Analyse

Bei der Far-Western-Analyse wird ein Protein mit Hilfe des Westernblotts an einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Die Nitrocellulosemembran wird mit dem putativen Bindungspartner in der flüssigen Phase inkubiert, welcher radioaktiv markiert wurde.

Nachdem die Membran gewaschen und getrocknet wurde, kann mit der Autoradiographie der Teil der radioaktiv markierten Proteine sichtbar gemacht werden, der durch eine Protein-Protein-Interaktion an der Nitrocellulosemembran binden konnte.

Zunächst wurde jeweils ein μg des rekombinanten GST-Proteins auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen, das Gel wurde über Nacht auf eine Nitrocellulose Transfer Membran (Protran, Schleicher&Schuell) geblottet.

Die immobilisierten Proteine wurden in 6 M Guanidinium-Hydrochlorid in Puffer A (20 mM HEPES pH 7,9; 100 mM KCL; 0,2 mM EDTA; 20% Glycerol; 1,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 0,5 mM Benzamidin) für eine Stunde denaturiert, um daraufhin durch eine Verdünnungsreihe, die alle 10 Minuten 12 mal 1:1 mit destilliertem Wasser gemischt wurde, wieder renaturiert zu werden (Kohtz et al., 1994; Mehta et al., 2000).

Über Nacht wurde der Filter in Puffer A mit 5% BSA und 5% Milchpulver bei 4°C geblockt. Dann folgte die Hybridisierung der geblotteten Proteine mit den ^{35}S -markierten Proteinen ASP beziehungsweise KSRP (5×10^5 cpm/ml) in Puffer B bei 30°C für 16 Stunden. Die Filter wurden dreimal 10 Minuten lang in Puffer C gewaschen und dann bei Raumtemperatur getrocknet und autoradiographiert.

GST-Pulldown-Analyse

Die GST-Pulldown-Analyse ist eine weitere Methode, mit der Proteinbindungen in einem *in vitro*-System nachgewiesen werden können. Hierbei wurden zunächst die Bindungspartner, der eine als GST-Protein, der andere wiederum radioaktiv markiert, miteinander inkubiert. Dann wird Gluthation-Sepharose dazugegeben, die in diesem System als feste Phase dient. Nach mehreren Waschschritten kann das durch die Bindung verbliebene radioaktiv markierte Protein auf einem autoradiographierten SDS-Gel nachgewiesen werden.

Für die Hybridisierung wurden jeweils 50 μl mit (^{35}S)-Methionin markiertes ASP beziehungsweise KSRP, hergestellt nach dem TNT-easy-*in vitro*-Transkriptions/Translations-Kit (Promega), mit je 50 μg GST-ASP, GST-Apobec-1, GST-KSRP und GST bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

50 µl Gluthatione-Sepharose (Amersham Pharmacia) pro Hybridisierungsreaktion wurden mit einem ml PBS gewaschen und dann mit 500 µl Blockpuffer (20 mM HEPES pH 7,9; 100 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 20% Glycerol; 1,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 0,5 mM Benzamidin; 5% BSA; 5% Milchpulver) über Nacht bei 4°C geblockt. Die Proteinansätze wurden dann zu der Gluthatione-Sepharose-Lösung dazugegeben und für drei Stunden bei 4°C gerollt. Nach dieser Zeit wurden die Ansätze zentrifugiert und 4x mit je 1 ml Puffer (20 mM HEPES pH 7,9; 100 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 20% Glycerol; 1,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 0,5 mM Benzamidin; 2,5 mM MgCl₂; 0,1% Tween 20) gewaschen.

Das Pellet wurde in 30 µl 2x SDS-Puffer aufgenommen, 10 min bei 80°C erhitzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dieses wurde getrocknet und autoradiographiert.

Protein-Protein-Interaktions-Analyse in Yeast-2-Hybrid System

Das Yeast-2-Hybrid-System basiert auf der Grundlage, daß ein Transkriptionfaktor, Gal4 in zwei Teile geteilt wurde, eine Aktivierungs- und eine Bindungsdomäne. Jeweils eine wurde in die beiden Vektoren pAS und pACT kloniert. Der Gal4 Transkriptionsfaktor kann jedoch nur dann funktionell aktiv werden und somit die Transkription des von ihm abhängigen Reportergenes lacZ aktivieren, wenn die beiden Domänen in unmittelbare Nähe gebracht werden. Die zu untersuchenden Proteine werden in die Vektoren pAS und pACT kloniert. Im Falle einer Bindung der Proteine befinden sich die Aktivierungs- und die Bindungsdomäne in unmittelbarer Nachbarschaft und somit erfolgt die Expression der Reportergene.

Die erfolgreiche Bindung der zu untersuchenden Proteine kann durch den β-Galaktosidase-Essay erfolgen, es kommt durch die Spaltung der Galaktose zu einer Grünverfärbung der Hefezellkolonien.

Die Vektoren pAS2-ASP, pAS2-Apobec-1, pACT2-ASP, pACT2-Apobec-1 und pACT2-KSRP wurden mir freundlicherweise von Romy Kirsten zur Verfügung gestellt (Konstrukte siehe Abbildung 8 und 9). ASP wurde mit *EcoRI* und *SalI* in die Multiple Cloning Site von pAS2-1 kloniert, Apobec-1 mit *SalI* und *NcoI*. In den Vektor pACT2 wurde ASP mit *BamHI* und *SalI*, Apobec-1 mit *NcoI* und *SalI/XhoI* und KSRP mit *EcoRI* hineinkloniert. Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung und Verdau überprüft.

Um die Protein-Interaktions-Analyse durchzuführen, wurden der Hefestamm Y 187 Nährmedium angezchtet.

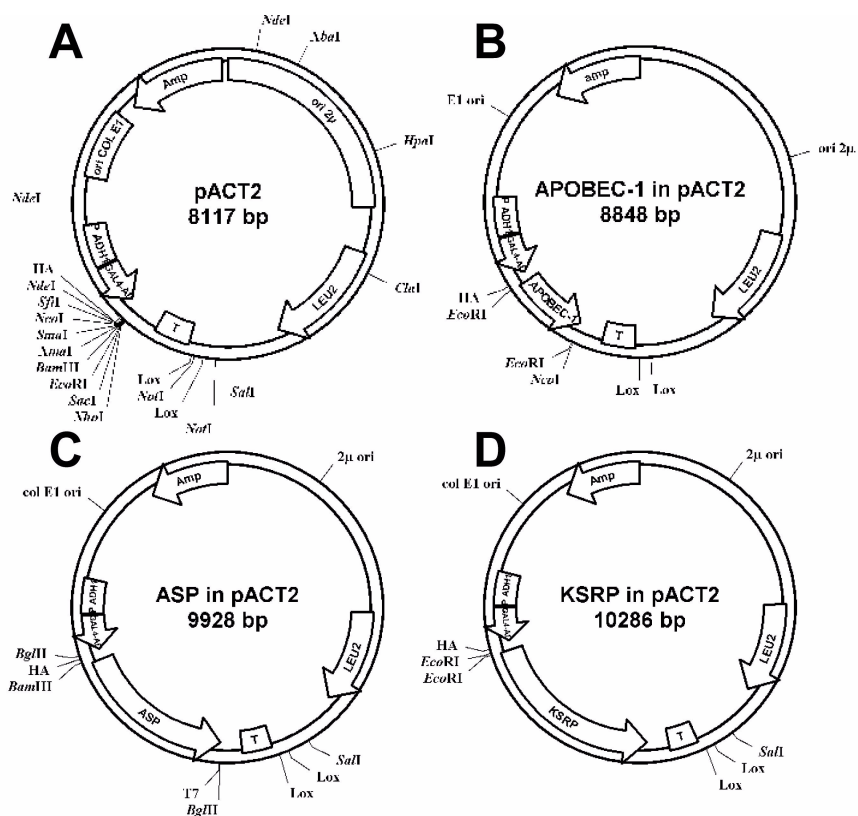


Abbildung 8: **A** pACT2 Vektor mit Detaildarstellung der Klonierungsstelle. **B** Apobec-1 in pACT2 **C** ASP in pACT2 **D** KSRP in pACT2. Amp Beta-Lactamase-Ampicillinresistenz; P ADH1 Hefe-Promotor ADH1; GAL4-AD GAL4-Activation-Domain; T Hefe-Terminator ADH1; LEU2 LEU2-Gen Selektionsmarker; HA Hämagglutinin-Epitop; f1 ori Replikationssequenz des f1 Phagen; ori Replikationsstart in *E.coli*.

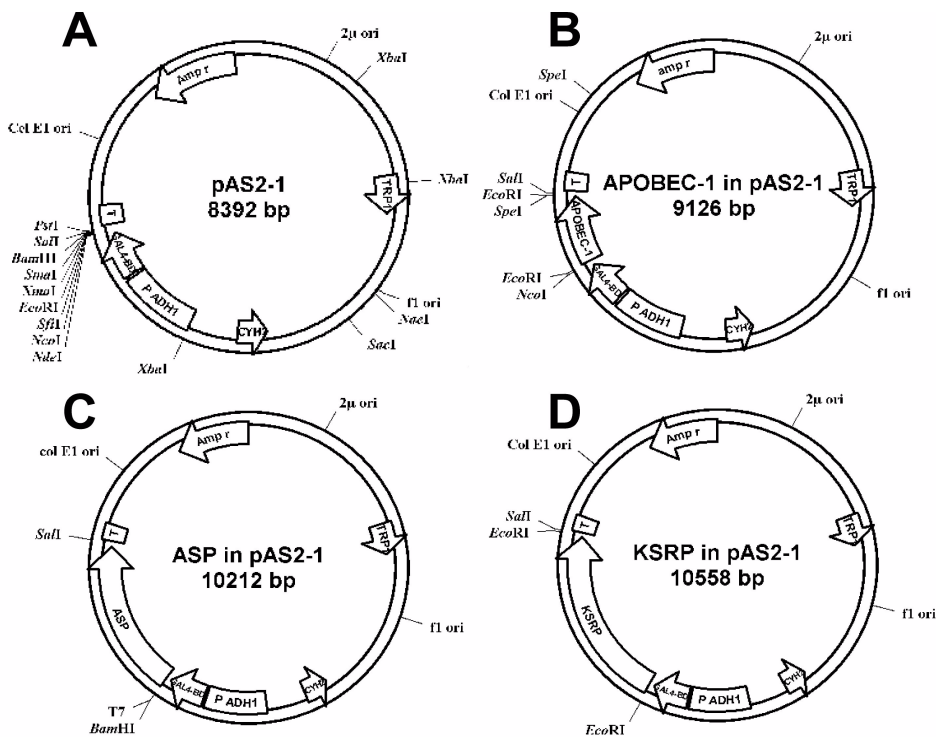


Abbildung 9: **A** pAS2-1 Vektor mit Detaildarstellung der Klonierungsstelle. **B** Apobec-1 in pAS2-1 **C** ASP in pAS2-1 **D** KSRP in pAS2-1. Amp r Beta-Lactamase-Ampicillinresistenz; P ADH1 Hefe-Promotor ADH1; GAL4-BD GAL4-Binding-Domain; T Hefe-Terminator ADH1; CYH2 CYH2-Gen Cycloheximid-Sensitivität; TRP1 TRP1-Gen Selektionsmarker; f1 ori Replikationssequenz des f1 Phagen; ori Replikationsstart in *E.coli*.

Transformation der Konstrukte in die Hefestämme

Es wurde eine Übernachtskultur in 50 ml YPD plus 2% Glucose bei 30°C angesetzt, die dann bei einer $OD_{600} > 1,5$ auf 250 ml YPD plus 2% Glucose verdünnt wurde. Bei Erreichen der OD_{600} von $0,5 \pm 0,1$ wurde die Kultur zentrifugiert, das Pellet mit 25 ml ddH₂O gewaschen, erneut zentrifugiert, das Pellet in frisch bereiteter 1,5 ml 1x Tris EDTA/LiAc Lösung (150 µl TE, 150 µl LiAc, 1,2 ml ddH₂O) aufgenommen. Unterdessen wurden jeweils 0,1 µg der Plasmide vermisch mit 0,1 mg Hering-Sperma-Träger-DNA (herring testes carrier, HTC), die zuvor 5 min bei 95°C denaturiert und dann 5 min auf Eis gestellt wurde. Dazu gab man je 100 µl kompetente Zellen und 0,6 ml PEG/LiAc Lösung (1,6 ml PEG; 0,2 ml TE; 0,2 ml LiAc). Die Reaktionsgefäße mit dem Reaktionsansatz wurden dann 30 min bei 30°C auf den Schüttler gegeben. Danach wurden je 70 µl DMSO hinzugefügt, bei 42°C 15 min erhitzt, 2 min auf Eis gestellt und dann zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen wurden in 0,5 ml YPD plus 2% Glucose aufgenommen und auf den Selektionsplatten ausgestrichen.

Die Nährplatten wurden bei 30°C inkubiert. Der Vektor pAS2-1 hat das Gen zur Synthese von Tryptophan, pACT das zur Synthese von Leucin, so daß das Ausstreichen der transformierten Hefen und deren Wachstum auf lysin- und tryptophanfreien Kontrollplatten einen Hinweis auf den Erfolg der Transformation gibt.

β-Galactosidase-Assay

Um eine mögliche Interaktion der Proteine nachzuweisen, wurde ein β-Galactosidase-Assay durchgeführt. Dafür wurde ein Abklatsch von den Hefepetten mit einem Nitrocellulosefilter (Whatman) abgenommen, der auf einer Nährplatte über Nacht inkubiert wurde.

