

**Funktionelle Analyse der Lokalisation und  
Regulation der humanen Homeodomänen-  
Interagierenden Protein Kinase 2 (HIPK2)**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades am Fachbereich  
Biologie der Universität Hamburg**

**vorgelegt von**

**Andreas Möller**

**aus Schwalmstadt**

Hamburg, Januar 2003 (Drucklegung)



---

<b>I. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Funktionelle Architektur des Zellkerns</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Das PML-Nuclear Body Kompartiment</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 HIPK2</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 Der Tumorsuppressor p53</b> .....	<b>10</b>
<b>1.5 SIAH-1 und das Ubiquitin System : Proteosomale Proteindegradation     durch Ubiquitylierung</b> .....	<b>12</b>
<b>1.6 Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>17</b>
<b>II. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>18</b>
2.1.1 Antikörper.....	18
2.1.1.1 Primärantikörper.....	18
2.1.1.2 Sekundärantikörper für Westernblot Analysen.....	19
2.1.1.3 Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz .....	19
2.1.2 Bakterienstämme .....	20
2.1.3 Chemikalien.....	20
2.1.4 Enzyme .....	20
2.1.5 Eukaryontische Zellen .....	21
2.1.6 Expressionsplasmide .....	22
2.1.7 Kits .....	22
2.1.8 Nährmedien .....	23
2.1.8.1 Medien zur Kultivierung von prokaryontischen Zellen.....	23
2.1.8.2 Medien zur Kultivierung von eukaryontischen Zellen .....	23
2.1.9 Molekulargewichtsstandards .....	24
2.1.10 Oligodesoxynukleotide.....	24
2.1.10.1 Synthetische Oligonukleotide zur Klonierung.....	25
2.1.10.2 Oligodesoxynukleotide zur Mutagenese.....	25
2.1.11 Puffer und Lösungen .....	26
2.1.12 Radioaktive Nucleotide .....	29
2.1.13 Vektoren .....	29
2.1.14 Zellzyklus-beeinflußende Chemikalien .....	30

<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	31
2.2.1.1 Arbeiten mit Bakterienkulturen .....	31
2.2.1.2 Lagerung von Bakterienkulturen .....	31
2.2.1.3 Präparation chemokompetenter <i>E. coli</i> .....	31
2.2.1.4 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	32
2.2.1.5 Qiagen Plasmid DNA Präparation.....	32
2.2.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmung .....	33
2.2.1.7 Restriktionsverdau von DNA .....	33
2.2.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA Abschnitten.....	34
2.2.1.9 Auffüllen von 5' überhängenden kohäsiven DNA-Fragment Enden .....	35
2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
2.2.1.11 Gerichtete Generierung von DNA-Punktmutationen .....	35
2.2.1.12 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	36
2.2.1.13 DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	36
2.2.1.14 Präparation von mRNA .....	36
2.2.1.15 cDNA-Synthese aus mRNA ( <i>Reverse</i> Transkription) .....	37
2.2.1.16 RT-PCR Analysen .....	37
2.2.1.17 Aktivitätsbestimmung von Promotorelementen durch Bestimmung der Luziferaseaktivität .....	38
2.2.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden.....	38
2.2.2.1 Kultivierung von Suspensionszellen.....	38
2.2.2.2 Kultur von adhärent wachsenden Zelllinien .....	39
2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	39
2.2.2.4 Transfektion von Zellen.....	39
2.2.2.4.1 Transfektion von Suspensionszellen mittels Elektroporation.....	40
2.2.2.4.2 Transfektion adhärenter Zellen mittels SuperFect® oder Polyfect® Reagenz.....	40
2.2.2.4.3 Transfektion adhärenter Zellen mittels Lipofectamine® Reagenz .....	41
2.2.2.4.4 Transfektion adhärenter Zellen mittels FuGENE6™ Reagenz .....	41
2.2.2.5 Etablierung stabiler Zelllinien .....	41
2.2.2.6 Lyse von Zellen .....	41
2.2.2.7 Messung von Zellzyklus Parametern mittels Durchflußzytometrie.....	42

---

2.2.2.8 Sortierung von Zellen im FACSvantage.....	42
2.2.2.9 Immunfluoreszenz Analysen .....	42
2.2.2.10 Konfokale Mikroskopie .....	44
2.2.2.11 Lebendzellbeobachtung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop....	44
2.2.2.12 Detektion der eGFP-Fluoreszenz in lebenden Zellen	
am Leica TCS SP .....	44
2.2.2.13 Aufnahme von schnellen Bewegungsvorgängen innerhalb der Zelle....	44
2.2.2.14 Aufnahme von langsameren Prozessen innerhalb der Zelle .....	45
2.2.2.15 Synchronisation von Zelllinien .....	45
2.2.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden .....	46
2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen .....	46
2.2.3.2 Westernblot und Immundetektion .....	47
2.2.3.3 Coomassie Färbung, Radioaktive Gelelefs.....	47
2.2.3.4 Immunpräzipitation aus Zellkulturzellen.....	48
2.2.3.5 <i>In vivo</i> <sup>35</sup> S-Markierung von Proteinen zur Bestimmung	
ihrer Halbwertszeit .....	49
2.2.3.6 Kinaseaktivitätsbestimmung mittels <sup>32</sup> P Substratmarkierung.....	49
2.2.3.7 Expression und Aufreinigung GST-markierter, rekombinanter Proteine	50
2.2.3.8 GST-Pull Down Experimente.....	51

---

<b>III. Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von HIPK2 .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 Die Expression der kinaseninaktiven HIPK2 K221A führt zur Ausbildung von deformierten Zellkernen.....</b>	<b>59</b>
<b>3.3 HIPK2 kann durch PML IV Expression oder Behandlung mit As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / UV in PML-NB rekrutiert werden und interagiert dort mit CBP und p53.....</b>	<b>63</b>
<b>3.4 Der inhibitorische Einfluss von HIPK2 auf die Zellproliferation ist unabhängig von der Lokalisation der Kinase.....</b>	<b>68</b>
<b>3.5 Sp100 wirkt als Koaktivator für die HIPK2 vermittelte Transaktivierung .....</b>	<b>74</b>
<b>3.6 HIPK2 wird im Zellzyklus durch die physische und funktionelle Interaktion mit SIAH-1 reguliert .....</b>	<b>81</b>
<b>IV. Diskussion .....</b>	<b>100</b>
<b>4.1 HIPK2 Domänen – Ein neues nukleäres Subkompartiment.....</b>	<b>100</b>
<b>4.2 Funktionelle Interaktion von HIPK2 mit dem PML-Nuclear Body Kompartiment .....</b>	<b>102</b>
<b>4.3 HIPK2 als Modulator der Genexpression.....</b>	<b>104</b>
<b>4.4 SP100 wirkt als transkriptioneller Koaktivator für HIPK2- vermittelte Genexpression .....</b>	<b>105</b>
<b>4.5 HIPK2 wird im Zellzyklus durch die Interaktion mit SIAH-1 reguliert.....</b>	<b>107</b>
<b>4.6 HIPK2 ist ein neuer Zellzyklusregulator .....</b>	<b>111</b>

<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>114</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>VII. Abkürzungen.....</b>	<b>132</b>
<b>VIII. Publikationsliste .....</b>	<b>134</b>



## I. Einleitung

### 1.1 Funktionelle Architektur des Zellkerns

Bereits im 19. Jahrhundert postulierten die beiden Forscher Rabl und Boveri, dass der Zellkern nicht eine zufällige, chaotische Ansammlung von Proteinen und DNA ist und die Organisation der Interphasen Chromosome nicht zufällig sei (Rabl, 1885; Boveri, 1888).

Doch erst durch den Fortschritt in der Antikörpertechnik, der Biochemie und der Fluoreszenzmikroskopie gelang es, den Aufbau des Zellkerns genauer zu definieren. Der Zellkern von Säugetieren ist ein komplexes, multi-funktionelles Organell (Spector, 1993; Lamond und Earnshaw, 1998, Misteli und Spector, 1998; Matera, 1999). So ist er der Platz, an dem die Antwort auf die meisten extra- und intrazellulären Signale entsteht, außerdem der Ort der Genexpression, der DNA Replikation, Reparatur und der DNA und RNA Modifikation. Dieser hohe Grad der funktionellen Komplexität sollte eine hohe morphologische Komplexität voraussetzen. Bis vor einigen Jahren aber konnten mit den biochemischen Methoden, die sich im Zytoplasma sehr gut zur Aufklärung der verschiedenen Organellen eigneten, im Zellkern keine morphologisch definierten Strukturen isoliert werden. Daher wurde der Zellkern allgemein als „chaotische Organelle“ bezeichnet, in dem große Mengen disorganisierter DNA in einer homogenen Proteinmasse verpackt sind.

Diese These wurde 1982 durch eine Reihe sehr eleganter Experimente von Cremer et al. widerlegt. Sie konnten zeigen, dass bestimmte Chromosome im Interphasen Zellkern distinkte, klar abgegrenzte sogenannte Territorien belegen. Diese Daten wurden einige Jahre später mit Methoden zur direkten Visualisierung von Chromosomen im Fluoreszenzmikroskop verifiziert (Pinkel et al., 1988).

Doch nicht nur die Chromosomen sind im Zellkern an bestimmten Aufenthaltsorte gebunden. Der Zellkern enthält des weiteren eine Vielzahl verschiedener Subkompartimente, welche funktionell durchaus mit den Organellen des Zytoplasma

vergleichbar sind. Die nukleären Subkompartimenten sind selektiv zusammengesetzte Räume, in denen spezifische biochemische und signalverarbeitende Prozesse beschleunigt ablaufen können. Dies wird durch die lokale Konzentration bestimmter Enzyme erreicht. Einige dieser Subkompartimente konnten bereits biochemisch aufgereinigt und ihre Zusammensetzung analysiert werden (Busch et al., 1967; Mintz et al., 1999; Andersen, 2002). Während die Proteinzusammensetzung der einzelnen nukleären Subkompartimente untereinander stark variiert, so ist Allen das Fehlen einer begrenzenden Membran gemeinsam.

Viele nukleäre Proteine liegen sowohl in einem löslichen, nukleoplasmatischen Anteil als auch in distinkten intranukleären Kompartimenten vor. Die spezifische Akkumulation der Proteine erlaubt eine spezialisierte Funktion eines Kompartiments zur richtigen Zeit am richtigen Ort, wobei die Spezifität über die Auswahl der Proteine gesteuert werden kann (Misteli et al., 2001; Spector, 2001).

Das am besten untersuchte nukleäre Kompartiment ist der Nukleolus. Es ist auch derzeit das einzige, welchem eine klare Funktion, die der rRNA Synthese, zugewiesen werden konnte (Scheer und Hock, 1999; Olson et al., 2000). Der Nukleolus entsteht durch die Aggregation bestimmter DNA Sequenzen, die rRNA Gene enthalten. Doch auch der Nukleolus an sich ist nochmals in drei funktionelle Kompartimente unterteilt. Das innere, fibrilläre Zentrum, welches als Depot für rRNA Gene dient, das dichte fibrilläre Kompartiment (DFC), in der die Maturation der pre-rRNA Transkripte abläuft und das granuläre Kompartiment (GC), in welchem präribosomale Partikel zusammengefügt werden (Tollervey und Kiss, 1997; Carmo-Fonesca et al., 2000). Zusätzlich scheint der Nukleolus ebenfalls in der Sesquestration von nukleären Proteinen eine Rolle zu spielen (Pederson, 1998; Olson et al., 2000).

Neben dem Nukleolus Kompartiment existieren noch weitere nukleäre Kompartimente. Ort der Transkription und des Splicing sind Splice Faktor Kompartimente, auch „Splice Bodies“ genannt (Lewis und Tollervey, 2000; Misteli, 2000). Außerdem gibt es eine Reihe kleiner nukleärer Foci, zu denen unter anderem auch die Cajal Körper (Gall, 2000) und die Promyeolitsche Leukämie (PML) „nuclear bodies“ (PML-NBs) zählen (Zhong, et al., 2000). Die Funktionen der meisten Kompartimente und die Interaktion zwischen den Kompartimenten und dem nukleären Umfeld sind aber meist noch weitestgehend unbekannt.

Die Zellkernarchitektur hat einen essentiellen Einfluss auf die Genexpression. So konnte Croft et al., 1999 zeigen, dass das Chromosom 18, welches sehr wenig aktive Gene enthält, häufig am Rande des Zellkerns zu finden ist, während sich Chromosom 19 mit vielen aktiv transkribierten Genen sich im Zellkernzentrum aufhält. Ebenso konnte beobachtet werden, dass Differenzierungsvorgänge in PC12 Zellen mit der Translokation von Chromatinregionen vom Zellkernzentrum zur Peripherie einhergehen (Par und DeBoni, 1996). Dass dies ein genereller Effekt ist, wurde durch Experimente mit einem artifiziellen VP16 Gen bestätigt. Während sich dieses stabil in ein Chromosom eingebautes Konstrukt nur zu Beginn der G1 und der S-Phase im Zellkerninneren befand, bewirkte die ständige Aktivierung des Konstrukts einen permanenten Aufenthalt im Inneren des Zellkerns (Tumbar, und Belmont, 2001).

## 1.2 Das PML-Nuclear Body Kompartiment

Die PML-NBs, auch Nuclear Domain 10 (ND10), PML Oncogenic Domains (POD) oder Kremer Bodies genannt, sind nukleäre, Matrix assoziierte Strukturen von etwa 250-500 nm Durchmesser. Sie kommen in fast allen untersuchten Zellen als etwa 10-30 über den Zellkern verteilte, kugelartige Kompartimente vor (Ascoli und Maul, 1991; Stuurman, et al., 1992). Die Zahl und Größe der PML-NBs variiert im Laufe des Zellzyklus (Koken, et al., 1995). Das PML Protein ist für die Ausbildung von PML-NBs essentiell (Ishov, et al., 1999). Das PML Gen besteht aus neun Exons und es gibt mindestens 7 verschiedene Spliceformen von PML, PML I bis PML VII (Jensen, et al., 2001). Dabei variieren die Spliceformen hauptsächlich in ihren carboxyterminalen Bereichen. PML VII ist ein zytoplasmatisches Protein, während alle anderen in PML-NBs und im Nukleoplasma lokalisieren. Das PML Protein besteht aus einer charakteristischen RBCC Domäne (RING B-Box coiled-coil). Wie der Name schon sagt, setzt sich die RBCC Domäne aus einer RING Finger Domäne (siehe dazu Kapitel 1.3), einer oder zwei Cysteinreichen Zink-bindenden B-Boxen und einem  $\alpha$ -helikalen coiled-coil Motiv zusammen. Das PML Protein kann dabei an drei Stellen, jeweils einmal in der RING Finger Domäne, in der ersten B-Box und im coiled-coil Motiv

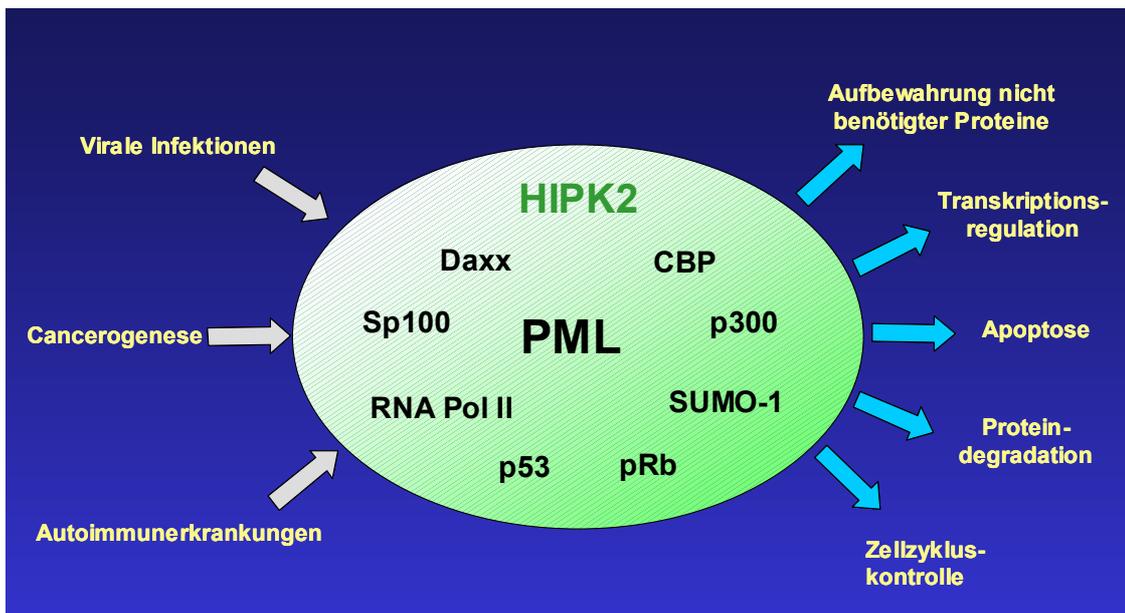
durch das SUMO-1 Protein modifiziert werden (siehe Kapitel 1.4; Boddy, 1996; Müller, et al., 1998; Kamitani, et al., 1998). Unmodifiziertes PML Protein ist nukleoplasmatisch lokalisiert, während SUMOliertes PML Protein fest mit PML-NBs assoziiert vorliegt (Müller, 1998).

Neben dem PML Protein und SUMO-1 lokalisiert eine ständig steigende Zahl anderer zellulärer Proteine in den PML-NBs. Das erste beschriebene PML-NB Protein ist Sp100 (Szostecki, et al., 1987; Szostecki, et al., 1990), welches eine komplette Kolokalisation mit PML zeigt und auch durch SUMO-1 modifiziert wird (Sternsdorf, et al., 1997; Sternsdorf, et al., 1999). Zusätzlich wurden einige Proteine beschrieben, die ganz oder teilweise mit PML-NBs kolokalisieren und unter bestimmten Umständen in die PML-NBs rekrutiert werden können (Schema 1). Dazu gehören die Tumorsuppressoren p53 (Lain, et al., 1999; Ferbeyre, et al., 2000; Pearson, et al., 2000; Fogal, et al., 2000) und Retinoblastomprotein (Rb, Alcalay et al., 1998), die Histonacetylase CBP (Doucas, et al., 1999), Daxx (Everett, et al., 1999; Torii, et al., 1999) als auch Sp140 (Dent, et al., 1996), Sp110 (Bloch, et al., 2000), das Heterochromatin Protein 1 (HP1, Everett, et al., 1999; Seeler, et al., 1998; Lehming, et al., 1998), die Bloom Syndrom Helikase BLM (Ishov, et al., 1999), als auch DNA Reparaturproteine RAD51 und RP-A (Bischof, et al., 2001).

In PML<sup>-/-</sup> knock-out Zellen unterbleibt ebenfalls die Ausbildung von PML-NBs, und konstitutive PML-NB Proteine wie Sp100 lokalisieren ohne Akkumulation in Kompartimenten (Ishov, et al., 1999; Zhong, et al., 2000). Hingegen ist die Lokalisation anderer, rekrutierbarer PML-NB Proteine weitestgehend unverändert.

Desweiteren bildet eine PML Mutante, welche nicht mehr SUMOliert werden kann, in PML<sup>-/-</sup> Zellen eine aberante Struktur und kann andere PML-NB Proteine nicht mehr in diese rekrutieren (Zhong, et al., 2000). Diese Experimente zeigen, dass die SUMOlierung eine Veränderung der subnukleären Lokalisation eines Substratproteins bewirken kann. Die Überexpression von PML führt zu einem Wachstumsstopp oder zur Apoptose, abhängig von der Proteinmenge und vom Zelltyp (Pearson und Pelicci, 2001). Im Gegensatz dazu führt eine Geninaktivierung des PML Gens zu einer erhöhten, tumorähnlichen Zellproliferation (Wang, et al., 1998). Dies ist auch der Fall in einigen Fällen der akuten promyelocytische Leukämie (APL), in der das PML Protein durch eine chromosomale Translokation an das Retinsäurerezeptor Protein (RAR)

fusioniert vorliegt (de Thé, et al., 1991; Koken, et al., 1994; Weis, et al., 1994). Dieses PML/RAR t(15;17) Fusionsprotein ist diffus im Nukleus in sogenannten Mikrotüpfeln lokalisiert und es unterbleibt eine Ausbildung von PML-NBs (de Thé, et al., 1991; Goddard, et al., 1991; Kakizuka, et al., 1991). Andere PML-NB Proteine, wie das Sp100 Protein, sind bei dieser Krankheit ebenfalls in diesen Mikrotüpfeln zu finden (Koken, et al., 1994).



**Schema 1. Die PML-NBs.** PML-NBs werden bei verschiedenen pathogenen Erkrankungen verändert. Es ist eine Auswahl an Proteinen aufgeführt, die in PML-NBs lokalisieren. Die Funktionen, die den PML-NBs zugeschrieben werden, reichen von der Aufbewahrung nicht benötigter Proteine über Transkriptionsregulation bis zur Zellzykluskontrolle.

Die Expression des PML/RAR Fusionsprotein ist für die onkogene Transformation von Zellen hinreichend (Grisolano, et al., 1997; Altabel, et al., 1996). Als Therapie wird bei diesen Patienten All-Trans Retinsäure eingesetzt, welches in bis zu 95% aller Fälle zu einer Remission der Krankheit und einer Wiederausbildung der PML-NBs führt (Degos 1994; Grignani, et al., 1994). Ein weiterer Therapieansatz besteht in der Applikation von As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Die Behandlung von normalen Zellen mit Arsentrioxid (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) führt zu

einer vermehrten Rekrutierung von PML aus dem nukleoplasmatischen Anteil in PML-NBs (Müller, et al., 1998).

PML-NBs werden außerdem durch die Infektion von Zellen mit bestimmten Viren wie des Herpes Simplex Virus aufgelöst (Maul, et al., 1993). Verantwortlich dafür ist das virale ICP0/Vmx110 Protein, welches sich in PML-NBs anreichert und dort die proteosomale Degradation von PML induziert, was eine Auflösung der PML-NBs induziert (Everett, et al., 1998). In einer ähnlichen Weise assoziiert auch das Zytomegalusvirusprotein IE1 mit PML-NBs und löst diese Struktur durch einen bisher unaufgeklärten Mechanismus gänzlich auf (Ahn, et al., 1998; Everett, 2001).

Für das CREB Bindende Protein (CBP) wurde neben einer überwiegend nukleoplasmatischen Lokalisation auch eine partielle Kolo-kalisation in PML-NBs beschrieben (Pearson, et al., 2000; Doucas, et al., 1999; von Mikecz, et al., 2000; Boisvert, et al., 2001). Zusätzlich konnte eine biochemische Assoziation von CBP mit PML gezeigt werden (Doucas, et al., 1999). CBP und das verwandte p300 Protein sind Histone Acetyl Transferasen (HAT) mit einer für nukleären HATs typischen Bromodomäne. CBP kann durch diese intrinsische HAT Aktivität Chromatindenkondensation durch Acetylierung der Histone auslösen (Ogryzko, et al., 1998). Daneben kann aber CBP auch verschiedene Transkriptionsfaktoren (Goodman und Smolik, 2000) und nukleäre Hormonrezeptoren (Chakravarti, et al., 1996) durch Acetylierung aktivieren.

Sp100 wurde zuerst als ein Antigen charakterisiert, welches mit Antikörpern aus Seren von Autoimmunpatienten reagiert (Szostecki, et al., 1987; Szostecki, et al., 1990). Sp100 gehört zu einer kleinen Proteinfamilie, zu denen unter anderem noch Sp110 und Sp140 zählen. Ihnen allen ist eine N-Terminale HSR Domäne (Homogenously Staining Region) gemeinsam, die im Falle von Sp100 die Oligomerisierung mit PML vermittelt (Sternsdorf, et al., 1999). Im Gegensatz zu PML ist aber die SUMOlierung von Sp100 nicht für die konstitutive Lokalisation in PML-NBs notwendig (Sternsdorf, et al., 1999). Über die Funktion von Sp100 ist wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Sp100 die Transkription inhibiert, wenn es über heterologe DNA-bindende Domänen oder durch Rekrutierung mittels des Heterochromatinkomponente HP1 in die Nähe von DNA gebracht wird (Seeler, et al., 1998; Lehming, et al., 1998). Vor kurzem konnte Wasyluk,

et al., (2002) zeigen, dass Sp100 mit dem Transkriptionsfaktor ETS-1 interagiert. Durch diese Interaktion verstärkt Sp100 unter anderem die Transkription des Collagenase Promotors und von synthetischen ETS spezifischen Promotoren. Mit diesen Daten wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Sp100 auch als transkriptioneller Koaktivator wirken kann.

Die Expression von PML und Sp100 ist durch Interferone von Typ I (Interferone  $\alpha$  und  $\beta$ ) als auch Typ II (Interferon  $\gamma$ ) aktivierbar (Chelbi-Alix, et al., 1995; Lavau, et al., 1995; Stadler, et al., 1995). Interferone gehören zu den Zytokinen und sind für antivirale und anti-parasitäre Effekte verantwortlich.

Es gibt inzwischen mehr als 50 Proteine, die als PML-NB Proteine beschrieben wurden (Borden, 2002). Da eine PML-NB Lokalisierung auch ein Überexpressionsartefakt sein kann und artifiziell exprimierte DNA ebenfalls in PML-NBs lokalisieren kann, ist die Zuordnung zu PML-NBs teilweise zweifelhaft (Tsukamoto, et al., 2000). Auch die Kreuzreaktivität mancher Antikörper mit Bestandteilen von PML-NBs hat zu Falschidentifikation von Proteinen in PML-NBs geführt (Quignon, et al., 1998).

Bezüglich der Funktion der PML-NBs gibt es verschiedene Hypothesen.

Einige Gruppen konnten für PML-NBs eine Rolle in der Transkription nachweisen. Direkt sind die PML-NBs in der Transkription viraler Gene beteiligt (Maul, 1998). Einen direkten Zusammenhang zwischen PML-NBs und Transkription konnte durch naszente RNA Polymerase II Transkripte innerhalb der PML-NBs demonstriert werden (LaMorte, et al., 1998). Auch andere Studien zeigten dies, jedoch wiesen sie die Transkripte in der Peripherie der PML-NBs nach (Grande, et al., 1996; Boisvert, et al., 2000). Zusätzlich konnte auch die Histoneacetylase CBP und RNA Polymerase II direkt in Fluoreszenzstudien in PML-NBs detektiert werden (von Mikecz, et al., 2000).

Andere Gruppen vertreten die Meinung, dass die PML-NBs vorrangig der Aufbewahrung nicht benötigter Proteine und zu deren Degradation dienen. Sie leiten dies unter anderem aus der Beobachtung der offensichtlichen Proteinheterogenität der PML-NBs her (Maul, et al., 2000). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass fremde oder überexprimierte Proteine mit diesen Strukturen assoziieren (Melnick und Licht, 1999; Tsukamoto, et al., 2000). Durch die Funktion als Aufbewahrungsort für endogene, zur Zeit nicht gebrauchter Proteine, beteiligt sich das PML-NB

Kompartiment über eine Titration der Proteine ins Nukleoplasma direkt an der Modulation von biochemischen Vorgängen.

### 1.3 HIPK2

Die Homeodomänen Interagierende Protein Kinase 2 (HIPK2) gehört neben HIPK1 und HIPK3 zu der kleinen Familie der Homeodomänen-Interagierenden Protein Kinasen (Kim, et al., 1998). Die einzelnen Familienmitglieder sind untereinander und zwischen den Spezies stark konserviert. So sind die humane und murine HIPK2 auf Proteinebene zu 98% identisch (Hofmann, et al., 2000). Allen HIPKinasen gemeinsam ist die Abfolge der verschiedenen funktionellen Motive. Sie besitzen eine aminoternale Kinase Domäne, welche Serine und Threonine phosphorylieren kann. Die Kinasedomäne von HIPK2 hat eine hohe Ähnlichkeit zur Kinasedomäne von YAK1 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (43 % Identität) und YAKA aus *Dictyostelium discoideum* (42 % Identität). Die Arretierung des Zellzyklus der Hefe in der S-Phase wiederum führt zu einer Erhöhung des YAK1 Levels (Garret, et al., 1991). Eine für YAKA negative Zelllinie zeigt eine Beschleunigung des Zellzyklus, wohingegen die Überexpression von YAKA auch zu einer Arretierung im Zellzyklus von *D. discoideum* Zellen führt (Souza, et al., 1998).

Gefolgt wird die Kinasedomäne von der Interaktionsdomäne für die Homeodomänen Transkriptionsfaktoren, einer Korepressordomäne und einem PEST Motiv. Dieses PEST Motiv wird häufig in kurzlebigen Proteinen identifiziert und gilt als Signal für den schnellen proteolytischen Abbau von Proteinen (Rogers, et al., 1986). Jedoch konnte diese Eigenschaft für die HIPKinasen wie auch für viele andere Proteine nicht nachgewiesen werden. Am äußersten Carboxyterminus haben die HIPKinasen ein Tyrosin/Histidin reiches Motiv (YH Motiv) mit bislang unbekannter Funktion für diese Proteine. Zusätzlich besitzen die HIPKinasen drei nukleäre Lokalisationssignale (NLS, Kim, et al., 1999), woraus computergestützte Vorhersagen die HIPKinasen mit einer >98% Wahrscheinlichkeit als nukleäre Proteine ausgeben.

Sowohl die murine (Kim, et al., 1999) als auch die humane HIPK2 (Daten nicht gezeigt) werden durch das SUMO-1 Protein posttranslational modifiziert. Die murine HIPK2 wird am äußersten Carboxyterminus SUMOliert und interagiert mit dem E2 Enzym mUBC9.

Die chromosomale Lokalisation der HIPK2 Gene wurde mit einer FISH Analyse (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) bestimmt und für das murine Gen eine Position auf Chromosom 6b und für die humane HIPK2 auf 7q32-q34 bestimmt (Hofmann, et al., 2000). Northern Blot Experimente zeigen für humane HIPK2 vier verschiedene mRNA Transkripte von 1.4, 4.5, 7.8 und 11 kb, was für verschiedene HIPK2 Splicevarianten spricht (Wang, et al., 2001).

Die murine HIPK2 wurde erstmals 1998 von Kim et al beschrieben und aufgrund der Interaktion mit dem Homeodomänen Transkriptionsfaktor Nkx-1.2 kloniert (Kim, et al., 1998). In dieser namensgebenden Studie wurde auch gezeigt, dass HIPK2 mit den Homeodomänen Transkriptionsfaktoren NK-1, NKx-2.5, HoxC4 und HoxD4 interagiert und die DNA-Bindung des Homeodomänen Transkriptionsfaktor NK-3 erhöht. Gleichzeitig verstärkt HIPK2 die Korepressorfunktion von NK-3. Jedoch konnte für keinen der Transkriptionsfaktoren HIPK2-vermittelte Phosphorylierung gezeigt werden, weshalb die physiologische Rolle dieser Interaktionen noch nicht klar ist.

HIPK2 wurde ausserdem als Teil eines Korepressorkomplexes mit Groucho und Histon Deacytelasen (HDACs) beschrieben (Choi, et al., 1999). HIPK2 interagiert auch mit dem Homeodomänen Transkriptionsfaktor TTF-1 (Missero, et al., 2001) sowie mit dem Transkriptionsfaktor STAT3 (Matsuo, et al., 2001).

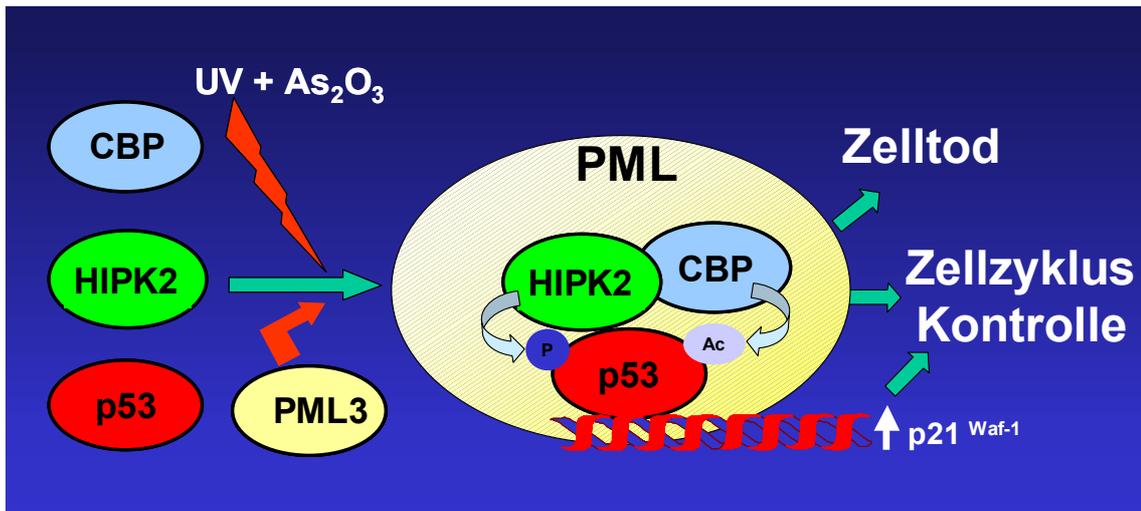
Die Hamster HIPK2 (auch PKM genannt) wurde in einem Hefe-2-Hybrid Experiment mit MxA gefunden (Trost, et al., 2000). MxA ist eine Interferon induzierbare GTPase mit antiviraler Aktivität. MxA bindet an den C-Terminus von HIPK2, jedoch bleibt die Auswirkung von HIPK2 auf die Eigenschaften von MxA bisher unbekannt.

Humane und murine HIPK2 konnten als Interaktionspartner von p53 und CBP identifiziert werden. Dabei bindet der Carboxyterminus von HIPK2 an p53. HIPK2 aktiviert kinaseabhängig p53 abhängige Promotoren wie den p21<sup>Waf-1</sup> Promotor und induziert ebenfalls kinaseabhängig eine Inhibition der Zellproliferation. HIPK2 vermittelt die UV induzierte p53 Phosphorylierung an Serin 46, welche die nachfolgende Acetylierung durch CBP an Lysin 382 von p53 ermöglicht. Durch eine

Verminderung der endogenen HIPK2 Proteinmenge durch Antisense Morpholinos konnte die UV induzierte p53 Phosphorylierung an Serin 46 stark reduziert werden (Hofmann, et al., 2002; D'Orazi, et al., 2002). Desweiteren konnte HIPK2 ebenfalls als Interaktor des zur p53 Familie gehörenden p73 identifiziert werden (Kim, et al., 2002).

## **1.4 Der Tumorsuppressor p53**

p53 ist ein weitreichend untersuchter Tumorsuppressor, der für die Erhaltung der Genomintegrität wichtig ist (Ko und Prives, 1996; Levine, 1997). So kommen in vielen Tumoren Fehlfunktionen der p53 abhängigen Signalwege oder Mutationen im p53 Protein selber vor. Einige Studien besagen sogar, dass in mehr als 50% aller Tumore das p53 Gen mutiert oder deletiert ist (Hollstein, et al., 1996). p53 ist ein zentrales Protein bei vielen Stress-induzierten Signalvorgängen und wird nach DNA Schäden, Mikrotubulinzerstörung, Veränderung des Redoxstatus oder Sauerstoffmangel (Hypoxia) aktiviert. Diese Stimuli führen zu post-translationalen Modifikationen bei p53, vorrangig der Phosphorylierung, was zur Aufhebung der Interaktion mit MDM2 und damit zur Stabilisierung und verstärkten DNA Bindung von p53 zur Folge hat. In normal proliferierenden Zellen wird p53 durch die Interaktion mit MDM2 reguliert. MDM2 stellt eine E3 Ubiquitin Protein Ligase für p53 dar und sorgt für den Kernexport des Proteinkomplexes und dessen Ubiquitinylierung und proteosomale Degradation (siehe auch Kapitel 1.4, Prives und Hall, 1999). Gleichzeitig wird das mdm2 Gen durch p53 aktiviert, was einen autoregulatorischen Kreislauf ermöglicht.



Schema 2. HIPK2 lokalisiert induzierbar in PML-NB und phosphoryliert p53 an Serin 46, welches eine Voraussetzung für die nachfolgende Acetylierung durch CBP darstellt. Dieser Mechanismus spielt eine wesentliche Rolle bei der UV vermittelten Apoptose und bei der Zellzyklus Regulation.

p53 Aktivierung führt zu einer Aktivierung und Repression verschiedener Gene, durch die dann, abhängig vom zellulären Kontext die Proliferation inhibiert wird oder beim Vorliegen irreparabler Schäden die zelluläre Seneszenz oder Apoptose einsetzt (Giaccia und Kastan, 1998). Es gibt eine große Anzahl an p53 regulierten Genen, zu denen auch p21<sup>Waf-1</sup> gehört. p21<sup>Waf-1</sup> reguliert den G1 / S Übergang des Zellzyklus und kann zelluläre Seneszenz auslösen (Deng, et al., 1995). Weitere p53 Zielgene sind die proapoptischen Gene Noxa und Bax (Vousden, 2000).

Es konnte auch ein funktioneller Zusammenhang zwischen p53 und den PML-NBs etabliert werden. Fogal, et al., (2000) konnte zeigen, dass p53 spezifisch durch die Expression von PML-IV in PML-NBs rekrutiert werden kann. Dort interagiert p53 mit PML-IV, wodurch die transkriptionelle Aktivität verstärkt wird.

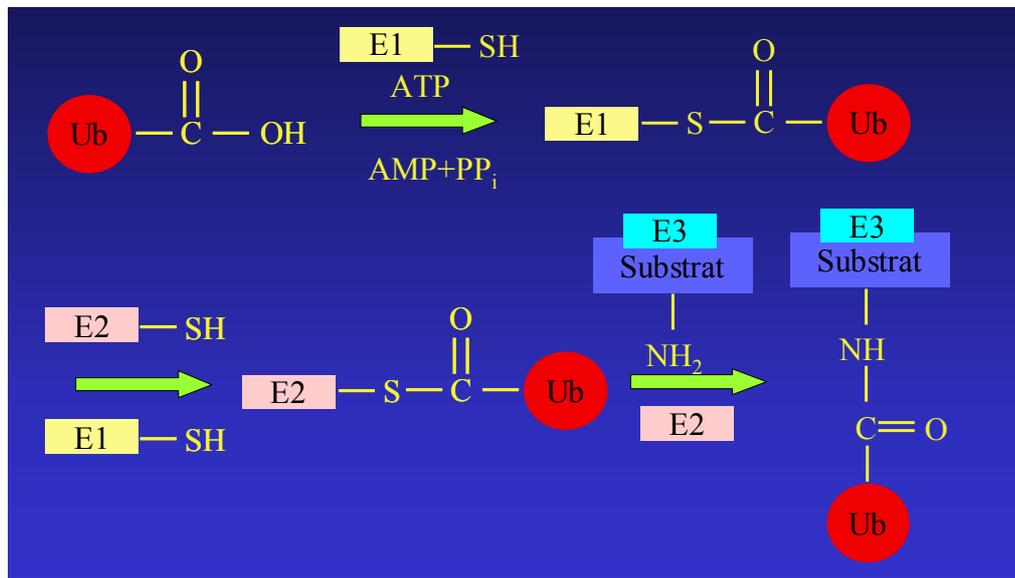
Auch die Acetylierung von p53 wird zum Teil durch CBP reguliert (Pearson, et al., 2000), wobei die Phosphorylierung von p53 an Serin 46 eine Voraussetzung für die vollständige Acetylierung darstellt (Hofmann, et al., 2002). Die p53 Acetylierung ist in PML<sup>-/-</sup> Zellen verringert, was darauf hinweist, dass die PML-NBs einen wesentlichen Einfluss auf die CBP vermittelte Acetylierung hat (Pearson, et al., 2000).

## **1.5 SIAH-1 und das Ubiquitin System : Proteosomale Proteindegradation durch Ubiquitinylierung**

Eukaryontenzellen verfügen über ein stark konservierten, weit verbreiteten Mechanismus, vorhandene Protein über eine Veränderung der Stabilität zu regulieren (Varshavsky, 1997; Hershko und Ciechanover, 1998). Hierbei wird ein Ubiquitinkette bestehend aus vielen einzelnen Ubiquitinproteinen an das zu degradierende Protein angehängt. Dieses so markierte Protein wird dann durch das Proteasom erkannt und proteolytisch abgebaut.

Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren langes, evolutionär stark konserviertes Protein. Es variiert zwischen Mensch und Hefe nur in drei Aminosäuren. Durch die konstitutive oder signalinduzierte Ubiquitin Modifikation von Proteinen (Ubiquitinylierung) ist Ubiquitin in fast allen zellulären Vorgängen involviert.

Auch der Mechanismus, der zu der Polyubiquitinylierung von Substratproteinen führt, ist stark konserviert. Ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (auch E1 Enzym genannt) bildet in einem ATP-abhängigen Prozess eine Thiol-Ester Bindung mit dem carboxyterminalen Glycin von Ubiquitin aus (Schema 2). Dieses aktivierte Ubiquitin wird auf ein Ubiquitin-Konjugierendes Enzym (E2 Enzym) durch eine Transthiol Reaktion übertragen. Die Substratspezifität wird durch ein E3 Enzym (Ubiquitin Protein Ligase) erreicht. Diese interagiert spezifisch mit dem Substrat und dem E2 Enzym und katalysiert den Transfer des Ubiquitin an eine  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins im Substrat (Pickart, 2001).



**Schema 3. Die Ubiquitinierung.** Freies Ubiquitin (Ub) wird in einer ATP verbrauchenden Thiolester Reaktion an ein E1 aktivierendes Enzym (E1) angehängt. Daraufhin wird Ubiquitin auf E2 konjugierende Enzyme (E2) übertragen. Die E3 Ligasen (E3) interagieren mit dem Substratprotein und dem E2 konjugierenden Enzym, woraufhin Ubiquitin an das Substratprotein angefügt wird.

Während es nur ein Gen und durch alternative Startpunkte zwei Isoformen für die E1 Enzyme gibt, ist die Zahl der E2 Enzyme viel höher. Bisher sind etwa 25 Familienmitglieder in Menschen bekannt. Allen gemeinsam ist eine 14-16 kDa Zentraldomäne, wobei die Unterscheidung in Variationen der amino- oder carboxyterminalen Bereiche liegt. Diese Bereiche könnten für die spezifische Interaktion mit E3 Enzymen verantwortlich sein (Finley, et al., 1984; Xie und Varshavsky, 1999).

Die Gruppe der E3 Enzyme teilt sich in zwei Familien, die sich durch die E2 Interaktionsdomänen unterscheiden.

Die HECT Domäne (hergeleitet von: Homologie zu E6-AP Carboxyterminus) wurde zuerst bei dem E6-AP Protein beschrieben (Huibregtse, et al., 1995). Es wurde gefunden, als die Interaktion zwischen dem humanen Papillomavirus Protein E6 und p53 untersucht wurde. Diese Studie führte zu der Identifikation des E6-AP (E6-Assoziiertes Protein). E6 dient dabei als Adaptor zwischen p53 und E6-AP, wodurch E6-AP zur Ubiquitylierung von p53 führt (Scheffner, et al., 1993). In der ~350

Aminosäuren großen carboxyterminalen HECT Domäne, die allen Proteinen der Familie gemeinsam ist, existiert ein konserviertes Cystein, welches die kovalente Thiolester Bindung mit Ubiquitin ausbildet (Huibregtse, et al., 1995). Typisch für alle HECT E3 Enzyme ist die Ausbildung eines Thiol-Ester Intermediates mit Ubiquitin. Diese Eigenschaft weist die zweite Gruppe der E3 Enzyme, die charakterisiert ist durch eine bestimmte Abfolge von Histidinen und Cysteinen, nicht auf. Die Histidin/Cystein Domäne ist durch andere Aminosäuren so voneinander getrennt, dass die Koordination von Zink Ionen in dieser Struktur ermöglicht wird. Diese Domäne wird RING Finger (Really Interesting New Gene) genannt (Deshaies, 1999; Borden, 2000). Bisher konnten bei allen nicht HECT E3 Enzymen eine RING Finger Domäne identifiziert werden. Wie auch bei den HECT E3 Enzymen katalysiert die RING Finger Domäne die Substratmodifikation mit Ubiquitin durch Interaktion der RING Finger Domäne mit dem E2 Enzym, während die Substratspezifität durch den Rest des Proteins erzielt wird. Um eine Spezialform der Ubiquitinylierung handelt es sich bei der Modifikation von Proteinen mit dem 101 Aminosäuren großen SUMO-1 Protein (Small Ubiquitin like Modifizierer 1). Im Gegensatz zu der Ubiquitinylierung, die zur Degradation des modifizierten Proteins führt, verändert die SUMOlierung die intrazelluläre Lokalisation des Proteins (wie PML) oder ändert die Stabilität des Proteins. Der Mechanismus, der zu einer SUMOlierung führt, ist analog zu dem der Ubiquitinylierung. SUMO-1 wird über eine E1, E2 und E3 Ligation an ein Lysin eines Proteins angehängt. Auch ist wenigstens auf der Stufe der E2 Enzyme eine Redundanz vorhanden, denn für das E2 Enzym hUbc9 wurde gezeigt, dass es sowohl in der Ubiquitinylierung als auch in der SUMOlierung verwendet wird. Neben dem PML und Sp100 Protein wird auch die HIPK2 SUMOliert (Kim, et al., 1999; 1.5).

Der R7 Photorezeptor ist der letzte von acht Photorezeptoren, die sich in jedem Ommatidium des Komplexauges von *Drosophila melanogaster* entwickelt. In *sina* (seven in absentia) Mutanten wird die Ommatidienentwicklung durch das Fehlen des R7 ab diesem Entwicklungspunkt abnormal (Carthew und Rubin, 1990). Dies hängt unter anderem an dem Fehlen von SINA als Transkriptionsrepressor für Tramtrack (TTK88) und PHYL (Li, et al., 1997; Chang, et al., 1995). SINA bindet das E2 Konjugierende Enzym UBCD1 durch seine aminoterminalen RING Finger Domäne und interagiert mit PHYL. Dieser Komplex führt dann zu einer Degradation von TTK88 durch den

Ubiquitin vermittelten proteosomalen Weg (Tang, et al., 1997). In *Drosophila* wurden zwei Gene für SINA Proteine identifiziert, die starke Homologie zu den humanen SIAH-1 und SIAH-2 (seven in absentia Homolog) Proteinen aufweisen. SIAH-1 kodiert für ein 282 Aminosäuren großes Protein, welches eine 76 %ige Identität zu den SINA Proteinen hat (Hu, et al., 1997). SIAH-1 und SIAH-2 untereinander haben auch eine sehr hohe Identität und unterscheiden sich nur im Carboxyterminus in einigen Aminosäuren. Das SIAH-1 Gen liegt auf dem Chromosom 16q12 und SIAH-2 auf 3q25. In der Maus existieren drei SIAH Proteine, wobei die 282 Aminosäuren großen mSIAH-1A und mSIAH-1B sich nur in 6 Aminosäuren voneinander unterscheiden. Das 325 Aminosäuren große mSIAH-2 unterscheidet sich von den mSIAH-1 Proteinen nur durch eine aminoterminalen Extension. Die hSIAH Proteine sind nahezu identisch mit den mSIAH Proteinen (Holloway, et al., 1997; Hu, et al., 1997).

Die aminoterminalen Region von SIAH inklusive des RING Finger Motivs vermitteln die Bindung mit E2 Enzymen, während der carboxyterminale Bereich für die Substrat- und Kofaktorbinding zuständig ist (Hu, et al., 1997b; Hu und Fearon, 1999; Polekhina, et al., 2002).

Die meisten beschriebenen Substrate für SIAH vermittelte Proteinstabilisation wurden durch Hefe-2-Hybrid Ansätze identifiziert. Eine Reihe von verschiedenen Proteinen wurde als Substrate für SIAH beschrieben. So werden DCC (Deleted in colorectal cancer; Hu, et al., 1997b),  $\beta$ -catenin (Liu, et al., 2001; Matsuzawa, et al., 2001), OBF-1 (Böhm, et al., 2001; Tiedt, et al., 2001), Vav 1 (Germani, et al., 1999), Numb (Susini, et al., 2001), Bag-1 (Sourisseau, et al., 2001), N-CoR (Zhang, et al., 1998) und Synaptophysin (Wheeler, et al., 2002) durch SIAH-vermittelte Proteolyse reguliert. SIAH-1 und SIAH-2 funktionieren äquivalent in der Induktion der Degradation mancher Proteine (wie DCC), wohingegen andere Proteine (wie Bag-1) spezifische Ziele von entweder SIAH-1 oder SIAH-2 sind.

Einige Studien haben für SIAH-1 eine Rolle als p53 abhängiges Effektorprotein beschrieben. Die Überexpression von p53 induziert die transkriptionelle Aktivierung von der SIAH-1 Genfamilie in verschiedenen Säugetierzellen (Amson, et al., 1996; Hu, et al., 1997; Liu, et al., 2001) und die Überexpression von SIAH-1 kommt den Effekten einer p53 Aktivierung gleich und induziert Zellzyklusstopp oder Apoptose (Matsuzawa, et al., 1998; Relaix, et al., 2000). Dabei soll SIAH-1 als E3 Ubiquitin Ligase in einem

Komplex mit den SIAH-Interagierenden Protein (SIP), der SCF Komponente Skp1 und dem F-BOX Protein Ebi gezielt das  $\beta$ -catenin Protein nach p53 Aktivierung für die Ubiquitin medierte Degradation markieren (Liu, et al., 2001; Matsuzawa und Reed, 2001; Polakis, 2001). Dabei ist wichtig, dass sowohl die Expression von p53 oder SIAH-1 die  $\beta$ -catenin Degradation initiieren kann, welche durch Koexpression durch eine SIAH-1 Mutante, die eine Mutation oder Deletion der RING Finger Domäne enthält, verhindert werden kann. Nach diesem Modell könnte also nach DNA Schaden die p53 induzierte Degradation von  $\beta$ -catenin unabhängig von dem normalen GSK3 $\beta$  medierten Degradationsweg ablaufen. Doch bei all diesen Studien, in denen SIAH-1 als negativer Regulator von p53 beschrieben wurde, handelt es sich um „gain-of-function“ Experimente, in denen p53 oder SIAH-1 in transformierten Zellen überexprimiert wurden.

In einer anderen Studie untersuchte die Gruppe von D. Bowtell die p53 Aktivierung in SIAH-1A/SIAH-2 Doppel Knock-out Zellen. Im Gegensatz zu den vorherigen Berichten konnte diese Gruppe zeigen, dass die p53 Aktivierung und p53 induzierte Seneszenz, Zellzyklusstopp oder Apoptose durch  $\gamma$ -Strahlung, UV-Behandlung, Etoposid, Doxorubicin oder Cisplatin ohne SIAH-1A und SIAH-2 nicht verändert ist (Frew, et al., im Druck). Somit scheint es sich bei der p53 vermittelten Expression von SIAH nicht um einen allgemeinen Mechanismus zu handeln.

Die Überexpression von SIAH-1 führt in MCF7 Zellen (Brustkrebs Zelllinie) zu Veränderung in der Mitose, nicht ablaufender Zytokinese und verstärkter Apoptose (Bruzzoni-Giovanelli, et al., 1999). Diese gestörte Mitose könnte auf die Interaktion von SIAH-1 mit dem Chromokinesin Kid und  $\alpha$ -Tubulin zurückzuführen sein, welche als Substrate für SIAH- vermittelte Degradation identifiziert wurde (Germani, et al., 2000). Den Einfluss von SIAH-1A auf die Meiose konnte in einer knock out Maus untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass die männlichen Mäuse steril sind, was auf eine nicht ablaufende Meiose zurück geführt werden konnte. Der Verlust von SIAH-1A führt zu einem Stopp der Meiose in der Meta- und Telophase der Meiose I und anschließender Apoptose (Dickins, et al., 2002).

## **1.6 Zielsetzung dieser Arbeit**

Die Arbeit sollte sich in zwei Teile gliedern.

Im zellbiologischen Teil der Arbeit sollte mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien die intrazelluläre Lokalisierung der HIPK2 genau untersucht werden. Die für den Aufenthalt in HIPK2 nukleären Domänen und die Rekrutierung in PML-NBs wichtigen Bereiche sollten kartiert werden und eine vergleichende Analyse mit anderen subnukleären Kompartimenten sollte klären, inwieweit HIPK2 Domänen als eigenständige subnukleäre Strukturen angesehen werden können.

Es war vorgesehen, die Interaktion von HIPK2 mit dem PML-NB Protein Sp100 zu untersuchen und die funktionellen Auswirkungen auf die p53-abhängige Genexpression darzustellen.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte die Regulation von HIPK2 im Zellzyklus analysiert werden. Eine Identifikation und Charakterisierung von dafür verantwortlichen Proteinen sollte sich anschließen und der Einfluss dieser Proteine auf HIPK2 untersucht werden.

## II. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

##### 2.1.1.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Antigen	Herkunft/Referenz
anti-FLAG (M2)	Maus	DYKDDDDK	Sigma, Taufkirchen
anti-HA (12CA5)	Maus	YPYDVPDYA	Roche Diagnostic
anti-HIPK2	Kanninchen	SSPQRSKRVKENTP PRC	Eurogentec, Belgien
anti-PML (PG-M3)	Maus		Santa Cruz Biotechnology
anti-MYC (9E10)	Maus	MEQKLISE	Santa Cruz Biotechnology
anti-GFP	Maus	GFP	Zymed Laboratories
anti-p53 (DO-1)	Maus		Santa Cruz Biotechnology
anti-p53 (FL-393)	Kanninchen		Santa Cruz Biotechnology
anti-βActin (C2)	Maus		Santa Cruz Biotechnology
anti-CBP (C1)	Maus		Santa Cruz Biotechnology
anti-CBP (A22)	Kanninchen		Santa Cruz Biotechnology
anti-p21 (F5)	Maus		Santa Cruz Biotechnology
anti-p19ARF(G-19)	Ziege		Santa Cruz Biotechnology
anti-Cdk2 ((D-12)	Maus		Santa Cruz Biotechnology
anti-GMP-1	Maus		Zymed Laboratories
anti-SIAH-1	Maus		Dr.D.Bowtell,Melbourne
anti-Ubiquitin	Maus		Zymed Laboratories
anti-BRCA-1 (Ab1)	Maus		Oncogene Research
anti-NOH61	Maus		Dr.M.Schmitt-Zachmann, Heidelberg
anti-Coilin	Meerschwein		Dr.M.Reichenzeller,

---

		Heidelberg
anti-SP100 (DF2/2)	Kanninchen	Dr.H.Will,Hamburg
anti-cyclin B1 (D11)	Maus	Santa Cruz Biotechnology
anti-cyclinA(BF683)	Maus	Santa Cruz Biotechnology
anti-cyclinD1(R124)	Maus	Santa Cruz Biotechnology
anti-Cyclin E (M20)	Kanninchen	Santa Cruz Biotechnology
anti-Rb (C15)	Kanninchen	Santa Cruz Biotechnology
anti-EEA1	Maus	BD Biosciences

---

### 2.1.1.2 Sekundärantikörper für Westernblot Analysen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
GAM-Pox	Ziege	Peroxidase	Jackson Laboratories
GAR-Pox	Ziege	Peroxidase	Jackson Laboratories
RAG-Pox	Kanninchen	Peroxidase	Jackson Laboratories

---

### 2.1.1.3 Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Herkunft/Referenz</b>
Alexa Fluor® 488	Ziege	Maus	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488	Ziege	Kanninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 488	Ziege	Ratte	Molecular Probes
Alexa Fluor® 546	Ziege	Maus	Molecular Probes
Alexa Fluor® 546	Ziege	Kanninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 594	Ziege	Ratte	Molecular Probes
Alexa Fluor® 633	Ziege	Maus	Molecular Probes
Alexa Fluor® 633	Ziege	Kanninchen	Molecular Probes
Alexa Fluor® 660	Ziege	Ratte	Molecular Probes

---

Cy <sup>TM</sup> 5	Ziege	Maus	Jackson Laboratories
Cy <sup>TM</sup> 5	Ziege	Kanninchen	Jackson Laboratories
Cy <sup>TM</sup> 3	Ziege	Maus	Jackson Laboratories
Cy <sup>TM</sup> 3	Ziege	Kanninchen	Jackson Laboratories
AMCA	Ziege	Ratte	Jackson Laboratories

### 2.1.2 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Verwendung	Herkunft/Referenz
BL21 (DE3)	Herstellung von rekombinanten Proteinen	Novagen
SCS110	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene
Sure	Vermehrung von Plasmiden	Stratagene
TOP10	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen
XL1 blue	Mutagenese	Stratagene

### 2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Biozol (München) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

### 2.1.4 Enzyme

Enzym	Herkunft
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	Roche Diagnostics
Deep Vent <sup>TM</sup> DNA Polymerase	New England Biolabs

---

Trypsin EDTA Lösung	Life Technologies
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
PfuTurbo™ DNA Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
	MBI Fermentas
	Roche Diagnostics

---

### 2.1.5 Eukaryontische Zellen

---

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft</b>
293	Humane embryonale Nierenzelllinie
293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit dem langen Arm des SV-40 Virus
H1299	Humane Non-Small Lungencarcinom Zelllinie
HeLa	Humane Cervixcarcinomzelllinie
Jurkat	Humane T-Zell-Leukämie-Linie
Jurkat TA <sub>g</sub>	Humane T-Zell-Leukämie-Linie, stabil transfiziert mit dem großen SV-40 Antigen
MCF7	Humane Brustkarzinom Zelllinie
MEF allgemein	Maus embryonale Fibroblastenzelllinie
SIAH 1A <sup>-/-</sup> 2 <sup>-/-</sup> MEF	Maus embryonale Fibroblastenzelllinie aus SIAH 1A <sup>-/-</sup> 2 <sup>-/-</sup> Mäusen
p53 <sup>-/-</sup> MEF	Maus embryonale Fibroblastenzelllinie aus p53 <sup>-/-</sup> Mäusen
NIH 3T3	Maus Fibroblasten Zelllinie
p53 tsm C135V	Ratten Embryonale CL-6 Zelllinie
U2OS	Humane Osteosacoma Zelllinie
SaoS2	Humane Osteosacoma Zelllinie

---

### 2.1.6 Expressionsplasmide

Für diese Arbeit wurden freundlicherweise folgende eukaryontischen oder prokaryontische Expressionsplasmide zur Verfügung gestellt:

CDNA	Vektor	Eptitop-Tag	Herkunft
AP-1 luc	unbekannt	Ohne	Dr. R. Davis, Worcester
PML-L, bzw. 3	pSG5/pLink	Ohne/FLAG	Dr. H. Will, Hamburg
SP100 und Mutanten	pSG5/pLink	Ohne/FLAG	Dr. H. Will, Hamburg
SUMO/Ubc 9	/pGFP-C1	HA/GFP	Dr. Del Sal, Triest
BRCA1	pCDNA3	Ohne	Dr. L. Bordy, Bethesda
SIAH1 und Mutanten	pCDNA3	HA	Dr. T. Wirth, Ulm
SIAH1A+B,2	pKH3	HA	Dr. D. Bowtell, Melbourne
p21 <sup>Waf-1</sup> Luc	Unbekannt	Ohne	Dr. El-Deiry, Philadelphia
SIAH1 und Mutanten	pGex	GST	Dr. T. Wirth, Ulm
p53	pGFP	GFP	Dr. H. Zentgraf, Heidelberg
pG13 Luc	Unbekannt	Ohne	Dr. T. Hofmann, Hamburg
pMG15 Luc	Unbekannt	Ohne	Dr. T. Hofmann, Hamburg
Ubiquitin	pMT123	HA	Dr. D. Bohmann, New York
MMTV-Luc	Unbekannt	Ohne	Dr. T. Schmidt, Iowa City

### 2.1.7 Kits

Kit	Herkunft
DNA-Mini-Spin-Kit	Qiagen, Hilden
DNA-Maxi-Spin-Kit	Qiagen, Hilden
Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Hilden
PCR-Purification-Kit	Qiagen, Hilden
Quickchange-Site-Directed-Mutagenesis-Kit	Stratagene
TNT <sup>®</sup> gekoppelltes Reticulozyten Lysat	Stratagene

---

 In vitro SUMOlation Kit

Dr. F. Melchior, Martinsried

---

### 2.1.8 Nährmedien

#### 2.1.8.1 Medien zur Kultivierung von prokaryontischen Zellen

Luria-Bertani-Medium (LB)	10 g/l	Baktotrypton (1%)
	5 g/l	Hefe-Extrakt (0.5%)
	5g/l	NaCl (0.5%)
Für Platten	16 g/l	Agar (1.6%)

Folgende Antibiotika wurden zur Selektion resistenter Bakterien eingesetzt:

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml

#### 2.1.8.2 Medien zur Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Die fertig angesetzten Nährmedien DMEM, OptiMEM und RPMI 1640 wurden von der Firma Gibco Life Technologies (Karlsruhe) bezogen. Vor der Verwendung wurden diese Medien wie folgt supplementiert:

DMEM	10% (v/v)	Hitzeinaktiviertes FCS
	100 U/ml	Penicillin
	100 U/ml	Streptomycin
OptiMEM	10% (v/v)	Hitzeinaktiviertes FCS

	100 U/ml	Penicillin
	100 U/ml	Streptomycin
RPMI 1640	10% (v/v)	Hitzeinaktiviertes FCS
	10 mM	HEPES
	2 mM	Glutamin
	100 U/ml	Penicillin
	100 U/ml	Streptomycin

Das in den Medien verwendete FCS wurde vorher für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

Zu Selektion von eukaryontischen Zellen wurde G418, (Sigma, Taufkirchen) verwendet.

### 2.1.9 Molekulargewichtsstandards

Name	Herkunft
Proteinmolekulargewichtsmarker	Bio-Rad, München
Proteinmolekulargewichtsmarker	Sigma, Taufkirchen
100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
1 kb DNA-Leiter	MBI Fermentas, St.Leon-Rot

### 2.1.10 Oligodesoxynukleotide

Sämtliche unter 2.1.10 aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technologies (Karlsruhe) oder Operon/Qiagen (Hilden) bezogen und auf eine Standardkonzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

### 2.1.10.1 Synthetische Oligonukleotide zur Klonierung

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
HIPK2 –EcoRV hinten	GAT ATC TAT GTA AGG GTA CTG GTT GAC
HIPK2 1A EcoRI	GAA TTC ATG GCC TCA CAT GTG CAA G
HIPK2 HIS2A	AGG ATC CCA GAA TAA TGC AAG CGG GG
HIPK2 HIS2B	AAA GCT TGC TAA ACT TGT TTT GCT TCA G
HIPK2 HIS5A	AGG ATC CCC AAC CAG CAC CAC CTC C
HIPK2 HIS6A	AGG ATC CCA GCA GGC CTA CAT CAC TC
HIPK2 HIS6B	AAA GCT TTA TGT AAG GGT ACT GGT TGA C
551 FOR	TAA TAC GAC TCA ACT ATA GGG AAG TAC CCT GAA CCA TCC CTT TGT CAC CAT G
691 FOR	TAA TAC GAC TCA ACT ATA GGG AAG TCA GCA AGC TCT CAT CGT GTG TCC CCC CGG
691 REV	GCC GGG GGG ACA CAC GAT GAG AGC TTG CTG
850 FOR	TAA TAC GAC TCA ACT ATA GGG AAG TAA TGT CTC CAC CTG TGA GGT GTC CTC C
850 REV	GGA GGA CAC CTC ACA GGT GGA GAC ATT
1000 FOR	TAA TAC GAC TCA ACT ATA GGG AAG TAA CCC CCG AAC CAT CAT CGT GCC ACC CCT G
1000 REV	CAG GGG TGG CAC GAT GAT GGT CGG GGG TT
1190 REV-ENDE	GGG TAT CCA GTG TAG ACG GTG GAG GC

### 2.1.10.2 Oligodesoxynukleotide zur Mutagenese

Zu jedem der folgenden Oligodesoxynukleotide wurde das entsprechende reverse Gegenstück synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
HIPK2 K25R	GTA GTG TGA AGA AAA CTA AGA GTA AGA GCC AAG TTC CAA C
HIPK2 K319R	GTT GGA ACT TGG CTC TAA GAG TAG TTT CTT CAC

---

 ACT AC
 

---

**2.1.11 Puffer und Lösungen**

PBS	137 mM	NaCl	pH = 7,4
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	2,7 mM	KCl	
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
TBS (10 x für Western Blot)	250 mM	Tris	pH = 7,4
	1,37 M	NaCl	
	50 mM	KCl	
	7 mM	CaCl <sub>2</sub>	
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>	
TBE (5 x)	445 mM	Tris	
	445 mM	Borsäure	
	5 mM	EDTA	
TE	10 mM	Tris	
	1 mM	EDTA	
SDS-Probenpuffer (5 x, reduz.)	312,5 mM	Tris-HCl, pH = 6,8	
	25% (v/v)	β-Mercaptoethanol	
	50% (v/v)	Glycerol	
	10% (w/v)	SDS	
	0,01% (w/v)	Bromphenolblau	
SDS-Sammelgel (3%)	125 mM	Tris-HCl, pH = 6,8	
	3% (v/v)	Acrylamid	
	0,1% (w/v)	SDS	

---

	0,04% (v/v)	APS
	0,3% (v/v)	TEMED
SDS-Trenngel	350 mM	Tris-HCl, pH = 8,8
	8,5-15%	Acrylamid
	0,1% (w/v)	SDS
	0,04% (v/v)	APS
	0,075% (v/v)	TEMED
SDS-Laufpuffer (5 x)	125 mM	Tris-Base
	960 mM	Glycin
	0,5% (w/v)	SDS
Transferpuffer Westernblot	25 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
	0,038% (w/v)	SDS
NP-40 Lysepuffer	20 mM	Tris-HCl, pH = 7,5
	1% (v/v)	NP-40
	150 mM	NaCl
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10% (v/v)	Glycerol
	25 mM	NaF
	1 mM	Orthovanadat
	1 mM	PMSF
	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
High-Salt Lysepuffer	50 mM	Tris-HCl, pH = 7,5
	1% (v/v)	NP-40
	300 mM	NaCl

---

	1 mM	DTT
	10% (v/v)	Glycerol
	5 mM	EDTA
	25 mM	NaF
	1 mM	Orthovanadat
	1 mM	PMSF
	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
No-Salt Lsyepuffer	50 mM	Tris-HCl, pH = 7,5
	1% (v/v)	NP-40
	1 mM	DTT
	10% (v/v)	Glycerol
	5 mM	EDTA
	25 mM	NaF
	1 mM	Orthovanadat
	1 mM	PMSF
	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
GST-Puffer	20 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
	0,2% (v/v)	NP-40
	20% (v/v)	Glycerol
	0,5 mM	EDTA
	200mM	KCl
	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
RIPA Lysepuffer	1 % (w/v)	Desoxycholat
	1 % (v/v)	NP-40
	0,1 % (w/v)	SDS

	25 mM Tris, pH 8,2
	50 mM NaCl
DNA-Probenpuffer (6 x)	30 % (v/v) Glycerol
	60 mM EDTA
	6 mM Tris, pH 7
Fixierlösung	20 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure

Spezielle Puffer, Substanzen oder Lösungen werden in den jeweiligen Abschnitten erwähnt und erklärt.

### 2.1.12 Radioaktive Nucleotide

Bezeichnung	Herkunft
$\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]ATP	NEB
$\alpha$ -[ <sup>35</sup> S]ProMix	Amersham, Freiburg
$\alpha$ -[ <sup>35</sup> S]Methionin	Amersham, Freiburg

### 2.1.13 Vektoren

Name	Verwendungszweck	Herkunft/Referenz
pcDNA3	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen
pEF-Flag	eukaryontischer Expressionsvektor mit N-terminalem Flag-Epitop-Tag	Musci et al., 1997
peGFP-C2	eukaryontischer Expressionsvektor zur Herstellung von eGFP-Fusionsproteinen	Clontech
pGEX 4T-1, -2, -3;	prokaryontischer Expressionsvektor zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen	Pharmacia

---

---

### Herstellung von GST-Fusionsproteinen

---

---

#### 2.1.14 Zellzyklus-beeinflußende Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden zur Synchronisation von eukaryontischen Zellen eingesetzt

<b>Name</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Herkunft</b>
Thymidine	Synchronisation G1/S Phasenübergang	Sigma, Taufkirchen
Nocodazol	Synchronisation in Prometaphase/Mitose	Calbiochem, Schwalbach

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

#### 2.2.1.1 Arbeiten mit Bakterienkulturen

Die verwendeten Bakterienkulturen wurden in LB-Medium als Suspensionskultur oder auf LB- Agarplatten kultiviert. Das Wachstum der Suspensionskulturen erfolgte bei 37°C. Die LB-Agarplatten wurden bei 37°C für mindestens 12 Stunden kultiviert. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte durch Wachstum in Gegenwart von Antibiotika, gegen die die transformierten Bakterien eine Resistenz aufwiesen.

#### 2.2.1.2 Lagerung von Bakterienkulturen

Um Bakterienkulturen über einen längeren Zeitpunkt aufbewahren zu können, wurden diese mit 20% Glycerin versetzt und zur Durchmischung vorsichtig über Kopf gedreht. Die so hergestellten Stocklösungen wurden anschließend bei -70°C eingefroren.

#### 2.2.1.3 Präparation chemokompetenter *E.coli*

Die Präparation von chemisch kompetenten *E.coli* Stämme erfolgte nach einer CaCl<sub>2</sub>-Methode. Eine Einzelkolonie wurde gepickt und 50 ml LB Medium damit angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur mit 100 ml frischen Medium verdünnt und diese bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,5 – 0,7 wachsen gelassen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Bakterien wurden zuerst für 15 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C bei 4000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 50 ml steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und dann für 30 weitere Minuten auf Eis gekühlt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in steriler 10 % Glycerol/ 0,1 M CaCl<sub>2</sub> Lösung aufgenommen und zu je 100 µl aliquotiert. Die Zellen wurden sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

#### **2.2.1.4 Transformation kompetenter *E. coli***

Die Transformation kompetenter *E.coli* erfolgte nach einem verkürzten Hitzeschock-Protokoll. Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA (100-500 ng) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis wurden die Zellwände durch ein 45 sekündiges Erhitzen auf 42°C permeabilisiert und die Bakterien nach kurzer Kühlung unter Zugabe von 900 µl antibiotikafreiem LB Medium für 90 Minuten bei 37°C hochgeschüttelt.

Danach erfolgte die Selektion auf transformierte Bakterien durch Ausplattierung des Transformationsansatzes auf antibiotikahaltige Platten und eine mindestens 12 stündige Inkubation bei 37°C.

#### **2.2.1.5 Qiagen Plasmid DNA Präparation**

Um Plasmid DNA für Klonierungen und Sequenzierungen einsetzen zu können, muß diese möglichst frei von chromosomaler DNA, RNA, Proteinen und anderen zellulären Verunreinigungen sein.

Um dieses zu erreichen, wurde die DNA Präparation nach Verfahren der Firma Qiagen, Hilden durchgeführt.

Für eine DNA Präparation im kleinen Maßstab wurde das Qiaquick Miniprep-Kit laut mitgelieferten Protokollen eingesetzt. Die daraus resultierende DNA Ausbeute aus einer exponentiell wachsenden 2ml Übernachtskultur lagen, abhängig vom verwendeten *E.coli* Stamm zwischen etwa 25 bis 50µg.

Für Plasmid DNA Isolationen im größeren Maßstab wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit nach den mitgelieferten Protokoll eingesetzt.