Dann wurde der Filter in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um daraufhin auf ein Filterpapier mit 3 ml Z-Puffer / X-Gal-Lösung (Yeast Protocols Handbook, Clontech) gelegt zu werden.

Ergebnisse

Bakterielle Expression von GST-Apobec-1, GST-ASP, GST-KSRP und GST-Protein

Die Proteinsynthese erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll, die Synthese von GST-Protein und GST-Apobec-1 zeigte sich als problemlos. Es wurde eine Proteinkonzentration von 4,5 µg/µl bei GST, 6,5 µg/µl bei GST-Apobec-1 gemessen. Bei der Analyse durch den Westernblott konnte in der Coomassiefärbung eine Bande in Höhe von 25 kDa gezeigt werden, die der Größe des GST-Proteins entspricht, was durch die Antikörperfärbung noch einmal bestätigt wurde. Das GST-Apobec-1 konnte mit einer Größe von 65 kDa in der Coomassiefärbung und bei der Antikörperfärbung dargestellt werden, was ebenfalls den Erfolg der Proteinsynthese bestätigte.

Als weitaus schwieriger erwies sich die Synthese der längeren Proteine GST-ASP und GST-KSRP. Unter den bis dahin angewandten Bedingungen konnte GST-ASP nur mit einer Konzentration von 0,95 µg/µl gewonnen werden. Mit 12,5 µg/µl wurde bei der Synthese von GST-KSRP zwar eine große Ausbeute erzielt, bei der Färbung des Blotts zeigte sich allerdings eine multiple Fraktionierung des Proteins in kleinere Bruchstücke. Man ging davon aus, daß schon während der vierstündigen Synthesephase der Proteine eine Proteolyse stattfinden könnte und verkürzte darauf diese um eine Stunde. Bei GST-ASP zeigte sich dieser Versuch als erfolgreich, es wurde eine Ausbeute von 3,57 µg/µl gewonnen. In der folgenden Analyse stellte sich das Protein mit einer Größe von 90 kDa und einer geringen Trunkierungsrate dar. Der Erfolg der Synthese konnte sowohl in der Coomassiefärbung als auch bei der Antikörperfärbung des Westernblotts bestätigt werden (siehe Abbildung 10).

Bei der Herstellung des Proteins GST-KSRP konnte mit der verkürzten Synthesephase nicht der gewünschte Erfolg erzielt werden. Auch die Verkürzung um eine weitere Stunde konnte keine Veränderung erwirken, die bei ASP dagegen einen weiteren Anstieg der Ausbeute auf 4,28 µg/µl nach sich zog.

Die folgende Arbeitshypothese fußte auf der Überlegung, das Protein könnte bei der Reinigung über die Säule proteolysiert werden. Daher entschloß ich mich, der Waschlösung im folgenden Versuch einen Proteinaseinhibitor zuzusetzen (2 Tabletten Complete Protease

Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Auch dieser Versuch zeigte keine Verbesserung, GST-KSRP war weiterhin nur in geringen Mengen als Protein in voller Länge nachweisbar.

Im nächsten Schritt wurden die Wachstumsbedingungen während der Inkubation verändert. Es wurden 2% Glucose zum 2x YTA-Medium hinzugefügt. Als auch das keinen durchschlagenden Erfolg brachte, entschloß ich mich, mit dem bisher gewonnen GST-KSRP zu arbeiten. Es lag demnach eine geringere Menge der vollen Länge des Proteins (100 kDa) vor als bei den anderen Proteinen.

Abschließend ist zu sagen, daß die Synthese eines Proteins sich um so schwieriger darstellte, desto länger es war. Ob des komplexen Ablaufs der biologischen Proteinsynthese läßt sich nicht sicher feststellen, welcher Schritt zu einer unvollständigen Synthese beziehungsweise dem vorzeitigen Abbau der Proteine führt.

Yeast-Two-Hybrid

Um Protein-Proteinbindungen nachzuweisen, wurde der Hefestamm Y 187 verwandt. Die Transformation von jeweils zwei Vektoren in den verschiedenen Kombinationen (pAS-ASP und pACT-Apobec-1, pAS

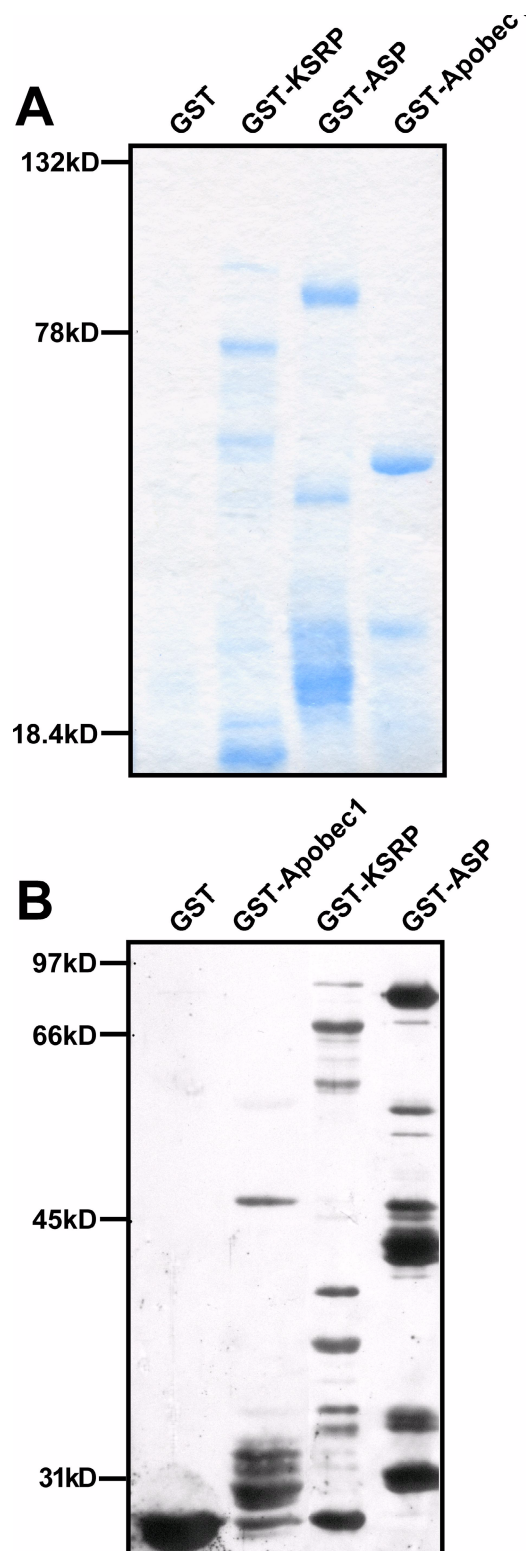


Abbildung 10: Nachweis der GST-Proteine **A:** Coomassie gefärbtes SDS-Page mit GST-Apobec-1, GST-ASP, GST-KSRP und GST. Jeweils 50 µg in bl 21 E. coli exprimiertes GST-Apobec-1, GST-ASP, GST-KSRP und GST wurden auf ein 7,5 % SDS-Gel geladen und mit 0,02 % Coomassie Blue angefärbt. **B:** Antikörperfärbung mit GST-Antikörper eines Westernblotts mit GST, GST-Apobec-1, GST-KSRP und GST-ASP. In bl 21 E. coli exprimiertes GST, GST-Apobec-1, GST-KSRP und GST-ASP wurden auf ein 10 % SDS-Gel geladen, geblottet und mit dem GST-Antikörper hybridisiert (Ziege-Anti-GST-Antikörper, Amersham).

Apobec-1 und pACT-ASP, pAS-ASP und pACT-ASP, pAS-Apobec-1 und pACT-Apobec-1, pAS-ASP und pACT-KSRP sowie pAS-Apobec-1 und pACT-KSRP) wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt und erwies sich als relativ problemlos. Die erfolgreiche Transformation der Vektoren in die Hefezellen läßt sich durch das bloße Wachstum der Hefen auf den leucin- und tryptophanfreien Kulturplatten beobachten. Jeder Vektor verfügt über eines der Gene zur Expression einer der Aminosäuren, die zum Wachstum auf den Kulturplatten nötig sind.

Der verwendete Hefestamm Y 187 verfügt über das Reportergen LacZ. Im Falle einer erfolgten Protein-Protein-Interaktion kommt es zur Transkription des Reportergenes. Die erfolgte Transkription des Reportergenes läßt sich wiederum im Galaktosidase-Assay nachweisen, die Spaltung der Galaktose zieht eine Grünfärbung der entsprechenden Hefekolonien nach sich.

ASP und Apobec-1 bilden Homodimere

Im Yeast 2 Hybrid System wurden als Positivkontrollen die von der Firma Clontech zur Verfügung gestellten Plasmide pGADT7-p32 und pGBKT7-T verwendet. In den ersten Heferversuchen zeigte sich schnell, daß auch durch uns die schon zuvor beschriebene Dimerbildung von Apobec-1 nachgewiesen werden konnte (Lau et al., 1994). Das Wachstum, wie auch die Quantität der Grünfärbung der Hefekolonien glich der der Positivkontrollen.

Da die zentrale Fragestellung der Doktorarbeit die Bindung der Proteine ASP, Apobec-1 und KSRP untereinander war, wurde die ASP-ASP-Bindung zunächst nicht untersucht. Erst als sich bei der Far-Western-Analyse ein Hinweis auf eine solche Interaktion ergab, wurde diese auch in der Hefe darzustellen versucht. Bei der folgenden Transformation zeigten die Hefekolonien mit der Proteinkonstellation pACT-ASP plus pAS-ASP ein gutes Wachstum und eine starke β -Galactosidase-Aktivität, die ebenfalls der der Positivkontrollen pGADT7-p32 plus pGBKT7-T glich.

In den Hefen ließ sich also die Aussage machen, daß in diesem System, ASP an sich selbst zu binden, in der Lage ist. ASP ist offensichtlich in der Lage, in vivo Homodimere zu bilden. Dieses Phänomen konnte, wie schon zuvor beschrieben war, auch bei Apobec-1 bestätigt werden (siehe Abbildung 11,12).

ASP und Apobec-1 zeigen keine Interaktion in Hefen

Die Proteininteraktion der beiden Proteine ASP und Apobec-1 wurde sowohl in der Konstellation pAS-ASP und pACT-Apobec-1 wie auch pAS-Apobec-1 und pACT-ASP untersucht. Das Wachstum der Hefen auf den Kulturplatten war gut, was die erfolgreiche

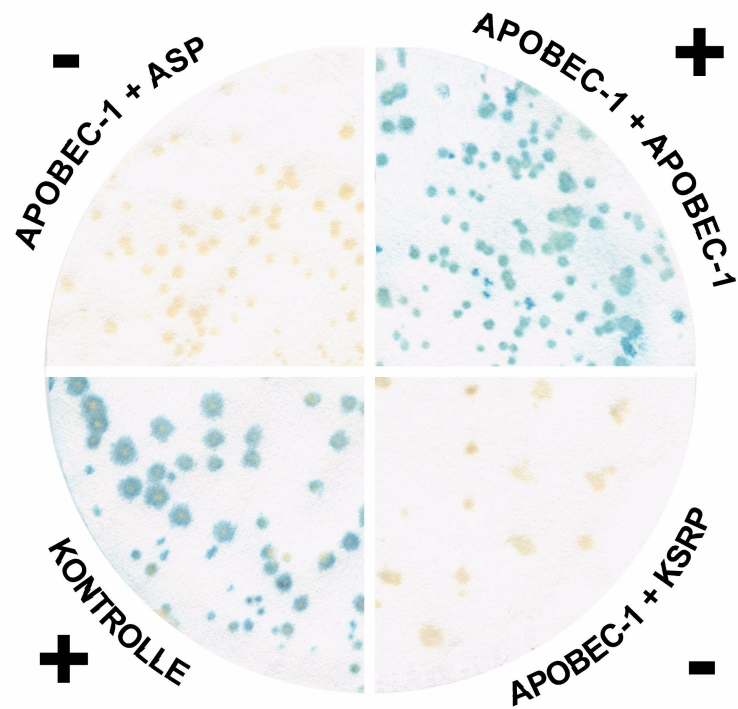


Abbildung 11: Yeast 2 Hybrid Proteininteraktionsanalyse: β -Galaktosidase Assay der auf -trp/-leu-Kulturplatten angezüchteten Hefekolonien. Der Hefestamm Y 181 wurde jeweils mit pAS-Apobec-1 plus pACT-ASP/ pACT-KSRP/ pACT-Apobec-1 oder pGADT7-T plus pGBKT7-p53 (Positivkontrollvektoren) transformiert. Mit '+/-' markierte Filterassays zeigen positives respektive negatives Bindungsergebnis.