Hierzu wurden 250 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert und das Bakteriensediment in Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Durch die Zugabe von 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurden die Bakterien durch vorsichtiges Durchmischen lysiert. Daraufhin wurde die Suspension mit 10 ml eiskalten Puffer P3 (3 M KAc, pH 5,5) versetzt, vorsichtig

gemischt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert, wobei chromosomale DNA, Zelltrümmer und Protein sedimentierten. Der Plasmid DNA enthaltende Überstand wurde durch einen Faltenfilter direkt auf eine Qiagen Tip500-Säule gegeben, die zuvor mit 15 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, pH 7,0, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, 0,15 % Triton X-100) equilibriert worden war. Bei den verwendeten Bedingungen wurde die Plasmid DNA an die Anionentauschersäulenmatrix gebunden. Hierauf folgten 2 Waschschrte mit je 25 ml Puffer QC (1 M NaCl, pH 7,0, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol) und eine Elution der Plasmid DNA durch den Auftrag von 15 ml Puffer QF (12,5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 15 % Ethanol) auf die Säule. Die eluierte Plasmid DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und in einem Corex Zentrifugengefäß sedimentiert. Das Sediment wurde einmal mit 70%igen Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde die Plasmid DNA in 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 1 mM EDTA) aufgenommen und die Konzentration bestimmt (2.1.6).

#### 2.2.1.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt durch Messung der Absorption doppelsträngiger DNA bei 260 nm unter Verwendung eines Genequantpro-Spektralphotometers. Dabei entsprach eine  $OD_{260nm}$  ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

Ein Verhältnis von einer  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}} = 1,8$  bis 2,0 entsprach einer reinen DNA.

#### 2.2.1.7 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsanalyse von DNA durch Restriktions-Endonukleasen wurde zur Klonierung, Überprüfung von Klonierungsansätzen oder fremden DNAs eingesetzt. Dabei wurde je 1 µg der zu analysierenden DNA mit mindestens 1 Unit der ausgesuchten Restriktions-Endonuklease in dem jeweilig optimierten Puffersystem verwendet. Der Verdau wurde bei der optimalen Reaktionstemperatur der Endonuklease

(in der Regel bei 37°C ) für mindestens 1 Stunde durchgeführt. Die Analyse wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.12) vorgenommen.

### **2.2.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA Abschnitten**

Die Polymerasekettenreaktion erlaubt die Amplifikation eines definierten Nukleinsäureabschnittes. Um fehlerhafte Vervielfältigungen zu vermeiden, wurde das Enzym Pfu Turbo (Stratagene) eingesetzt. Dieses verfügt im Gegensatz zu normalen Taq-Polymerase eine intrinsische 3'-5'-Exonukleaseaktivität ("Proof-Reading"), wodurch Punktmutationen im amplifizierten Produkt aufgrund fehlerhafter Basenpaarung vermieden werden. Ein PCR Reaktionsansatz wie der folgende wurden standardmäßig verwendet:

1x PCR Puffer  
10 mM je Desoxynukleotid  
100 pmol Sense-Primer  
100 pmol Antisense-Primer  
25-100 ng Template DNA  
1 Unit Pfu Turbo DNA-Polymerase  
ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

Bei Verwendung eines PCR Cycler ohne beheizbaren Deckel, wurde der PCR Ansatz mit 50 µl Mineralöl überschichtet.

Die PCR wurde bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1. Denaturierung: 5 Minuten - 95°C
  2. Denaturierung: 30 Sekunden - 95°C
  3. Annealing: 30 Sekunden - 48-58°C (abhängig von eingesetzten Primern)
  4. Elongation: 1 Minute/kB Amplifikatlänge - 72°C
- Wiederholung der Schritte 2.-4.: 20-30 Zyklen
5. Kühlen des Reaktionsansatzes auf 6°C

Die Analyse fand durch eine Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1.12) statt.

### 2.2.1.9 Auffüllen von 5' überhängenden kohäsiven DNA-Fragment Enden

Die Ligation von verschiedenen DNA-Fragmenten, die nach ihrer endonukleolytischen Spaltung keine zueinander komplementären Basensequenzen aufwiesen, wurde möglich nach einer Auffüllreaktion. Hierbei wurden die überhängenden Enden durch 10 Units Klenow Polymerase in Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT) und 0,5 mM Desoxynukleotiden bei 30°C für 30 Minuten aufgefüllt. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 75°C wurde die DNA aufgereinigt.

### 2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die durch Restriktions-Endonukleasen geöffneten Plasmid DNAs lassen sich durch die Verwendung von rekombinanter T4 DNA-Ligase aus *E.coli* mit anderen, kompatiblen DNA Enden anderer DNA Fragmente verbinden. Dabei wurden die Ligationsansätze in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit bis zu 50 ng linearisierter, gereinigter Plasmid-DNA, der fünffachen Menge Insert DNA, geeigneten Salzbedingungen (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 1 mM ATP, 5 µg/ml BSA) und 5 Units T4 DNA-Ligase durch langsames Abkühlen von Raumtemperatur auf 4°C durchgeführt. 10% des Ligationsansatzes wurden danach in kompetente *E.coli* Bakterien transformiert (2.1.4).

### 2.2.1.11 Gerichtete Generierung von DNA-Punktmutationen

Um einzelne oder wenige Nukleotide einer Gensequenz zu verändern oder zu deletieren, wurde das „Quick Change Kit Gold“ der Firma Stratagene nach mitgelieferten Protokoll verwendet. Bei dieser Technik werden bewußt falsche Basen in eine Primersequenz eingefügt, so dass die resultierende Basenabfolge zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins führt. Durch eine modifizierte Polymerasekettenreaktion wird das synthetische Oligonukleotid an die doppelsträngige Plasmid-DNA angelagert. Dabei trägt das Oligonukleotid die gewünschte Substitution oder Deletion in der Mitte der Sequenz, flankiert von zur Original DNA komplementärer Sequenz. Die neue gebildeten Kopien tragen die gewünschten

Modifikationen und dienen in weiteren Zyklen ebenfalls als Template. Die mutierte, PCR-generierte DNA wird von der ursprünglichen DNA durch einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Dpn I* (2,5 U, 1 Stunde bei 37°C) getrennt. Da dieses Enzym ausschließlich methylierte DNA schneidet, wird nur das Ausgangstemplate zerschnitten, da dieses im Gegensatz zu den neuen, PCR-generierten Amplifikaten methyliert vorliegt.

Die mutierte, linearisierte DNA wurde nun in superkompetente Bakterien (*E.coli* XL1 Blue) transformiert. Diese konnten die aufgenommene DNA Sequenz ligieren und konnten nun auf antibiotikahaltigen Agaroseplatten ausgesät und isoliert werden. Die Analyse von DNA aus Einzelkolonien durch Sequenzierung zeigte den Erfolg der Mutagenese.

#### **2.2.1.12 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Die verwendeten TBE oder TAE Agarosegele hatten eine Agarosekonzentration von 0,8% bis 1,5% und wurden mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid interkaliert sequenzunabhängig mit DNA und kann unter UV-Licht (306 und 254 nm) sichtbar gemacht werden. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-130 V.

#### **2.2.1.13 DNA-Isolierung aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen wurde das *Quiaquick Gel Extraction-Kit* der Firma Qiagen, Hilden laut mitgelieferten Protokoll verwendet. Die Menge und Reinheit der aufgereinigten DNA wurde anschließend mit einem Agarosegel untersucht.

#### **2.2.1.14 Präparation von mRNA**

Die Präparation von mRNA aus Zellkulturzellen erfolgte nach dem mRNA Extractoin Kit (Qiagen, Hilden) laut den mitgelieferten Protokollen. Zellen wurden je nach Versuchsbedingungen in 6 cm Zellkulturschalen oder in 6/12-well Zellkulturplatten

ausgesät und gegebenenfalls transfiziert. Bei der mRNA Präparation wurde besonders auf eine möglichst RNase freie Umgebung geachtet. Eine durchschnittliche Ausbeute einer 6 cm Schale lag bei 20 µg.

#### **2.2.1.15 cDNA-Synthese aus mRNA (*Reverse Transkription*)**

Für die cDNA-Synthese wurde 6 µg Gesamt-RNA eingesetzt. In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurde die RNA mit 1 mM dNTPs, 750 ng *Randomprimer*, 2 µg Oligo (dT)<sub>20</sub>-*Primer*, 16 Units RNAsin und 300 Units M-MLV *Reverse Transkriptase* für zwei Stunden bei 37°C in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben. Durch den Einsatz von Oligo (dT)<sub>20</sub>-*Primern* wurde sichergestellt, dass für die cDNA-Synthese mRNA als Matrize diente. Anschließend wurde der Ansatz für fünf Minuten bei 95°C und zehn Minuten auf Eis inkubiert. 1,5 Units RNase H wurden hinzugefügt, um die RNA des RNA-DNA Hybrids bei 37°C für 20 Minuten abzdauen. Um Doppelstrang-DNA zu synthetisieren, wurden nach Einzelstrangsynthese und RNase-Verdau 20 Units DNA-Polymerase I hinzugegeben. Die cDNA wurde dann zwei Stunden bei 37°C in doppelsträngige DNA umgeschrieben.

#### **2.2.1.16 RT-PCR Analysen**

Die umgeschriebene DNA wurde in Kombination mit einem mRNA Ansatz ohne reverse Transkriptase in eine quantitative PCR eingesetzt. Hierbei befindet sich die gebildete Menge an PCR Fragmenten innerhalb des Zyklus in der exponentiellen Phase. Dadurch wurde ein Mengenausgleich zwischen den einzelnen Proben erzielt.

Die umgeschriebene DNA wurde dann in PCR Analysen mit HIPK2 spezifischen Primern (His-Tag 5A+5B) in Kombination (in einem Tube oder in verschiedenen Tubes) mit Actin oder GAPDH2 Primern (als Mengenabgleich, Act1/2; 5312/5315; von Jörn Gotter / Jens Debrinsky zur Verfügung gestellt).

Die Analyse erfolgte mittels Agarose Gelelektrophorese.

### **2.2.1.17 Aktivitätsbestimmung von Promotorelementen durch Bestimmung der Luziferaseaktivität**

Das Enzym Luziferase, gewonnen aus dem Glühwürmchens *Photinus pyralis*, katalysiert die ATP-abhängigen Oxidation seines Substrates Luziferin. Dabei wird eine biolumineszente Lichtemission erzeugt.

Dabei ist bei einem Überschuss von Luziferin die emittierte Lichtmenge direkt proportional zu der vorhandenen Luziferasemenge. Wird das Luziferasegen an eine Promotorsequenz gekoppelt, kann damit in Zellen die Induktion des Promotors indirekt durch die Menge an gebildeter Luziferase gemessen werden.

Zellen wurden mit einem Luziferase Reporter Konstrukt und gegebenenfalls anderen DNAs transfiziert und nach 24-48 Stunden einmal in PBS gewaschen und in 50 bis 100  $\mu\text{l}$  1x Reporter-Lysepuffer (Promega) bei Raumtemperatur lysiert. Die Aktivität der Luziferase von 10  $\mu\text{l}$  des durch Zentrifugation geklärten Überstandes wurde dann mit Hilfe eines Luminometers (Berthold DuoLumat LB 9501) bestimmt. Dabei wurde die Lichtmenge (Lumineszenz) für 20 Sekunden nach Injektion von 50  $\mu\text{l}$  der Luziferin Substratlösung (40 mM Tricin, 2,14 mM  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 5,34 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,2 mM EDTA, 66,6 mM DTT 540  $\mu\text{M}$  Acetyl-Coenzym A, 940  $\mu\text{M}$  Luziferin, 1,06 mM ATP) bei einer Wellenlänge  $\lambda = 562 \text{ nm}$  aufgezeichnet.

## **2.2.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden**

### **2.2.2.1 Kultivierung von Suspensionszellen**

Suspensionszellen (Jurkat und Jurkat TAg) wurden bis zu einer Dichte von ca.  $5 \times 10^5/\text{ml}$  in RPMI (modifiziert, 1.7.2) in einer Atmosphäre mit 95% Luftfeuchtigkeit und 5 %  $\text{CO}_2$  bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Das Umsetzen der Zellen erfolgte durch Verteilung der Zellen in gewünschten Dichten auf neue Kulturgefäße. Die verwendeten Zellkulturgefäße waren durch Gammabestrahlung sterilisierte Kulturflaschen, Kulturschalen oder Zellkulturplatten verschiedener Firmen (Falcon, Renner, Greiner, Becton&Dickinson u.a.).

### **2.2.2.2 Kultur von adhärent wachsenden Zelllinien**

Adhärent wachsende Zelllinien (alle außer Jurkat/Jurkat TAg) wurden in dem der jeweiligen Zelllinie optimal angepassten Medium (meist DMEM, 1.7.2) kultiviert. Die Zelllinien wurden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Das Umsetzen der Zellen erfolgte durch zweifaches Waschen der Zellen in sterilem PBS mit folgender Inkubation der Zellen mit Trypsin in PBS für fünf Minuten bei 37°C. Zu den abgelösten Zellen wurde anschließend FCS-haltiges Medium gegeben und die Zellen ggf. durch Zentrifugation pelletiert. Danach wurden die Zellen in der gewünschten Dichte in Medium aufgenommen und ausgesät.

Die verwendeten Zellkulturgefäße waren durch Gammabestrahlung sterilisierte Kulturflaschen, Kulturschalen oder Zellkulturplatten verschiedener Firmen (Falcon, Renner, Greiner, Becton&Dickinson u.a.).

### **2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Das Einfrieren erfolgte in verschiedenen Kühlstufen. Jeweils  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO, 4°C) aufgenommen und in Cryo Röhrchen (Nalgene) überführt. Die Zellen wurden für 10 Minuten auf 4°C gekühlt und nach einer Lagerung bei -80°C von 24 Stunden bis maximal 1 Woche wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte dagegen zügig bei 37°C im Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden einmal in vorgewärmtem Medium gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen und ausgesät.

### **2.2.2.4 Transfektion von Zellen**

Die Transfektion eukaryontischer Zellen wurde nach unterschiedlichen Verfahren durchgeführt. Dabei war es von der zu transfizierenden Zelllinie abhängig, welches Verfahren zur Anwendung kam.

#### **2.2.2.4.1 Transfektion von Suspensionszellen mittels Elektroporation**

Bei der Elektroporation setzt man die Suspensionszellen in Gegenwart der zu transfizierenden Plasmid-DNA kurzzeitig einer hohen Spannung aus, wodurch die Zellmembran für DNA durchlässig wird.

$2 \times 10^7$  Jurkat T-Zellen wurden pro Transfektionsansatz einmal mit serumfreien RPMI Medium gewaschen und dann in je 375  $\mu$ l serumfreien RPMI Medium resuspendiert. Vorgelegt wurde die gewünschte DNA, je nach Ansatz zwischen 5 und 30  $\mu$ g. Dieser Ansatz wurde dann in eine Gene Pulser<sup>®</sup> Küvette (Bio-Rad, 0,4 cm) überführt. Anschließend erfolgte ein Stromstoß in einem Gene Pulser<sup>®</sup> II (Bio-Rad) bei 250 Volt, 950  $\mu$ F für 20 bis 35 ms. Die Zellen wurden danach direkt in vorgewärmten RPMI Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt. Die Analyse erfolgte nach einer 20 bis 48 stündigen Inkubation.

#### **2.2.2.4.2 Transfektion adhärenter Zellen mittels SuperFect<sup>®</sup> oder Polyfect<sup>®</sup> Reagenz**

Adhärenente Zellen wurden vorzugsweise mit dem SuperFect<sup>®</sup> Reagenz Firma Qiagen bzw. Polyfect<sup>®</sup>, ebenfalls Qiagen, transfiziert. Beide Verfahren beruhen darauf, dass durch die sphärische Struktur eines aktivierten Dendrimer die terminalen, geladenen Aminosäuren mit der DNA einen Komplex bilden. Dieser Komplex kann dann an negativ geladene Oberflächenstrukturen der Zellen (z.B. Rezeptoren) binden und die DNA kann endosomal von der Zelle aufgenommen werden. Dabei inhibiert SuperFect<sup>®</sup> beziehungsweise PolyFect<sup>®</sup> die lysosomalen Nukleasen.

Die Transfektion wurde analog zu den mitgelieferten Protokollen durchgeführt. Bei der SuperFect<sup>®</sup> Transfektion wurde, in Abweichung zu den Protokollen, pro  $\mu$ g DNA 45  $\mu$ l Serumfreies Medium und 5  $\mu$ l SuperFect<sup>®</sup> verwendet. Wichtig bei beiden Transfektionreagenzien ist der 10 sekundige Vortexschritt nach Zusammenbringen von DNA, Medium und SuperFect<sup>®</sup>/PolyFect<sup>®</sup>.

Sollte die Transfektion zur Etablierung stabiler Linien dienen, wurden die Zellen direkt nach dem Mediumwechsel (3 Stunden nach Transfektion) unter Selektionsdruck, z.B. durch G418, gesetzt.

#### **2.2.2.4.3 Transfektion adhärenter Zellen mittels Lipofectamine<sup>®</sup> Reagenz**

Lipofectamine<sup>®</sup> (Gibco Life Technologies) ist ein 3:1 Formulierung aus DOSPA und DOPE. Die Kombination beider Stoffe mit DNA führt zu einer Komplexierung und ermöglicht die Aufnahme der DNA durch die Zellen.

Die Transfektion wurde wie in den mitgelieferten Protokollen beschrieben durchgeführt. Ein Mediumwechsel wurde, abhängig von der Zelllinie, nach 4 bis 6 Stunden vorgenommen.

#### **2.2.2.4.4 Transfektion adhärenter Zellen mittels FuGENE6<sup>™</sup> Reagenz**

Sollten Zelllinien mit den anderen Transfektionsreagenzien nicht oder nur in einem geringen Maße transfizierbar sein, wurde die Transfektion mit FuGENE6<sup>™</sup> (Roche) durchgeführt. FuGENE6<sup>™</sup> ist ein Multi-Komponenten, lipid-basierendes Transfektionsreagenz, welches DNA komplexiert und somit Zellen transfizieren kann. Die Transfektionen wurden analog zu den mitgelieferten Protokollen durchgeführt.

#### **2.2.2.5 Etablierung stabiler Zelllinien**

Für die stabile Transfektion wurden die Zellen direkt nach der Transfektion unter Selektionsdruck durch G418 gesetzt (Hela: 750 µg/ml, U2OS: 800 µg/ml, H1299: 500 µg/ml). Dadurch konnten nur positiv transfizierte Zellen, die das entsprechende Plasmid mit Resistenzgen aufgenommen haben, überleben. Nach 10 Tagen wurden die stabilen Zellen klonal gesetzt (96well Platte, in verschiedenen Verdünnungen), gefärbt (Kolonie-Formierungs Assay) oder durch Western Blot analysiert.

Positiv getestete stabile Zelllinien wurden auch weiterhin unter Selektionsdruck gehalten und expandiert.

#### **2.2.2.6 Lyse von Zellen**

Zur Vorbereitung der Analyse von Proteinen in einem Western Blot wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen und dann in einem eiskalten Lysepuffer (NP40, Totex oder RIPA, siehe 2.1.11) aufgenommen. Die Lyse verlief bei 4°C für 30 Minuten.

Alternativ wurden Zellen nach zweifacher PBS Inkubation direkt mit 1xSDS Probenpuffer oder 8M Harnstoff, 100mM Tris-HCL, pH 7,5 in PBS lysiert. Darauf erfolgte eine Sonifikation mit Ultraschall, um chromosomale DNA zu zerkleinern.

#### **2.2.2.7 Messung von Zellzyklus Parametern mittels Durchflußzytometrie**

Zellen haben zu einer gegebenen Zellzyklusphase einen definierten DNA Gehalt. Damit lässt sich über die DNA ein Rückschluss auf die Verteilung von Zellen innerhalb des Zellzyklus treffen.

Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen und dann mit 0,25% Trypsin von den Zellkulturgefäß abgelöst. Nach einer vorsichtigen Zentrifugation wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und unter Schütteln tropfenweise zu 1,2 ml eiskalten 70% Ethanol gegeben. Nach dieser Fixierung wurden die Zellen bei -20°C gelagert.

Die fixierten Zellen wurden schonend abzentrifugiert und das Ethanol entfernt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS klumpenfrei aufgenommen. 15 bis 30 Minuten vor der Analyse wurde Propidiumiodid (f.c. 0,05 mg/ml) zugefügt.

#### **2.2.2.8 Sortierung von Zellen im FACSvantage**

Die Anreicherung transfizierter Zellen erfolgte durch Zellsortierung im FACSvantage. Hierzu wurden Hela oder U2OS Zellen mit den entsprechenden Konstrukten und einem GFP Leervektor (Verhältnis 10:1) transfiziert. 30 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen gewaschen, gefiltert und auf Eis gelagert. Die Zellen wurden dann in dem FACSvantage auf positive GFP Signale sortiert und in einer definierten Dichte für die <sup>3</sup>H-Thymidine Inkorporationsanalysen oder MTT Assays in 96well Zellkulturplatten ausgesät.

#### **2.2.2.9 Immunfluoreszenz Analysen**

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde die intrazelluläre Lokalisation verschiedener Proteine bestimmt. Hierzu wurden Zellen auf Deckgläser (18mm, rund, Langenbrick) ausgesät. Die Deckgläser wurden vorher mit 70% Ethanol sterilisiert und in 12well

Zellkulturplatten überführt. Nach einem Waschschrift mit sterilen PBS wurde Medium mit den Deckgläsern inkubiert. Vor dem Aussäen der Zellen wurde dieses Medium durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 40-60% ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen ggf. transfiziert oder behandelt. Nach entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen mit einem 1:1 Gemisch aus Aceton/Methanol (-20°C) für 45 Sekunden fixiert. Alternativ erfolgte die Fixierung in frisch angesetzten 4% Paraformaldehyd, 0,1% Triton X100 in PBS. Nach der Aceton/Methanol Fixierung wurden die Zellen getrocknet und mit PBS rehydriert. Alle weiteren Schritten wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und alle Lösungen/Antikörper in PBS angesetzt. Bei beiden Fixierungsprotokollen folgte nun ein Block Schritt mit 10%igen Ziegen Serum für 20 Minuten. Dies führt zur Unterdrückung unspezifischer Signale. Danach erfolgte die Inkubation mit entsprechenden Primärantikörpern (0,1 µg/ml bis 2 µg/ml) für 45 Minuten. Nach zwei PBS Waschschriften erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz Farbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (5 µg/ml bis 30 µg/ml) für 30 Minuten. Nach einem erneuten PBS Waschschrift wurde die chromosomale DNA mittels DAPI oder Hoechst 33342 (bisBenzimide, 1 µg/ml) für 15 Minuten markiert. Danach erfolgten drei je 10 minütige PBS Waschschriften. Die Deckgläser wurden dann aus den Zellkulturplatten geholt und mit der Zellseite nach unten auf 40 µl gewärmter KAISERS Glyceringelantine (Merck) auf Objektträger gelegt und leicht angedrückt. Die Präparate wurden dann für mindestens 1 Stunde zum Aushärten bei 4°C gelagert. Überschüssige Gelantine wurde dann mit 70% Ethanol entfernt und die Präparate in Boxen bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

Sollte die DNA mit Propidiumiodid gefärbt werden, wurde alternativ nach der Inkubation des 2. Antikörpers und waschen mit PBS die Zellen in einem 1:5 Gemisch von Vectashield<sup>®</sup> mit PI (Linaris) und KAISER Glyceringelantine eingedeckelt und dann wie oben beschrieben weiter behandelt.

Wurden Konstrukte mit intrinsischer Aktivität (eGFP,eYFP,eCFP,eBFP,dsRED o.ä.) verwendet, so wurden die Zellen nach entsprechenden Zeiten fixiert und ggf. wie oben beschrieben mit DAPI gefärbt. Die Zellpräparate wurden dann ebenfalls mit KAISERS Glyceringelantine auf Objektträgern fixiert und entsprechend gelagert.

Die Analyse der Präparate erfolgte mit einem AxioPlan2 Fluoreszenz Mikroskop und die Aufnahme mit einer digitalen AxioCam (beides Zeiss) und entsprechender Software. Die Weiterverarbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop Version 5.0.

#### **2.2.2.10 Konfokale Mikroskopie**

#### **2.2.2.11 Lebendzellbeobachtung am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop**

Zur Lebendzellbeobachtung wurden die Zellen auf 5 cm Runddeckgläsern ausgesät und in eine Lebendbeobachtungskammer eingebracht. Daraufhin wurden sie mit 3 ml DMEM/FCS/PenStrep ohne Phenolrot am Mikroskop bei 37° C und unter 5 % CO<sub>2</sub>-Zufuhr inkubiert. Der Verzicht auf die Zugabe von Phenolrot ist wichtig, da dieser Farbindikator eine Eigenfluoreszenzanregung besitzt, die bei der Detektion der Fluoreszenzemission von EGFP und EGFP-Fusionsproteinen in lebenden Zellen störend wirkt.

#### **2.2.2.12 Detektion der eGFP-Fluoreszenz in lebenden Zellen am Leica TCS SP2**

Als Anregungswellenlänge für eGFP wurde die Wellenlänge 488 nm des Argon-Ionen-Lasers gewählt. Nach Auswählen einer geeigneten Farbtabelle wurden Laserintensität und Empfindlichkeit des PMT so eingestellt, dass das aufzunehmende Signal gerade gut sichtbar war. Dabei wurde der volle Dynamik des PMT (8 oder 12 bit) ausgenutzt und die Laserintensität so gering wie möglich gehalten. Die Fluoreszenzanregung erfolgte unter Verwendung des RSP500, der Wellenlängen unter 500 nm zur Anregung durchläßt und Wellenlängen über 500 nm reflektiert. Die Detektion der Emission wurde zwischen 505 und 540 nm festgelegt.

#### **2.2.2.13 Aufnahme von schnellen Bewegungsvorgängen innerhalb der Zelle**

Sollten unter Einbezug des Zeit-Parameters (t) 3D-Aufnahmen gemacht werden, um schnelle Bewegungsabläufe innerhalb einer Zelle bzw. eines Zellkerns zu untersuchen und zu analysieren, so wurden die Aufnahmeparameter entsprechend darauf abgestimmt. Das Aufnahmeformat wurde auf 256x256 Pixel beschränkt, da die Zeit, die

der Scannkopf des Mikroskops für den Scan einer einzelnen konfokalen Ebene benötigt von der Anzahl der zu scannenden Bildzeilen abhängt. Entsprechend wurde die Scan-Geschwindigkeit auf 1000 Hz erhöht. So wird für den Scan eines Bildes im Format 256x256 Pixel nur die Hälfte der Zeit benötigt, die für ein Bild im Format 512x512 Pixel mit der gleichen Scan-Geschwindigkeit benötigt würde. Der verwendete Zoom-Faktor wurde in Abhängigkeit vom jeweilig benutzten Objektiv gewählt. Mit dieser Einstellung konnte zum Beispiel ein 256x256 Pixel großer Bildausschnitt bei 21 aufzunehmenden optischen Ebenen und einer Scan-Geschwindigkeit von 1000 Hz in 8 s 711 ms aufgenommen werden. Die übrigen Hardware-Parameter wurden wie bereits beschrieben eingestellt. Der Abstand zwischen den zu scannenden optischen Ebenen wurde stets auf 300 nm eingestellt. Bei Aufnahmen mitotischer Zellen, die bei einem z-Abstand von 300 nm sehr viele konfokale Schnittebenen erfordern würden, wurde der Abstand auf 500 nm vergrößert.

#### **2.2.2.14 Aufnahme von langsameren Prozessen innerhalb der Zelle**

Für Beobachtungen, die eine größere Zeitspanne zwischen den einzelnen Aufnahmen erlaubten (2-30 min), wurden die Aufnahmeparameter so gewählt, daß eine bessere optische Auflösung möglich war. Es wurde das Bildformat 512x512 Pixel, eine Scan-Geschwindigkeit von 400 oder 800 Hz und ein vom verwendeten Objektiv abhängiger Zoom-Faktor eingestellt. Der z-Abstand zwischen den optischen Ebenen betrug meist 300 nm, für die Aufnahme von mitotischen Zellen wurde der Abstand auf 500 nm erhöht. Die Laserintensität und PMT-Einstellungen wurden wie in 2.2.2.12 beschrieben eingestellt.

#### **2.2.2.15 Synchronisation von Zelllinien**

Eine Synchronisation von Zellen (Hela, NIH3T3, U2OS, MEFs, H1299 u.a.) wurde durch verschiedene chemische Substanzen erreicht.

Zellen wurden in geeigneten Zellkulturgefäßen ausgesät und mit 2 mM Thymidine (Sigma) für 12 Stunden vorsynchronisiert. Nach Lösen des Thymidine Blocks durch mehrfaches Waschen mit PBS und Zugabe frischen Mediums wurden die Zellen 4-8

Stunden später für 4 Stunden mit 0,04 mg/ml Nocodazol in der Prometaphase geblockt. Durch einen mitotischen Shake-off mit anschließendem Waschen und Ausplattieren konnten die Zellen synchronisiert in der G1 Phase analysiert werden. Die prozentuale Menge der synchronen Zellen wurde mittels FACS und Western Blot überprüft und betrug bei dieser Methode durchschnittlich 90-95%.

Um synchrone Zellen in der S Phase zu untersuchen, wurde nach einem 17 stündigen Thymidine Block und einem 9 stündigen Release die Zellen erneut mit 2 mM Thymidine für 15 Stunden an dem Übergang von G1 zur S Phase arretiert. Nach Aufhebung des Blockes konnten die Zellen dann in der S Phase analysiert werden. Auch hierbei wurde das Maß der Synchronität mit FACS und Western Blot geprüft. Die Zahl der in der S Phase synchronen Zellen lag bei etwa 90%.

NIH 3T3 Zellen wurden in der G0 Phase durch eine 36 stündige Inkubation in einem Medium synchronisiert, welches nur 0,5% FCS enthielt. Durch Ersetzen des Mediums mit 10% FCS traten die Zellen synchron in die G1 Phase ein.

### **2.2.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden**

#### **2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen**

Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) werden Proteinproben durch ein 3%iges Acrylamid-Sammegel und ein 7,5%-15%iges Acrylamid-Trenngel der Größe nach aufgetrennt.

Durch die Verwendung von SDS (Natriumdodecylsulfat) sowohl in Auftragspuffer als auch im Acrylamidgel und während des Aufkochens der Proben werden die Proteine denaturiert. Bei der Auftrennung migrieren kleinere Proteine daher schneller als größere, unabhängig von ihrer Nettoladung.

Die Formulierung der Acrylamidgele ist in 2.1.11 angegeben. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol (2-Propanol) überschichtet, welches nach Polymerisation des Gels mit Wasser weggespült wurde. Nach Gießen des Sammelgels wurde ein Probenkamm in die Flüssigkeit geschoben. Dies ermöglichte nach Polymerisation das Auftragen der Proteinproben in 1xSDS-Probenpuffer. Die Proben wurden dann 5 Minuten bei 95°C, ggf. unter Schütteln, aufgekocht. Bei jedem Lauf

wurde parallel ein vorgefärbter Molekulargewichtsstandard aufgetragen, der eine spätere Größenabschätzung eines Signals ermöglichte. Das Einlaufen in das Sammelgel erfolgte bei 90 V, die Auftrennung im Trenngel bei 120-150 V.

### **2.2.3.2 Westernblot und Immundetektion**

Nach elektrophoretischer Auftrennung eines Proteingemisches in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine in einem „Semidry“-Transferblot auf eine Polyvinylidendifluoriden (PVDF) Membran (Immobilon™, Millipore) transferiert und hier immobilisiert. Hierzu wurde die PVDF Membran mit Methanol aktiviert und die Platinelektroden der Blotapparatur mit Transferpuffer benetzt. Auf die Kathode wurden nun 2 in Transferpuffer getränkte Gelblotpapiere (GB004, Schleicher&Schüll) gelegt und die Luftblasen entfernt. Hierauf wurde die aktivierte und in Transferpuffer gewaschene Membran gelegt. Nun kam das SDS-Page, gefolgt von einem weiteren Gelblotpapier. Die Apparatur wurde zusammengebaut und der Blot erfolgte bei 10 Volt für 15 Minuten und 15 Volt für 60 Minuten. Die Blot Effizienz konnte anhand des Transfers des Größenstandards überprüft werden.

Die Membran wurde kurz mit TBS-Tween gewaschen und die unspezifischen Bindestellen mit einer 1 stündigen Inkubation in 5% (w/) Magermilchpulver/TBS-Tween bei 4°C abgesättigt. Danach wurde die Membran mindestens 2 Stunden mit dem Primärantikörper (1:1000 bis 1:3000 in 2%Magermilch/TBS-Tween) bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach fünf 5 minütigen Waschschritten mit TBS-Tween erfolgte die Zugabe eines Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers (1:2000 bis 1:5000 in 0,5% Magermilch/TBS-Tween). Nach erneutem Waschen konnten die Proteine durch eine Chemolumineszenz Reaktion (ECL-Kit, Perkin Elmer oder SuperSignal® West Femto, Pierce) sichtbar gemacht werden und Röntgenfilme diesem Signal exponiert werden.

### **2.2.3.3 Coomassie Färbung, Radioaktive Gelelfs**

Sollten Proteine direkt im Acrylamidgel sichtbar gemacht werden, wurden die Gele nach erfolgter Auftrennung 30 Minuten in einer Fixierlösung (10% Essigsäure, 20%

Methanol) geschwenkt, und dann mit einer Färbelösung (10% Essigsäure, 20% Methanol, 0,1% Coomassie-Brilliantblau (Serva)) behandelt. Nach einer 20 minütigen Inkubation wurde das Gel bis zum gewünschten Entfärbegrad mit Entfärbelösung (20% Essigsäure, 30% Methanol) gewaschen. Häufig fand diese Methode Anwendung bei der Mengenabschätzung, z.B. nach einer GST-Aufreinigung.

Wurden mit einem SDS-PAGE radioaktive Proben aufgetrennt, wie  $^{32}\text{P}$ -markierte Proben nach einem Kinase Assay oder  $^{35}\text{S}$  markierte Proteine nach einer in vitro Translation, so wurden diese Gele ebenfalls durch Inkubation mit der Fixierlösung behandelt. Danach erfolgte bei  $^{35}\text{S}$  markierten Proteinen noch eine 20 minütige Verstärkung (Amplify, Amersham).

Anschließend wurden alle Coomassie oder Radioaktivgele bei  $70^\circ\text{C}$  vakuumgetrocknet.

#### **2.2.3.4 Immunpräzipitation aus Zellkulturzellen**

Die Immunpräzipitation erlaubte es, spezielle zelluläre Proteine durch den Einsatz von spezifischer Antikörper zu präzipitieren. Dabei diente diese Technik zur Aufkonzentration der präzipitierten Proteine oder zur Analyse von kopräzipitierenden Proteinen. Die Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen und dann in einem geeigneten Volumen eines entsprechenden Lysepuffer (2.1.11) aufgenommen. Die Lyse erfolgte für 30 Minuten auf Eis.

Nach einer Zentrifugation (13.000 rpm, 10 Minuten,  $4^\circ\text{C}$ ) wurde der geklärte Überstand mit 1-2  $\mu\text{g}$  unspezifischen, isotypspezifischen Kontrollantikörper (IgG) für eine Stunde im Kühlraum auf einem Rolltaumler inkubiert. Die Kontrollantikörper wurden mit 25  $\mu\text{l}$  Protein A/G-Agarose für eine Stunde im Kühlraum unter sanften Schütteln präzipitiert. Hierauf wurde der Ansatz zentrifugiert (13.000 rpm, 1 Minuten,  $4^\circ\text{C}$ ), der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 1-2  $\mu\text{g}$  spezifischen Antikörper wieder im Kühlraum inkubiert.

Die Agarose Kugeln wurden fünf mal mit 800  $\mu\text{l}$  des verwendeten Lysepuffers gewaschen, trocken gelegt und in 25  $\mu\text{l}$  1x SDS für 4 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  unter Schütteln aufgeköcht und bis zur Analyse bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Dem Überstand wurden zwei Stunden später 25  $\mu\text{l}$  Protein A/G- Agarose hinzugefügt und für mindestens weitere 4 Stunden präzipitiert.

Die Agarose wurde dann ebenfalls fünf mal mit 800 µl des verwendeten Lysepuffers gewaschen und die Proben trocken gelegt. Die Proben wurden dann mit 25 µl 1x SDS für 4 Minuten bei 95°C unter Schütteln aufgeköcht. Die Analyse erfolgte auf einem 8,5-15% SDS-PAGE, wobei 10%-20% der Lyse, die IgG Kontrolle und der Präzipitationsansatzes aufgetragen wurden.

Wenn für die Präzipitation / Detektion des endogenen Proteins keine geeigneten Antikörper zur Verfügung standen, konnten transfizierte, also exogen exprimierte Proteine mittels Epitop-Markierungen (Flag, Myc, HA, GFP) präzipitiert und analysiert werden.

#### **2.2.3.5 *In vivo* <sup>35</sup>S-Markierung von Proteinen zur Bestimmung ihrer Halbwertszeit**

Um die Halbwertszeit von endogenen oder exogenen Protein zu bestimmen, wurden Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in einem Medium inkubiert, welches sich von dem Standardmedium durch das Fehlen von Methionin und Cystein unterschied. Daraufhin wurden die beiden fehlenden Aminosäuren als <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein markierte Aminosäuren supplementiert. Dies führte zu einem Einbau der Aminosäuren in neu gebildete Proteine, wodurch diese Proteine radioaktiv markiert wurden. Nach einer einstündigen Inkubation wurde das Medium mit den radioaktiven Aminosäuren nach mehrfachen Waschen mit sterilen PBS durch normales Medium ersetzt. Nach den in den Versuchen angegebenen Zeiten wurden die Zellen lysiert und das untersuchte Protein mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Die Präzipitate wurden dann auf einem SDS-Page aufgetrennt, das Gel fixiert, verstärkt und getrocknet (2.2.3.3) und dann Röntgenfilme exponiert.

#### **2.2.3.6 Kinaseaktivitätsbestimmung mittels <sup>32</sup>P Substratmarkierung**

Bei dieser Methode ist es möglich, die Kinaseaktivität in einem *in vitro* Test zu bestimmen. Dabei wird ein radioaktiv markiertes Phosphor durch die Kinase an ein Substratprotein gekoppelt. Nach dieser Kinasierung kann der Phosphorylierungszustand des Substrates durch eine Autoradiographie analysiert werden.

Für diesen Test wurden Zellen zur Analyse endogener Kinaseaktivität lysiert, oder mit entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert und entsprechend später lysiert. Alternativ wurden in manchen Kinasetests die Kinase durch *in vitro* Translation hergestellt. Bei zellulärer Expression wurde die zu untersuchende Kinase mit Hilfe spezifischer Antikörper aus dem Lysat und bei *in vitro* Translation aus dem Translationsansatz immunopräzipitiert. Nach drei Waschschritten mit Lysepuffer wurde die Präzipitate durch zweimaliges Waschen mit Kinasepuffer (20 mM HEPES pH 7,45, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM β-Glycerophosphat, 2 mM Dithiothreitol, 0,1 mM Orthovanadat) für die anschließende Kinasereaktion vorbereitet. Dazu wurden die an die Sepharose-Kügelchen gekoppelten Antikörper-Protein Komplexe schließlich vorsichtig trockengesaugt.

Die zu untersuchenden Substrate, wie das rekombinant hergestellte Substratprotein MBP (myelin basic protein, Upstate Biotechnology) oder bakteriell expremierte und aufgereinigte Proteine (GST-SIAH-1, GST-p53, je etwa 2 µg) wurden nun in der eigentlichen Kinasereaktion in der Gegenwart von 5 µCi γ-<sup>32</sup>P-Adenosintriphosphat (NEN) und 20 µM nicht radioaktiven ATP durchgeführt. Die Kinasereaktion wurde typischerweise in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl bei 30°C für 20 Minuten durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS Probenpuffer unter Aufkochen beendet. Der Phosphorylierungsstatus der Substrate wurde anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert.

### 2.2.3.7 Expression und Aufreinigung GST-markierter, rekombinanter Proteine

Die Fusion eines Proteins an Glutathion-S-Transferase (GST) ermöglicht die Expression in geeigneten Bakterienstämmen. Nach Expression der GST-Fusionsproteinen können diese mittels Präzipitation durch reduzierten Glutathion aus Bakterienlysaten präzipitiert werden.

Verwendet wurden pGEX-SIAH1 (komplett), GST-SIAH1 ΔN(Aminosäure 125-333) und GST-SIAH1 ΔC (Aminosäure 1-125)

Diese Plasmide wurden in *E.coli* BL21 (DE3) transformiert und die Übernachtskultur 1:10 mit Antibiotika haltigen LB-Medium verdünnt.

Nach 3 Stunden wurde die Expression der GST-Proteine durch die Zugabe von IPTG (finalen Konzentration 400  $\mu\text{M}$ ) induziert. Während der nächsten 4 Stunden wurden die Bakterien bei 30°C weiter hochgeschüttelt. Während dieser Zeit exprimierten die Bakterien die Fusionsproteine und die verringerte Temperatur begünstigt die dabei Produktion der rekombinanten Proteinen.

Nach den vier Stunden wurden die Bakterien pelletiert und in PBS aufgenommen. Nach Hinzufügen von Lysozym erfolgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Diesem Lysat wurde Triton X-100 (finale Konzentration 1% v/v) zugefügt und dann ultrabeschallt. Nach einer Pelletierung der unlöslichen Bestandteile wurde der Überstand für 1 Stunde bei 4°C mit equilibrierten Glutathion-Sepharose inkubiert und die GST-Fusionsproteine präzipitiert.

Die präzipitierten GST-Fusionsproteine wurden in vier Elutionsschritten in je 300  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer (8 mM reduziertes Glutathion 20 mM Tris pH 7,5) abgetrennt. Die eluierten GST-Fusionsproteine wurden durch Dialyse gegen 20 mM HEPES pH 7,5 von Glutathion abgetrennt, aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Konzentration und Reinheit einzelner Aliquots wurden dann mit Hilfe verschiedener Albumin Mengenstandards auf einem Coomassie gefärbten SDS-Page analysiert.

### 2.2.3.8 GST-Pull Down Experimente

Die gereinigten GST Proteine wurden entweder für *in vitro* Kinasetests als Substrat eingesetzt, oder die Bindungsfähigkeit mit anderen Proteinen oder Peptiden in einem GST-Pull Down Experiment bestimmt.

Bei diesem Experiment wurden unter geeigneten Pufferbedingungen (2.1.11) 5  $\mu\text{g}$  GST-markiertes Protein und z.B. *in vitro* translatierte  $^{35}\text{S}$ -markiertes Protein zusammengebracht. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei sanften Rollern im Kühlraum wurden in GST-Puffer equilibrierte Glutathion Sepharose (30  $\mu\text{l}$  je Ansatz, Amersham Biotech) dazugegeben. Diese binden über das Glutathion an GST und ermöglichen die Präzipitation der GST markierten Proteinen und eventuell kopräzipitierenden  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteinen. Nach einer 3 stündigen Präzipitation unter

Rollern im Kühlraum wurde die Sepharose fünf mal mit 800  $\mu$ l GST-Puffer gewaschen, in SDS Probenpuffer aufgekocht und mit einem SDS-PAGE getrennt. Die Detektion kopräzipitierender Proteine erfolgte je Protein durch Western Blot oder Autoradiographie.

### III. Ergebnisse

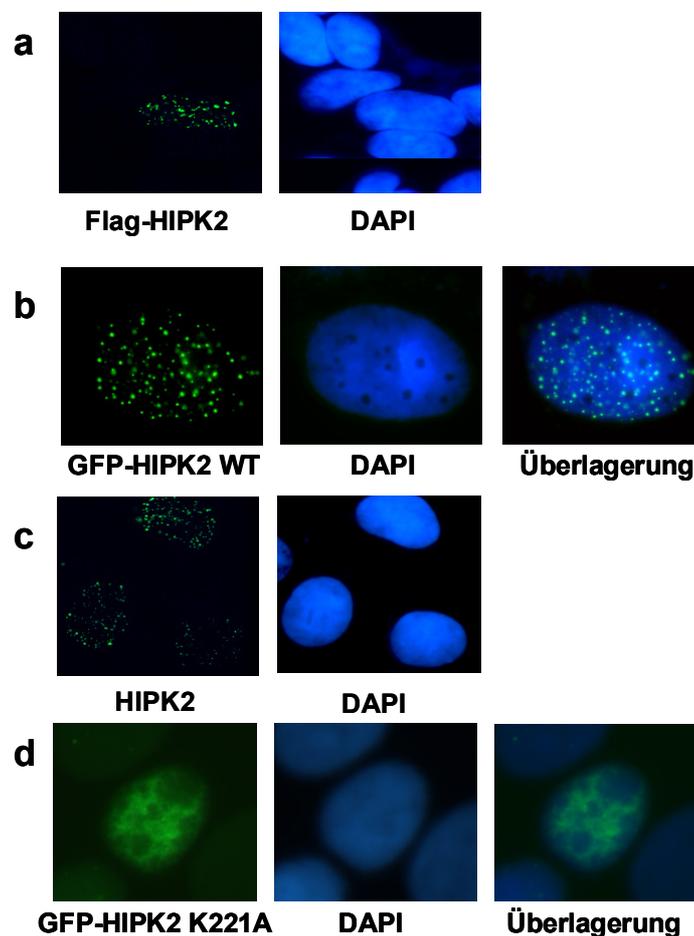
#### 3.1 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von HIPK2

Die Verteilung der endogenen Homeodomänen-Interagierenden Protein Kinase 2 (HIPK2), einer Serin / Threonin Kinase, in verschiedenen Zelltypen ist bislang unbekannt. Daher wurden verschiedenen Zelltypen auf das Vorkommen endogener HIPK2 getestet (Tabelle 1). Hierzu wurden Gesamtproteinextrakte der aufgeführten Zelllinien hergestellt und anhand eines  $\beta$ -Actin Proteinabgleichs standardisiert. Diese Extrakte wurden dann in einer Westernblotanalyse auf das endogene 140 kDa große HIPK2 Protein hin untersucht. U2OS und H1299 Zellen besitzen eine hohe endogene HIPK2 Menge, wohingegen Hela oder Jurkat Zellen eine mittlere Proteinmenge besitzen. C2C12 Zellen besitzen keine endogene HIPK2. In diesen transformierten Zellen ist kein Zusammenhang zwischen der Herkunft der Zellen und der HIPK2 Proteinmenge zu erkennen.

Zelllinie	HIPK2 Proteinmenge
293 bzw. 293T	-
C2C12	-
HS27	+
Jurkat Wildtyp bzw Jurkat TAg	++
Hela	++
H1299	+++
U2OS	+++

**Tabelle 1.** Die Proteinmengen von Zellysate verschiedener Zelllinien wurden mit  $\beta$ -Actin abgeglichen. Daraufhin wurden die HIPK2 Proteinmengen bestimmt. - kein HIPK2 Signal detektierbar; + geringe HIPK2 Mengen; ++ mittlere HIPK2 Proteinmengen; +++ sehr hohe endogene HIPK2 Proteinmengen

HIPK2 besitzt drei nukleäre Lokalisationssequenzen (Kim, et al., 1999). Daher sollte die subzelluläre Lokalisation einer exogen exprimierten und der endogenen HIPK2 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine FLAG-markierte Version von HIPK2 in HeLa Zellen exprimiert und anschließend durch FLAG-spezifische Primärantikörper und Farbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper durch Immunfluoreszenz analysiert. Um eine Zuordnung der Färbung zum Nukleus vornehmen zu können, wurde die chromosomale DNA durch DAPI angefärbt. In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Wissenschaftler wurde eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation für HIPK2 gefunden.



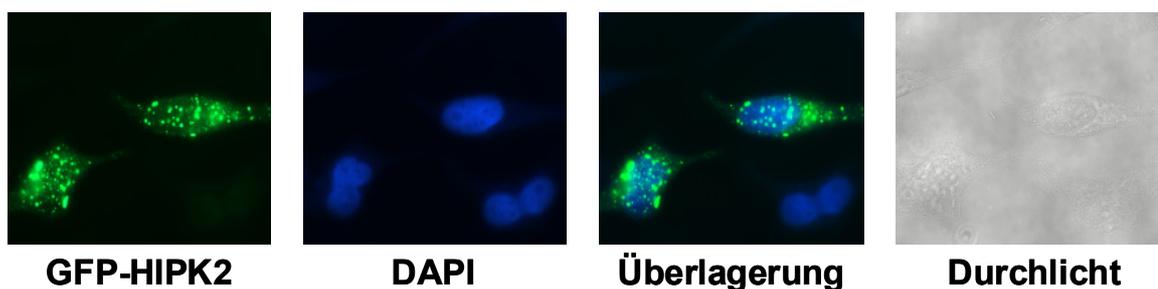
**Abbildung 1. HIPK2 lokalisiert in nukleären Domänen.**

(a) HeLa Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit FLAG-HIPK2 WT transfiziert. 30 Stunden später wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation von FLAG-HIPK2 sichtbar gemacht. (b) U2OS Zellen wurden mit GFP-HIPK2 transfiziert und die Lokalisation durch die intrinsische Fluoreszenz des GFP bestimmt. (c) U2OS Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und die Lokalisation endogener

HIPK2 mittels HIPK2 Antikörpern sichtbar gemacht. **(d)** U2OS Zellen wurden mit einem GFP-HIPK2 K221A Konstrukt transfiziert und der Nachweis erfolgte wie unter (b). Die chromosomale DNA wurde durch DAPI angefärbt.

Innerhalb des Nukleus lokalisierte der überwiegende Teil von HIPK2 in diskreten Kompartimenten, die im Folgenden HIPK2 Domänen genannt wurden. Ein kleiner Teil von HIPK2 wies zudem eine nukleoplasmatische Lokalisation auf (Abbildung 1a). Die Expression einer GFP-markierten HIPK2 wies ebenfalls eine vorwiegende Lokalisation in HIPK2 Domänen mit einem schwächeren nukleoplasmatischen Anteil auf (Abbildung 1b). Damit ist die Lokalisation nicht von dem verwendeten Konstrukt abhängig. Nun wurde die Lokalisation der endogenen HIPK2 in U2OS Zellen untersucht, da diese Zellen relativ viel endogene HIPK2 aufwiesen (Tabelle 1). Die endogene HIPK2 lokalisiert ebenfalls im Zellkern, wo sie neben einem geringen nukleoplasmatischen Anteil überwiegend in HIPK2 Domänen konzentriert ist (Abbildung 1c).

Im Gegensatz zur endogenen und exogenen HIPK2 wies die Expression einer GFP-markierten kinasedefizienten HIPK2 K221A Mutante eine gänzlich andere Lokalisation auf. Sie zeigt keine Konzentration in HIPK2 Domänen und ist diffus im Nukleoplasma verteilt (Abbildung 1d). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Organisation der HIPK2 in HIPK2 Domänen unter anderem von einer intakten Kinasefunktion abhängig ist.

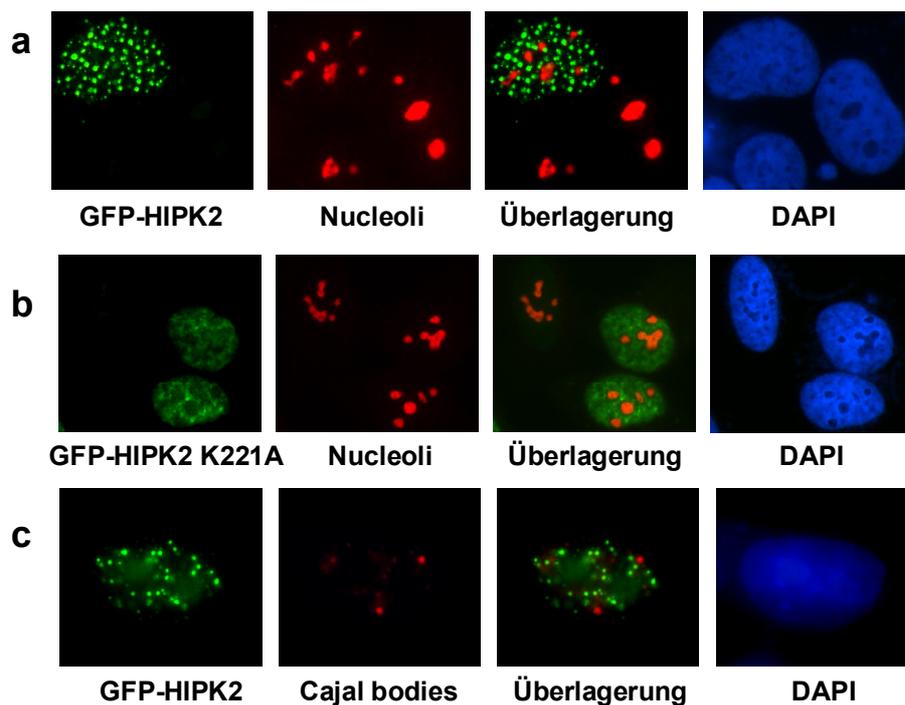


**Abbildung 2. HIPK2 ist in einigen Zellen zusätzlich zytoplasmatisch lokalisiert.**

Hela Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit GFP-HIPK2 transfiziert. 30 Stunden später wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation mittels der intrinsischen Fluoreszenz des GFP bestimmt.

Auffällig bei der Analyse der subzellulären Verteilung von exogener HIPK2 war aber, das einige Zellen ein anderes Färbemuster aufwiesen. Bei diesen wies HIPK2 neben der nukleären auch eine starke zytoplasmatische Verteilung auf (Abbildung 2).

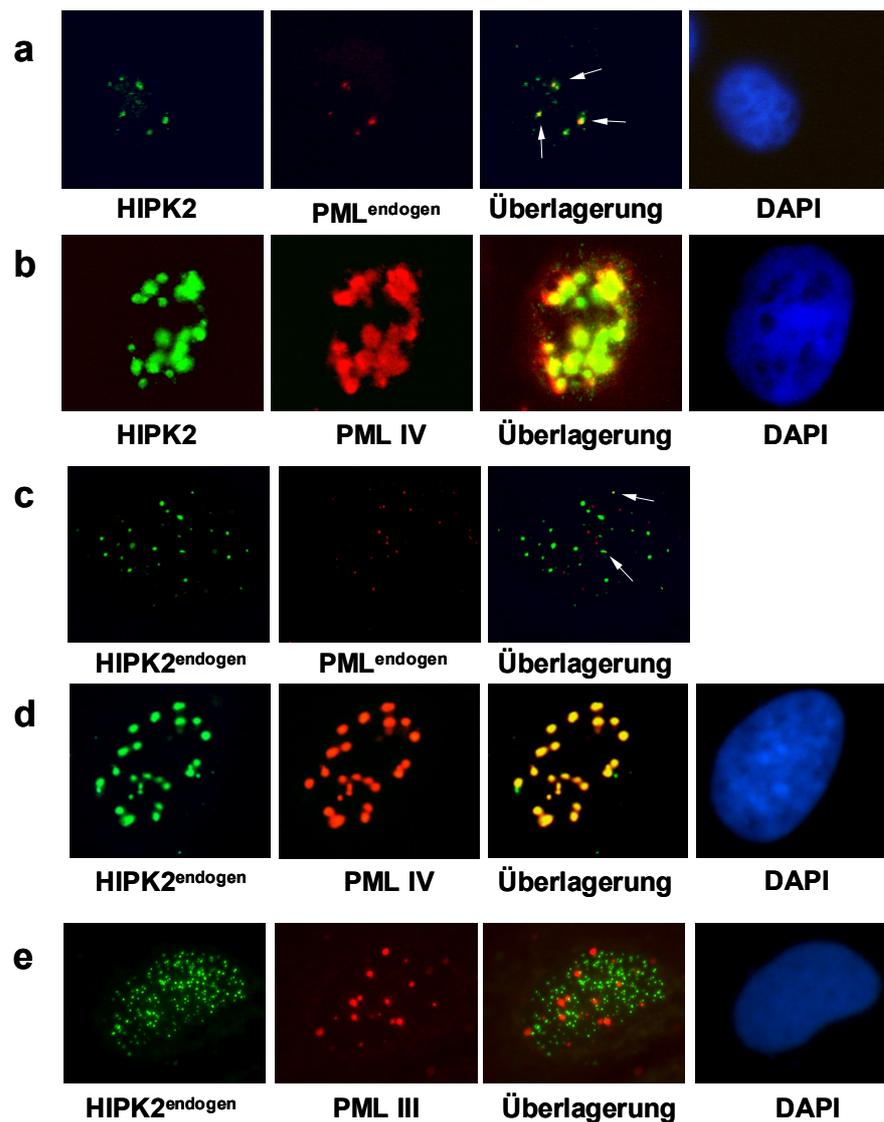
Um eine Zuordnung zu anderen nukleären Kompartimenten vornehmen zu können, wurde die Lokalisation der GFP-HIPK2 mit der von endogener, nukleolären Helicase 61 (NOH61, ZITAT), einem ständigen Bestandteil der Nukleoli, verglichen (Abbildung 3a). In U2OS Zellen konnte für beide Proteine eine Lokalisation in verschiedenen nukleären Subkompartimenten gefunden werden. Da die kinasedefiziente HIPK2 K221A eine vom Wildtyp abweichende Lokalisation aufweist, wurde die Lokalisation dieser HIPK2 Mutante ebenfalls mit der von NOH61 verglichen. Dabei zeigte HIPK2 K221A ebenfalls eine deutliche Aussparung der Nukleoli sowohl in U2OS Zellen, als auch Hela Zellen (Abbildung 3b, Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3. HIPK2 kolokalisiert nicht mit Nucleoli und Cajal-Körpern.**

(a) U2OS Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit GFP-HIPK2 transfiziert. 36 Stunden später wurden die Lokalisation von HIPK2 und NOH61 bestimmt. (b) U2OS Zellen wurden mit GFP-HIPK2 K221A transfiziert und wie unter (a) analysiert. (c) U2OS Zellen wurden mit GFP-HIPK2 transfiziert und die Lokalisation von Coilin und HIPK2 wie unter (a) bestimmt. In allen Fällen wurde die chromosomale DNA mit DAPI sichtbar gemacht.

Der Vergleich der Lokalisation von HIPK2 mit der von Coilin, einem Markerprotein der Cajal-Körper, ergab keine Überlappung der beiden Kompartimente (Abbildung 3c). Ein Vergleich der HIPK2 Domänen mit PML-NBs zeigte für FLAG-markierte HIPK2 eine partielle Kolokalisation mit endogenen PML-Protein (Abbildung 4a). In der Überlagerung kann die Kolokalisation zwischen den beiden Proteinen als gelbe Fluoreszenz erkannt werden. Die kolokalisierenden Bereiche sind zusätzlich mit Pfeilen markiert. Für die PML Splicevariante PML IV wurde eine Rekrutierungsfähigkeit von Proteinen in PML-NBs beschrieben. Eine Koexpression von HIPK2 und PML IV führte zu einer nahezu kompletten Lokalisation von HIPK2 in PML-NBs (Abbildung 4b). Daher sollte nun überprüft werden, ob sich das endogene HIPK2 Protein ähnlich wie das exogene verhält. Hierzu wurde die Lokalisation der endogenen HIPK2 mit der des endogenen PML verglichen. In der Überlagerung der Einzelfluoreszenzen kann eine partielle Kolokalisation zwischen dem endogenen HIPK2 Protein mit PML-NBs erkannt werden (Abbildung 4c). Die Expression von PML IV führte zu einer nahezu kompletten Rekrutierung der endogenen HIPK2 in PML-NBs (Abbildung 4d). Die Verwendung einer anderen PML Splicevariante, PML III, zeigte, dass diese nicht in der Lage war, die endogene HIPK2 signifikant in PML-NBs zu rekrutieren (Abbildung 4e).

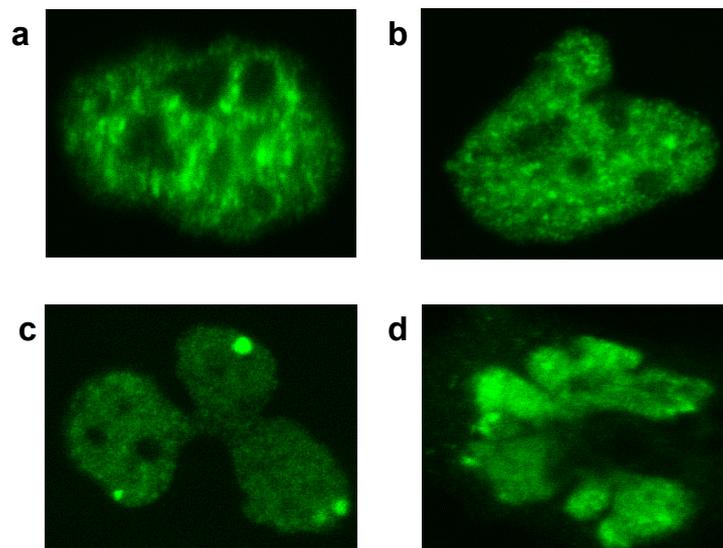


**Abbildung 4. HIPK2 kolokalisiert partiell mit PML-NB und kann durch PML IV quantitativ in PML-NB rekrutiert werden.**

(a) H1299 Zellen wurden auf die Lokalisation von FLAG-HIPK2 und endogenen PML hin untersucht. Dabei ist HIPK2 grün und PML rot gefärbt. Kolokalisation ist in der Überlagerung in gelb zu erkennen und mit Pfeilen markiert. (b) Die Lokalisation von FLAG-HIPK2 und PML IV wurde in H1299 Zellen miteinander verglichen. Die Analyse wurde wie unter (a) beschrieben durchgeführt. (c) In U2OS Zellen wurde die Lokalisation von endogenen HIPK2 und PML in einer Doppelfärbung bestimmt. Wie unter (a) ist dabei HIPK2 (grün) und PML (rot) zu erkennen. In der Überlagerung wurden kolokalisierende Bereiche (gelb) mit Pfeilen hervorgehoben (d) U2OS Zellen wurden mit PML IV transfiziert und endogene HIPK2 und PML IV in einer Doppelfärbung analysiert. (e) U2OS Zellen wurden wie mit PML III transfiziert und wie unter (a) beschrieben detektiert. Die chromosomale DNA wurde in allen Fällen durch DAPI oder Hoechst 33342 sichtbar gemacht.

### 3.2 Die Expression der kinaseninaktiven HIPK2 K221A führt zur Ausbildung von deformierten Zellkernen

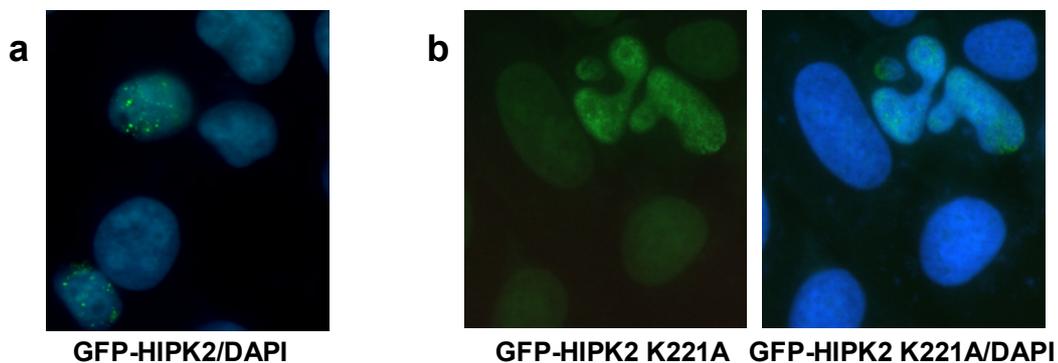
Während HIPK2 zum großen Teil in distinkten nukleären HIPK2 Domänen und zu einem geringeren Teil im Nukleoplasma lokalisiert, ist die kinaseinaktive HIPK2 K221A nur nukleoplasmatisch lokalisiert, ohne eine Konzentration in Domänen zu zeigen (Abbildung 1). Bei der Analyse der HIPK2 K221A transfizierten Zellen konnten einige Zellen mit abgeschnürten oder ausgestülpten Zellkernen gefunden werden (Abbildung 5b). Andere HIPK2 K221A exprimierende Zellen wiesen mehrlappige Strukturen auf. In Abbildung 5c sieht man den Zellkern einer Zelle, der in drei Bereiche unterteilt ist, die untereinander mit dünnen Schläuchen in Verbindung stehen. Wieder andere Zellen zeigten einen stark deformierten, abgeschnürten Zellkern, der in 6 oder mehr Lappen unterteilt ist (Abbildung 5d).



**Abbildung 5. Studien zur Lokalisation von Flag-HIPK2 K221A in HeLa Zellen.**

HeLa Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit einem Flag-HIPK2 K221A Konstrukt transfiziert. Nach 30 Stunden wurden die Zellen fixiert und HIPK2 (grün) durch indirekte Immunfluoreszenz mittels konfokaler Mikroskopie detektiert. Dabei zeigte es sich, dass die Expression von HIPK2 K221A zu Abnormalitäten des Zellkerns führte. **(a)** Normal geformter Zellkern, **(b)** Leichte Deformationen durch Abschnürung einzelner Zellkernbereiche, **(c)** Dreilappiger Zellkern **(d)** Viellappiger Zellkern.

Hela Zellen haben, verglichen mit anderen Zellen, einen mittleren endogenen HIPK2 Proteinanteil (Tabelle 1, Daten nicht gezeigt). Nun war es wichtig auszuschließen, dass die beobachteten Effekte nicht auf einer Interaktion mit den in Hela Zellen vorhandenen viralen Papillomvirusproteinen E6 und E7 oder auf ein Artefakt des Flag-HIPK2 K221A Konstruktes beruhten. Daher wurde die Ausbildung der aberanten Kernstrukturen in anderen Zelllinien mit anderen HIPK2 K221A Konstrukten überprüft. U2OS Zellen wurden mit einem GFP-markierten HIPK2 Wildtyp bzw. K221A Konstrukt transfiziert und nach 24 Stunden die Lokalisation der Proteine und die Kernform bestimmt. Diese Experimente zeigten auch für U2OS Zellen die Ausbildung deformierter Zellkerne (Abbildung 6b). Analog zu den Beobachtungen in Hela Zellen zeigten einige U2OS Zellen kleine Abschnürungen des Zellkerns, während bei anderen der Zellkern in zwei fast gleich große Teile, die mit einem Schlauch in Verbindung standen, geteilt war. In etwa 10 % der Zellen konnte die in Abbildung 6b erkennbare Abtrennung eines Zellkernteils beobachtet werden.

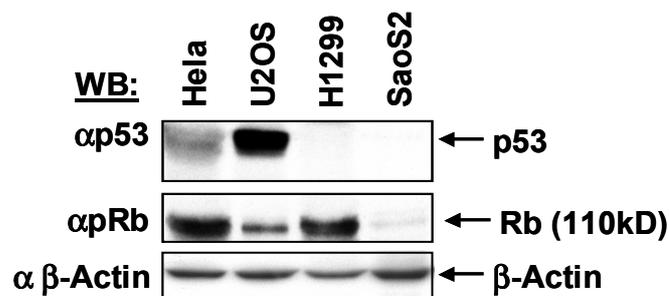


**Abbildung 6. Deformation von U2OS Zellkernen durch HIPK2 K221A Expression.**

U2OS Zellen wurden mit einem GFP-HIPK2 WT (a-c) oder GFP-HIPK2 K221A (d-e) Konstrukt transfiziert und 24 Stunden später die intrinsische Fluoreszenz des GFP (grün) detektiert. Chromosomale DNA (blau) wurde durch DAPI Färbung markiert.

HIPK2 kolokalisiert und interagiert funktionell mit dem Tumorsuppressorprotein p53 (Abbildung 9). Ebenfalls in den p53-negativen H1299 Zellen konnten deformierte Zellkerne beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Da die PML-NBs neben dem p53 Protein auch den Zellzyklusregulator Retinoblastoma Protein (Rb) beinhalten, wurde überprüft, ob die Deformation der Nuklei in der Abwesenheit dieser beiden Proteine

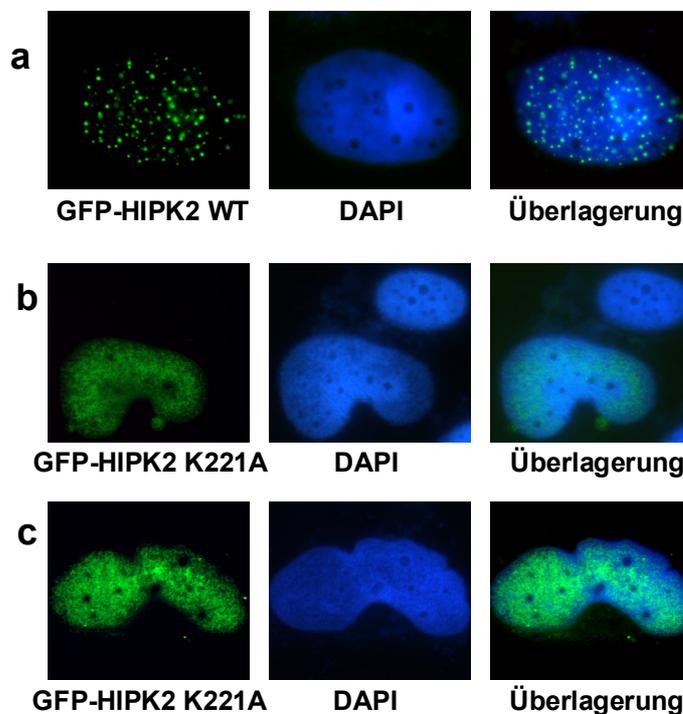
vorkommt. Zur Klärung dieser Frage eignen sich SaoS2 Zellen. Diese besitzen weder funktionelles p53 noch pRb (Abbildung 7) und bieten daher die Möglichkeit, in Abwesenheit dieser beiden Proteine die Zellkernform zu untersuchen.



**Abbildung 7. Detektion von p53 und pRb in verschiedenen Zelllinien.**

Aus den angegebenen Zelllinien wurden Proteinextrakte gewonnen und auf die Anwesenheit von p53, pRb und  $\beta$ -Actin hin untersucht.

Eine Transfektion von SaoS2 Zellen mit GFP-HIPK2 Wildtyp zeigte auch in SaoS2 Zellen das in anderen Zellen beobachtete Verteilungsmuster für HIPK2 (Abbildung



**Abbildung 8. HIPK2 K221A abhängige Kerndeformation treten auch in p53/pRb negativen SaoS2 Zellen auf.**

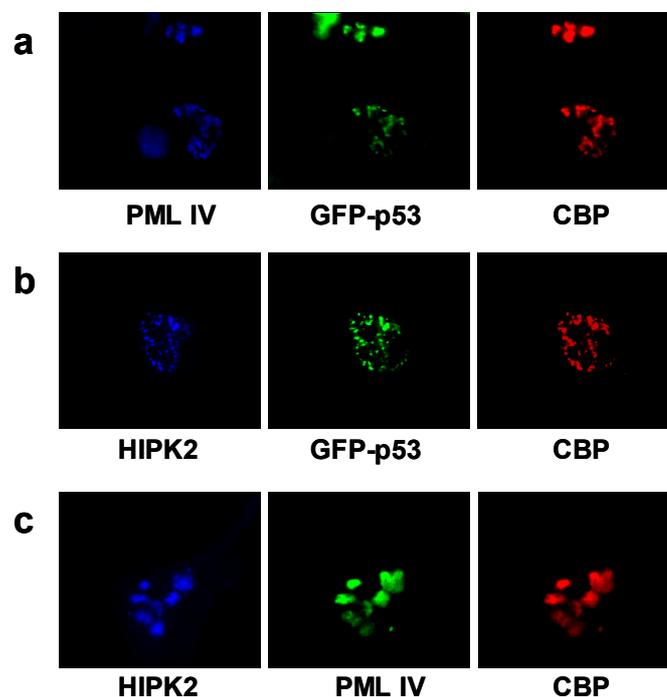
SaoS2 Zellen wurden mit einem GFP-HIPK2 WT **(a)** oder GFP-HIPK2 K221A **(b+c)** Konstrukt transfiziert. 28 Stunden später wurde die intrinsische Fluoreszenz von GFP (grün) detektiert und die chromosomale DNA (blau) des Zellkerns durch DAPI Färbung markiert.