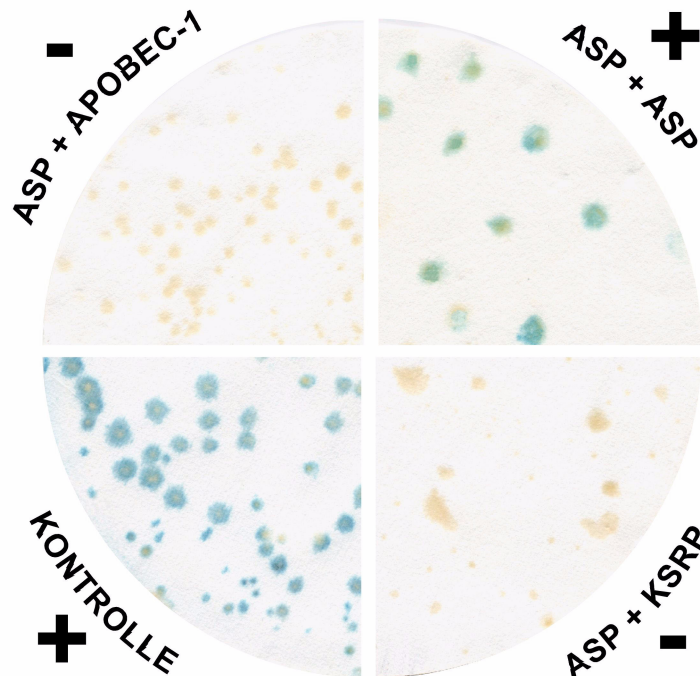


Abbildung 12: Yeast 2 Hybrid Proteininteraktionsanalyse: β -Galaktosidase Assay der auf -trp/-leu-Kulturplatten angezüchteten Hefekolonien. Der Hefestamm Y 181 wurde jeweils mit pAS-ASP plus pACT-ASP/ pACT-KSRP/ pACT-Apobec-1 oder pGADT7-T plus pGBKT7-p53 (Positivkontrollvektoren) transformiert. Mit '+/-' markierte Filterassays zeigen positives respektive negatives Bindungsergebnis.

Transformation der Vektoren in die Hefen nachwies. Im β -Galaktosidase-Assay zeigte sich kein positives Ergebnis, die Proteine interagierten nicht (siehe Abbildung 11, 12).

KSRP bindet nicht an ASP oder Apobec-1

Auch die Transformation der Vektoren pAS-ASP, pAS-Apobec-1 und pACT-KSRP in den Hefestamm Y 187 erwies sich als problemlos, das Wachstum der Hefekolonien war gleichmäßig. Auch nach mehrmaligem Wiederholen der Versuche ließen sich keine Bindungen nachweisen. KSRP geht *in vivo* keine Interaktion mit den Proteinen ASP oder Apobec-1 ein (siehe Abbildung 11,12).

Far Western Analyse

Für die Herstellung eines Blottes mit den GST-Proteinen wurden jeweils 5 μ g der GST-Proteine auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. Parallel dazu wurde ein ebenfalls 10% SDS-Gel mit je 10 μ g GST-Protein beladen, welches später Coomassie-gefärbt wurde. Der Blott wurde mit Ponceau-Lösung (Serva) gefärbt und mit dem Coomassie-Gel verglichen, um die Richtigkeit der Proteingrößen zu bestimmen und den Erfolg des Blottvorganges zu überprüfen.

Im ersten Versuch wurden die *in-vitro* synthetisierten, radioaktiv markierten Proteine eingesetzt, ohne daß im Reaktionsgemisch verbliebene Retikulozytenlysat und das ungebundene (35 S) Methionin zu entfernen. Der

folgende Blott zeigte, daß es nötig war, diese Reste vor der Verwendung der Proteine zu entfernen, da das Lysat und damit auch die Radioaktivität an der Nitrocellulosemembran band und eine etwaige Protein-Protein-Bindung durch den starken Hintergrund nicht mehr sichtbar gemacht werden konnte. So wurde die Proteinlösung über eine pd10-Säule gefiltert und umgepuffert (siehe Material und Methoden).

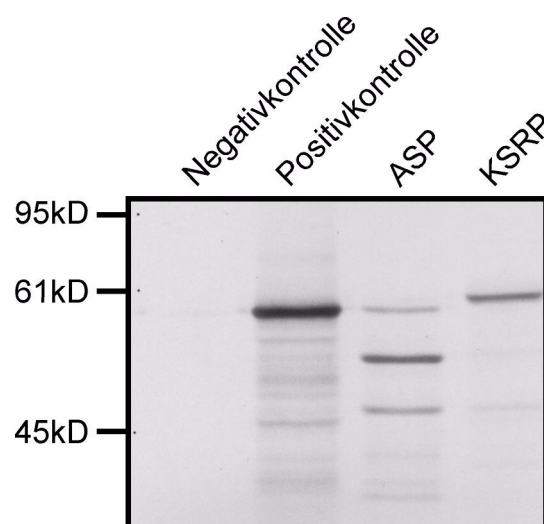


Abbildung 13: Nachweis der *in vitro* transkribierten und translatierten, (35 S) Methionin markierten Proteine ASP und KSRP Jeweils 5 μ l des *in vitro* synthetisierten (mit TNT Quick easy, Promega) mit radioaktiven Schwefel markierten ASP und KSRP, Luciferase als Positivkontrolle, H₂O als Negativkontrolle wurden auf ein 10 % SDS-Gel geladen, das Gel getrocknet und autoradiographiert.

ASP zeigt auch im Far Western Versuch Homodimerbildung

In den folgenden Versuchen zeigte sich eine Bindung auf dem Blott, der mit markiertem ASP hybridisiert wurde, in Höhe des Volle Länge GST-ASP, wobei es interessant zu beobachten war, daß die ASP-ASP-Bindung schon bei einer Menge von 2×10^3 cpm/ml zu erkennen war.

Auf dem mit markiertem KSRP hybridisierten Blott waren keine Bindungen nachzuweisen. Als die Bedingungen weniger stringent gewählt wurden, bei einer Hybridisierungstemperatur von 4°C statt 30°C und der Erhöhung der Konzentration von (^{35}S) Methionin markiertem ASP bzw. KSRP, zeigten sich mehr und mehr unspezifische Bindungen bis hin zu einer Bindung an die Negativkontrolle GST.

Bemerkenswert war die Tatsache, daß die Dimerisierung von ASP nur mit dem Protein in seiner vollen Länge zu sehen war, nicht aber mit einem der GST-ASP Fragmente (siehe Abbildung 14). Der GST-Tag befindet sich am carboxyterminalen Teil des jeweiligen Protein. Die Coomassiefärbung des Sepharosegeles zeigte multiple Fraktionierungen verschiedener

Größen für GST-ASP, wobei es sich hier jeweils um GST mit einem Teil von ASP handelt, da die Sepharose das GST bindet. Bei allen Far-Western Versuchen konnte nur für das GST-ASP in seiner vollen Länge eine Homodimerbildung beobachtet werden.

KSRP zeigt keine Proteininteraktionen

Auch nach mehrfachem Wiederholen des Versuches und unter weniger stringenter Bedingungen ließ sich für KSRP keine Bindungspotenz gegenüber den Proteinen ASP und

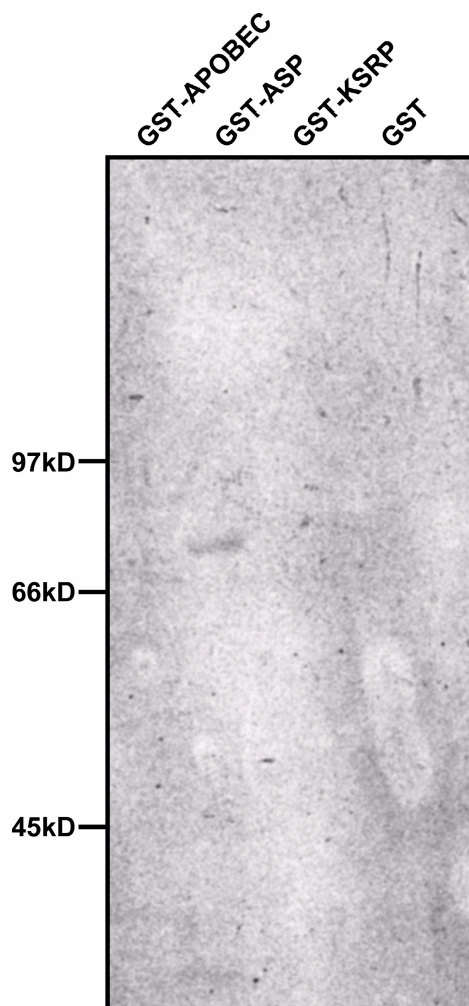


Abbildung 14: Far Western Analyse mit (^{35}S)Methionin markiertem ASP : Autoradiographie des mit GST-Apobec-1, GST-ASP, GST-KSRP und GST geladenem, geblottetem, mit Guanidinium Hydrochlorid de- und renaturiertem, geblocktem und mit (^{35}S) Methionin markiertem ASP hybridisierten 7,5 % SDS-Geles.

Apobec-1 und schließlich auch sich selbst nachweisen (siehe Abbildung 15).

GST-Pulldown

Die GST-Pulldown-Analyse wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Im ersten Versuch zeigten sich Bindungen sowohl mit radioaktivem KSRP als auch mit radioaktivem ASP an alle GST-Proteine, so auch an die Negativkontrolle GST.

Daraufhin wurden die Versuchsbedingungen verändert, wobei sich das Trägermedium, die Gluthationsepharose, die Hybridisierungs- sowie die Waschbedingungen als Stellglieder boten.

Zunächst wurde nur noch die Hälfte der Sepharosemenge verwandt unter der Annahme, daß die Sepharose als Trägersubstanz in zu großer Menge die

radioaktiv markierten Proteine unspezifisch zu binden in der Lage ist. Dann wurde die Blockierungszeit derselben verdoppelt. Diese Veränderungen erwiesen sich als noch nicht ausreichend. Es kam zwar zu einer Verringerung der Bindungssignale, noch immer jedoch banden die radioaktiven Proteine auch an der Negativkontrolle.

Im Folgenden wurden die beiden Hybridisierungsschritte, die der GST-Proteine mit den markierten Proteinen und die der Proteingemische mit der Sepharose, bei Raumtemperatur statt bei 4°C durchgeführt. Obschon das Heraufsetzen der Temperatur, wie schon zuvor erwähnt, bei der Far-Western-Analyse die entscheidende Verringerung der unspezifischen Bindungen erbracht hatte, erwies sie sich in diesem Fall als nicht suffizient genug.

Als nächstes Stellglied wurde der Waschvorgang gewählt. Die Anzahl der Waschschrte wurde verdoppelt, dann wurde die Zusammensetzung des Puffers modifiziert. Es wurde die

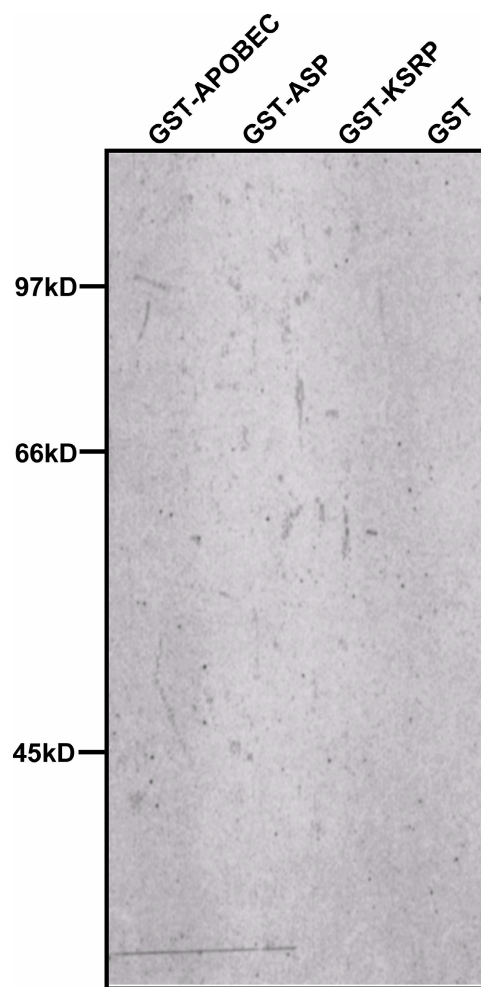


Abbildung 15: Far Western Analyse mit (³⁵S) Methionin markiertem KSRP: Autoradiographie des mit GST-Apobec-1, GST-ASP, GST-KSRP und GST geladenem, geblottetem, mit Guanidinium Hydrochlorid de- und renaturiertem, geblocktem und mit (³⁵S) Methionin markiertem KSRP hybridisierten 7,5 % SDS-Gels.

doppelte Menge Tween (0,2 % statt 0,1 %) und ebenfalls die doppelte Menge $MgCl_2$ (5 mM statt 2,5 mM) zu gesetzt.

ASP bildet Homodimere auch im GST-Pulldown Assay

Die gleichen Bedingungen konnten bei dem Versuch mit ^{35}S -ASP die unspezifischen Bindungen nicht vollständig verhindern. Es zeigte sich jedoch deutlich, daß die stringenteren Waschbedingungen die Bindungen von ASP an alle

GST-Proteine stark reduzierte, bis auf die an GST-ASP. Hier zeigte sich quantitativ eine deutlich höhere Affinität, die sich durch steigende Stringenz immer deutlicher herausarbeiten ließ (siehe Abbildung 16).

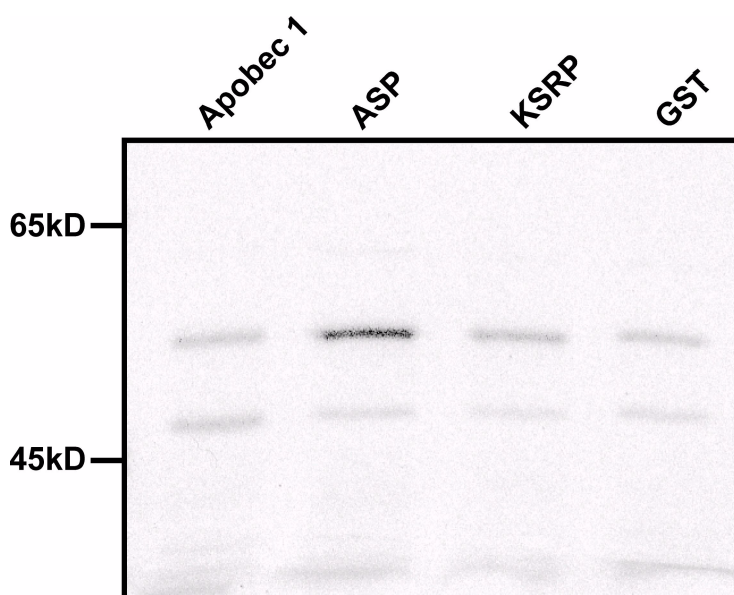


Abbildung 16: GST-Pulldown Analyse mit (^{35}S) markiertem ASP Radioaktiv markiertes ASP wurde mit GST-Apobec-1/ GST-ASP/ GST-KSRP/ GST und Glutathionsepharose hybridisiert, nach mehreren Waschschritten auf ein SDS-Gel aufgetragen und autoradiographiert.

KSRP bindet nicht an KSRP, Apobec-1 und ASP

Nach dieser Reihe von Veränderungen konnten die unspezifischen Bindungen an die Negativkontrolle bei dem Versuch mit radioaktivem KSRP vollständig eliminiert werden. Es zeigte sich auch in diesem Versuchssystem, daß KSRP keine Bindung mit einem der anderen Proteine ASP und Apobec-1 oder mit KSRP selbst einging (siehe Abbildung 17).

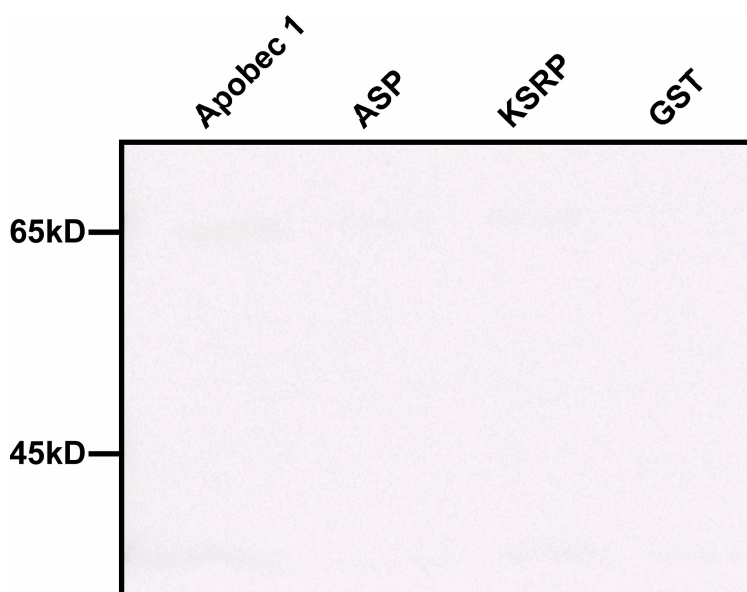


Abbildung 17: GST-Pulldown Analyse mit (^{35}S) markiertem KSRP Radioaktiv markiertes KSRP wurde mit GST-Apobec-1/ GST-ASP/ GST-KSRP/ GST und Glutathionsepharose hybridisiert, nach mehreren Waschschritten auf ein SDS-Gel aufgetragen und autoradiographiert.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß alle drei der durchgeführten Versuche zum Nachweis von Proteininteraktionen in die gleiche Richtung wiesen. Es zeigte sich bei allen drei Versuchen eine starke Dimerisierungspotenz von ASP, die auch durch stringentere Versuchsbedingungen kaum herabzumindern war. Zum anderen konnte gezeigt werden, daß die Proteine ASP, Apobec-1 und KSRP ohne weitere Faktoren nicht aneinander binden, *in vitro* wie *in vivo*. Im Hefesystem wurde außerdem die schon vorher bekannte Dimerisierungspotenz von Apobec-1 rekonstruiert.

Diskussion

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war der Nachweis eventueller Bindungen der am mRNA-Editing beteiligten Proteine Apobec-1, ASP und KSRP. Die Analyse von putativen Proteinbindungen stellt einen weiteren Schritt im Verständnis um das Zusammenspiel der auxiliären Komponenten und damit den Ablauf des Apo B mRNA Editings dar.

Bis dahin war bekannt, daß Apobec-1 alleine nicht in der Lage ist, die Editingreaktion zu katalysieren. Für Apobec-1 und ASP zusammen konnte Editingaktivität nachgewiesen werden. Beide Proteine in Gemeinschaft führten *in vitro* wie *in vivo* zu einer Editierung der ApoB mRNA (Lellek et al., 2002; Chester et al., 2000).

Das Protein KSRP wurde zusammen mit dem Protein ASP aus Rattenleberzellextrakten aufgereinigt. KSRP zeigte *in vitro* keine Erhöhung der Editing Aktivität, ist jedoch möglicherweise ein stabilisierender Faktor der Editingreaktion und somit ein weiteres Mitglied des Editing-Enzym-Komplexes (Lellek et al., 2000). Unsere Arbeitsgruppe konnte *in vivo* in Hefen nachweisen, das KSRP die Editingaktivität in Gegenwart von ASP und Apobec-1 signifikant zu steigern in der Lage ist (Lellek et al., 2002).

Funktionsfähigkeit der Proteine

Zu Beginn der Versuche war es wichtig, alle eventuellen technischen Fehler zu beseitigen beziehungsweise sicherzustellen, daß die *in vitro* wie *in vivo* synthetisierten Proteine in funktionsfähiger Form vorlagen. Auf dem Weg der Proteinsynthese gab es mehrere Schritte, bei denen es zu einem Fehler hätte kommen können. Aus diesem Grund wurden Kontrollen an den jeweiligen Punkten durchgeführt, um einen solchen Fehler zu vermeiden oder frühzeitig aufzudecken.

Der erste zu kontrollierende Schritt lag bei der Klonierung der Protein-DNA in die jeweiligen Vektoren. Hierbei kann es beispielsweise zu einem Frameshift kommen oder die Proteine können nicht *in frame* in die Multiple Cloning Site hinein kloniert werden. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die Konstrukte sequenziert, sowohl die den GST-Proteinen zugrundeliegenden pGex-Vektoren, die pGem-Teasy-Vektoren, die der Synthese der radioaktiv markierten Proteine dienten, wie auch die Hefekonstrukte (pAS-ASP, pAS-Apobec-1, pACT-

ASP, pACT-Apobec-1, pACT-KSRP) (Vektorkarten siehe Abbildungen 6-9 und Sequenzen im Anhang). Hierbei zeigte sich, daß die Proteine korrekt und *in frame* in die Vektoren kloniert wurden.

Ein weiterer Schritt zur Prüfung der Proteine ist ihre Aktivität. In diesem Falle läßt sich die Editingreaktion als Monitor für die Funktionsfähigkeit der Proteine nutzen. So wurden mit den in Bakterien synthetisierten GST-Proteinen Editing-Assays durchgeführt. Hierbei konnte über das resultierende Editing der Apo B mRNA gezeigt werden, dass die Proteine in funktionsfähiger Form vorlagen.

Darüber hinaus ist für Apobec-1 bekannt, dass es in dimerisierter Form vorliegt (Lau et al., 1994). Die Tatsache, dass diese Dimerisierung auch im Rahmen der durchgeführten Versuche beobachtet werden konnte, bestätigte zusätzlich das Vorliegen funktionstüchtiger Proteine. So kam es sowohl bei ASP als auch bei Apobec-1 zu einer Dimerisierungsreaktion, was die Funktionsfähigkeit dieser beiden verwendeten Proteine bestätigte und somit als Positivkontrolle eingesetzt werden konnte.

ASP, Apobec-1 und KSRP Interaktionen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ASP in der Lage ist, Homodimere zu bilden. Zwischen Proteinen ASP, Apobec-1 und KSRP kam es in Rahmen der durchgeführten Versuche zu keiner darstellbaren Bindung.

Für die Proteine Apobec-1, ASP und KSRP konnte in anderen Arbeiten jeweils eine Bindung an die Apo B mRNA nachgewiesen werden. ASP zeigt eine spezifische Bindungsaktivität an die Apo B mRNA im Vergleich zu Apobec-1. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung zwischen ASP und der Apo B mRNA unabhängig von Apobec-1 stattfindet und das Apobec-1 keinen Einfluß auf diese hat (Mehta et al., 2002). Die Tatsache, dass ASP und Apobec-1 zusammen die Editingreaktion katalysieren und für KSRP *in vivo* eine verstärkende Wirkung bei dieser Reaktion postuliert werden konnte und zum anderen eine Bindung aller drei Proteine an die Apo B mRNA nachgewiesen wurde, legt die Vermutung nahe, dass es zur Bindung der Proteine untereinander nur in Gegenwart der mRNA kommt.

Mehta et al. postulierten außer der Funktion als Teil des Editingkomplexes für ASP weitere Funktionen an der Apo B mRNA, beispielsweise in der Prozessierung der RNA (Mehta et al., 2002). Es wurde unter anderem beschrieben, dass ASP die Degradation der mRNA im Zusammenspiel mit Apobec-1 durch NMD (nonsense mediated decay) verhindert. Darüber hinaus verhindert ASP das Hyperediting durch Apobec-1 (Chester et al., 2003).

Weiterhin ist es denkbar, dass die für Apobec-1 beschriebene unspezifische Bindung an die Apo B mRNA durch ASP gefestigt wird und es im Rahmen dessen auch nach einer Konformationsänderung zu einer Bindung oder zumindest zur Interaktion der Proteine untereinander kommt. Des Weiteren wurde beschrieben, dass ASP mit Apobec-1 an die Apo B mRNA gebunden bleibt, dieser Komplex vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert wird, wo die Translation erfolgt (Chester et al., 2003). Im Rahmen dieser Studie wurde außerdem postuliert, dass Apobec-1 ASP als Cargo in den Zellkern dient. Allerdings ist zu bemerken, dass ASP auch im Zellkern nachgewiesen werden konnte, ohne das Vorhandensein von Apobec-1. Diese beschriebenen Erkenntnisse legen die Tatsache nahe, dass ASP, Apobec-1 und die mRNA im Rahmen der gesamten Editingreaktion in enger Relation zueinander vorliegen und die Proteine wichtige Aufgaben an der mRNA besitzen. Es ist daher durchaus denkbar, dass die Proteine erst miteinander interagieren, sobald das 'Reaktionsziel', also die mRNA vorliegt.

Eine mögliche Erklärung für die erst dann stattfindende Bindung von ASP und Apobec-1 und schließlich KSRP ist, daß es zu einer Konformationsänderung eines oder mehrerer der Proteine kommt und somit eine vorübergehende Bindung der Proteine möglich ist.

Eine weitere Tatsache spricht dafür, dass eine Bindung der Proteine ASP und Apobec-1 sowie KSRP nur unter Einwirkung der mRNA zustande kommt. ASP ist weit verbreitet in unterschiedlichen Geweben exprimiert, auch in Abwesenheit von Apobec-1 (Chester et al. 2000). ASP hat demnach noch andere editingunabhängige Aufgaben. Somit ist eine Spezifität der Editingreaktion gewährleistet, wenn eine Proteininteraktion nur in Gegenwart der mRNA erfolgt.

Dimere als Grundlage für Proteinbindung

Eine weitere Vermutung für den Grund, dass eine Bindung von ASP und KSRP und Apobec-1 nicht nachgewiesen wurde, lag in der These, es könne nur zu einer Bindung der Proteine kommen, wenn ASP und Apobec-1 als Dimere vorliegen. Diese Vermutung konnte jedoch durch die *in vivo* Versuche in den Hefezellen widerlegt werden. Hier konnte zum einen die Dimerisierungsfähigkeit der Proteine ASP und Apobec-1 belegt werden. Es kam jedoch auch in diesem *in vivo* System nicht zu einer Bindung der Proteine untereinander. Was jedoch schon zuvor beschrieben wurde ist, dass die kleinste Editingereinheit aus einem 120kD umfassenden Komplex besteht. Es lag die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Komplex um Apobec-1 als Dimer und ASP handeln könnte (Oka et al., 1996). Somit ist zwar im Rahmen der vorliegenden Versuche ausgeschlossen worden, dass eine Dimerisierung zur Interaktion der

Proteine führt, nicht aber, dass die Proteine bei der Editingreaktion unter Umständen als solche vorliegen könnten.

Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen

Gleichzeitig mit der Erstellung dieser Arbeit, untersuchten andere Arbeitsgruppen die Interaktion der am Editing beteiligten Proteine. Mehrere Arbeitsgruppen wiesen eine Interaktion von ACF und Apobec-1 nach. Hierbei liegt natürlich die Frage auf der Hand, weshalb es zu solch divergierenden Beobachtungen kommt. Dazu ist es notwendig, die angewandten Methoden näher zu beleuchten.

Blanc et al. konnten eine Interaktion der Proteine nachweisen, indem sie ASP und Apobec-1 jeweils mit einem myc- beziehungsweise einem flac-Tag in COS-Zellen transfizierten und daraufhin einen Westernblott durchführten unter der Verwendung eines Antikörpers gegen das jeweilige Protein. Bei der zweiten Methode handelte es sich um eine Far Western Analyse mit Apobec-1 und einer Chicken-DNA-library. Bei beiden Methoden kam es zu einer Interaktion der Proteine untereinander (*Blanc et al.*, 2000; *Blanc et al.*, 2001). Interessant dabei ist, daß es bei den Methoden nicht auszuschließen ist, ob eine vorhandene Apo B mRNA die Interaktion eventuell vermittelt, da sowohl in den cos-Zellen wie auch in den Chicken-intestinal-libraries das Vorhandensein von Apo B mRNA möglich ist.