8a). Untersucht man die Lokalisation von GFP-HIPK2 K221A, so konnte auch in diesen Zelltyp einige Zellen mit abgeschnürten Zellkernen sehen (Abbildung 8 b+c). Auch konnte hier bei einigen Zellen ein deutliche Vergrößerung des Zellkerns entdeckt werden (Abbildung 8 b).

Durch diese Untersuchung wurde demonstriert, dass die Expression der kinasedefizienten HIPK2 K221A zu einer Deformation des Zellkerns führt. Die Ausbildung der aberante Kernmorphologie ist unabhängig von funktionellen p53 und Rb Proteinen.

### 3.3 HIPK2 kann durch PML IV Expression oder Behandlung mit $\text{As}_2\text{O}_3$ / UV in PML-NBs rekrutiert werden und interagiert dort mit CBP und p53

Neben PML wurden auch die Proteine für p53 und CBP in PML-NBs nachgewiesen. Eine mögliche Kolokalisation zwischen HIPK2, p53 und CBP wurde in H1299 Zellen untersucht. H1299 Zellen enthalten kein endogenes p53 und sind somit für Untersuchungen von exogen eingeführtem p53 geeignet. Die Expression von PML IV rekrutierte sowohl ein GFP-p53 Protein als auch CBP in PML-NBs (Abbildung 9a). Nach PML IV Expression wurde nun die Lokalisation von Flag-HIPK2, GFP-p53 und exogenen CBP untersucht. Es konnte eine Kolokalisation aller drei Proteine in PML-NBs innerhalb des Nukleus gefunden werden (Abbildung 9b). Dies konnte durch eine Kolokalisation von HIPK2, PML IV und CBP gezeigt werden (Abbildung 9c). Damit kolokalisiert HIPK2 in PML-NB mit PML, p53 und CBP.

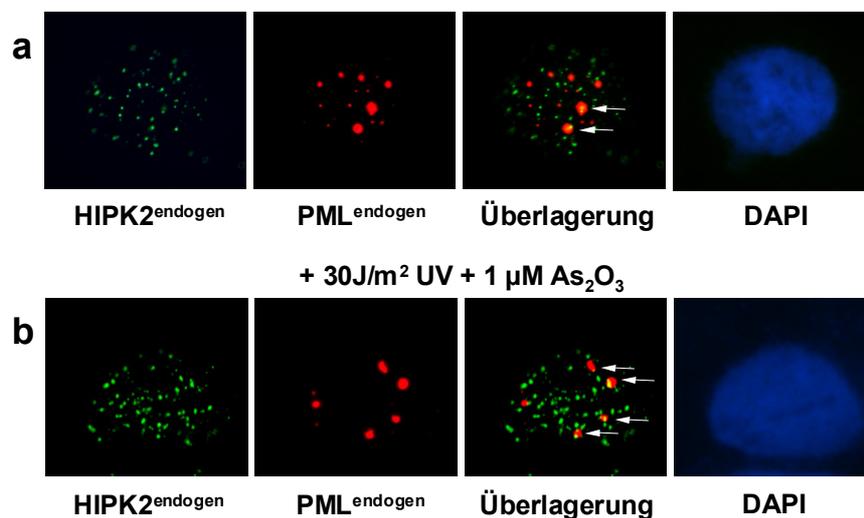


**Abbildung 9. Kolokalisation von HIPK2, p53, CBP und PML in PML-NB.**

(a) H1299 Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit PML IV, GFP-p53 und CBP transfiziert. In einer Doppelfärbung wurde PML (blau), CBP (rot) und die intrinsische Fluoreszenz (grün) des GFP detektiert. (b) H1299 Zellen wurden mit PML IV, GFP-p53, Flag-HIPK2 und CBP transfiziert und wie

oben detektiert. (c) H1299 wurden mit Flag-HIPK2, PML IV und CBP transfiziert und wie unter (a) gefärbt und untersucht.

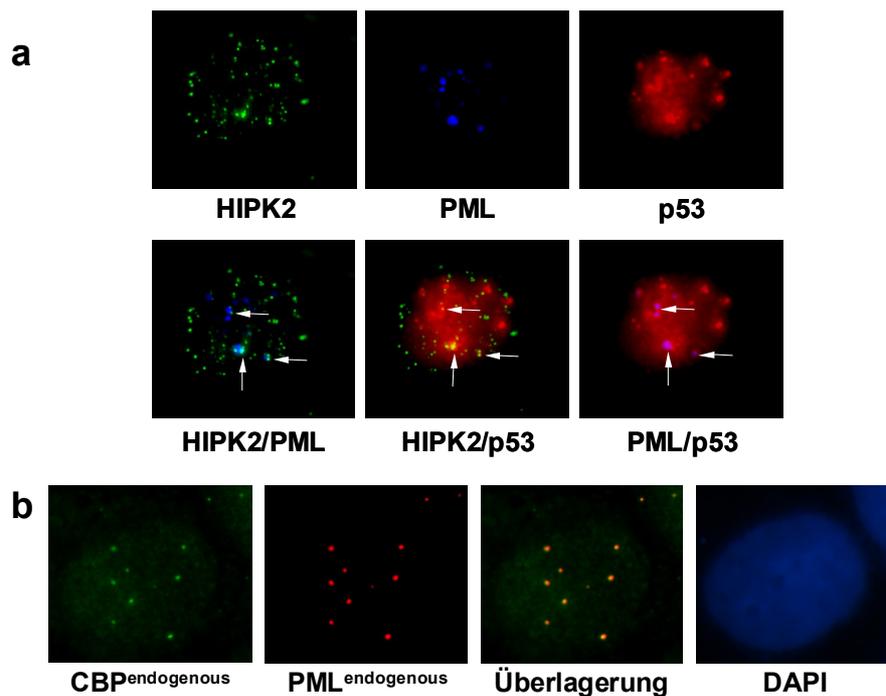
Arsen-Trioxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) führt zu einer verstärkten Formierung von PML-NBs und Rekrutierung von transienten PML-NB Proteinen. Eine Bestrahlung von Zellen und Geweben mit UV-Licht in niedrigen Dosierungen hingegen aktiviert und stabilisiert den Tumorsuppressor p53 und führt zu einer erhöhten Menge an p53 in PML-NBs. Nun sollte die Lokalisation von HIPK2 in U2OS Zellen bestimmt werden, die mit  $1 \mu\text{M}$   $\text{As}_2\text{O}_3$  und  $30 \text{ J/m}^2$  UV-Licht behandelt wurden. Dieser Stimulus führte zu einer geringen, aber signifikanten Rekrutierung von HIPK2 in PML-NBs (Abbildungen 10). Dieser Stimulus führte auch zu einer Kolokalisation von HIPK2 mit p53 in PML-NBs (Abbildung 11a). Die Bereiche der Kolokalisation sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Lokalisation von CBP im Vergleich zu PML-NBs wurde ebenfalls unter diesen Bedingungen untersucht (Abbildung 11b). Auch CBP lokalisiert nach diesem Stimulus in PML-NBs. Da für Immunfluoreszenzanalysen sowohl für CBP als auch für HIPK2 nur Antiseren der gleichen Spezies zur Verfügung standen, konnte die Kolokalisation der beiden endogenen Proteine nicht untersucht werden.



**Abbildung 10. HIPK2 kann durch  $\text{As}_2\text{O}_3$  / UV verstärkt in PML-NBs rekrutiert werden.**

U2OS Zellen wurden unbehandelt (a) oder 8 Stunden nach Stimulation mit  $30 \text{ J/m}^2$  UV /  $1 \mu\text{M}$   $\text{As}_2\text{O}_3$  (b) fixiert und die Lokalisation von endogener HIPK2 und endogenen PML bestimmt. Kolokalisation zwischen HIPK2 und PML ist mit Pfeilen markiert. Die chromosomale DNA wurde durch DAPI angefärbt.

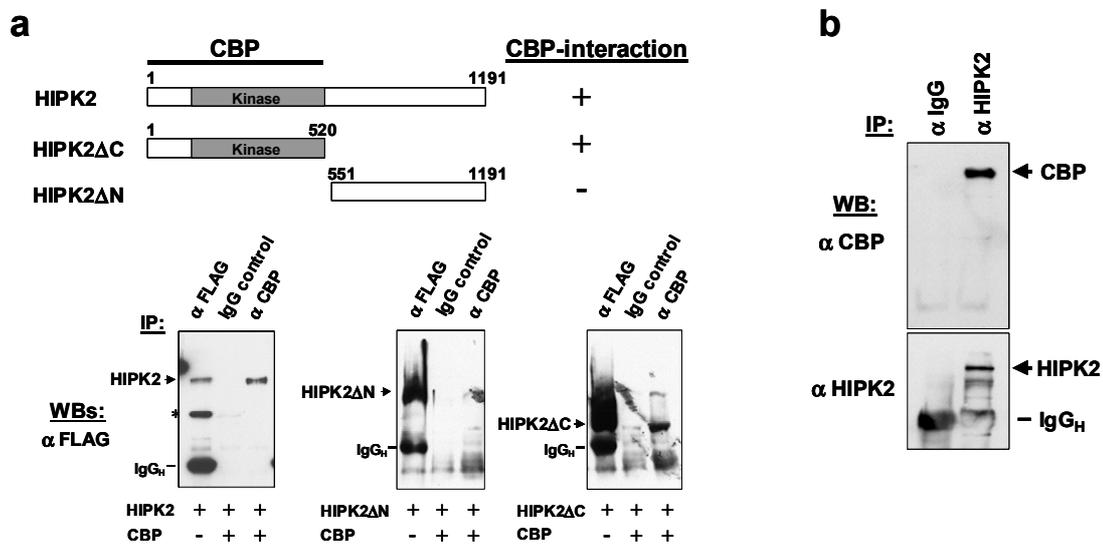
Die bisherigen Befunde zeigen eine Kolokalisation von HIPK2 und CBP in PML-NBs. Daher wurde eine Assoziation zwischen HIPK2 und CBP mit Hilfe einer Koimmunopräzipitation untersucht. Hierzu wurden HEK 293 Zellen mit Flag-HIPK2 Wildtyp (WT), dem N-terminalen Teil von HIPK2 (HIPK2  $\Delta$ C, Aminosäure 1-520) oder dem C-terminalen Teil von HIPK2 (HIPK2  $\Delta$ N, Aminosäure 551-1191) jeweils zusammen mit CBP transfiziert. Nach der Lyse der Zellen wurde diese auf die Anwesenheit der angegebenen Proteine untersucht (Abbildung 11A). Dabei wurde eine Interaktion zwischen HIPK2 mit CBP demonstriert. Die für diese Interaktion wichtigen HIPK2 Bereiche wurden in einem Kartierungsexperiment bestimmt. Während HIPK2  $\Delta$ N nicht mehr mit CBP interagiert, lässt HIPK2  $\Delta$ C die Bindung weiterhin zu. Diese Experimente zeigen, dass CBP an dem N-terminalen Bereich von HIPK2 bindet.



**Abbildung 11. Kolokalisation von HIPK2, p53, CBP und PML in PML-NB nach Behandlung mit As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und UV.**

(a) U2OS Zellen wurden mit 30 J/m<sup>2</sup> UV / 1  $\mu$ M As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> stimuliert und 6 Stunden danach die Verteilung der endogener HIPK2, PML und p53 analysiert. In einer Dreifachfärbung wurde PML (blau), HIPK2 (grün) und p53 (rot) durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Überlappende Lokalisationen sind mit Pfeilen markiert. (b) U2OS Zellen wurden wie in (a) behandelt und auf die Verteilung der endogener PML (rot) und CBP (grün) Proteine analysiert. Die chromosomale DNA wurde durch DAPI angefärbt.

Eine Interaktion zwischen den endogenen Proteinen wurde in U2OS Zellen untersucht. Dabei wurden U2OS Zellen lysiert, dieses mit IgG Antikörpern geklärt und mit HIPK2 spezifischen Antikörpern präzipitiert. Bei der anschließenden Analyse mittels Western Blot konnte mit CBP-spezifischen Antikörpern kopräzipitierende CBP-Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 12b).



**Abbildung 12. Ko-Immunopräzipitation von HIPK2 und CBP.**

(a) HEK 293 Zellen wurden mit Flag-HIPK2 Wildtyp (WT) oder den angegebenen Mutanten zusammen mit CBP transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Zellen lysiert und 10% des Lysats als Kontrolle geladen. Das Lysat wurde mit isotypspezifischen Kontrollantikörpern und dann mit CBP spezifischen Antikörpern präzipitiert. Kopräzipitierende HIPK2 wurde durch Immunoblotting identifiziert. (b) Endogene HIPK2 wurde aus U2OS Zellen präzipitiert und mit Hilfe eines Western Blot auf kopräzipitierendes CBP hin untersucht.

Die bisherigen Studien konnten zeigen, dass HIPK2 kinaseabhängig in HIPK2 Domänen lokalisiert, welche partiell mit PML-NBs, nicht aber Nucleoli oder Cajal Körpern, kolokalisieren. Durch die Expression von PML IV oder Stimulation mit As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> / UV kann die Menge an HIPK2 in PML-NB erhöht werden. In den PML-NBs kolokalisiert und interagiert HIPK2 mit CBP und p53. Weiterhin konnten wir eine HIPK2-vermittelte Verstärkung der p53-abhängigen Genexpression und Erhöhung der p21<sup>Waf-1</sup>

Proteinmenge zeigen. HIPK2 inhibiert p53-abhängig die Zellproliferation vollständig und in p53-defizienten Zellen kommt es zu einer Verminderung der Inhibition. HIPK2 induziert die p53 Phosphorylierung an Serin 46. Diese wird durch UV induziert und durch HIPK2 vermittelt. Diese Phosphorylierung verstärkt die CBP-induzierte Acetylierung. Der UV-induzierte Zelltod ist nach Reduktion von HIPK2 Proteinmengen reduziert (Hofmann, et al., 2002).

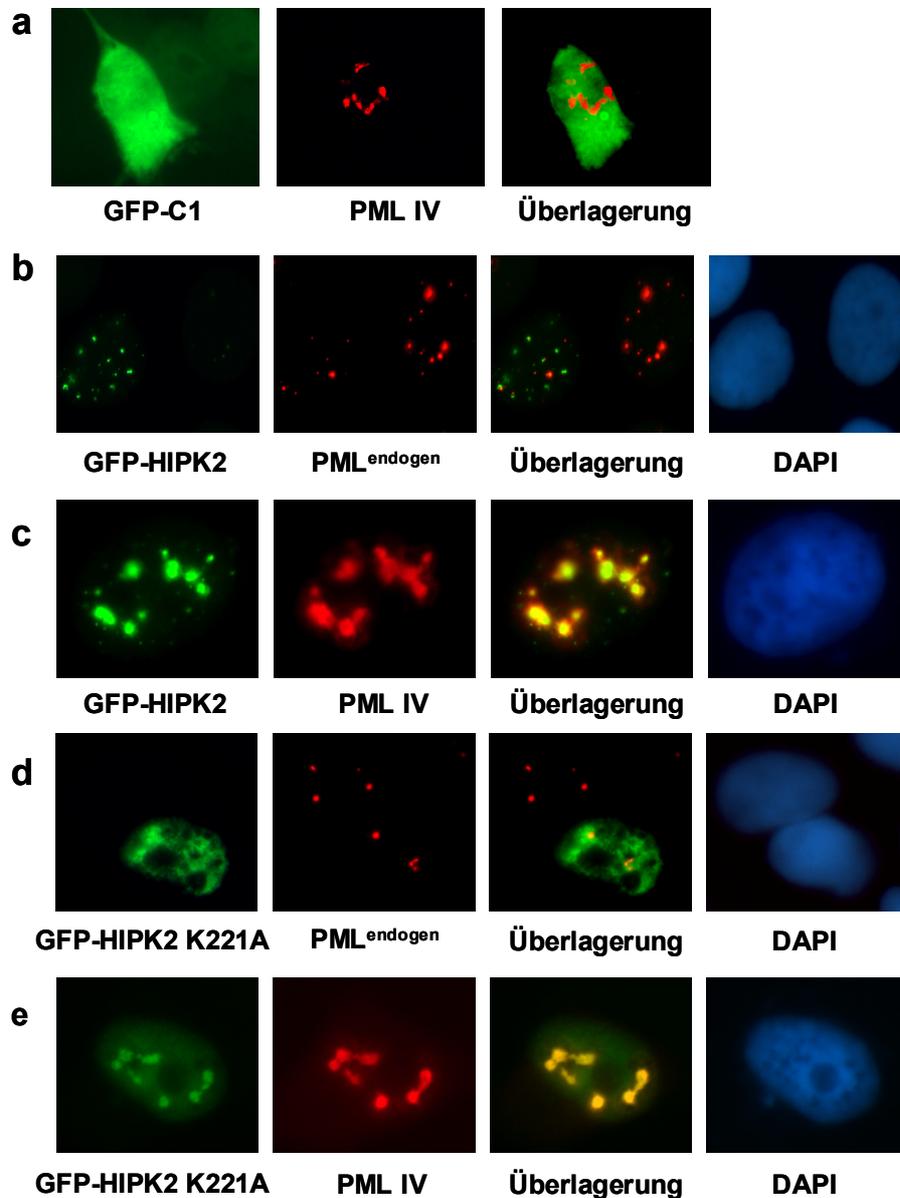
### 3.4 Der inhibitorische Einfluss von HIPK2 auf die Zellproliferation ist unabhängig von der Lokalisation der Kinase

Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, welcher Teil von HIPK2 für die Rekrutierung in PML-NBs verantwortlich ist und ob die Lokalisation von HIPK2 in PML-NBs eine Veränderung der HIPK2-Funktionen zur Folge hat. Dazu wurde das Rekrutierungsverhalten von HIPK2 und verschiedenen HIPK2 Mutanten in U2OS Zellen untersucht. GFP-HIPK2 wurde durch PML IV in PML-NBs rekrutiert (Abbildungen 13b+c, Tabelle 2). Hingegen akkumulierte in der Kontrolle das GFP Protein alleine nach PML IV Expression nicht in PML-NBs (Abbildungen 13a). Die kinasedefiziente Mutante HIPK2 K221A konnte durch Expression von PML IV quantitativ in PML-NBs rekrutiert werden (Abbildungen 13d+e, Tabelle 2). Damit ist die Rekrutierung unabhängig von der HIPK2 Kinasefunktion.

Die GFP-HIPK2  $\Delta C$  lokalisierte in U2OS Zellen nur im Nukleoplasma, ohne erkennbare Konzentration in HIPK2 Domänen oder PML-NBs (Abbildung 14a, Tabelle 2). Eine Koexpression von PML IV konnte nur einen kleinen Teil von GFP-HIPK2  $\Delta C$  rekrutieren, jedoch verblieb ein großer Teil im Nukleoplasma und kolokalisierte nicht in PML-NBs (Abbildung 14b, Tabelle 2). Dagegen lokalisiert GFP-HIPK2  $\Delta N$  nahezu komplett in HIPK2 Domänen und der nukleoplasmatische Anteil war im Gegensatz zu HIPK2 WT Färbungen stark verringert. GFP-HIPK2  $\Delta N$  zeigte bei diesen Studien mit endogenem PML nur eine geringe Kolokalisation (Abbildung 14c). Die Expression

HIPK2 Konstrukt	In PML-NBs lokalisiert	Durch PML IV rekrutierbar
Wildtyp	partiell	nahezu komplett
K221A	sehr gering	nahezu komplett
$\Delta C$	sehr gering	sehr gering
$\Delta N$	partiell	nahezu komplett

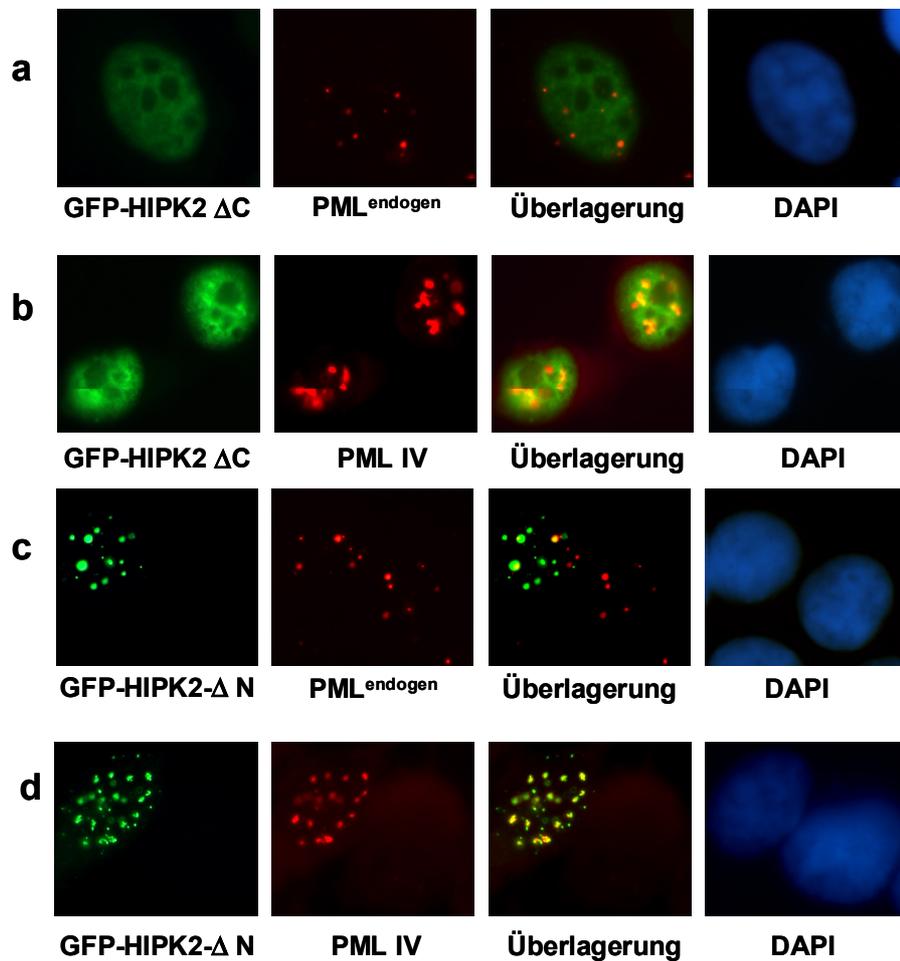
**Tabelle 2.** Zusammenfassung der Rekrutierungsergebnisse von HIPK2 Konstrukten in PML-NBs. Die HIPK2 Lokalisation wurde mit der von endogenen PML verglichen. Die gleiche Analyse wurde mit koexprimierten PML IV durchgeführt.



**Abbildung 13. Kolokalisation von GFP-HIPK2 und PML in PML-NB.**

(a) Zur Kontrolle wurden U2OS Zellen mit dem GFP-C1 Leervektor und PML IV transfiziert und die Lokalisation der Proteine bestimmt. (b) U2OS wurden mit GFP-HIPK2 transfiziert und in einer Doppelfärbung die Lokalisationen von HIPK2 und endogenen PML (rot) bestimmt. (c) Wie (b), aber die Zellen wurden zusätzlich mit PML IV transfiziert. (d) HIPK2 K221A wurde in U2OS Zellen transfiziert und die Lokalisation wie unter b) bestimmt. (e) wie (d), nur das zusätzlich PML IV koexprimiert wurde. In allen Fällen wurde die chromosomale DNA mit DAPI angefärbt.

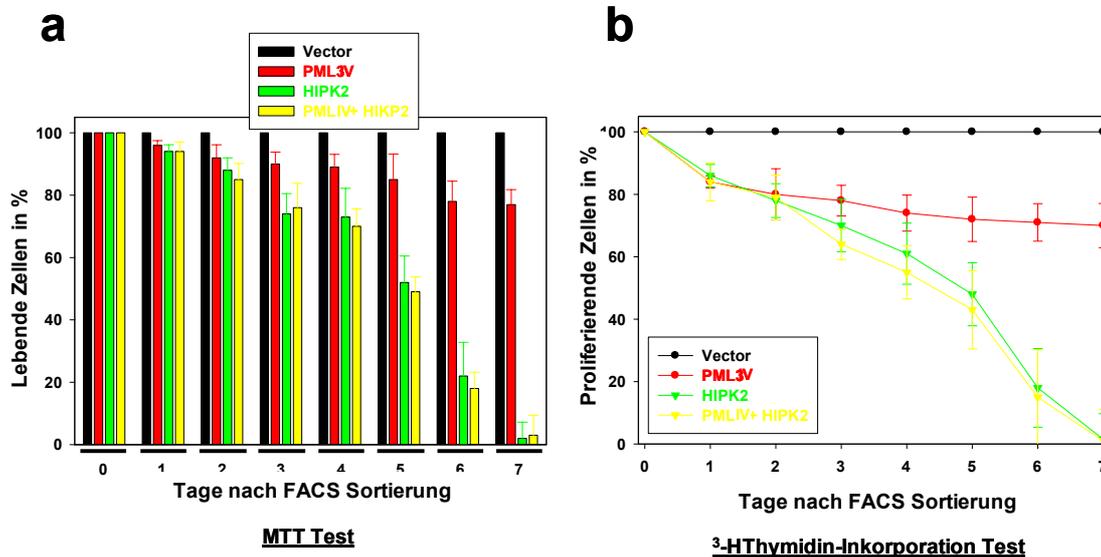
von PML IV veränderte die Lokalisation von GFP-HIPK2  $\Delta$ N und führt zu einer fast kompletten Lokalisation von GFP-HIPK2  $\Delta$ N in PML-NBs (Abbildung 14d, Tabelle 2).



**Abbildung 14. Untersuchung zu der für die PML-NB Rekrutierung verantwortlichen HIPK2 Domänen.**

(a) U2OS Zellen wurden mit GFP-HIPK2  $\Delta$ C transfiziert. In einer Doppelfärbung wurde endogenes PML (rot) gefärbt und die Lokalisation von GFP-HIPK2 (grün) durch intrinsische Fluoreszenz des GFP detektiert. (b) PML IV wurde in U2OS Zellen transfiziert und die Färbung wurde wie unter (a) durchgeführt. (c) GFP-HIPK2  $\Delta$ N wurde in U2OS Zellen expremiert und wie in (a) gefärbt. (d) U2OS Zellen wurden mit einem GFP-HIPK2  $\Delta$ N Konstrukt und PML IV transfiziert und wie in (a) gefärbt. In allen Fällen wurde die chromosomale DNA mit DAPI angefärbt.

HIPK2 Expression führt schon in geringer Menge zur Inhibition der Zellproliferation und zu einer damit verbundenen Verringerung der Zellzahl. Durch die Messung der Zellproliferation und der Anzahl der lebenden Zellen wurde untersucht, ob die antiproliferative Wirkungen von HIPK2 durch die Rekrutierung in PML-NBs beeinflusst werden kann. Dazu wurden Hela Zellen (Abbildung 15) und U2OS Zellen (Daten nicht gezeigt) mit Leervektor, HIPK2, PML IV oder einer Kombination aus HIPK2 und PML IV transfiziert. Durch eine Koexpression eines GFP-Vektors wurden transfizierte Zellen durch einen FACS Sorter isoliert und in einer definierten Zahl ausgesät. Die Zahl der lebenden Zellen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten in einem MTT Assay bestimmt (Abbildung 15a). Diese Ergebnisse zeigten, dass bei Expression von HIPK2 weniger lebende Zellen gezählt wurden als in den Kontrollansätzen. Nach 7 Tagen konnten keine lebenden Zellen in diesen Ansätzen mehr festgestellt werden. Die Koexpression von PML-IV konnte diese antiproliferative Eigenschaft von HIPK2 nicht verändern.

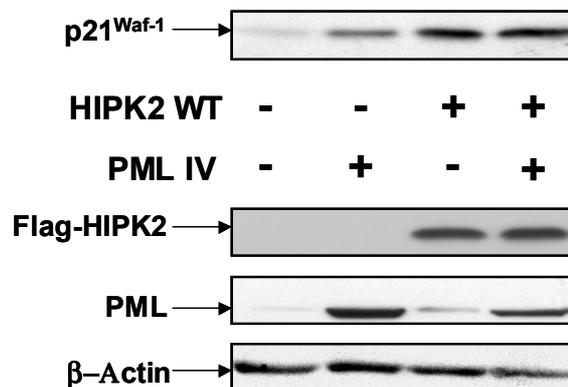


**Abbildung 15. Zellviabilität und Zellproliferation werden durch Rekrutierung von HIPK2 in PML-NB nicht beeinflusst.**

Hela Zellen wurden wie angegeben mit pcDNA3 Leervektor, HIPK2 und/oder PML IV transfiziert. Zusätzlich wurde bei jedem Ansatz ein GFP-Leervektor kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die GFP-positiven Zellen mittels FACS isoliert. Eine gleiche Anzahl ausgesäter Zellen wurde nach den angegebenen Tagen (a) in einem MTT Experiment oder (b) mittels eines <sup>3</sup>H-Inkorporationsexperiments untersucht.

Um diese Befunde auch in einem unabhängigen experimentellen Ansatz zu bestätigen, wurde die Proliferation der Zellen durch Messung der Inkorporation von  $^3\text{H}$ -markierten Thymidin gemessen (Abbildung 15a). Nach drei Tagen verminderte sich die Zahl der proliferierenden Zellen und nach 6 bis 7 Tagen wurden keine proliferierenden Zellen mehr festgestellt. Dieser antiproliferative Effekt von HIPK2 konnte nicht durch PML-IV Expression verstärkt werden.

Die Expression von HIPK2 führt zu vermehrter Expression des Zellzyklus Kontrollproteins  $\text{p}21^{\text{Waf-1}}$ . Die Erhöhung der  $\text{p}21^{\text{Waf-1}}$  Menge führt in Zellen zu einer Inhibition des Zellzyklus am G1/S Phasenübergang und verhindert nach induzierten DNA-Schäden die Zelle an der weiteren Proliferation bis entweder der Schaden repariert ist oder bei unreparablen Schäden die Apoptose der Zelle eingeleitet wird. Um zu untersuchen, ob die Rekrutierung von HIPK2 in PML-NBs die  $\text{p}21^{\text{Waf-1}}$  induzierenden Eigenschaften von HIPK2 beeinflusst, wurde die  $\text{p}21^{\text{Waf-1}}$  Proteinmenge in U2OS Zellen untersucht. Diese ist unabhängig davon, ob HIPK2 alleine oder in Kombination mit PML IV in den Zellen exprimiert wurde (Abbildung 16). Die Expression von HIPK2 und PML IV zusammen führte zu keiner Veränderung der HIPK2 vermittelten  $\text{p}21^{\text{Waf-1}}$  Induktion.



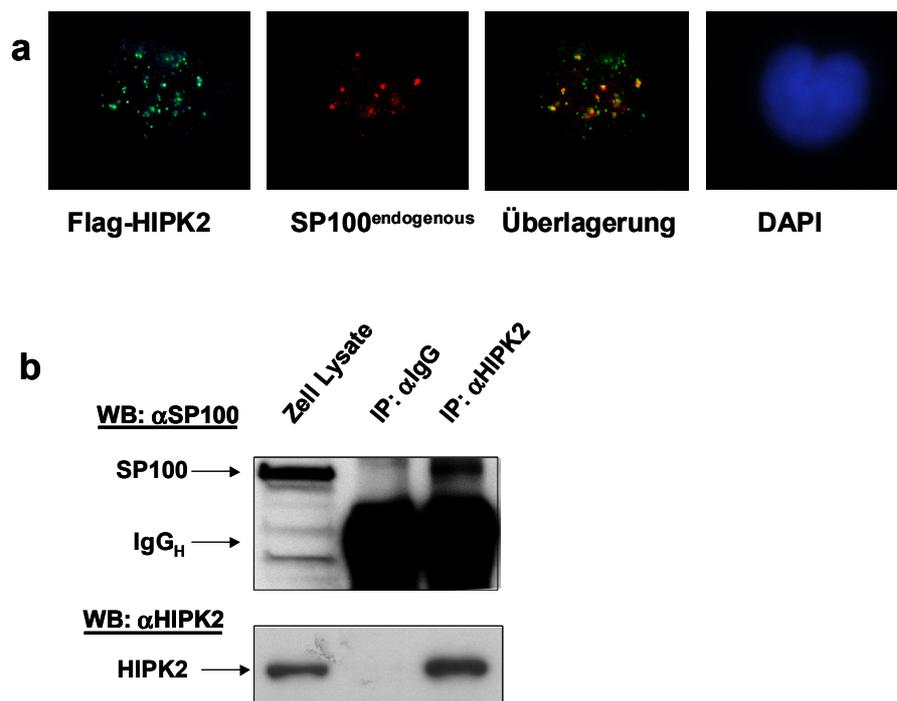
**Abbildung 16. Induktion von  $\text{p}21^{\text{Waf-1}}$  Expression ist unabhängig von der HIPK2 Rekrutierung in PML-NBs.**

U2OS Zellen wurden mit pcDNA3 Leervektor und Expressionsvektoren für HIPK2, PML IV und HIPK2+PML IV transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Zellen lysiert und mittels Westernblot bezüglich  $\text{p}21^{\text{Waf-1}}$ , Flag-HIPK2, PML und  $\beta$ -Actin analysiert.

Zusammengenommen zeigen diese Daten die Relevanz des Carboxyterminalen Bereiches von HIPK2 für die PML IV induzierte Rekrutierung in PML-NBs. Außerdem konnte für die HIPK2 vermittelte Inhibition der Proliferation und die Erhöhung von p21<sup>Waf-1</sup> keine Veränderung durch die Koexpression von PML IV festgestellt werden.

### 3.5 Sp100 wirkt als Koaktivator für die HIPK2 vermittelte Transaktivierung

Sp100 ist ein konstitutives PML-NB Protein. Da HIPK2 partiell mit PML-NBs kolokalisiert, sollte nun die funktionelle Interaktion zwischen HIPK2 und Sp100 untersucht werden. Ein Flag-markiertes HIPK2 Konstrukt wurde in U2OS Zellen transfiziert und die Lokalisation im Vergleich zu endogenem Sp100 Protein untersucht. Dabei konnte eine partielle Kolokalisation zwischen HIPK2 und Sp100 gefunden werden (Abbildung 17a). Nach der Stimulation von U2OS Zellen mit Interferon  $\gamma$  wurde in einem Kopräzipitationsexperiment die physikalisch Interaktion zwischen endogenen Sp100 und endogener HIPK2 demonstriert (Abbildung 17b).