Im Yeast-2-Hybrid System wurde diese Interaktion durch *Chester et al.* und *Blanc et al.* nachgewiesen (*Chester et al.*, 2003; *Blanc et al.*, 2000). Und weiterhin konnte diese Interaktion durch *Mehta et al.* mit *in vitro* synthetisiertem ACF und HA-markiertem Apobec-1 im Westernblott nachgewiesen werden (*Mehta et al.*, 2002).

Warum es zu diesen so unterschiedlichen Ergebnissen kam, ist letztlich unklar. In unseren Versuchen konnte eine solche Interaktion sicher ausgeschlossen werden. Jedoch ist die Beobachtung interessant, dass bei den nachgewiesenen Interaktionen immer das ASP (ASP 64) mit der fehlenden acht Aminosäuren umfassenden Insertion verwandt wurde, die von *Mehta et al.* beschrieben wurde, nicht die Splicevariante von ASP, die von unserer Arbeitsgruppe aufgereinigt wurde ASP (ASP 65). Wie schon in der Einleitung erwähnt, wurde zu dem Zeitpunkt, als von unserer Arbeitsgruppe ASP als weitere Komponente des Editosomes beschrieben wurde, ASP gleichzeitig von *Mehta et al.* beschrieben, wobei es sich um eine Splicevariante desselben Proteines handelte. Bei diesem ASP (64kD) handelt es sich um eine Splicevariante von ASP (65kD), bei der acht Aminosäuren fehlen (siehe Abbildung 14).

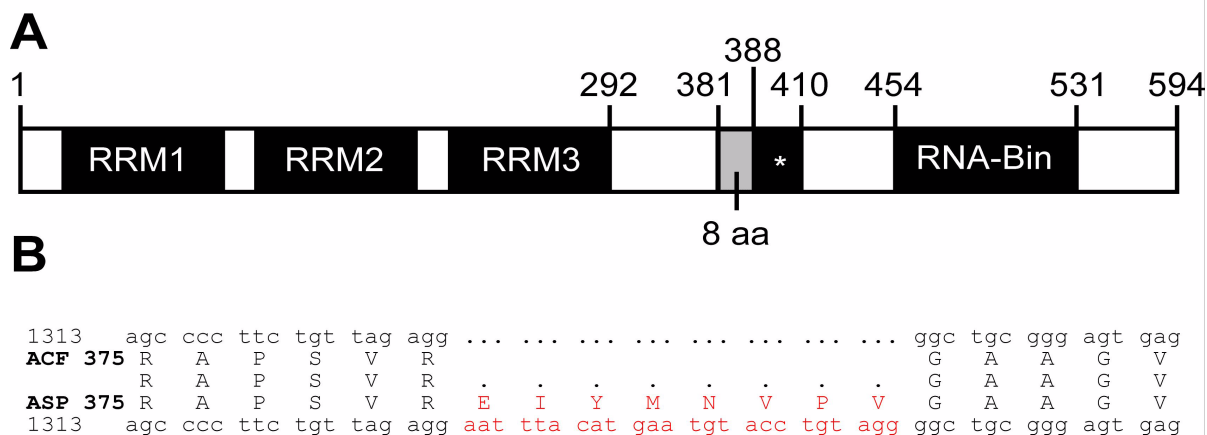


Abbildung 18: Lokalisation des divergenten Bereiches zwischen den Splicevarianten ASP und ACF **A:** Direkt aminoterminal der RG-reichen Region befinden sich die acht zusätzlichen Aminosäuren bei ASP (65kD). Bei der Splicevariante ACF fehlt dieser Bereich. RRM RNA recognition motif, aa Aminosäuren, RNA-Bin RNA-Bindungsdomäne, * RG-reiche Region, Die Positionsangabe erfolgt in Aminosäuren ab dem Startmethionin. **B:** Alignment von ACF und ASP auf Aminosäuren und Nukleotidebene, das die Region mit den divergenten acht Aminosäuren darstellt.

Die beiden Varianten von ASP (ASP 64 und ASP 65) entstehen durch eine alternative Splicing-Acceptor-Site auf dem Exon 12. Zwischen den beiden Varianten besteht funktionell kein Unterschied, sie katalysieren die Editingreaktion an äquivalenten Mengen der Apo B mRNA. ASP jedoch wird im Vergleich zu ACF in einem Verhältnis von 4:1 in Leber und Dünndarm exprimiert (Dance et al., 2002).

Es ist somit nicht klar, was für eine Rolle die Expression der Splicevarianten hat. Es scheint jedoch möglich, daß diese Splicevariabilität im Zusammenhang mit der Editingaktivität (zum Beispiel auf regulatorischer Ebene) steht.

Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß die bisherigen Bindungsstudien zwischen Apobec-1 und der kürzeren Variante von ASP (ASP 64) durchgeführt wurden, nicht jedoch wie in dieser Arbeit mit dem 65kD Protein. Die Abbildung 18 zeigt die Lokalisation der zusätzlichen acht Aminosäuren. Sie befinden sich in der Region zwischen der RRM3 unmittelbar vor der RG-reichen Region.

Es ist denkbar, daß ASP 65 nicht an Apobec-1 bindet, obwohl es sich funktionell von ASP 64 nicht unterscheidet, also gleiche Editingaktivität aufweist. Möglicherweise handelt es sich bei den acht Aminosäuren um einen Teil des Proteins, der eine Bindung verhindert. Dieses stützt wiederum die These, daß es sich bei der direkten Proteininteraktion zwischen ASP 64/ASP 65 und Apobec-1 nicht um eine notwendige Voraussetzung für das Editing handelt.

Diese Vermutung macht es wahrscheinlich, daß die Bindung der Proteine durch die Apo B mRNA vermittelt wird. Unter Umständen hat die Bindung von ACF an Apobec-1 noch eine andere Bedeutung und ist nicht essentiell für die Editingreaktion. Aus diesem Grund wäre es

interessant, das Bindungsverhalten der beiden Splicevarianten von ASP direkt miteinander zu vergleichen, zum Beispiel in einem Versuchsaufbau, wie er in dieser Arbeit vorlag.

Zu bemerken ist, daß in dieser Arbeit drei unterschiedliche Methoden kongruente Ergebnisse bezüglich des Bindungsverhaltens der Proteine erbrachten.

Weiterhin wurde von den anderen Arbeitsgruppen die Dimerisierungsfähigkeit des kürzeren ASP nicht untersucht. Auch gilt es zu beantworten, ob auch ASP 64 genau wie ASP 65 Dimere oder Heterodimere zu bilden in der Lage ist.

Die für die Bindung zwischen ASP 64 und der Apo B mRNA notwendige Region wurde beschrieben als die aminoternale Hälfte des Proteins, die die drei RRM-Regionen umfaßt (Mehta et al., 2002).

Zumindest in murinen Organismen wurden von ASP noch zwei weitere Splicevarianten, ACF 43 und ACF 45, beschrieben (ACF steht für Apobec-1 complementation factor, die Splicevarianten wurden unter diesem Namen beschrieben, daher wird diese Nomenklatur im Folgenden übernommen). Beide Proteine sind strukturell ASP identisch bis auf einen fehlenden Teil am c-terminalen Ende. Diese Varianten scheinen eine Rolle bei der Regulation der Editingreaktion zu spielen. ACF 45 kompetitiert die Bindung von ASP 64 an die Apo B mRNA. ACF 43 zeigt eine starke Bindung an Apobec-1, jedoch kaum an die Apo B mRNA. Diese Beobachtungen lassen die Vorstellung zu, dass ihr Vorhandensein eine regulative Funktion auf das Stattfinden des Apo B mRNA-Editings hat (Sowden et al., 2003).

ASP liegt in verschiedenen Splicevarianten vor, jede zeigt ein etwas unterschiedliches Bindungs- und Editingverhalten. So könnte auch ASP eine etwas andere Funktion als ASP 64 haben.

Andere Komponenten sind nötig zur Vermittlung der Proteinbindung

Eine Hypothese könnte sein, daß die Proteinbindung von ASP, KSRP und Apobec-1 nur dann zustande kommt, wenn weitere Faktoren vorhanden sind, die in einem *in vitro* System fehlen, in der Zelle, im biologischen Organismus jedoch vorhanden sind. Diese Hypothese kann jedoch widerlegt werden durch die Tatsache, dass Editing sowohl *in vivo*, wie auch *in vitro* rekonstruiert werden konnte (Lellek et al., 2002), wobei auch hier solche Faktoren nicht vorhanden waren.

Es ist nicht sicher auszuschließen, daß die Proteine ASP, KSRP und Apobec-1 *in vivo* im natürlichen Organismus aneinander binden, wenn man davon ausgeht, daß unter Umständen die Tertiärstruktur der Proteine eine Bindung vermittelt. Es ist nicht mit Sicherheit davon auszugehen, daß die Proteine in natürlicher Faltung vorliegen, wenn sie in Hefe exprimiert

werden. Was allerdings gegen diese These spricht ist die Tatsache, daß unsere Arbeitsgruppe ein System in Hefen etablieren konnte, indem es zu Editingaktivität in Gegenwart von ASP, Apobec-1 und der Apo B mRNA kam (Lellek et al., 2002). Wäre also die Bindung der Proteine zur Editingreaktion notwendig und aus diesem Grund in den Hefen nicht möglich, fände kein Editing statt.

ASP Dimerisierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte wiederholt in mehreren voneinander unabhängigen Versuchssystemen gezeigt werden, dass ASP eine Interaktion mit sich selber einzugehen in der Lage ist. Auch konnten in den durchgeführten Versuchen Beobachtungen bezüglich der Art der eingegangenen Bindungen gemacht werden.

ASP bildet allem Anschein nach Dimere unabhängig von der Tertiärstruktur, also von der natürlichen Faltung. Diese Beobachtung resultiert aus der Tatsache, dass es zu einer Bindung *in vitro* auch in denaturierter Form von ASP kommt. Im Far Western Versuch wurde eine Bindung nachgewiesen, unabhängig von der Durchführung eines Renaturierungsschrittes. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Bindung unabhängig von der natürlichen Faltung des Proteins stattfindet.

Auch über die eventuellen Bindungsdomänen lässt sich nach den durchgeführten Versuchen schon eine Aussage machen. So ist die Beobachtung interessant, daß es bei diesen Versuchen nur bei dem Volle-Länge-Protein von 90kD zu einer Dimerisierung kam.

Es gibt dafür zwei mögliche Erklärungen: Entweder liegt die für die Bindung notwendige Region am vom GST-Tag distal gelegenen Ende oder die Bindung wird durch das gesamte Protein vermittelt.

Die Beobachtung, daß der n-terminale Teil von ASP in jedem Fall für die Bindung nötig ist, ist in der Zusammenschau mit der Beobachtung interessant, daß gezeigt wurde, dass auch für die Editingreaktion von ASP diese Region unabdingbar ist (Mehta et al., 2002). In diesem Bereich liegen die drei RNA-Recognition Motivs (RRM).

Es wurde gezeigt, daß die n-terminale Hälfte von ASP für die Editingreaktion und die Interaktion mit Apobec-1 bei dieser Reaktion nötig ist. Genauer konnte gezeigt werden, daß vor allem die RRM2 Region für das Stattfinden eines Editings unbedingt notwendig ist (Blanc et al., 2001) (siehe Abbildung 18).

Es wurde ein Minimalprotein konstruiert, das gerade noch funktionsfähig war, dieses enthielt alle drei RRMs sowie die beiden flankierenden Regionen, zum einen bestehend aus der

präRRM-Region, zum anderen aus der RG-reichen Region carboxyterminal gelegen (auxiliary domain) (Mehta et al., 2002).

Durch die Far-Western Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich somit zeigen, daß der die drei RRM Motive enthaltende n-terminale Teil von ASP nicht nur, wie schon zuvor beschrieben, für die Editingreaktion von entscheidender Bedeutung, sondern daß mindestens dieser auch für die Dimerbildungsfähigkeit von ASP notwendig ist. Mehr noch ist es wahrscheinlich, daß das Protein in seiner ganzen Länge an dieser beteiligt ist.

ASP, Apobec-1 und KSRP binden nur in Gegenwart der Apo B mRNA

Durch die bisher durchgeführten Versuche ist sicher, daß Apobec-1 und ASP in jedem Fall miteinander agieren. Sie stellen die kleinstmögliche Editingereinheit dar. Das wurde *in vitro* (Chester et al., 2000) und im Hefesystem *in vivo* gezeigt (Lellek et al., 2002). Für KSRP konnte eine verstärkende Wirkung der Editingreaktion nachgewiesen werden. Welcher Art diese Interaktion von KSRP ist, ist zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht abschließend geklärt.

In der Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit läßt sich ein weiterer Baustein im Verständnis um die Editingreaktion hinzufügen. Die Proteine, die für das Apo B mRNA Editing nötig sind, sind ohne weitere Komponenten, wie die Apo B mRNA, nicht in der Lage, aneinander zu binden. Die Frage, die sich hierbei stellt ist, ob für die Interaktion der Enzymkomponenten des Apo B mRNA Editingkomplexes eine direkte Bindung der Proteine erfolgt. Durchaus möglich ist ebenso, daß die Proteine funktionell, jedoch nicht biochemisch interagieren.

Des weiteren ist es ebenso möglich, daß für eine direkte Bindung die mRNA nötig ist. Da für alle drei Proteine nachgewiesen wurde, daß sie an die Apo B mRNA binden, ist gesichert, dass für die Bindung an die mRNA keine Bindung der Proteine ASP, KSRP und Apobec-1 notwendig ist. So ist es durchaus vorstellbar, daß die Proteine erst durch die Anwesenheit der Apo B mRNA untereinander zu binden in der Lage sind.

Ausblick

Das Apo B mRNA Editing ist von großer Bedeutung bei der Genese der Atherosklerose. Um therapeutischen Nutzen aus dem Verständnis um diesen Vorgang ziehen zu können ist nötig,

ihn vollständig zu beleuchten. Der Editingkomplex ist ein wichtiger Bestandteil dieses Vorganges und ist somit weiter zu analysieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die am Editing beteiligten Proteine keine Proteininteraktion miteinander eingehen. Nun steht die Annahme im Raum, daß die Proteine in Gegenwart der Apo B mRNA aneinander binden. Es ist als nächster Schritt sicher interessant, einen Heferversuch zu etablieren, in dem die Proteine einzeln und zusammen auf eine Bindung in Gegenwart der Apo B mRNA untersucht werden können. Dazu könnte ein Tri-Hybrid-System verwendet werden.

ASP ist ein Protein, das offensichtlich über Dimerisierungsaktivität verfügt. Eine weitere Fragestellung ist das Analysieren der für die Dimerisierung von ASP und eventuell von Apobec-1 notwendigen Proteinbereiche. Dazu müßten trunkierte ASP/Apobec-1 Teile hergestellt werden und diese erneut Bindungsstudien zugrundegelegt werden. Interessant ist vor allem die Frage, ist ASP in seiner ganzen Länge nötig für diese Dimerisierung oder handelt es sich nur um den n-terminal gelegenen Teil. Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß die Bindung ASP-ASP nur bei dem Vorliegen des gesamten Proteins erfolgt, doch ist nicht klar, ob unter Umständen nur der n-terminale Teil benötigt wird. Dieses könnte in weiteren Bindungsstudien untersucht werden. Hierbei müßte allerdings ein anderes Tag als GST verwendet werden, um auch Trunkierungen herstellen zu können, bei denen Stück für Stück Teile von carboxyterminal her fehlen.

Apobec-1 wurde ebenfalls als Protein beschrieben, das als Homodimer vorliegt. Diese Dimerisierung ist nicht abhängig von Glykolyisierung oder vermittelt durch Disulfidbrückenbildung (Lau et al., 1994). Bindungsstudien dieser Art könnte ebenfalls für ASP durchgeführt werden, um die Dimerisierungsstruktur dieses Proteins genauer zu beleuchten.

Außerdem konnte in dieser Arbeit eine Bindungsfähigkeit von ASP an sich selbst gezeigt werden. Es ist jedoch nicht mit abschließender Sicherheit davon auszugehen, dass ASP tatsächlich nur Homodimere bildet und nicht Multimere. Es ist durchaus interessant, dieser Frage im weiteren, beispielsweise mit Hilfe eines Gel-Shift-Assays, auf den Grund zu gehen.

Wie schon oben erwähnt, wurde durch andere Arbeitsgruppen eine Interaktion zwischen ASP, genauer dem ASP mit der fehlenden acht Aminosäuren umfassenden Insertion, und Apobec-1 nachgewiesen. Es ist nicht sicher auszuschließen, daß die beiden Splicevarianten von ASP (ASP 64 und ASP 65) in ihrem Bindungsverhalten Unterschiede aufweisen. Daher sollten diese beiden Splicevarianten nochmals direkt miteinander verglichen werden, unter gleichen Versuchsbedingungen.

Unabhängig vom Bindungsverhalten der am Editing beteiligten Proteine, ist weiterhin interessant zu untersuchen, welche biologische Bedeutung die verschiedenen Splicevarianten von ASP haben (Sowden et al., 2003). Wie oben beschrieben, wurden für die verkürzten Varianten unterschiedliches Verhalten bezüglich der Bindung an die Apo B mRNA, an Apobec-1 und die Katalyse der Editingreaktion beschrieben. Die biologische Funktion im System des Editings ist noch nicht klar, es ist jedoch wahrscheinlich, dass es sich um regulatorische Aufgaben handelt.

Insgesamt zeigt sich, daß in den letzten Jahren große Fortschritte im Verständnis um die Editingreaktion gemacht wurden. Es gilt jedoch weiterhin, viele offene Fragen zu beantworten.

Zusammenfassung

Atherosklerose ist die vorherrschende Todesursache der industrialisierten Welt. Die Hypercholesterinämie, genauer ein hoher LDL-Spiegel, ist ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Atherosklerose.

Das Apolipoprotein Apo B 100 ist ein Bestandteil des atherogenen Lipoproteins LDL. Apo B 100 und das in HDL enthaltene Apo B 48 sind Produkte des selben Genes. Die Entscheidung für das eine oder das andere Apolipoprotein wird auf der Ebene der mRNA gefällt. Diesen Vorgang bezeichnet man als ApoB mRNA Editing.

Das mRNA Editing ist ein Regulationssystem auf Genebene, durch das die Genexpression durch posttranskriptionellen Nukleotidaustausch im Bereich der kodierenden Regionen verändert wird. Bei der Editingreaktion findet eine spezifische Deaminierung statt, wodurch ein C zu einem U editiert wird. Hierbei entsteht ein Stopkodon.

Infolgedessen wird das trunkierte ApoB 48 statt ApoB100 synthetisiert. Apo B mRNA Editing findet beim Menschen extensiv im Dünndarm statt, nicht jedoch in der Leber, wo in der Folge VLDL als Vorläufer des atherogenen LDL gebildet wird. In anderen Spezies wie Hund, Pferd, Maus und Ratte findet Apo B mRNA Editing auch in der Leber statt. In der Konsequenz verfügen diese Spezies über einen sehr niedrigen LDL-Spiegel und haben ein geringeres Atheroskleroserisiko.

Die Apo B mRNA Editingreaktion wird durch das Editingenzym katalysiert. Die kleinste Editingeinheit besteht aus Apobec-1 und ASP. Weitere Komponenten, die die Editingreaktion beeinflussen, wurden beschrieben, unter anderem KSRP, das in vivo die Effizienz der Editingreaktion steigert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob es im Rahmen der Editingreaktion zu einer Bindung der Proteine ASP, Apobec-1 und KSRP kommt.

Für ASP und Apobec-1 und KSRP konnte ohne weitere Komponenten keine Bindung gezeigt werden.

Aufgrund dieser Arbeit lässt sich der Vorgang des Apo B mRNA Editings ein Stück weiter beleuchten. Die am Editing beteiligten Proteine ASP und Apobec-1 gehen am ehesten eine Bindung unter Mitwirkung der mRNA ein. Hierbei ist es möglich, dass die Proteine durch die Interaktion mit der Apo B mRNA eine Konformationsänderung durchlaufen und es in Folge

dessen zu einer Bindung oder - im geringst möglichen Fall - zumindest zu einer funktionellen Interaktion kommt. Die Interaktion der Proteine ASP, KSRP und Apobec-1 ist somit wohl an das Vorhandensein der Apo B mRNA gebunden.

Die von anderen Arbeitsgruppen beschriebene Bindung zwischen ACF und Apobec-1 kann unter Berücksichtigung der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht bestätigt werden.

ASP ist in der Lage, an sich selber zu binden, also Dimere zu bilden. Diese Fähigkeit wurde interessanterweise schon zuvor für Apobec-1 beschrieben. Apobec-1 scheint auch bei der Editingreaktion als Dimer vorzuliegen. Die Dimerisierungsaktivität konnte in dieser Arbeit ebenfalls rekonstruiert werden.

Die Dimerisierung von ASP wurde nur bei dem Protein in voller Länge beobachtet. Es ist somit wahrscheinlich, daß an dieser Interaktion das gesamte Protein beteiligt ist oder der n-terminale Teil.

Literaturverzeichnis

- Alfonzo, J. D., Thiemann, O., and Simpson, L. (1997). The mechanism of U insertion/deletion RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *Nucleic Acids Res* 25, 3751-3759.
- Anant, S., and Davidson, N. O. (2000). An AU-rich sequence element (UUUN[A/U]U) downstream of the edited C in apolipoprotein B mRNA is a high-affinity binding site for Apobec-1: binding of Apobec-1 to this motif in the 3' untranslated region of c-myc increases mRNA stability. *Mol Cell Biol* 20, 1982-1992.
- Anant, S., and Davidson, N. O. (2001). Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing. *Curr Opin Lipidol* 12, 159-165.
- Anant, S., MacGinnitie, A. J., and Davidson, N. O. (1995a). apobec-1, the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme, is a novel RNA-binding protein. *J Biol Chem* 270, 14762-14767.
- Anant, S., MacGinnitie, A. J., and Davidson, N. O. (1995b). The binding of apobec-1 to mammalian apo B RNA is stabilized by the presence of complementation factors which are required for post-transcriptional editing. *Nucleic Acids Symp Ser* 33, 99-102.
- Backus, J. W., and Smith, H. C. (1991). Apolipoprotein B mRNA sequences 3' of the editing site are necessary and sufficient for editing and editosome assembly. *Nucleic Acids Res* 19, 6781-6786.
- Backus, J. W., and Smith, H. C. (1992). Three distinct RNA sequence elements are required for efficient apolipoprotein B (apoB) RNA editing in vitro. *Nucleic Acids Res* 20, 6007-6014.
- Benne, R. (1996). RNA editing: how a message is changed. *Curr Opin Genet Dev* 6, 221-231.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H., and Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46, 819-826.
- Blanc, V., Henderson, J. O., Kennedy, S., and Davidson, N. O. (2001a). Mutagenesis of apobec-1 complementation factor reveals distinct domains that modulate RNA binding, protein-protein interaction with apobec-1, and complementation of C to U RNA-editing activity. *J Biol Chem* 276, 46386-46393.
- Blanc, V., Navaratnam, N., Henderson, J. O., Anant, S., Kennedy, S., Jarmuz, A., Scott, J., and Davidson, N. O. (2001b). Identification of GRY-RBP as an apolipoprotein B RNA-binding protein that interacts with both apobec-1 and apobec-1 complementation factor to modulate C to U editing. *J Biol Chem* 276, 10272-10283.
- Boren, J., White, A., Wettsten, M., Scott, J., Graham, L., and Olofsson, S. O. (1991). The molecular mechanism for the assembly and secretion of ApoB-100-containing lipoproteins. *Prog Lipid Res* 30, 205-218.
- Burd, C. G., and Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621.

- Chen, S. H., Habib, G., Yang, C. Y., Gu, Z. W., Lee, B. R., Weng, S. A., Silberman, S. R., Cai, S. J., Deslypere, J. P., Rosseneu, M., and et al. (1987). Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 238, 363-366.
- Chester, A., Scott, J., Anant, S., and Navaratnam, N. (2000). RNA editing: cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1494, 1-13.
- Chester, A., Somasekaram, A., Tzimina, M., Jarmuz, A., Gisbourne, J., O'Keefe, R., Scott, J., and Navaratnam, N. (2003). The apolipoprotein B mRNA editing complex performs a multifunctional cycle and suppresses nonsense-mediated decay. *Embo J* 22, 3971-3982.
- Dance, G. S., Sowden, M. P., Cartegni, L., Cooper, E., Krainer, A. R., and Smith, H. C. (2002). Two proteins essential for apolipoprotein B mRNA editing are expressed from a single gene through alternative splicing. *J Biol Chem* 277, 12703-12709.
- Davies, M. S., Wallis, S. C., Driscoll, D. M., Wynne, J. K., Williams, G. W., Powell, L. M., and Scott, J. (1989). Sequence requirements for apolipoprotein B RNA editing in transfected rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 264, 13395-13398.
- Driscoll, D. M., and Casanova, E. (1990). Characterization of the apolipoprotein B mRNA editing activity in enterocyte extracts. *J Biol Chem* 265, 21401-21403.
- Driscoll, D. M., Lakhe-Reddy, S., Oleksa, L. M., and Martinez, D. (1993). Induction of RNA editing at heterologous sites by sequences in apolipoprotein B mRNA. *Mol Cell Biol* 13, 7288-7294.
- Driscoll, D. M., and Zhang, Q. (1994). Expression and characterization of p27, the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme. *J Biol Chem* 269, 19843-19847.
- Gerber, A. P., and Keller, W. (1999). An adenosine deaminase that generates inosine at the wobble position of tRNAs. *Science* 286, 1146-1149.
- Ginsberg, H. N., Goldberg, I. J. (1999). Erkrankungen des Lipoproteinstoffwechsels. In: *Harrisons Innere Medizin*, 14. edn, McGraw-Hill, Seite 2517-2529
- Greeve, J., Altkemper, I., Dieterich, J. H., Greten, H., and Windler, E. (1993). Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 34, 1367-1383.
- Greeve, J., Axelos, D., Welker, S., Schipper, M., and Greten, H. (1998a). Distinct promoters induce APOBEC-1 expression in rat liver and intestine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1079-1092.
- Greeve, J., Lellek, H., Apostel, F., Hundoegeger, K., Barialai, A., Kirsten, R., Welker, S., and Greten, H. (1999). Absence of APOBEC-1 mediated mRNA editing in human carcinomas. *Oncogene* 18, 6357-6366.
- Greeve, J., Lellek, H., Rautenberg, P., and Greten, H. (1998b). Inhibition of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme-complex by hnRNP C1 protein and 40S hnRNP complexes. *Biol Chem* 379, 1063-1073.
- Hersberger, M., and Innerarity, T. L. (1998). Two efficiency elements flanking the editing site of cytidine 6666 in the apolipoprotein B mRNA support mooring-dependent editing. *J Biol Chem* 273, 9435-9442.
- Hughes, S. D., Rouy, D., Navaratnam, N., Scott, J., and Rubin, E. M. (1996). Gene transfer of cytidine deaminase apoBEC-1 lowers lipoprotein(a) in transgenic mice and induces apolipoprotein B editing in rabbits. *Hum Gene Ther* 7, 39-49.
- Ince, T. A., and Scotto, K. W. (1995). A conserved downstream element defines a new class of RNA polymerase II promoters. *J Biol Chem* 270, 30249-30252.