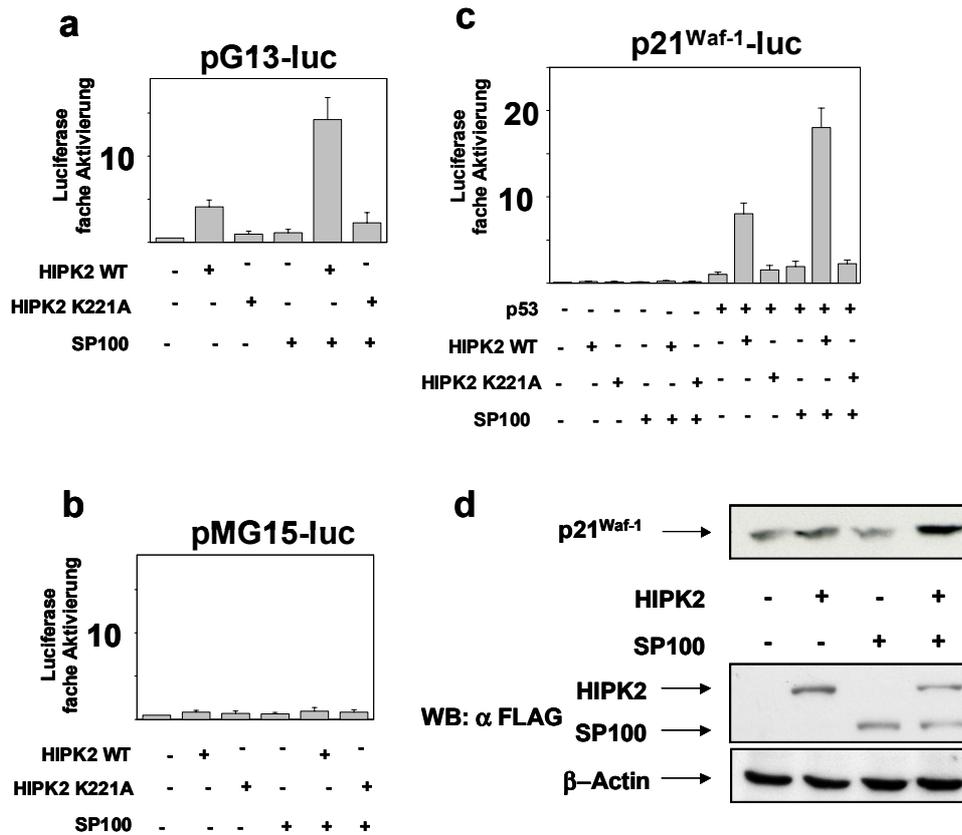
**Abbildung 17. HIPK2 kolokalisiert partiell und kopräzipitiert mit Sp100.**

(a) U2OS Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit Flag-HIPK2 transfiziert. In einer Doppelfärbung wurde HIPK2 (grün) und endogenes Sp100 (rot) durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert. Die chromosomale DNA wurde mit DAPI angefärbt.

(b) U2OS Zellen wurden mit Interferon  $\gamma$  stimuliert. Nach einer Immunopräzipitation (IP) mit HIPK2 Antiseren konnte in einem Westernblot (WB) kopräzipitierendes endogenes Sp100 detektiert werden. Nachfolgend wurde der Blot mit HIPK2 Antikörpern auf Anwesenheit von HIPK2 untersucht.

Aus diesem Grund wurde nun die funktionelle Interaktion von HIPK2, p53 und Sp100 getestet. Die Beeinflussung der p53-abhängigen Genexpression wurde mit Hilfe des pG13 Reporterplasmids getestet, bei welchem das Luciferase Reportergen unter der Kontrolle von multimerisierten p53 Bindestellen steht. Als Kontrolle wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem die p53 Bindestellen mutiert wurden (pMG15). Diese beiden Reporterkonstrukte wurden nun auf HIPK2 Induktion getestet. HIPK2 aktivierte das pG13 Reportergen kinaseabhängig etwa 4fach (Abbildung 18a), wohingegen die Sp100 Expression alleine keine Promotoraktivität induziert. Eine Kombination von HIPK2 und Sp100 führte zu einer synergistischen Aktivierung auf etwa den 12-fachen Wert. Das Kontrollplasmid konnte nicht aktiviert werden, was für Sp100 und HIPK2 eine p53-abhängige Genexpression zeigt (Abbildung 18b).

Um den stimulatorischen Effekt von Sp100 auch auf HIPK2/p53 vermittelte Genexpression im Kontext eines natürlichen Promotors zu messen, wurden in p53-defizienten H1299 Zellen die Aktivierung eines p21<sup>Waf-1</sup> Luciferasereportergens untersucht. HIPK2 und Sp100 können in Abwesenheit von funktionellen p53 dieses Reporterkonstrukt nicht aktivieren (Abbildung 18c).



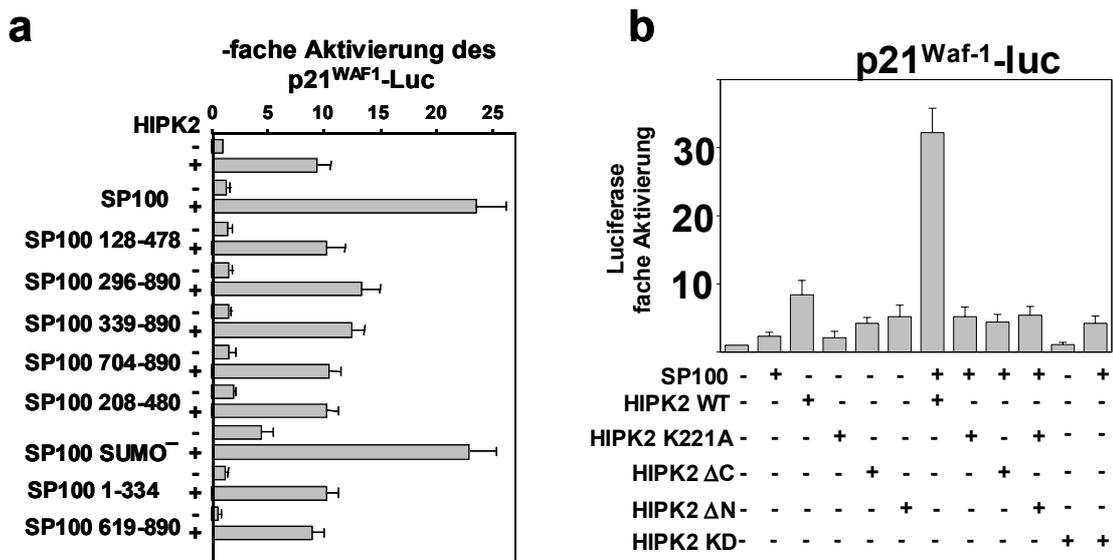
**Abbildung 18. Sp100 verstärkt die HIPK2 induzierte Aktivierung von p53-abhängigen Reporterplasmiden.**

(a) U2OS Zellen wurden wie angegeben mit Leervektor, 1  $\mu$ g HIPK2 WT, 1  $\mu$ g HIPK2 K221A und/oder 750 ng Sp100 und 200 ng eines pG13-Luciferase Reporterplasmids transfiziert. 36 Stunden später wurden die Zellen lysiert und die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten sind gezeigt. (b) U2OS Zellen wurden wie in (a) mit den entsprechenden Expressionsvektoren und 200 ng eines pMG15-Luciferase Reporterplasmids transfiziert. Die Luciferaseaktivität wurde wie unter (a) bestimmt. (c) H1299 Zellen wurden wie angegeben mit Leervektor, 1  $\mu$ g HIPK2 WT, 1  $\mu$ g HIPK2 K221A und/oder 750 ng Sp100 alleine oder in Kombination mit einem p53 Expressionsvektors und 500 ng eines p21<sup>Waf-1</sup>-Luciferase Reporterplasmids transfiziert. Die relative Luciferaseaktivität wurde wie unter (a) bestimmt. (d) U2OS Zellen wurden mit pcDNA3 Leervektor, HIPK2, Sp100 und HIPK2+Sp100 transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Zellen lysiert und in einer Westernblot Analyse die Proteinmengen von p21<sup>Waf-1</sup>, Flag-HIPK2, Flag-Sp100 und  $\beta$ -Actin als Ladungskontrolle bestimmt.

Nach Kotransfektion von p53 aktivierte HIPK2 alleine etwa 8-fach, in Kombination mit Sp100 wurde p21<sup>Waf-1</sup> Transkription etwa 18-fach aktiviert. Weder Sp100 alleine noch die kinasedefiziente HIPK2 Mutante K221A konnten das p21<sup>Waf-1</sup> Reportergen auch in

Gegenwart von kotransfiziertem p53 aktivieren. Daraufhin wurde untersucht, ob Sp100 auch die Expression von p21<sup>Waf-1</sup> innerhalb des natürlichen Chromatinkontextes aktivieren kann. Hierzu wurden U2OS Zellen mit HIPK2, Sp100 oder einer Kombination aus beiden transfiziert. Bei der nachfolgenden Analyse konnte HIPK2 die p21<sup>Waf-1</sup> Proteinmenge leicht erhöhen, wogegen Sp100 alleine keinen Effekt hatte. Eine Transfektion von HIPK2 und Sp100 führte dagegen zu einer deutlichen Erhöhung der p21<sup>Waf-1</sup> Menge.

Die für die transkriptionell aktivierende Wirkung entscheidenden Bereiche von Sp100 wurden mit Hilfe verschiedener Sp100 Mutanten bestimmt (Abbildung 19a). Die SUMOlierungsstelle 297 von Sp100 zeigte keinen Einfluss auf die Aktivierung von p21<sup>Waf-1</sup>. Hingegen sind alle anderen Teile von Sp100 für die komplette Aktivierung notwendig.



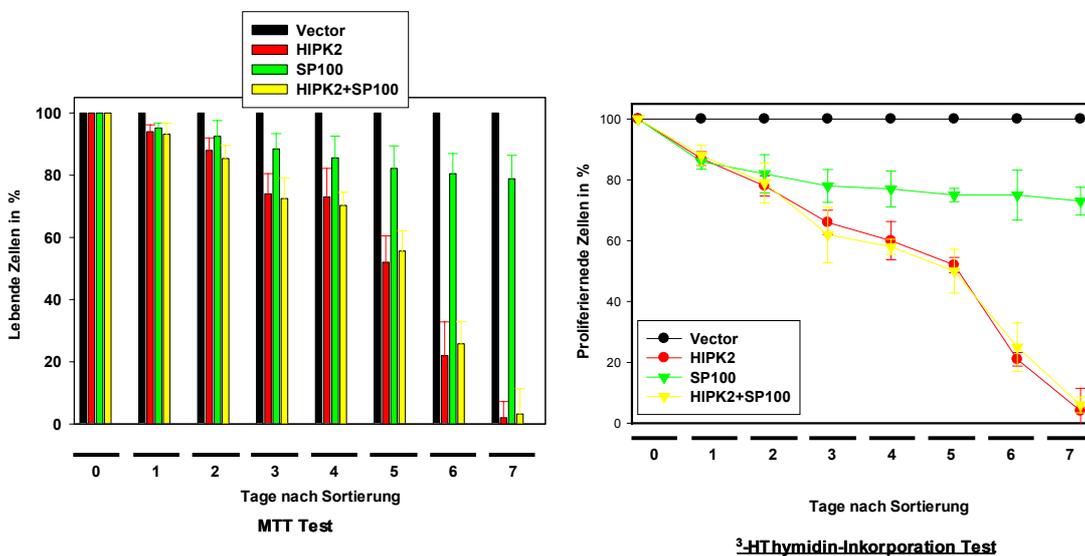
**Abbildung 19. Identifikation der für die synergistischen Aktivierung notwendigen Bereiche.**

(a) U2OS Zellen wurden wie angegeben mit Leervektor oder 1 µg HIPK2 in den gezeigten Kombinationen mit den verschiedenen Sp100 Konstrukten und 500 ng eines p21<sup>Waf-1</sup>-Luciferase Reporterplasmids transfiziert. 36 Stunden später wurden die Zellen lysiert und die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten sind gezeigt. (b) U2OS Zellen wurden wie angegeben mit Leervektor oder 750 ng Sp100 in Kombination mit den aufgeführten HIPK2 Konstrukten und 500 ng eines p21<sup>Waf-1</sup>-Luciferase Reporterplasmids transfiziert.

36 Stunden später wurden die Zellen lysiert und die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten sind gezeigt.

Eine entsprechende Untersuchung verschiedener Deletionsmutanten von HIPK2 ergab, dass HIPK2 kinaseabhängig p21<sup>Waf-1</sup> aktiviert, aber weder die Kinasedomäne noch ein anderes untersuchtes Fragment alleine für diese Aktivierung verantwortlich ist (Abbildung 19b). Es sind also neben der intakten Kinasefunktion von HIPK2 sowohl Elemente des amino- als auch carboxyterminalen Bereiches von Sp100 für die aktivierende Funktion notwendig.

Daher wurde der Einfluss von Sp100 auf die HIPK2 vermittelte, negative Regulation der Zellproliferation untersucht. Deshalb wurden U2OS Zellen mit Sp100 alleine oder in Kombination mit HIPK2 transfiziert. Ein kotransfizierter GFP-Vektor erlaubte die Isolierung der transfizierten Zellen durch FACS-Analyse. Im weiteren wurden die Zellen wie in Abbildung 15 beschrieben mittels MTT-Messung (Abbildung 20a) bezüglich ihrer Vitalität und mittels <sup>3</sup>H Thymidin Inkorporation (Abbildung 20b) auf

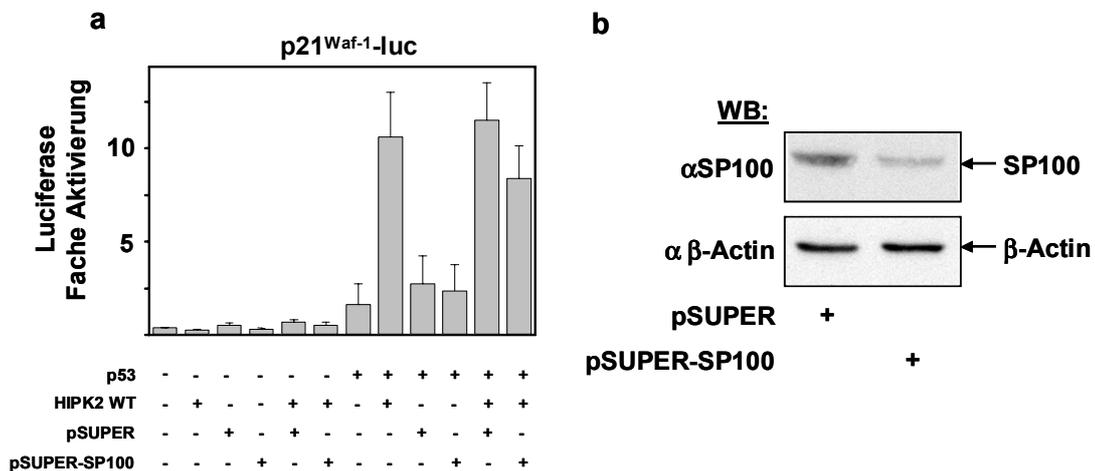


**Abbildung 20. Der Einfluss von HIPK2 auf Zellproliferation und Anzahl der lebender Zellen bleibt durch Sp100 Expression unbeeinflusst.**

U2OS Zellen wurden wie angegeben mit pcDNA3 Leervektor, HIPK2 und/oder Sp100 transfiziert. Zusätzlich wurde bei jedem Ansatz ein GFP-Leervektor kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die GFP-positiven Zellen mittels FACS sortiert und pro Ansatz eine definierte, gleiche Anzahl ausgesät. Nach den angegebenen Tagen wurden (a) in einem MTT Assay die lebenden Zellen bestimmt und (b) in einem <sup>3</sup>H-

Inkorporationsassay die Anzahl der proliferierenden Zellen jeweils im Verhältnis zur Vektorkontrolle bestimmt.

ihre Proliferation hin untersucht. Die Zahl der lebenden Zellen war nur von der Anwesenheit von HIPK2 abhängig. Auch die Zahl der proliferierenden Zellen sank nach HIPK2 Transfektion kontinuierlich nach 3 Tagen nach dem Sorting, so dass nach 7 Tagen bereits keine proliferierenden Zellen mehr detektierbar waren. Zellen, die zusätzlich Sp100 exprimierten, wiesen kein unterschiedliches Verhalten auf. Somit bleibt festzuhalten, dass der Effekt von HIPK2 auf Zellproliferation und Zahl der lebenden Zellen durch Sp100 nicht erkennbar moduliert werden kann.



**Abbildung 21. Die Reduktion von Sp100 reduziert die HIPK2 induzierte p21<sup>Waf-1</sup> Aktivierung.**

(a) U2OS Zellen wurden mit pSUPER Leervektor oder pSUPER-Sp100 transfiziert und die Sp100 Proteinmenge analysiert. (b) U2OS wurden mit p21<sup>Waf-1</sup>-luc und HIPK2 in Kombination mit pSUPER oder pSUPER-Sp100 transfiziert und die relative Luciferaseaktivität bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Nun sollte die Sp100 Abhängigkeit der HIPK2 vermittelten Aktivierung von p21<sup>Waf-1</sup> gemessen werden. Dafür wurde die Menge des endogenen Sp100 durch Expression einer small interfering RNA (siRNA) reduziert. Diese Technik beruht auf der Expression von kurzen RNA Stücken, die sich an die komplementäre mRNA anlagern und dadurch zur RNA Degradation führen. Diese Inhibition der Neusynthese eines Proteins bewirkt das Absinken der Proteinmenge. Misst man nun die HIPK2-vermittelte Aktivierung von p21<sup>Waf-1</sup>, so ist diese in Gegenwart von endogenem Sp100 deutlich

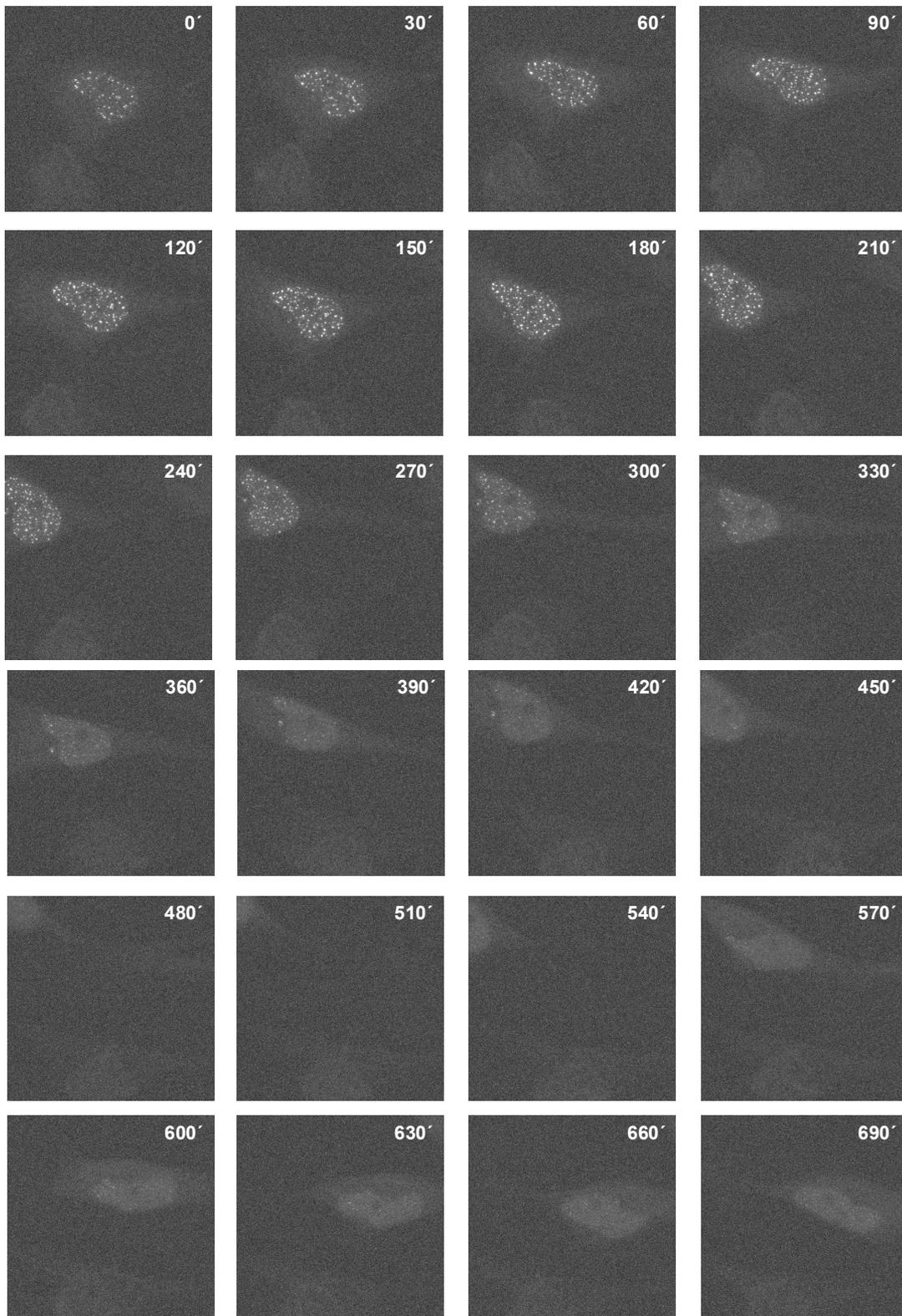
höher als die in Zellen, in denen der endogene Sp100 Menge durch siRNA reduziert wurde (Abbildung 21a). Die Sp100 Proteinmenge wurde durch diese Technik um etwa 60% reduziert werden (Abbildung 21b). Da aber hierbei nicht zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen unterschieden werden konnte, wird die Reduktion von Sp100 in den transfizierten Zellen deutlich höher sein.

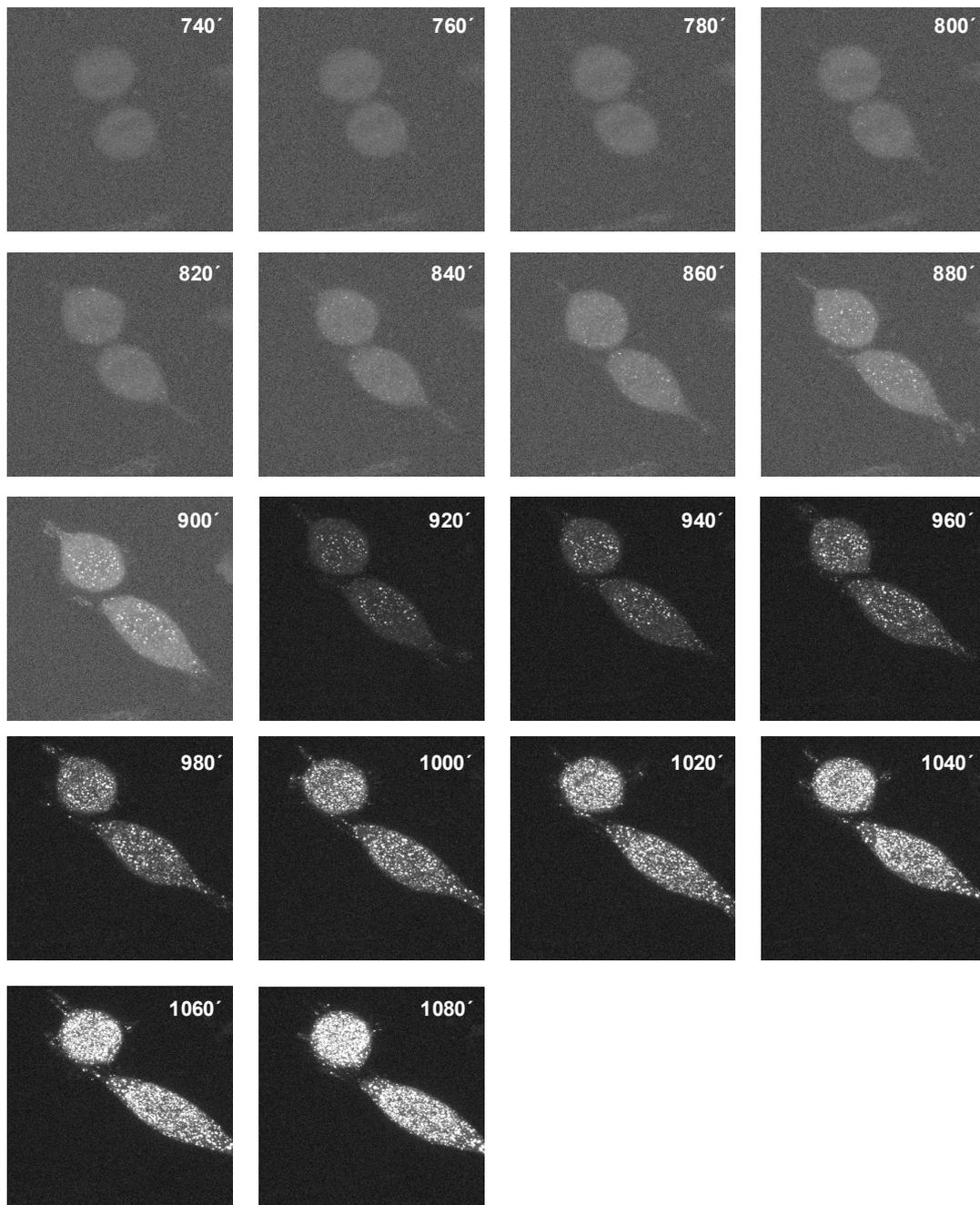
### **3.6 HIPK2 wird im Zellzyklus durch die physische und funktionelle Interaktion mit SIAH-1 reguliert**

HIPK2 lokalisiert im Zellkern hauptsächlich in HIPK2 Domänen als auch zu einem geringeren Teil im Nukleoplasma. Dies konnte für alle untersuchten Zelllinien bei der Untersuchung der endogenen HIPK2 als auch nach Expression verschiedener HIPK2 Konstrukte gefunden werden (Abbildung 1). Gleichwohl konnten stets einige Zellen identifiziert werden, die unabhängig vom verwendeten Konstrukt oder Zelllinie, eine zytoplasmatische Färbung für HIPK2 zeigten (Abbildung 2). Ebenfalls auffällig war, dass sowohl für exogene als auch endogene HIPK2 kein HIPK2 Signal in mitotischen Zellen zu identifizieren war (Daten nicht gezeigt).

Um diese anscheinend gegensätzlichen Befunde der verschiedenen HIPK2 Aufenthaltsorte genauer zu untersuchen, wurden HeLa Zellen mit GFP-HIPK2 transfiziert und das GFP-Signal bei lebenden Zellen innerhalb des Zellzyklus verfolgt. Das GFP-Signal wurde zu verschiedenen Zeitpunkten als Maximumprojektionen aufgenommen. Dies bedeutet, dass die Signale aller Schnittebenen, die von dem konfokalen Mikroskop zu einem Zeitpunkt aufgenommen worden sind, zu einer Projektion addiert werden. Damit verliert die Abbildung die Dreidimensionalität, ermöglicht aber eine Quantifizierung der Signale.

Deutlich ist in Abbildung 22 zum Zeitpunkt „0 Minuten“ ein HIPK2 Signal in HIPK2 Domänen zu erkennen. Während die Zelle innerhalb des Beobachtungsbereiches migriert, verändert sich das Signal nur wenig. Nach 240 Minuten verschwindet das HIPK2 Signal binnen 90 Minuten vollständig. 690 Minuten nach Beginn der Aufzeichnung kommt es zu einer deutlichen Längsstreckung und einer beginnenden Einschnürung der Zelle. 50 Minuten später ist deutlich zu erkennen, dass die Zelle sich in der Teilung befindet. 840 Minuten nach Beginn des Experiments befindet sich die Zelle am Ende der Mitose oder zu Beginn der G1 Phase des Zellzyklus. Hier kann ein erstes HIPK2 Signal in HIPK2 Domänen detektiert werden. Die Stärke des Signals nimmt in der Folgezeit stark zu. Ab 920 Minuten muss die Helligkeit reduziert werden, was an dem deutlich dunkleren Hintergrund in den Folgeaufnahmen erkennbar ist. Das





**Abbildung 22. Die Expression von HIPK2 ist von der Zellzyklus Phase abhängig.**

HeLa Zellen wurden mit einem GFP-HIPK2 Konstrukt transfiziert. Das GFP-Signal wurde dann mit einem konfokalen Mikroskop innerhalb einer Zelle in einem Zeitintervall von 10 beziehungsweise 15 Minuten aufgenommen. Dargestellt sind jeweils 20 oder 30 Minuten Intervalle. Die Schnitte eines jeweiligen Zeitpunktes wurden in einer Maximumprojektion addiert.

HIPK2 Signal verstärkt sich, sodass 1080 Minuten nach Beginn der Aufnahmeserie die Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus ein starkes HIPK2 Signal aufweisen, welches aber nicht gleichmäßig verteilt ist, sondern sich in umgrenzten Bereichen konzentrierten.

Diese Beobachtungen lassen auf eine starke Zunahme der HIPK2 Proteinmenge zum Ende der Mitose oder zu Beginn der G1 Phase schließen. Dies wurde nun anhand von synchronisierten U2OS Zellen (Daten nicht gezeigt) und Hela Zellen (Abbildung 23) untersucht. Dabei wurden Zellen mit einem einfachen Thymidinblock vorsynchronisiert. Die Applikation von Thymidin führt zu einem Stopp der Proliferation in der S-Phase. Nach Auswaschen des Thymidins wurden die Zellen mit Nocodazol in der Prometaphase der Mitose angehalten. Dabei verstärkt Nocodazol die Depolymerisation von Tubulinen, so dass die Mitose nicht mehr ablaufen kann.

Eine Analyse von HIPK2 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lösen des Blocks wurde begleitet mit einer FACS gestützten Analyse des Zellzyklus. Dabei konnte zum Zeitpunkt 0 Minuten eine Synchronisation von über 90% der untersuchten Zellen in der Mitose erreicht werden. Das HIPK2 Signal war zu diesem Zeitpunkt kaum detektierbar. 20 Minuten nach Lösen des Blockes befanden sich 13 % der Zellen in der G1 Phase, das HIPK2 Signal ist schon deutlich zu erkennen. Nach einer Stunde sind rund ein Drittel der Zellen in der G1 Phase, und das HIPK2 Signal ist sehr stark und deutlich zu erkennen. Während die Zellen dann im Zellzyklus fortschreiten, wird das HIPK2 Signal schwächer, um nach etwa 8 Stunden kaum noch erkennbar zu sein. Zu diesem Zeitpunkt sind 32 % der Zellen in der S-Phase und 58 % der Zellen in einer späten G1 Phase. Damit ist deutlich zu erkennen, dass die Intensität des HIPK2 Signals in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase variiert.

Stunden nach Blockaufhebung	0	1/3	1	2	4	8	12	24
HIPK2 →								
%G1-Phase	5	13	30	48	69	58	11	56
%S-Phase	3	6	7	21	23	32	84	33

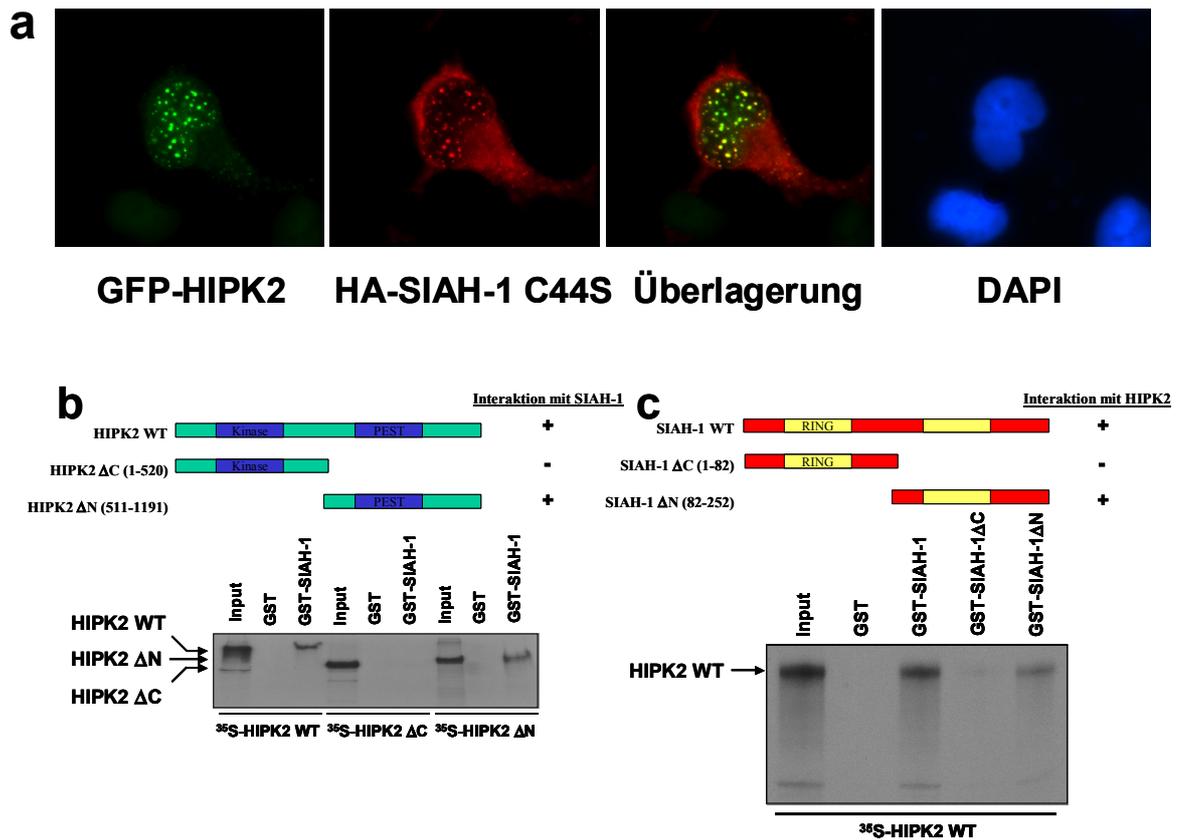
**Abbildung 23. Die HIPK2 Proteinmengen variieren in verschiedenen Zellzyklusphasen.**

Hela Zellen wurden mit einem Nocodazol Block in der Prometaphase der Mitose synchronisiert. Nach einem mitotischen Shake-off wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und zu den

angegebenen Zeitpunkten lysiert, beziehungsweise im FACS die Zellzyklusparameter durch eine Propidiumiodidfärbung bestimmt.

Im Rahmen eines in unserem Labor durchgeführten Hefe-2-Hybrid Screen wurde SIAH-1 als möglicher Interaktor für HIPK2 identifiziert. SIAH-1 ist ein RING Finger Protein und fungiert bei der Ubiquitinilierung und Degradation von Bob/Orf, Synpatosin und einigen anderen Proteinen als E3 Ligase für Ubiquitin.