- Innerarity, T. L., Boren, J., Yamanaka, S., and Olofsson, S. O. (1996). Biosynthesis of apolipoprotein B48-containing lipoproteins. Regulation by novel post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 271, 2353-2356.
- Jackle, S., Rinninger, F., Greeve, J., Greten, H., and Windler, E. (1992). Regulation of the hepatic removal of chylomicron remnants and beta-very low density lipoproteins in the rat. *J Lipid Res* 33, 419-429.
- Johnson, D. F., Poksay, K. S., and Innerarity, T. L. (1993). The mechanism for apo-B mRNA editing is deamination. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 1204-1210.
- Knott, T. J., Wallis, S. C., Powell, L. M., Pease, R. J., Lusic, A. J., Blackhart, B., McCarthy, B. J., Mahley, R. W., Levy-Wilson, B., and Scott, J. (1986). Complete cDNA and derived protein sequence of human apolipoprotein B-100. *Nucleic Acids Res* 14, 7501-7503.
- Kohtz, J. D., Jamison, S. F., Will, C. L., Zuo, P., Luhrmann, R., Garcia-Blanco, M. A., and Manley, J. L. (1994). Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* 368, 119-124.
- Lau, P. P., Villanueva, H., Kobayashi, K., Nakamuta, M., Chang, B. H., and Chan, L. (2001). A DnaJ protein, apobec-1-binding protein-2, modulates apolipoprotein B mRNA editing. *J Biol Chem* 276, 46445-46452.
- Lau, P. P., Zhu, H. J., Baldini, A., Charnsangavej, C., and Chan, L. (1994). Dimeric structure of a human apolipoprotein B mRNA editing protein and cloning and chromosomal localization of its gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8522-8526.
- Lellek, H., Kirsten, R., Diehl, I., Apostel, F., Buck, F., and Greeve, J. (2000). Purification and molecular cloning of a novel essential component of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme-complex. *J Biol Chem* 275, 19848-19856.
- Lellek, H., Welker, S., Diehl, I., Kirsten, R., and Greeve, J. (2002). Reconstitution of mRNA Editing in Yeast Using a Gal4-ApoB-Gal80 Fusion Transcript as the Selectable Marker. *J Biol Chem* 277, 23638-23644.
- Linton, M. F., Farese, R. V., Jr., and Young, S. G. (1993). Familial hypobetalipoproteinemia. *J Lipid Res* 34, 521-541.
- Maas, S., Melcher, T., and Seeburg, P. H. (1997). Mammalian RNA-dependent deaminases and edited mRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 9, 343-349.
- Mehta, A., and Driscoll, D. M. (2002). Identification of domains in apobec-1 complementation factor required for RNA binding and apolipoprotein-B mRNA editing. *Rna* 8, 69-82.
- Mehta, A., Kinter, M. T., Sherman, N. E., and Driscoll, D. M. (2000). Molecular cloning of apobec-1 complementation factor, a novel RNA-binding protein involved in the editing of apolipoprotein B mRNA. *Mol Cell Biol* 20, 1846-1854.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274, 18470-18476.
- Navaratnam, N., Bhattacharya, S., Fujino, T., Patel, D., Jarmuz, A. L., and Scott, J. (1995). Evolutionary origins of apoB mRNA editing: catalysis by a cytidine deaminase that has acquired a novel RNA-binding motif at its active site. *Cell* 81, 187-195.
- Navaratnam, N., Shah, R., Patel, D., Fay, V., and Scott, J. (1993). Apolipoprotein B mRNA editing is associated with UV crosslinking of proteins to the editing site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 222-226.
- Oka, K., Kobayashi, K., Sullivan, M., Martinez, J., Teng, B. B., Ishimura-Oka, K., and Chan, L. (1997). Tissue-specific inhibition of apolipoprotein B mRNA editing in

- the liver by adenovirus-mediated transfer of a dominant negative mutant APOBEC-1 leads to increased low density lipoprotein in mice. *J Biol Chem* 272, 1456-1460.
- Scott, J. (1995). A place in the world for RNA editing. *Cell* 81, 833-836.
- Shah, R. R., Knott, T. J., Legros, J. E., Navaratnam, N., Greeve, J. C., and Scott, J. (1991). Sequence requirements for the editing of apolipoprotein B mRNA. *J Biol Chem* 266, 16301-16304.
- Simpson, L., and Emeson, R. B. (1996). RNA editing. *Annu Rev Neurosci* 19, 27-52.
- Smith, H. C., and Sowden, M. P. (1996). Base-modification mRNA editing through deamination--the good, the bad and the unregulated. *Trends Genet* 12, 418-424.
- Sowden, M. P., Lehmann, D. M., Lin, X., Smith, C. O., and Smith, H. C. (2004). Identification of novel alternative splice variants of APOBEC-1 complementation factor with different capacities to support apolipoprotein B mRNA editing. *J Biol Chem* 279, 197-206.
- Teng, B., Burant, C. F., and Davidson, N. O. (1993). Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* 260, 1816-1819.
- Teng, B., and Davidson, N. O. (1992). Evolution of intestinal apolipoprotein B mRNA editing. Chicken apolipoprotein B mRNA is not edited, but chicken enterocytes contain in vitro editing enhancement factor(s). *J Biol Chem* 267, 21265-21272.
- Yamanaka, S., Balestra, M. E., Ferrell, L. D., Fan, J., Arnold, K. S., Taylor, S., Taylor, J. M., and Innerarity, T. L. (1995). Apolipoprotein B mRNA-editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8483-8487.
- Yamanaka, S., Poksay, K. S., Arnold, K. S., and Innerarity, T. L. (1997). A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme. *Genes Dev* 11, 321-333.
- Yamanaka, S., Poksay, K. S., Balestra, M. E., Zeng, G. Q., and Innerarity, T. L. (1994). Cloning and mutagenesis of the rabbit ApoB mRNA editing protein. A zinc motif is essential for catalytic activity, and noncatalytic auxiliary factor(s) of the editing complex are widely distributed. *J Biol Chem* 269, 21725-21734.
- Yang, Y., Ballatori, N., and Smith, H. C. (2002). Apolipoprotein B mRNA editing and the reduction in synthesis and secretion of the atherogenic risk factor, apolipoprotein B100 can be effectively targeted through TAT-mediated protein transduction. *Mol Pharmacol* 61, 269-276.
- Yang, Y., and Smith, H. C. (1997). Multiple protein domains determine the cell type-specific nuclear distribution of the catalytic subunit required for apolipoprotein B mRNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13075-13080.
- Young, S. G., Bertics, S. J., Curtiss, L. K., Dubois, B. W., and Witztum, J. L. (1987). Genetic analysis of a kindred with familial hypobetalipoproteinemia. Evidence for two separate gene defects: one associated with an abnormal apolipoprotein B species, apolipoprotein B-37; and a second associated with low plasma concentrations of apolipoprotein B-100. *J Clin Invest* 79, 1842-1851.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACF	Apobec-1-complementation factor
ADAR	adenosine deaminase that acts on RNA
AID	action induced deaminase
Apo B	Apolipoprotein B
AS	Aminosäure
ASP	Apobec-1 stimulating protein
CRS	cytoplasmatic retention signal
DNA	desoxyribonucleic acid
dsRBD	doublestranded RNA binding domain
HDL	high density lipoprotein
hnRNP	heterogenous nuclear ribonuclear binding protein
IDL	intermediate density lipoprotein
KSRP	K homology-type splicing regulatory protein
LDL	low density lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein a
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAT-1	novel Apobec-1 target 1
NES	nuclear export signal
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NLS	nuclear localisation signal
NMD	nonsense mediated decay
RNA	ribonucleic acid
RRM	RNA recognition motif
VLDL	very low density lipoprotein
Y-2-H	Yeast 2 Hybrid

Sequenzen

mRNA ACF Variante 1 mit unterstrichenem kodierendem Strang
Accession Number: NM_014576

```

1 tttgatatga cgattagagc ataacccgag tgacacggtg aattcgccat aatcaaggaa
61 accttttccg ggtggggatc tctgaaatta ctcagataac agtgctgtgc caaaaacctg
121 tggatthtct ctacaaaaat tattgagcaa ccctaattaa cctgattttt tgctgataat
181 cactctcaat ggaatcaaat cacaaatccg gggatggatt gagcggcact cagaaggaag
241 cagccctccg cgcactggtc cagcgcacag gatatagctt ggtccaggaa aatggacaaa
301 gaaaatatgg tggccctcca cctggttggg atgctgcacc ccctgaaagg ggctgtgaaa
361 tttttattgg aaaacttccc cgagaccttt ttgaggatga gcttatacca ttatgtgaaa
421 aaatcggtaa aatttatgaa atgagaatga tgatggattt taatggcaac aatagaggat
481 atgcatttgt aacattttca aataaagtgg aagccaagaa tgcaatcaag caacttaata
541 attatgaaat tagaaatggg cgctcttag gggtttgtgc cagtgtggac aactgcccag
601 tatttgttgg gggcatccca aaaacaaaa agagagaaga aatcttatcg gagatgaaaa
661 aggttactga aggtgttgtc gatgtcatcg tctaccaag cgctgcagat aaaacaaaa
721 accgaggctt tgccttcgtg gagtatgaga gtcacgagc agctgccatg gcgaggagga
781 aactgctacc aggaagaatt cagttatggg gacatggtat tgcatagac tgggcagagc
841 cagaagtaga agttgatgaa gatacaatgt ctccagtga aatcctatat gtaagaaatc
901 ttatgctgtc tacctctgaa gagatgattg aaaaggaatt caacaatc aaaccagggtg
961 ctgtggagag ggtgaagaaa attcgagact atgcttttgt gcacttcagt aaccgagaag
1021 atgcagttga ggctatgaaa gctttaaatg gcaagggtgt ggatggttcc cccattgaa
1081 tcaccttagc aaaaccagtg gacaaggaca gttatgttag gtataccga ggcacagggtg
1141 gaaggggac catgctgcaa ggagagtata cctactcttt gggccaagtt tatgatccca
1201 ccacaacctc cctgggagct cctgtcttct atgcccccca gacctatgca gcaattccca
1261 gtcttcattt ccagccacc aaaggacac tcagcaacag agccattatc cgagcccctt
1321 ctgttagagg gctgcggga gtgagaggac tgggcggccg tggctatttg gcatacacag
1381 gcctgggtcg aggataccag gtcaaaggag acaaaaagaga agacaaactc tatgacattt
1441 tacctgggat ggagctcacc ccaatgaatc ctgtcacatt aaaaccccaa ggaattaac
1501 tcgctcccca gatattagaa gagatttgtc agaaaaataa ctggggacag ccagtgtacc
1561 agctgcactc tgctattgga caagacaaa gacagctatt ctgttacaaa ataactatct
1621 ctgctctagc cagccagaat cctgcaatcc acccttcc acctccaaag ctgagtgctg
1681 ttgtggatga agcaaaagacg tatgcagccg aatacacctt gcagaccctg ggcattccca
1741 ctgatggagg cgatggcacc atggctactg ctgctgctgc tgctactgct ttcccaggat
1801 atgctgtccc taatgcaact gcacccgtgt ctgcagccca gctcaagcaa gcggtaaccc
1861 ttggacaaga cttagcagca tatacaacct atgaggtcta cccaactttt gcagtgtactg
1921 cccaggggga tggatatggc acctcttgaa gatgcttttt taaatttaag aataagacac
1981 acaaaactct attaaaaaaa aaaaagaat aaacctctaa ctcggtcccc aatgatcata
2041 aataaatatgt ttctaaga aatgcctttc cagagactgt atagcttata ccaattatag
2101 aatcatgaag taaaaaaaaa aaaaaaaa

```

mRNA ACF Variante 2 = ASP mit unterstrichenem kodierendem Strang
Accession Number: NM_138932

```

1 tttgatatga cgattagagc ataacccgag tgacacggtg aattcgccat aatcaaggaa
61 accttttccg ggtggggatc tctgaaatta ctcagataac agtgctgtgc caaaaacctg
121 tggatthtct ctacaaaaat tattgagcaa ccctaattaa cctgattttt tgctgataat
181 cactctcaat ggaatcaaat cacaaatccg gggatggatt gagcggcact cagaaggaag
241 cagccctccg cgcactggtc cagcgcacag gatatagctt ggtccaggaa aatggacaaa
301 gaaaatatgg tggccctcca cctggttggg atgctgcacc ccctgaaagg ggctgtgaaa
361 tttttattgg aaaacttccc cgagaccttt ttgaggatga gcttatacca ttatgtgaaa
421 aaatcggtaa aatttatgaa atgagaatga tgatggattt taatggcaac aatagaggat
481 atgcatttgt aacattttca aataaagtgg aagccaagaa tgcaatcaag caacttaata
541 attatgaaat tagaaatggg cgctcttag gggtttgtgc cagtgtggac aactgcccag
601 tatttgttgg gggcatccca aaaacaaaa agagagaaga aatcttatcg gagatgaaaa