Daher wurde zunächst untersucht, ob SIAH-1 mit HIPK2 in Hela Zellen kolokalisiert. Zur Lokalisation wurde ein SIAH-1 Konstrukt verwendet, was eine Mutation in der RING Domäne trägt, wodurch die Ubiquitinilierung und Degradation von Substratproteine verhindert wird. Bei diesen Studien wurde für HA-SIAH-1 C44S in



**Abbildung 24. HIPK2 kolokalisiert und interagiert *in vitro* mit SIAH-1.**

(a) HeLa Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit 1 µg GFP-HIPK2 WT und 100 ng HA-SIAH-1 C44S transfiziert. 36 Stunden später wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation von HIPK2 (grün) durch intrinsische Fluoreszenz des GFP und SIAH-1 (rot) sichtbar gemacht. Die chromosomale DNA wurde durch DAPI angefärbt. (b) *In vitro* translatierte, <sup>35</sup>S-markierte HIPK2, bzw. die Mutanten wurden

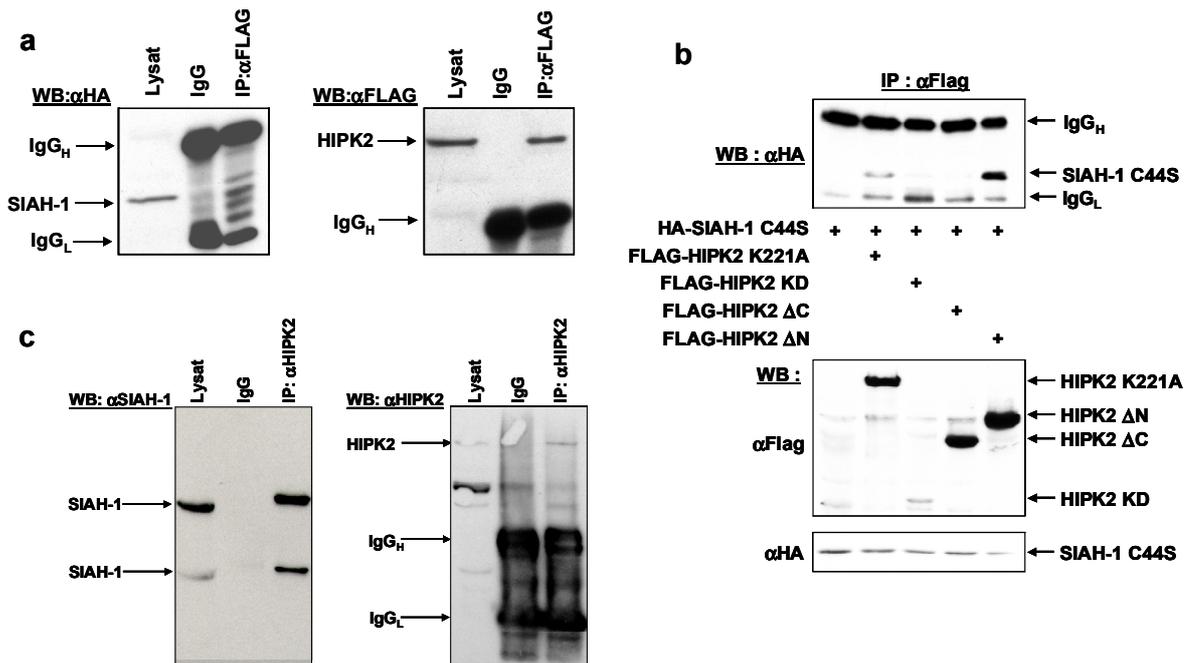
mit GST oder GST-SIAH-1 inkubiert und mit Gluthathion-Sepharose präzipitiert. Die Präzipitate und 25% des *in vitro* Einsatzes wurden durch SDS PAGE aufgetrennt und das getrocknete Gel wurde autoradiographiert. (c) wie in (b), nur das <sup>35</sup>S-markierte HIPK2 mit GST-SIAH-1 und Mutanten hiervon inkubiert wurden. Die verwendeten Konstrukte sind schematisch dargestellt.

Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Wissenschaftler (Boehm J. et al, 2001) eine punktierte Lokalisation innerhalb des mit DAPI markierten Zellkerns und eine schwächere zytoplasmatischen Färbung beobachtet (Abbildung 24a). In vielen der punktierten nukleären Aufenthaltsorten von SIAH-1 konnte eine Kolo-kalisation mit HIPK2 festgestellt werden.

Im Folgenden wurde die in Hefe gefundene Interaktion durch Gluthathione-S-Transferase (GST) „pull-down“ Experimente überprüft. Dazu wurde GST alleine oder GST-SIAH-1 in Gegenwart von *in vitro* translaterter, <sup>35</sup>S markierter HIPK2, HIPK2 ΔC oder HIPK2 ΔN unter geeigneten Pufferbedingungen gemischt. Nach Präzipitation mit Gluthathion Sepharose und Autoradiographie wurde die Hefe Interaktion für GST-SIAH-1 und HIPK2 bestätigt werden (Abbildung 24b). Kartierungsexperimente identifizierten den Carboxyterminus von HIPK2 als Interaktionsbereich. In allen Fällen kopräzipitierte HIPK2 nicht mit GST, so dass die Interaktionen spezifisch für SIAH-1 sind. Bei einem reziproken GST „pull-down“ Ansatz mit <sup>35</sup>S- HIPK2 in Kombination mit GST-SIAH-1, GST-SIAH-1 ΔC oder GST-SIAH-1 ΔN ist der Carboxyterminus von SIAH-1 als für eine Interaktion hinreichend identifiziert worden (Abbildung 24c). Die Interaktion zwischen HIPK2 und SIAH-1 konnte anhand dieser Ergebnisse auf einen Bereich zwischen den Aminosäuren 551 und 1191 für HIPK2 und 80-222 für SIAH-1 eingegrenzt werden.

Zur Klärung der *in vivo* Interaktion der beiden Proteine wurden Hela Zellen mit FLAG-HIPK2 und HA-SIAH-1 C44S transfiziert. Dabei wurde nach Präzipitation von HIPK2 mit FLAG Antikörpern kopräzipitierendes SIAH-1 detektiert werden (Abbildung 25a). Durch Inkubation derselben Membran mit FLAG Antikörpern konnte die Anwesenheit von HIPK2 nachgewiesen werden. Unter Verwendung verschiedener HIPK2 Deletionsmutanten zeigten Kartierungsexperimente in Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen den Carboxyterminus von HIPK2 als Interaktionsdomäne (Abbildung 25b).

Um Aufschluss über die Interaktion der endogenen Proteinen zu erhalten, wurde U2OS Zellen lysiert und endogene HIPK2 präzipitiert. Bei dem anschließenden Westernblot konnte kopräzipitierendes, endogenes SIAH-1 Protein nachgewiesen werden (Abbildung 25c). Als Kontrolle wurde dieselbe Membran danach mit einem HIPK2 Antikörper inkubiert. Hierbei konnte für HIPK2 ebenfalls in der Lysat als auch in der mit HIPK2 präzipitierten Spur das Vorhandensein von HIPK2 nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass es neben dem Signal für die monomere SIAH-1 Form von etwa 35 kDa ein weiteres Signal in Höhe von etwa 75 kDa erkennbar ist. Dies ist konform mit Beobachtungen anderer Wissenschaftler (Frew, et al., 2002). Ob es sich um dieses in manchen Zelllinien beobachtete Phänomen um eine Dimerisierung von SIAH Proteinen handelt oder um eine kovalente Modifikation mit einem bisher unidentifizierten Protein, ist unklar.



**Abbildung 25. HIPK2 interagiert *in vivo* mit SIAH-1.**

(a) HeLa Zellen wurden mit FLAG-HIPK2 und HA-SIAH-1 C44S transfiziert. Die Lysate (1. Spur, 15 %) wurden mit einem isotyp spezifischen IgG Antikörper (2. Spur) präzipitiert und die geklärten Überstände mit FLAG Antikörpern präzipitiert (3. Spur). Der Westernblot wurde mit HA-Antikörpern auf kopräzipitierendes SIAH Protein untersucht und zur Kontrolle wurde HIPK2 mittels FLAG Antikörpern detektiert. (b) HeLa Zellen wurden mit Flag-HIPK2 WT, Kinase Domäne (KD),  $\Delta$ C oder  $\Delta$ N in

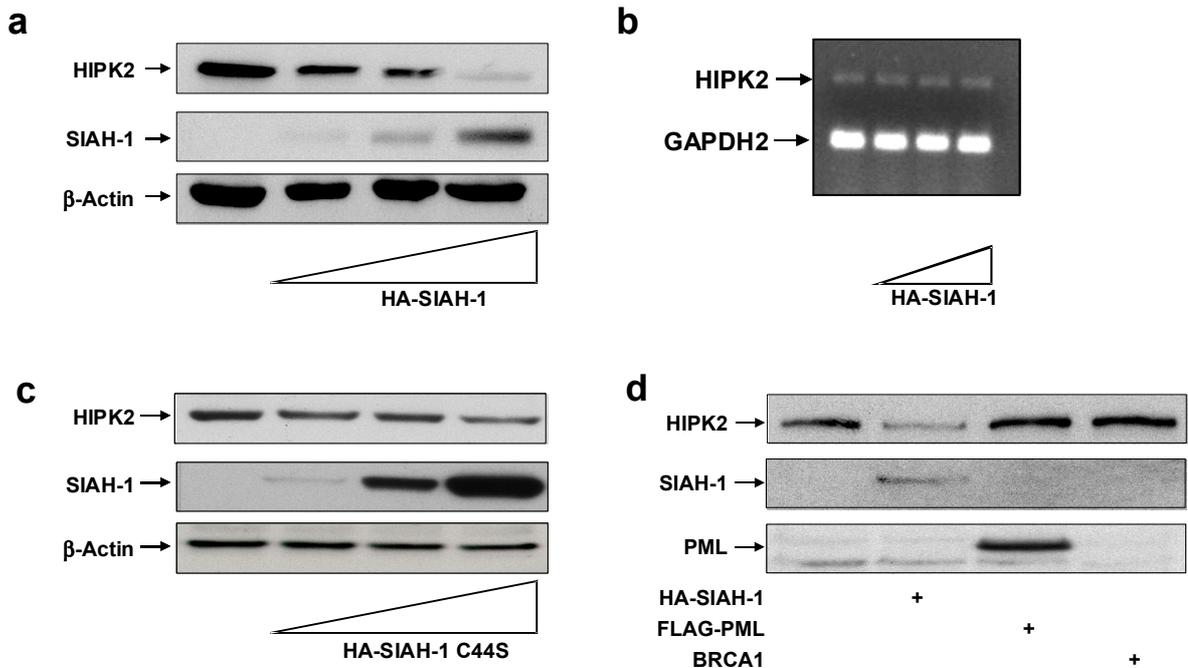
Kombination mit HA-SIAH-1 C44S transfiziert. Die Lysate wurden mit FLAG-Antikörpern präzipitiert. (c) U2OS Zellen wurden lysiert. Das Lysat wurde mit 1,5 µg eines Kontrollantikörpers gleichen Isotyps präzipitiert (IgG Spur) und darauf folgende mit 1,5 µg eines Hasen HIPK2 Antiserums (IP:αHIPK2). 10 % des Lysates wurde als Kontrolle aufgetragen.

SIAH-1 besitzt eine N-Terminale RING Domäne. Proteine mit einer RING Domäne sind sehr häufig in der proteosomalen Degradation von Proteinen beteiligt. Dabei spielen die RING Proteine eine Rolle als E3 Ligasen für die kovalente Anheftung eines Ubiquitin Proteins an das Substrat. Daher sollte überprüft werden, ob die Interaktion zwischen HIPK2 und SIAH-1 zu einer Degradation von HIPK2 führt.

Hierzu wurden U2OS Zellen mit einem Leervektor oder steigenden Mengen von HA-SIAH-1 transfiziert. Aus den Ansätzen wurden Proteinextrakte gewonnen und auf HIPK2, SIAH-1 und β-Actin untersucht (Abbildung 26a). Die Expression von steigenden Mengen SIAH-1 resultierte in einer starken Verringerung der HIPK2 Proteinmenge. Diese Verminderung des HIPK2 Signals kann durch eine Degradation auf Proteinebene oder einer Regulation auf mRNA Ebene zurückzuführen sein. Zur Klärung dieser Frage wurden U2OS Zellen wie oben beschrieben transfiziert und aus den Zellen mRNA isoliert. In einer quantitative RT-PCR blieben die Mengen von HIPK2 mRNA gleich, unabhängig von der transfizierten SIAH-1 Menge (Abbildung 26b). Die Abwesenheit genomischer DNA und der Einsatz gleicher cDNA Mengen wurden durch einen GAPDH Abgleich (Abbildung 26b) und verschiedene andere Test-PCRs überprüft (Daten nicht gezeigt).

Die Degradation von HIPK2 beruht auf der intakten RING Domäne von SIAH-1, was durch eine Analyse der SIAH-1 C44S Mutante demonstriert wurde. Die Expression steigender Mengen von SIAH-1 C44S führte zu keiner Verringerung der HIPK2 Mengen (Abbildung 26c). Da SIAH-1 C44S auch nicht mehr in der Lage ist, sich selbst zu ubiquitinieren und damit für den proteosomalen Abbau zu markieren, sind die Mengen an SIAH-1 C44S höher als in dem analogen Experiment mit SIAH-1 (Vergleiche 26a und 26c). Ein Test der Spezifität zeigte, dass nicht die bloße Koexpression einer RING Domäne ausreichend ist, die Proteinmengen von HIPK2 zu verringern. Die Verwendung von den RING Finger Proteinen HA-SIAH-1, PML oder BRCA1 zeigte, dass nur SIAH-1 in der Lage war, die HIPK2 Proteinmengen zu

reduzieren (Abbildung 26d), wohingegen PML oder BRCA1 Expression keinen Einfluss hatten.

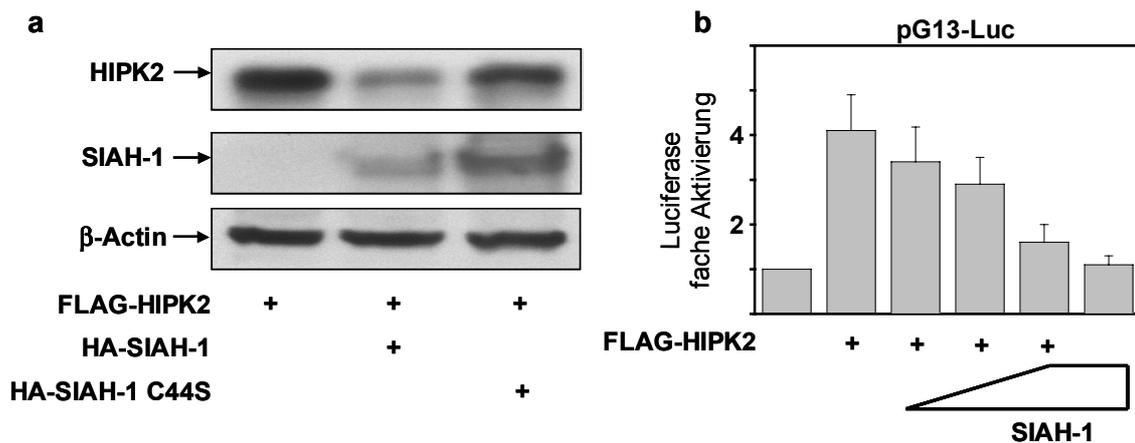


**Abbildung 26. Das endogene HIPK2 Protein wird durch Interaktion mit SIAH-1 auf Proteinebene degradiert.**

(a) U2OS Zellen wurden mit Leervektor oder steigenden Mengen (2, 4, 8  $\mu$ g) HA-SIAH-1 transfiziert. 24 Stunden später wurde die Hälfte der Zellen lysiert und 20 % der Lysate auf HIPK2, HA-SIAH-1 und  $\beta$ -Actin hin untersucht. (b) Die zweite Hälfte des Ansatzes aus (a) wurde lysiert und aus den Proben mRNA isoliert. Diese wurde dann durch reverse Transcriptase in cDNA umgeschrieben und in einer quantitativen PCR mit Primern für HIPK2 und GAPDH2 analysiert. (c) U2OS Zellen wurden mit Leervektor, 2, 4 oder 8  $\mu$ g HA-SIAH-1 C44S transfiziert. Die Analyse erfolgte wie unter (a) beschrieben. (d) U2OS Zellen wurden mit 6  $\mu$ g Leervektor oder 6  $\mu$ g HA-SIAH-1, FLAG-PML oder BRCA1 transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen lysiert und die Proben nach einem SDS Page und Western Blot mit Antikörpern auf HIPK2, SIAH-1, PML, BRCA1 und  $\beta$ -Actin detektiert.

Weitere Experimente in U2OS Zellen zeigen, dass auch überexprimiertes HIPK2 von SIAH-1, aber nicht von SIAH-1 C44S degradiert werden kann (Abbildung 27a).

Die Auswirkungen auf HIPK2 vermittelte Genexpression wurde in U2OS Zellen mit einem p53-abhängigen Reporterkonstrukt gemessen (Abbildung 27b). Die durch HIPK2 Expression induzierte Aktivierung wurde durch steigende Mengen von koexprimierten SIAH-1 fast vollständig aufgehoben. Dies zeigt, dass SIAH-1 die Effektorfunktionen von HIPK2 beeinflusst.



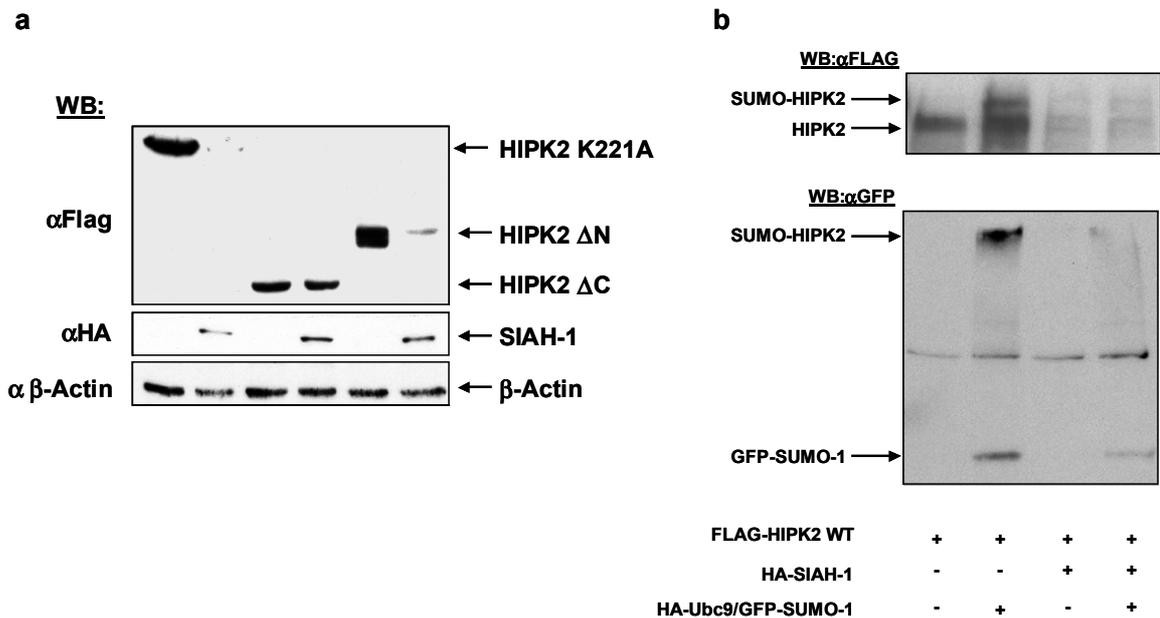
**Abbildung 27. Die Regulation von HIPK2 durch SIAH-1 beeinflusst die Aktivität von HIPK2.**

(a) Hela Zellen wurden mit 3 µg FLAG-HIPK2 und 50 ng HA-SIAH-1 oder HA-SIAH-1 C44S wie gezeigt transfiziert. 36 Stunden später erfolgte die Lyse der Zellen und die Analyse mittels Western Blot Analyse mit FLAG-spezifischen (für HIPK2), HA-spezifischen (für SIAH) oder β-Actin-spezifischen Antikörpern. (b) U2OS Zellen wurden mit einem Reporterkonstrukt (pG13-Luc) alleine oder in Kombination mit 1 µg FLAG-HIPK2 alleine oder in Kombination mit steigenden Mengen (5 ng, 15 ng, 30 ng) HA-SIAH-1 transfiziert. Nach 30 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Im Folgenden wurde untersucht, welcher Bereich von HIPK2 für die Degradation durch SIAH-1 notwendig ist. Dazu wurden verschiedene HIPK2 Mutanten bezüglich des SIAH-1 vermittelten Abbau hin untersucht. Die kinasedefiziente HIPK2 wurde durch SIAH-1 Koexpression abgebaut (Abbildung 28a). HIPK2 ΔC konnte nicht mehr durch SIAH-1 abgebaut werden, während die Menge an HIPK2 ΔN hingegen nach Koexpression von SIAH-1 reduziert wurde. Somit ist der HIPK2 C-Terminus für SIAH-1 vermittelte Degradation wichtig.

Diese Untersuchungen wurden in 293T Zellen durchgeführt, da sie kein endogenes HIPK2 Protein enthalten (Tabelle 1). Wurde das gleiche Experiment in Hela oder U2OS Zellen durchgeführt, wurden alle Einzelbereiche von HIPK2 degradiert (Daten nicht gezeigt). Dies könnte darauf schließen lassen, dass überexprimierte HIPK2 mit endogener HIPK2 interagieren kann und somit auch abgebaut wird.

Die kovalente Modifizierung eines Proteins mit dem Small-Ubiquitin-like-modifier-1 (SUMO-1) führt zu einer veränderten Proteinlokalisierung und einer erhöhten Proteinstabilität. Humane HIPK2 wird an Lysin 25 kovalent durch SUMO-1 modifiziert (Daten nicht gezeigt). Für Maus HIPK2 konnte gezeigt werden, dass Ubc9 das E2 Enzym für die Modifikation durch SUMO-1 ist. Um zu untersuchen, ob die SUMO-1 modifizierte HIPK2 auch durch SIAH-1 abgebaut wird, wurden Hela Zellen mit HIPK2 alleine oder in Kombination mit SIAH-1 oder SUMO-1 transfiziert (Abbildung 28b). Hierbei konnte beobachtet werden, dass HIPK2 effektiv durch Expression von GFP-SUMO-1/Ubc9 SUMOliert werden konnte. Dies ist an der langsamer migrierenden Bande oberhalb des eigentlichen HIPK2 Signals zu erkennen. Eine Expression von SIAH-1 führt zu Degradation von HIPK2. Wurde HIPK2 in Gegenwart von GFP-SUMO/Ubc9 und SIAH-1 exprimiert, so wurde sowohl die SUMOlierte als auch die unmodifizierte HIPK2 degradiert. Dies zeigt, dass in diesem Ansatz die SUMOlierung von HIPK2 offensichtlich keinen Schutz gegen den SIAH-1 induzierten Abbau bietet.

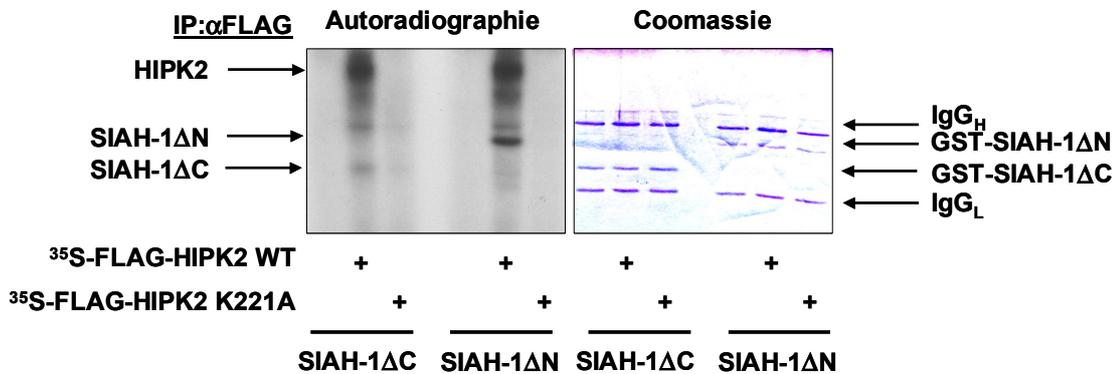


**Abbildung 28. Kartierung der HIPK2 Domäne, die für die Degradation notwendig ist.**

(a) 293T Zellen wurden mit FLAG-HIPK2 K221A, FLAG-HIPK2  $\Delta$ C oder FLAG-HIPK2  $\Delta$ N mit oder ohne HA-SIAH-1 transfiziert. Nach Lyse der Zellen wurden die gezeigten Proteine im Western Blot nachgewiesen. (b) HeLa Zellen wurden mit HIPK2 WT und GFP-SUMO-1/HA-Ubc 9 transfiziert. Dieser Ansatz wurde mit oder ohne Kotransfektion von HA-SIAH-1 durchgeführt. Nach SDS-Page wurden die Proteine wie angegeben analysiert.

Da HIPK2 eine Kinase ist, wurde untersucht, ob *in vitro* translatierte  $^{35}\text{S}$  markierte HIPK2 WT und HIPK2 K221A verschiedene bakteriell exprimierte GST-SIAH Konstrukte *in vitro* phosphorylieren können. In der Autoradiographie ist deutlich eine Phosphorylierung von GST-SIAH-1  $\Delta$ N durch HIPK2 WT zu erkennen, wohingegen keine Phosphorylierung auftritt, wenn HIPK2 K221A oder das Retikulozytenlysat verwendet wird. GST-SIAH-1  $\Delta$ C wurde jedoch von HIPK2 nicht phosphoryliert (Abbildung 29a).

Als Kontrolle für die Verwendung identischer GST-Proteinmengen wurde das SDS-Page vor dem Trocken mit Coomassie angefärbt (Abbildung 29b). Deutlich ist zu erkennen, dass in den drei Spuren, in denen GST-SIAH-1  $\Delta$ C bzw. DN eingesetzt wurden, jeweils die gleiche Menge GST-Protein eingesetzt wurde.



**Abbildung 29. HIPK2 phosphoryliert den Carboxyterminus von SIAH-1.**

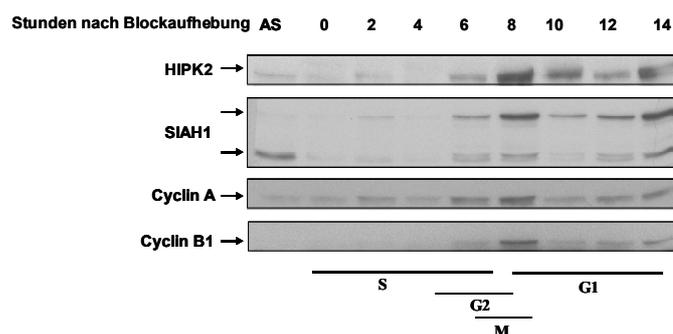
*in vitro* translatierte <sup>35</sup>S-HIPK2 WT oder K221A wurden mit GST-SIAH-1 ΔC oder GST-SIAH-1 ΔN als Substrat in einem Kinaseassay mit  $\gamma^{32}$ P-ATP eingesetzt und die Phosphorylierung von GST-SIAH-1 in einer Autoradiographie bestimmt. Dabei wurde das <sup>35</sup>S Signal abgeschirmt. Daneben die Coomassie Färbung des gleichen Geles.

Für HIPK2 wurde eine Zellzyklus-abhängig Regulation festgestellt. Daher wurde als nächstes die Verteilung von SIAH-1 im Zellzyklus untersucht. Hierzu wurden Hela Zellen mit einem Doppel-Thymidinblock an dem Übergang der G1 zur S-Phase angehalten und synchron in die S-Phase entlassen. Man konnte für HIPK2 ein schwaches Signal erkennen, welches nach 4 Stunden, bei dem die Zellen sich alle in der S-Phase befanden, kaum noch erkennbar war. Nach etwa 6 Stunden wurde das Signal wieder stärker, sodass es nach 8 Stunden die höchste Intensität erreichte. Nach 10 Stunden ging das Signal wieder stark zurück (Abbildung 30). Für SIAH-1 konnte während der S-Phase der Zellen ebenfalls nur ein schwache Expression detektiert werden. Wie die Expression der HIPK2, so gab es auch für SIAH-1 das stärkste Signal nach 8 Stunden nach Aufhebung des Blocks. Analog zum HIPK2 Signal, wurde auch das SIAH-1 Signal danach wieder schwächer.

Die Zellzyklusphasen, in der sich die Zellen zu den untersuchten Zeitpunkten befunden haben, wurde durch eine Analyse einiger Zellzyklusmarker bestimmt. Cyclin A wird zum Ende der S-Phase exprimiert, und hat die höchste Expression in der G2-Phase. Zur M-Phase hin fällt die Expression sehr schnell ab. Cyclin B1 ist spezifisch für die M-Phase des Zellzyklus. Untersuchungen der Proteinlysate zeigte für Cylin A eine starke

Expression bei 6 und 8 Stunden. Dies lässt darauf schließen, dass zu diesen Zeitpunkten die Zellen sich in der G2-Phase befinden. Entsprechend ließ sich Cyclin B1 8 Stunden nach Aufhebung des Blocks nachweisen. Dies bedeutet, dass sich zu diesem Zeitpunkt viele Zellen in der Mitose befinden.

Eine parallele Bestimmung der Zellzyklusparameter durch eine FACS-Analyse bestätigte, dass sich die Zellen bis 4 Stunden synchron in der S-Phase befinden. Nach 8 Stunden sind die Zellen zum Teil in der G2/M-Phase, wobei sich aber 21 % schon in der frühen G1-Phase befinden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expressionsmenge von HIPK2 und SIAH-1 zu ähnlichen Zeitpunkten im Zyklus einer Zelle vergleichbar reguliert sind. Außerdem bestätigen diese Experimente den Befund, dass HIPK2 am Ende der S-Phase abgebaut wird.

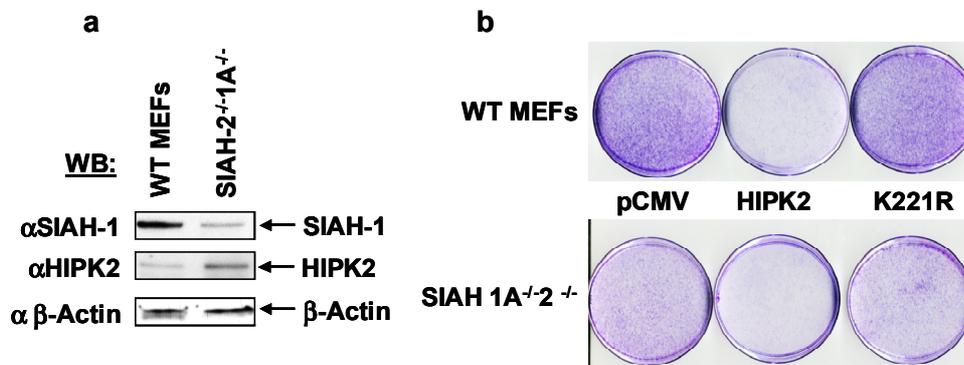


**Abbildung 30. Zellzyklusverteilung von endogener HIPK2 und SIAH-1 Proteinen.**

Hela Zellen wurden mit einem doppelten Thymidin Block an der Grenze von der G1 zur S-Phase synchronisiert. Nach Lösen des Blocks wurden zu den angegebenen Zeitpunkten ein Teil der Zellen lysiert und die Proteinmengen für HIPK2, SIAH-1 und die angegebenen Zellzyklus Phasen spezifischen Proteine analysiert. Ein anderer Teil der Zellen wurde zu den Zeitpunkten fixiert und eine Zellzyklus Analyse per FACS durchgeführt. Das Ergebnis ist schematisch dargestellt. AS: Asynchrone Zellen

Nun wurden die HIPK2 Proteinmenge in SIAH-1A<sup>-/-</sup>2<sup>-/-</sup> Maus Embryonalen Fibroblasten (MEFs) mit denen in Wildtyp MEFs verglichen. Diese Doppel „knock out“ Zellen besitzen nur noch das SIAH-1B Protein. Die Menge an HIPK2 ist in den SIAH-1A<sup>-/-</sup>2<sup>-/-</sup> MEFs gegenüber dem Wildtyp MEFs signifikant erhöht. Wurde die Proliferationsgeschwindigkeit der beiden MEFs miteinander verglichen, so konnte kein wesentlicher Unterschied ermittelt werden (Frew, et al., 2002), jedoch resultierte eine

exogene Expression von muriner HIPK2 zu einer kinaseabhängigen Inhibition der Kolonieformierung (Abbildung 31b).



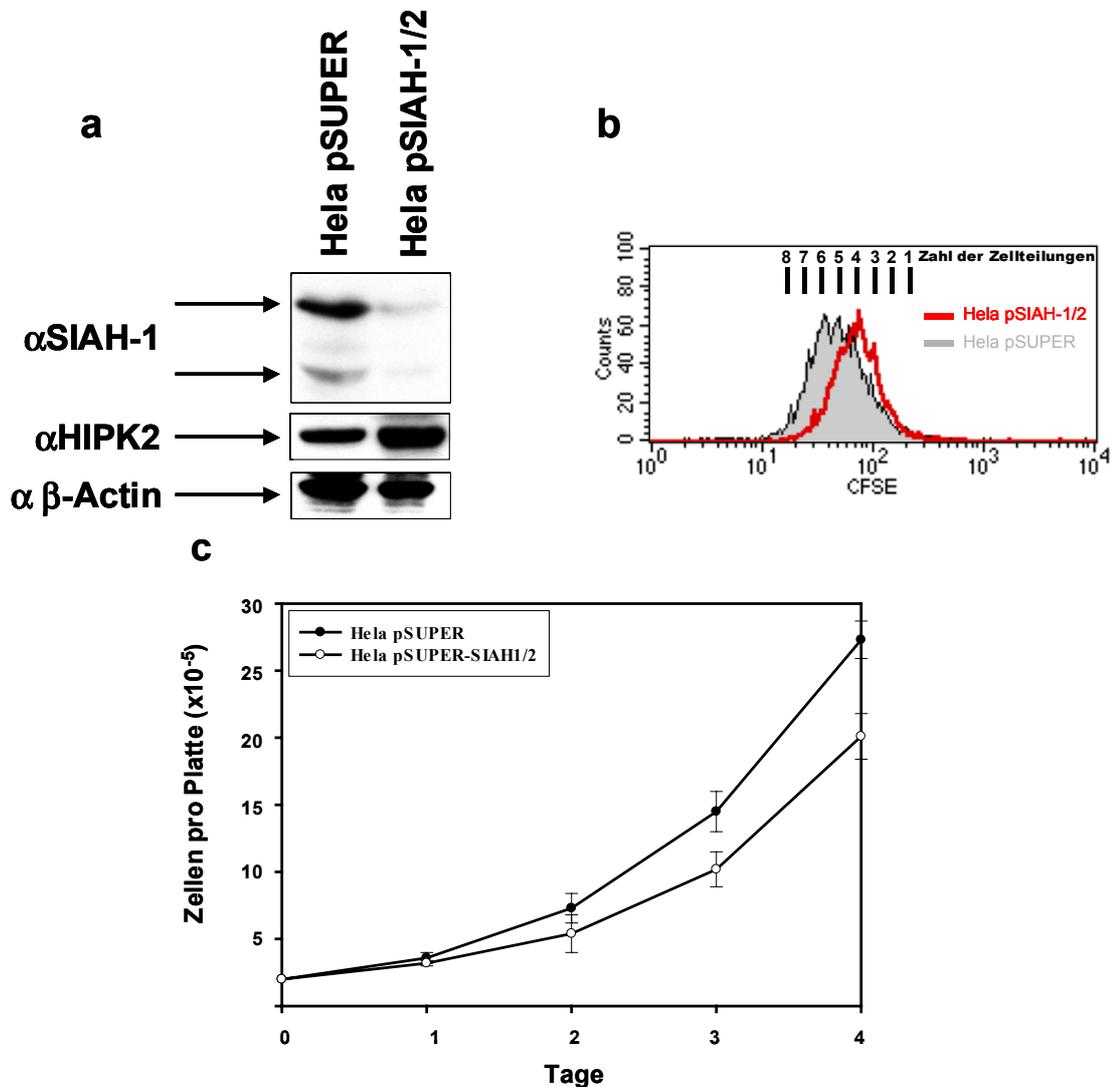
**Abbildung 31. Wildtyp und SIAH-1A<sup>-2</sup>-MEFs zeigen nur geringe Unterschiede in der HIPK2 Menge.**

(a) Gleiche Proteinmengen von Wildtyp und SIAH-1A<sup>-2</sup>-MEFs wurden im Westernblot auf die Proteinmengen von HIPK2 hin untersucht. (b) Kolonieformierungstest von Wildtyp und SIAH-1A<sup>-2</sup>-MEFs nach Expression eines Leervektors, HIPK2 oder HIPK2 K221A. Die MEFs wurden mit je 1,5 µg des entsprechenden Konstruktes transfiziert, auf positiv transfizierte MEFs mit G418 selektiert und 14 Tage zu Kolonien wachsen gelassen. Die Kolonien wurden mit Crystalviolett gefärbt.