```

661 aggttactga agggtgtgtc gatgtcatcg tctaccaag cgctgcagat aaaacaaaa
 721 accgaggctt tgcttcctg gagtatgaga gtcatcgagc agctgccatg gcgaggagga
 781 aactgctacc aggaagaatt cagttatggg gacatggtat tgcagtagac tggtcagagc
 841 cagaagtaga agttgatgaa gatacaatgt cttcagtga aatcctatat gtaagaatc
 901 ttatgctgtc tacctctgaa gagatgattg aaaaggaatt caacaatatc aaaccagggtg
 961 ctgtggagag ggtgaagaaa attcgcagact atgcttttgt gcacttcagt aaccgagaag
 1021 atgcagttga ggctatgaaa gctttaaagt gcaagggtgt ggatggttcc cccattgaa
 1081 tcaccctagc aaaaccagtg gacaaggaca gttatgttag gtatacccga ggcacaggtg
 1141 gaaggggcac catgctgcaa ggagagtata cctactcttt ggccaagtt tatgatccca
 1201 ccacaaccta ccttggagct cctgtcttct atgccccca gacctatgca gcaattccca
 1261 gtcttcattt cccagccacc aaaggacatc tcagcaacag agccattatc cgagcccctt
 1321 ctgttagaga aattttacatg aatgtacctg taggggctgc gggagtgaga ggactgggag
 1381 gccgtggcta tttggcatac acaggcctgg gtcgcagata ccagggtcaa ggagacaaaa
 1441 gagaagacaa actctatgac attttacctg ggatggagct cacccaatg aatcctgtca
 1501 cattaaaacc ccaaggaatt aaactcgtc cccagatatt agaagagatt tgtcagaaaa
 1561 ataactggg acagccagtg taccagctgc actctgctat tggacaagac caaagacagc
 1621 tattcttcta caaaataact atcctgctc tagccagcca gaatcctgca atccaccctt
 1681 tcacacctcc aaagctgagt gcctttgtgg atgaagcaaa gacgtatgca gccgaataca
 1741 ccctgcagac cctgggcatc cccactgatg gaggcgatgg cacatggct actgctgctg
 1801 ctgctgtac tgctttccca ggatgtgctg tcctaattg aactgcacc gtgctgcag
 1861 ccagctcaa gcaagcggta acccttggac aagacttagc agcatataca acctatgagg
 1921 tctaccaaac ttttgcagtg actgcccag gggatggata tggcaccttc tgaagatgct
 1981 tttttaatt taagaataag acacacaaa ctctattaaa aaaaaaaaag aaataaacct
 2041 ctaactcgt cccgaatgat cataaataat atgtttccta aagaaatgcc tttccagaga
 2101 ctgtatagct tataccaatt atagaatcat gaagtaaaaa aaaaaaaaaa aa

KSRP mRNA mit unterstrichem kodierendem Strang

Accession Number: NM_003685

1 tgtggagcga agccttgttc ccgcgttgag ccgcgcgcgc cgccgcgcgc tcctcagctt
 61 cagctccgc gcaaggccc gccccgcgc gccatgtcgg actacagcac gggaggacc
 121 ccgcccgggc cgccgcgcgc cgccgcgcgg ggcgggggag ccggaggcgc cgggggaggc
 181 cctccgcgcg gcccgcagc cgccggggac cgggggcgcg gcggtccctg cgggcgcgcc
 241 ccggggcggg ggtcggccg ggcccctct cagccaccgc gcccggcgcg cccgggaatc
 301 cgcaaggacg ctttcgccga cgccgtgcag cgggcccgc agattgcagc caaaattgga
 361 ggcgatgctg ccacgacagt gaataacagc actcctgatt ttggttttgg gggcaaaaa
 421 agacagtttg aagatggaga tcaaccggag agcaagaagc tggttccca gggagactca
 481 atcagttctc aacttgacc catccatcct cccccaagga cttcaatgac agaagagtac
 541 aggttcccag acggcatggt ggcctgac attggcagag gaggtgaaca aattaacaaa
 601 atccaacagg attcaggctg caaagtacag atctctccag acagcgttgg cctaccggag
 661 cgcagtgtgt ccttgacagg agccccagaa tctgtccaga aagccaagat gatgctggat
 721 gacattgtgt ctcggggtcg tgggggcccc ccaggacagt tccacgacaa cgccaaccgg
 781 ggccagaacg gcaccgtgca ggagatcatg atccccgcg gcaaggccg cctggtcatt
 841 ggcaagggcg gggagaccat taagcagctg caggaacgcg ctggagtga gatgatctta
 901 attcaggacg gatctcagaa tacgaatgtg gacaaaacct tccgcatcat tggggatcct
 961 tacaaagtgc agcaagcctg tgagatggtg atggacatcc tccgggaacg tgaccaaggc
 1021 ggctttgggg accggaatga gtacggatct cggattggcg gaggcatcga tgtgccagtg
 1081 cccaggcatt ctgttggcgt ggtcattggc cggagtggag agatgatcaa gaagatccag
 1141 aatgatgctg gctgcccgat acagttcaag caagatgacg ggcagggccc cgagaagatt
 1201 gtcatataaa tggggcccc agacaggtgc gagcacgcag cccggatcat caacgacctc
 1261 ctccagagcc tcaggagtgg tccccaggt cctccagggg gtccagggat gccccggggg
 1321 ggccgaggcc gaggaagagg caaggcaat tggggcccc ctggcgggga gatgaccttc
 1381 tccatcccca ctcacaagtg tgggctggtc atcggccgag gtggcgagaa tgtgaaagcc
 1441 ataaaccagc agacgggagc cttcgtagag atctcccggc agctgccacc caacggggac
 1501 cccaacttca agttgttcat catccggggt tcaccccagc agattgacca cgccaagcag
 1561 cttatcgagg aaaagatcga gggtcctctc tgcccagttg gaccagggcc agtgggccca
 1621 ggcctgctg gcccattggg gcccttcaat cctgggccc tcaaccaggg gccaccgggg
 1681 gctccccac atgcccgggg gccccctct caccagtacc caccccaggg ctggggcaat
 1741 acctaccccc agtggcagcc gctgtcctct catgacccaa gcaaagcagc tgacgcccgc
 1801 gcccagccca acgcccgcgtg ggcccctac tactcaact actaccagca gccccggggc
 1861 ccgctccccg gccccgcacc ggcccctgcg gccccaccg ctcagggtga gccccctcag
 1921 ccccaccaca ccggccagtc ggactacact aaggcctggg aagagtatta caaaaagatc
 1981 ggccagcagc cccagcagcc cggagcggcc ccacagcagg actacacgaa ggcttggggag
 2041 gagtactaca agaagcaagc gcaagtggcc accggagggg gtccagggagc tccccagggc
 2101 tcccagccag actacagtg cgccctggcg gaatattaca gacagcaggg cgcttactac
 2161 ggacagacc caggtcctgg cgccccagc ccgcccacca cgagcagggg acagcagcag
 2221 gctcaatgaa tcgaatgaat gtgaacttct tcatctgtga aaaatctttt tttttccat
 2281 tttgttctgt ttggggcctt ctgttttgtt tggcgagaga gcgatggtgc cggtggggagt
 2341 actggggagc cctcgcggca agcaggggtg gggggacttg ggggcatgcc gggcccctac

```

2401 tctctgcct gttctgtgtc tcacatgctt tttctttcaa aattgggac cttccatggt
2461 gagccagcca gagaagatag cgagatctaa atctctgcca aaaaaaaaaa aaacttaaaa
2521 attaaaaaca caaagagcaa agcagaactt ataaaattat atatatatat attaaaaagt
2581 ctctattctt cccccccag ctttctgaa cctgcctctc tgaggataaa gcaattcatt
2641 ttctcccacc ctgggcccctc ttgtttttaa aataaacttt taaaaaggaa aaaaaaaagt
2701 cactcttgct atttcttttt tttagttaga ggtggaacat tccttggacc aggtgttgta
2761 ttgcaggacc ctttccccca gcagccaagc cccctcttct ctccctccc ccttgggtca
2821 gctcccgcgg cccgcgccgt cccccctccc aggactggtc tgttgccttt tcatctgttc
2881 aagaggagat tgaactgaa aacaaaatga gaacaacaaa aaaaattgta tggcagtttt
2941 tactttttat cgctcgtttt taacttcaca aataaatgat acaaaaacct caaaaaaaaa
3001 aaaaaaaaa

```

Apobec-1 mRNA mit unterstrichenem kodierendem Strang
Accession Number: NM_001644

```

1 gatcccagag gaggaagtcc agagacagag caccatgact tctgagaaag gtccttcaac
61 cggtgacccc actctgagga gaagaatcga accctgggag tttgacgtct tctatgaccc
121 cagagaactt cgtaaagagg cctgtctgct ctacgaaatc aagtggggca tgagccggaa
181 gatctggcga agctcaggca aaaacaccac caatcacgtg gaagttaatt ttataaaaaa
241 atttacgtca gaaagagatt ttcaccatc catcagctgc tccatcacct gtttctgtc
301 ctggagtccc tgctgggaat gctcccaggc tattagagag tttctgagtc ggcaccctgg
361 tgtgacteta gtgatctacg tagctcggct tttttggcac atggatcaac aaaatcggca
421 aggtctcagg gaccttgta acagtggagt aactattcag attatgagag catcagagta
481 ttatcactgc tggaggaatt ttgtcaacta cccacctggg gatgaagctc actggccaca
541 ataccacact ctgtggatga tgttgtacgc actggagctg cactgcataa ttctaagctc
601 tccaccctgt ttaaagattt caagaagatg gcaaaatcat cttacatttt tcagacttca
661 tcttcaaac tgccattacc aaacgattcc gccacacatc cttttagcta cagggctgat
721 acatccttct gtggcttggga gatgaatagg atgattccgt gtgtgtactg attcaagaac
781 aagcaatgat gaccactaa agagtgaatg ccatttagaa tctagaatg ttcacaaggt
841 acccaaac tctgtagctt aaaccaacaa taaatatgta ttacctctgg c

```

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Katharina Herberger
Geburtsdatum und -ort: 18. April 1978 in Schwäbisch-Hall
Eltern: Dieter Ludwig Herberger und Gerhild Herberger, geb. Mahns
Anschrift: Hoheluftchaussee 151
20251 Hamburg
E-mail: katharina-herberger@gmx.de

Schulbildung

1984 – 1985 Grundschule Gerabronn, Baden-Württemberg
1985 – 1988 Grundschule Lütjenmoor, Norderstedt, Schleswig-Holstein
1988 – 1997 Copernicus-Gymnasium, Norderstedt, Schleswig-Holstein
Allgemeine Hochschulreife (Note 1,8)

Studium

1997 Beginn des Humanmedizinstudiums in Hamburg (Herbst '97)
1999 Ärztliche Vorprüfung (Herbst '99)
2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Herbst '00)
Note 3
2000 Beginn der Promotionsarbeit in der Abteilung für Innere Medizin des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Arbeitsgruppe PD Dr. J.
Greeve
2000-2002 Aufbaustudiengang Molekularbiologie, Zentrum für Molekulare Neu-
robiologie Hamburg, Abschlußnote 1
2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Frühjahr '03)
Note 1,6
2003-2004 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf und
Inselspital Bern, Schweiz
2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Frühjahr '04) Note 2,0
Seit August 2004 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Dermatologie der
Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Hamburg, den 08. Februar 2005

Danksagung

Ich danke besonders PD Dr. Jobst Greeve für die Gelegenheit, die Molekularbiologie in seiner Arbeitsgruppe zu erlernen. Auch bedanke ich mich dafür, daß er mich zu jeder Zeit durch seine außerordentlichen wissenschaftlichen Erfahrungen weiter brachte. Außerdem standen mir von seiner Seite während der Ausführung meiner Versuche großzügige materielle Mittel zur Verfügung.

Ich bedanke mich bei Ines Diehl, die mir mit unerschütterlicher Geduld und Freundlichkeit meine ersten Schritte im Labor ermöglicht hat und auch in der Folgezeit immer ein offenes Ohr und die passende Lösung für meine Probleme hatte.

Großen Dank richte ich an Kerstin Olivier, ohne die ich an so manchem Tag verzweifelt wäre. Durch sie und mit ihr wurde mir die Arbeit sehr erleichtert. Überdies war die Arbeit mit ihr eine große Party.

Danke an die gesamte Arbeitsgruppe Greeve an Frank Apostel, Nina Pluntke, Heinrich Lellek, Kristina Krause, Antje Phillipsen.

Weiterhin ein Dank an Romy Kirsten, deren Vorarbeit mir viel Zeit erspart hat. Ich habe sie zwar nur kurz kennengelernt, aber ihre Erbschaft hat mich im Labor begleitet.

Vor allem aber möchte ich Frank Leypoldt danken, der mir wirklich immer mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne ihn wäre sie sicher nicht oder nicht in dieser Form zu einem Ende gebracht worden.

Zum Schluß möchte ich noch meiner geliebten Familie danken, meinem Vater und meiner Mutter, Patricia, Claudia, Franziska, Adrian und Kristina, die inzwischen auch irgendwie dazu gehört. Sie hatten immer die richtigen Worte für mich parat, auch als ich auf dem Höhepunkt meiner Verzweiflung angekommen war.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, im Februar 2005