Um nun eine Situation ohne endogenes SIAH Protein zu untersuchen, wurden HeLa Zellen stabil mit pSUPER als Kontrolle oder pSUPER-SIAH-1/2 transfiziert. Die stabilen HeLa pSUPER-SIAH-1/2 Zellen zeigen eine um 90 % reduzierte Menge an endogenem SIAH-1 Protein im Vergleich zu HeLa pSUPER Zellen (Abbildung 33a). Der Proteinmenge von SIAH-2 konnte hingegen nicht bestimmt werden, da zur Zeit kein Antikörper für dieses endogene Protein existiert. Jedoch wurde das verwendete Konstrukt so ausgewählt, das es beide SIAH Formen vermindern sollte. Der Proteinmenge von endogener HIPK2 ist in den HeLa pSUPER-SIAH-1/2 im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht (Abbildung 33a).

Da die HeLa-pSUPER-SIAH-1/2 Zellen augenfällig langsamer proliferierten als die Kontrollzellen, wurde ein CFSE-basierender Zellproliferationstest durchgeführt. CFSE (5(6)-CFDA,SE) ist ein Farbstoff, der frei in eine Zelle diffundiert, sich im Zytoplasma anlagert und dort über mehrere Wochen stabil bleibt. Bei jeder Zellteilung wird CFSE

zu gleichen Teilen an die beiden Tochterzellen weitergeben, sodass die CFSE Menge mittels FACS Analyse quantifiziert werden kann.



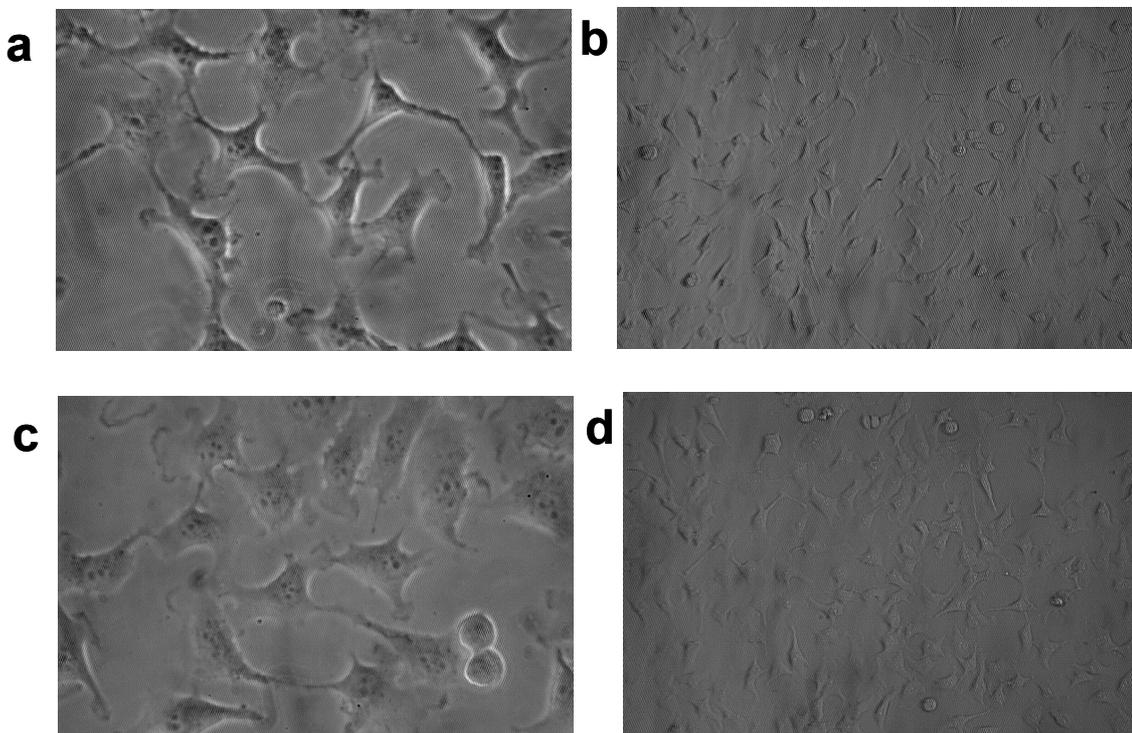
**Abbildung 33. Charakterisierung von HeLa-pSUPER-SIAH-1/2 Zellen.**

(a) Stabil transfizierte HeLa pSUPER oder HeLa pSUPER-SIAH-1/2 Zellen wurden mittels Westernblot bezüglich der SIAH-1, HIPK2 und  $\beta$ -Actin Mengen verglichen. (b) HeLa pSUPER oder HeLa pSUPER-SIAH-1/2 Zellen wurden mit CFSE gefärbt und 5 Tage später die Fluoreszenz mittels FACS analysiert. (c)  $1 \times 10^5$  HeLa pSUPER oder HeLa pSUPER-SIAH-1/2 Zellen wurden ausgesät und die Zellzahl nach den angegebenen Tagen ausgezählt

Die HeLa-pSUPER Kontrollzellen teilten sich nach 5 Tage etwa 1 bis 2 mal häufiger als die HeLa-pSUPER-SIAH-1/2 Zellen (Abbildung 33b). Auch die Bestimmung der

Zellzahl zeigte eine deutliche Verlangsamung der Zellproliferation in Hela-pSUPER-SIAH-1/2 Zellen (Abbildung 33c)..

Die beiden Zelllinien unterscheiden sich aber auch morphologisch. So sind die Hela pSUPER Zellen nicht von unbehandelten Hela Zellen zu unterscheiden. Sie zeigen eine gestreckte Morphologie mit relativ wenig Zytoplasma. Hingegen sind die Hela pSUPER-SIAH-1/2 Zellen nicht so gestreckt und das Zytoplasma ist runder und vergrößert (Abbildung 34).

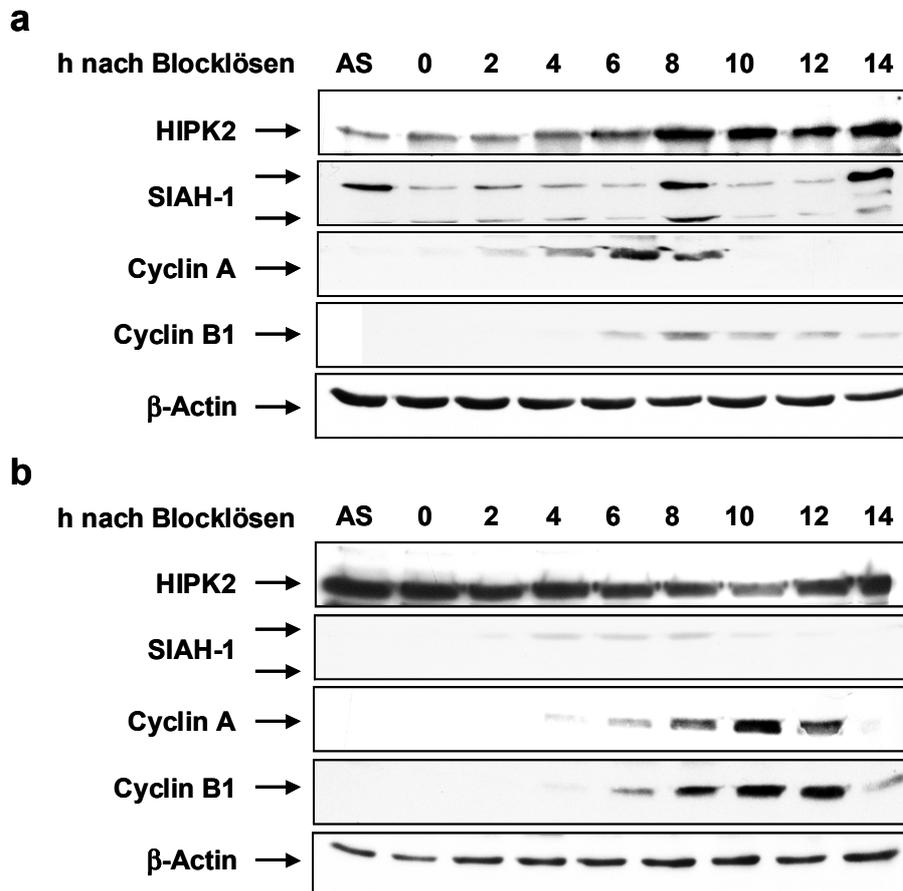


**Abbildung 34. Morphologische Unterschiede zwischen Hela pSUPER und Hela-pSUPER-SIAH-1/2 Zellen.**

Lichtmikroskopische Analyse von Hela pSUPER Zellen (a+b) und Hela pSUPER-SIAH-1/2 Zellen (c+d). a+c sind jeweils Aufnahmen mit einem 20x, b+d mit einem 2.5x Objektiv.

In Abbildung 28 konnte gezeigt werden, dass HIPK2 und SIAH-1 während des Zellzyklus ähnlich reguliert sind. Daher wurde nun die Distribution von HIPK2 in Hela pSUPER-SIAH-1/2 Zellen mit der in Hela-pSUPER Zellen verglichen. Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, ist die HIPK2-Menge in den Kontrollzellen während der S-Phase gering und steigt zur Mitose/G1-Phase stark an. Im Gegensatz hierzu ist der

Proteinmenge von HIPK2 in der S-Phase erhöht. Deutlich sieht man auch in diesem Experiment, dass die SIAH negativen Zellen länger brauchen, um die Mitose zu



**Abbildung 35. Zellzyklus Analyse von HeLa pSUPER und HeLa-pSUPER-SIAH-1/2 Zellen.**

HeLa pSUPER Zellen (**a**) und HeLa pSUPER-SIAH-1/2 Zellen (**b**) wurden mit einem doppelten Thymidin Block an der Grenze von der G1- zur S-Phase synchronisiert. Nach Lösen des Blocks wurden zu den angegebenen Zeitpunkten ein Teil der Zellen lysiert und die Proteinmengen für HIPK2, SIAH-1 und die angegebenen Zellzyklusphasen spezifischen Proteine analysiert. Ein anderer Teil der Zellen wurde zu den Zeitpunkten fixiert und eine Zellzyklus Analyse per FACS durchgeführt. AS: Asynchrone Zellen

durchlaufen. Beide Linien zeigen ein hohes Maß an Synchronität zu Zeitpunkt des Lösen des Blocks. Nach 8 Stunden befinden sich 80 % der Kontrollzellen in der G2/M Phase. Hingegen befinden sich bei den HeLa-pSUPER-SIAH-1/2 Zellen zu diesem Zeitpunkt nur 36 % in dieser Phase, die meisten Zellen befinden sich hier noch in der S

Phase. Es zeigte sich also kein Unterschied des HIPK2 Signals in den verschiedenen Zellzyklusphasen.

Für HIPK2 konnte somit durch zellbiologische und biochemische Untersuchungen eine Regulation innerhalb des Zellzyklus demonstriert werden. Gleichzeitig wurde HIPK2 als Substrat der Ubiquitinligase SIAH-1 identifiziert, wodurch auch die Effektorfunktionen von HIPK2 betroffen sind. Die ähnliche Regulation beider Proteine innerhalb des Zellzyklus und die Disregulation der HIPK2 Degradation ohne funktionelles SIAH-1 weisen auf einen funktionellen Zusammenhang in der Kontrolle von HIPK2 innerhalb des Zellzyklus hin.

## **IV. Diskussion**

### **4.1 HIPK2 Domänen – Ein neues nukleäres Subkompartiment**

Die wesentlichen Funktionen des Zellkerns reichen von Transkription und Replikation, der Prozessierung und Transport von mRNA, bis zur Biogenese von Ribosomen. Diese unterschiedlichen Funktionen muss die individuelle Zelle mit den umgebenen Zellen eines Gewebes koordinieren. Zur Ausführung dieser Aufgaben entwickelten sich hochkomplexe signalweitergebende und interpretierende Proteinnetzwerke, welche letztendlich die richtige Antwort innerhalb des Nukleus auf ein Signal gewährleisten. In nukleären Subkompartimenten kommt es durch eine hohe Konzentration spezifischer Enzyme und der Aggregation ihrer Substrate zu abgegrenzten biochemischen Reaktionsräumen. Klassische Beispiele für nukleäre Subkompartimente sind die Nukleoli. In den letzten Jahren wurden weitere Zellkernkompartimente entdeckt, zu denen die PML-NBs und die Cajal Körper gehören.

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der Lokalisation von HIPK2 in der Zelle. Sie zeigte eine punktförmige Verteilung innerhalb des Zellkerns. Interessanterweise wurde keine Kolo­kalisierung mit Nukleoli und Cajal Körpern gefunden, wohl aber eine partielle Überlappung mit PML-NBs. Das HIPK2 Protein konzentriert sich sowohl endogen als auch exogen überwiegend in etwa 10 bis 40 kleine, runde Orte, wohingegen die PML-NBs viel größer, dafür aber nicht so zahlreich sind. Aufgrund dieser Daten stellen die Aufenthaltsorte von HIPK2 ein neues nukleäres Kompartiment, die HIPK2 Domänen, dar.

Im Gegensatz zur endogenen HIPK2 lokalisiert die kinasdefiziente HIPK2 K221A im Nukleoplasma, wobei sie die Nukleoli ausspart. Es erfolgt aber keine Konzentration in HIPK2 Domänen. Dies bedeutet, dass die Lokalisation in HIPK2 von einer funktionierenden Kinasefunktion abhängt. Zwei Gründe dafür sind denkbar. Zum einen könnte die HIPK2 in diesen Domänen ein anderes Protein phosphorylieren. Dies könnte der Auslöser der hohen Konzentration von HIPK2 rund um dieses mögliche Substrat sein. Eine andere Möglichkeit ergibt sich aus dem Befund, dass HIPK2 eine

autophosphorylierende Kinase ist (Abbildung 29). Daher wäre ein Zusammenhang zwischen Autophosphorylierung und Lokalisation denkbar. Die autophosphorylierte HIPK2 lokalisiert in den Domänen und phosphoryliert dort mögliche Substrate, während die unphosphorylierte HIPK2, wie auch die HIPK2 K221A, in einer nukleoplasmatischen Fraktion vorliegt. Fraglich ist, ob es einen Austausch zwischen diesen beiden Aufenthaltsorten der HIPK2 gibt und ob dieser Austausch einen Regulationsmechanismus für HIPK2 darstellen könnte, wobei gleichsam über die Freisetzung aus oder Akkumulation in die Domänen die HIPK2 Aktivität bestimmt wird.

Die Expression von HIPK2 K221A führt zu einer Deformation und Abschnürung des Zellkerns, welche unabhängig von p53 und Rb ist. Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche Funktion der HIPK2-Kinaseaktivität für die Erhaltung der Integrität des Zellkerns hin. Der Einfluss könnte durch eine unterbleibende Phosphorylierung von Kernmembranbestandteilen zu erklären sein. Ein mögliches Substratprotein wäre der Lamin B Rezeptor (LBR). Dieser wird unter anderem über die Phosphorylierung reguliert (Papoutsopoulou, et al., 1999). Eine Mutation des LBRs oder die falsche Phosphorylierung führen zu einer veränderten nukleären Morphologie von Granulozyten, ein Merkmal der vererbaren Pelger-Huët Anomalie (Hoffmann, et al., 2002). Eine andere Möglichkeit ist eine fehlerhafter Abbau und Zusammenbruch der Kernmembran in der Prometaphase der Mitose, eine unvollständig ablaufende Zytokinese oder eine unkorrekte Reorganisation der Kernmembran nach abgeschlossener Mitose. Die Untersuchungen der Regulation von HIPK2 haben eine sehr geringe Proteinmenge in der Mitose ergeben, jedoch eine stark ansteigende Menge nach Beendigung der Mitose. Somit ist eine Interaktion von HIPK2 mit der Reorganisation der Kernmembran am wahrscheinlichsten. Leider sind bislang die biochemischen Vorgänge, die zur Erhaltung der Kernmorphologie oder den Wiederaufbau des Zellkern nach der Mitose verantwortlich sind, ebenso wenig aufgeklärt wie der Einfluss der HIPK2 auf diese Prozesse.

## 4.2 Funktionelle Interaktion von HIPK2 mit dem PML-Nuclear Body Kompartiment

HIPK2 kolokalisiert partiell mit dem PML-NB Kompartiment. Durch Stimulation mit UV / As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oder Expression von PML IV konnte HIPK2 quantitativ in die PML-NBs rekrutiert werden. Bei der Analyse der für die Rekrutierung wichtigen Bereiche von HIPK2 konnte festgestellt werden, dass die Rekrutierung unabhängig von der intakten HIPK2-Kinasefunktion ist. Für die Konzentration in PML-NBs ist also im Gegensatz zu der in HIPK2 Domänen diese enzymatische Funktion nicht entscheidend. Die PML III Splicevariante ist nicht in der Lage, HIPK2 in die PML-NBs zu rekrutieren. Dahingegen können p53 und CBP durch die Expression einer beliebigen PML-Variante in PML<sup>+/+</sup> MEFs in PML-NBs rekrutiert werden. In PML<sup>-/-</sup> MEFs kann nur CBP, nicht aber p53, durch eine PML-Variante in neu ausgeformte PML-NBs rekrutiert werden (Bischof, et al., 2002). Die Ausbildung der HIPK2 Domänen in PML<sup>-/-</sup> MEFs ist hingegen unbeeinflusst (Dr. Sirma, persönliche Mitteilung). Somit scheint es sowohl überlappende als auch unterschiedliche Rekrutierungsmechanismen für HIPK2, CBP und p53 in PML-NBs zu geben. Möglicherweise wird über diese verschiedenen Signale die Zusammensetzung und die Funktion der PML-NBs je nach Situation variiert.

Die Expression von PML IV, nicht aber der anderen Splicevarianten, kann zelluläre Seneszenz in primären Fibroblasten oder PML<sup>+/+</sup> MEFs auslösen (Bischof, et al., 2002). In dieser Arbeit konnten aber für die HIPK2-vermittelten Inhibition der Zellproliferation keine Unterschiede gefunden werden, unabhängig davon, ob HIPK2 durch PML IV in PML-NBs lokalisiert oder nur eine partielle Kolokalisation mit PML-NBs zeigt. Auch die Induktion des p21<sup>Waf-1</sup> Proteins ist in beiden Situationen identisch. Ob es einen funktionellen Zusammenhang zwischen der spezifisch durch PML IV induzierten zellulären Seneszenz und der Lokalisation von HIPK2 in PML-NBs durch die Expression dieser Splicevariante gibt, ist ungeklärt.

HIPK2 kolokalisiert und interagiert in den PML-NBs auch mit dem Tumorsuppressorprotein p53, welches ein zentrales Schaltprotein der Proliferationskontrolle und der Apoptose ist. HIPK2 verstärkt zudem die p53-abhängige Genexpression und vermittelt die UV-induzierte p53-Phosphorylierung an Serin 46 (Abbildungen 9 bis 11, Hofmann, et al., 2002). p53 interagiert zudem mit PML IV und

kann durch die ektopische Expression von PML IV in PML-NBs rekrutiert werden. Zusätzlich wird die transaktivierende Funktion von p53 durch die Rekrutierung erhöht (Fogal, et al., 2000). Berücksichtigt man diese Resultate, so könnte die Phosphorylierung von p53 durch HIPK2 in PML-NBs stattfinden. Durch die Rekrutierung dieser beiden Proteine würden die PML-NBs den Ort für diese enzymatischen Funktionen darstellen. Im Einklang mit diesen Daten kann die Expression von PML IV, eventuell durch die Rekrutierung von HIPK2 in PML-NBs, die p53 Phosphorylierung an Serin 46 induzieren. Jedoch kommt es in PML<sup>-/-</sup> MEFs zu keiner Modulation der p53 Funktion (Bischof, et al., 2002). Zusammengefasst weisen diese Daten auf ein Netzwerk hin, in welchem PML IV notwendig aber alleine nicht ausreichend ist, HIPK2 und p53 in PML-NBs zu rekrutieren und die p53 Serin 46 Phosphorylierung zu ermöglichen. Anstatt der Expression von PML IV kann die Rekrutierung und Phosphorylierung auch durch den Stimulus UV / As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ausgelöst werden.

Zukünftige Experimente werden zeigen, welche HIPK2 Effektorfunktionen von PML-NBs abhängen und welche davon unabhängig sind (siehe Modelle 1 und 3).

Einige Wissenschaftler vertreten die Ansicht, dass PML-NBs einen Aufbewahrungsort für zur Zeit nicht gebrauchte Proteine darstellen (Maul, et al., 2000). Damit würden die HIPK2 Proteine, die mit PML-NBs kolokalisieren, dort transient gelagert werden. Demnach sollte eine Erhöhung der HIPK2 Proteinmenge die Menge in PML-NBs ebenfalls erhöhen. Jedoch führt die Erhöhung der HIPK2 Menge durch Transfektion nicht zu einer erkennbaren Zunahme von HIPK2 in PML-NBs (Abbildungen 4, 9, 10 und 13). Dies bedeutet, dass entweder das exogene HIPK2 Material nicht wie endogene HIPK2 reguliert und in PML-NBs gelagert wird oder aber dass die PML-NBs nicht vorrangig den Aufbewahrungsort für nicht benutzte HIPK2, vielleicht aber für andere Proteine, darstellen.

### 4.3 HIPK2 als Modulator der Genexpression

Eine wesentliche Funktion des Zellkerns ist die Genexpression. Die Zelle muss über komplexe Regulationsnetzwerke sicherstellen, dass die richtigen Gene zur richtigen Zeit exprimiert beziehungsweise reprimiert werden. Diese Aufgabe muss die Zelle mit den umgebenen Zellen eines Gewebes koordinieren. Die erste Kontrolle der Genexpression stellt die Variabilität der Zugänglichkeit der DNA dar. Diese ist abhängig von dem Acetylierungsstatus der Histone, welcher durch Histonacetylasen (CBP/p300 Familie oder PCAF) und Histondeacetylasen (HDACs) reguliert wird. HIPK2 interagiert mit der Histonacetylase CBP (Abbildung 12) und mit Histon-Deacetylasekomplexen (HDACs, Choi, et al., 1999). Die HIPK2-induzierte Phosphorylierung von p53 ermöglicht die anschließende CBP-vermittelte Acetylierung dieses Transkriptionsfaktors (Hofmann et al., 2002). HIPK2 ist, abhängig von der Kinasefunktion, ein breiter Aktivator der Genexpression (Abbildungen 10, 12 und Daten nicht gezeigt). Wenn HIPK2 die Aktivitäten von CBP und HDACs auch im Kontext der Histonacetylierung beeinflusst, wäre HIPK2 in der Modulation der Transkription involviert. Dies würde auch die Aktivierung verschiedener, voneinander funktionell unabhängiger Promotoren erklären. Erste Ergebnisse zeigen eine Veränderung des Acetylierungsstatus von Histonen nach der Expression von HIPK2 (Daten nicht gezeigt). Interessant wird die Aufklärung des Mechanismus sein, da nach bisherigen Daten CBP nicht durch HIPK2 direkt phosphoryliert wird (Daten nicht gezeigt). Andererseits werden die Histone und die Chromatinzugänglichkeit ebenfalls über Phosphorylierung reguliert (Orlando und Jones, 2002). Die Phosphorylierung von Histone 3 beispielsweise ist ein dynamischer Prozess und ist eine direkte Antwort auf Transkriptioninitiation (Thomson, et al., 2001). Von daher könnte die Interaktion von HIPK2 mit Histonacetylasen wie CBP im Chromatinkontext zu einer Phosphoacetylierung oder durch die Interaktion mit HDACs zu einer Phosphodeacetylierung von Histonen führen und damit die Genexpression regulieren.

Eine weitere, davon unabhängige funktionelle Bedeutung kann die Kolokalisation von HIPK2 und CBP in den PML-NBs haben. Für CBP wurde PML als transkriptioneller Koaktivator beschrieben (Doucas et al., 1999). Möglicherweise interagieren CBP und HIPK2 auch in den PML-NBs und können dort direkten Einfluss auf die basale

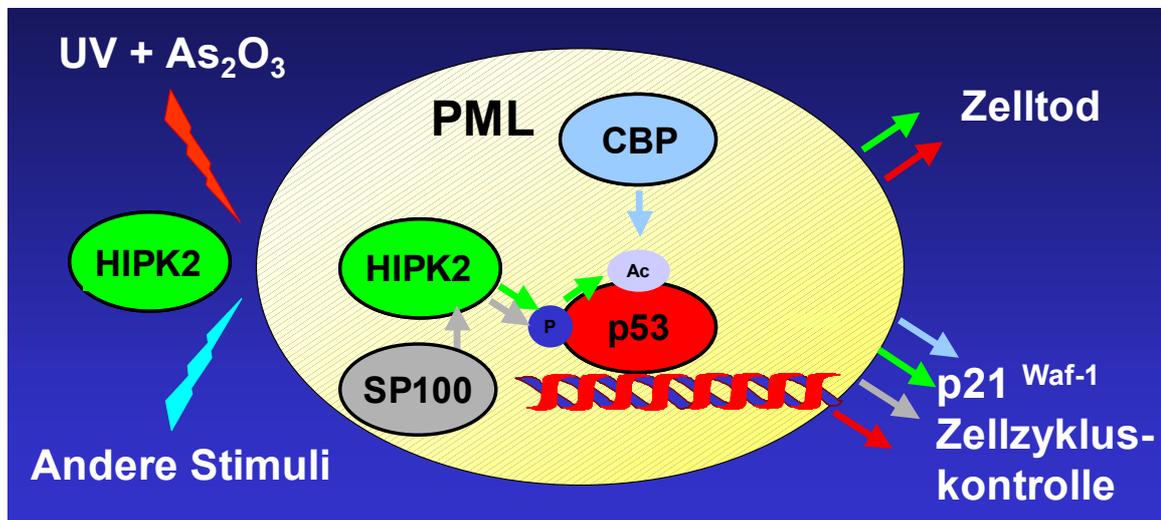
Transkriptionsmaschinerie nehmen oder als Proteinkomplex die PML-NBs verlassen und an anderer Stelle im Kern die Funktion ausüben. Für eine HIPK2 Funktion in den PML-NBs spricht das Auffinden von RNA-Polymerase II und nativer RNA-Transkripte in der Peripherie oder in PML-NBs.

#### **4.4 SP100 wirkt als transkriptioneller Koaktivator für HIPK2 vermittelte Genexpression**

SP100 ist ein konstitutives PML-NBs Protein, welches mit p53 und CBP kolokalisiert. SP100 alleine aktiviert weder die untersuchten Promotorkonstrukte, noch erhöht es die Proteinmenge von p21<sup>Waf-1</sup>. In Verbindung mit HIPK2 Expression konnte eine synergistische Stimulierung der HIPK2/p53-induzierten Genexpression gefunden werden. Diese stimulatorische Wirkung von SP100 als Koaktivator kann auf zwei mögliche Mechanismen zurückgeführt werden: Einerseits könnte sie darauf beruhen, dass SP100 die Aufhebung von Genrepression bewirkt und dadurch die HIPK2 vermittelte Genaktivierung verstärkt. Andererseits könnte SP100 als transkriptioneller Kofaktor für HIPK2-vermittelte Genexpression dienen. Für diese zweite Möglichkeit spricht auch der Befund, dass die beiden Proteine miteinander interagieren. Dies wäre für einen unabhängigen Mechanismus nicht notwendig.

Der Synergismus von HIPK2 und SP100 wurde auf die Aktivierung von p53-abhängigen Genen, wie der von p21<sup>Waf-1</sup>, hin untersucht. Gleichzeitig ist die exogene Erhöhung der Proteinmenge von SP100 für diesen Synergismus notwendig. Physiologisch kann die SP100 Proteinmenge durch die Stimulation von Zellen durch Interferon  $\gamma$  erhöht werden, was auch zu einer Erhöhung der p21<sup>Waf-1</sup> Proteinmenge führt (Sternsdorf, et al., 1999). Das Zytokin Interferon  $\gamma$  wird bei viralen Infektionen ausgeschüttet. Denkbar ist damit die Koaktivierung der HIPK2/p53-vermittelten Genexpression durch steigende Mengen an SP100, was möglicherweise die anti-virale Genexpression erhöht und über HIPK2/p53 die Zellproliferation inhibiert. Damit im Einklang steht der Befund, dass die Verringerung der endogenen SP100 Menge zu einer Reduktion der HIPK2 vermittelten Genaktivierung führt.

Für HIPK2 konnten Interaktionen mit p53 und CBP gezeigt werden und auch SP100 interagiert direkt mit p53 (Dr. Staeger, pers. Mitteilung). Daher stellt sich die Frage, ob SP100 und HIPK2 in einem Multiproteinkomplex mit p53 und CBP vorliegen. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen SP100 und p53 konnte durch die Analyse der HIPK2-vermittelten Genexpression dargestellt werden. Diese Koaktivierung funktionierte ohne die DNA Bindung von SP100, da einige der verwendeten SP100 Konstrukte weder die DNA bindenden SAND oder HMG Domänen anderer SP100 Splicevarianten besitzt (Sternsdorf, et al., 1999).



**Modell 1.** HIPK2 und SP100 agieren möglicherweise in einem Multiproteinkomplex. Nach UV / As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und anderen, bislang unbekanntem Stimuli, lokalisieren HIPK2, p53, CBP und SP100 in PML-NBs. Dort konnten bislang für alle Proteine mit Ausnahme von SP100/CBP eine Interaktion demonstriert werden. HIPK2 phosphoryliert p53 und steigert dessen transkriptionelle Aktivität. Beide Effekte können durch SP100 verstärkt werden und führen zur Kontrolle des Zellzyklus, speziell der UV induzierten, p21<sup>Waf-1</sup> vermittelten Arretierung. Die Phosphorylierung ist Voraussetzung für die CBP induzierte Acetylierung von p53. Der Einfluss von SP100 und CBP auf den p53 abhängigen Zelltod bleibt zu demonstrieren.

Die stimulatorische Rolle von SP100 für HIPK2 kann durch verschiedene Mechanismen erklärt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass es durch HIPK2-vermittelte Signalprozesse zur Oligomerisierung von SP100, möglicherweise auch mit den SP110 / SP140 Proteinen oder anderen transkriptionellen Koaktivatoren kommen kann. Diese

Oligomerisierung könnte eine Revertierung der SP100 induzierten Genrepression bewirken. Weiterhin könnte eine durch HIPK2 induzierte Reorganisation der PML-NBs stattfinden, die eine Delokalisation von SP100 zum offenen Chromatin an transkriptionell aktive Stellen bewirkt. Überexprimiertes SP100 befindet sich hauptsächlich am äußeren Rand der PML-NB (Negrov 2001) und die Interaktion von HIPK2 und SP100 konnte erst nach einer Steigerung der SP100 Proteinmenge durch Interferon  $\gamma$  demonstriert werden. Daher könnte die Bindung und funktionelle Interaktion zwischen SP100 und HIPK2 also am Rand oder außerhalb der PML-NBs erfolgen. Dies stimmt auch mit dem Befund überein, dass die HIPK2 Domänen in der Ausbildung und einige Funktionen betreffend von PML-NBs unabhängig sind. Dass die koaktivierende Wirkung von SP100 durchaus außerhalb der PML-NB stattfinden kann, zeigen die Daten, dass die SP100 vermittelte Koaktivierung von Ets-1 auch funktioniert, wenn SP100 durch Ets-1 vermittelte Effekte aus den PML-NB entfernt wurde (Wasylyk et al, 2002). Vorläufige Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass SP100 die HIPK2 vermittelte p53 Phosphorylierung an Serin 46 verstärken kann (Daten nicht gezeigt). Ob SP100 als Koaktivator, wie in dem Zusammenspiel mit HIPK2, oder als Repressor wie mit HP1, funktioniert, scheint dabei von dem SP100 aktivierenden Signal und / oder von dem Chromatinkontext abzuhängen.

#### **4.5 HIPK2 wird im Zellzyklus durch die Interaktion mit SIAH-1 reguliert**

In den verschiedenen Phasen des Zellzyklus benötigt die Zelle jeweils verschiedene Proteinfunktionen. Dies wird durch eine Veränderung der Proteinzusammensetzungen erreicht.

Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der Regulation von HIPK2 innerhalb des Zellzyklus. Durch biochemische und zellbiologische Methoden wurde eine Variation der HIPK2 Proteinmengen während des Zellzyklus festgestellt. Die hohe HIPK2 Menge in der G1 Phase geht einher mit der Phase der Transkription, was ein weiterer Hinweis auf die Rolle der HIPK2 in der Genexpression ist. Die in dieser Phase beobachteten zytoplasmatischen HIPK2 Domänen zeigt sich auch für die endogene

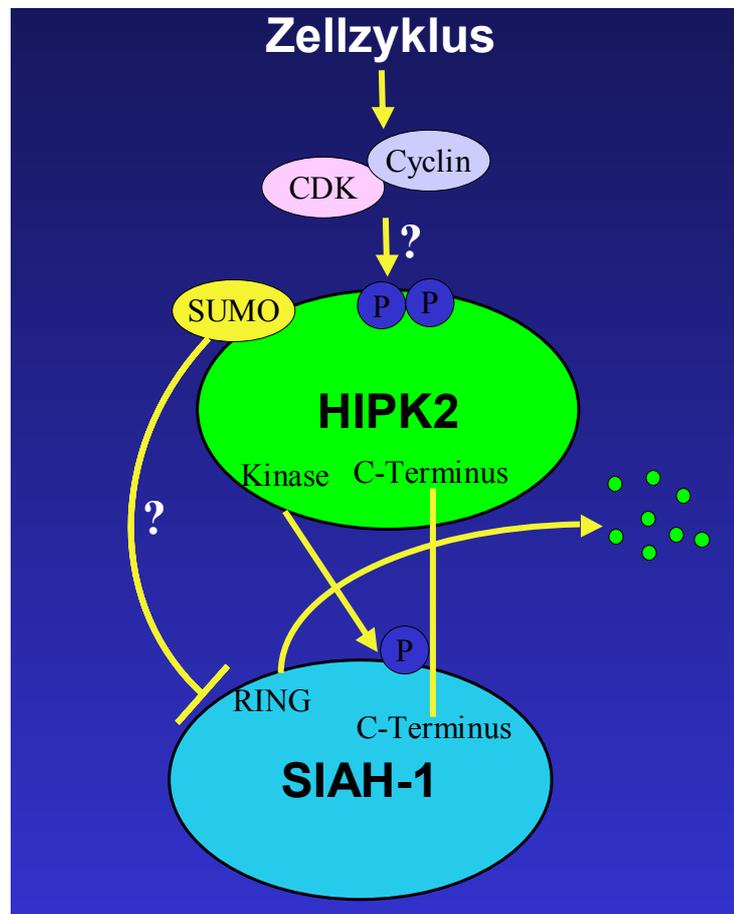
HIPK2 (Daten nicht gezeigt). Somit kann HIPK2 auch über die Lokalisation in das nukleäre oder zytoplasmatische Kompartiment reguliert werden. So ist bereits für eine Reihe wichtiger Transkriptionsregulatoren wie für HDAC4 und HDAC5 eine verschiedene Lokalisation bei einsetzender Differenzierung (McKinsey, T.A., et al., *Nature* 2000; Zhao X., et al., *JBC* 2001) und für Smad1 eine nukleäre Relokalisation bei Wachstumsfaktorstimulation (Xiao, Z., et al., *JBC* 2001) demonstriert worden. Bei anderen Proteinen kommt dabei dem Kernimportsignalen (NLS) eine wesentliche Rolle zu. So ist eine Regulation des Kernimports von HIPK2 über die Maskierung des NLS möglich. Erst wenn diese Maskierung aufgehoben wird, vielleicht auf Grund einer Reduktion der nukleären HIPK2 Menge, kann der Import der zytoplasmatischen HIPK2 vonstatten gehen. Dies würde für eine Rolle dieser Fraktion als eine Vorrat sprechen. Ob diese Fraktion eine Funktion im Zytoplasma ausübt, zum Beispiel in der Signalweitergabe, ist gänzlich unbekannt.

Die Proteinmenge von HIPK2 verringert sich am Ende der S-Phase, sodass während der Mitose kein Signal für die 140 kDa große HIPK2 mehr detektierbar ist. Dies schließt jedoch eine Implikation von anderen HIPK2 Splicevarianten in den Ablauf der Mitose nicht aus. Der zellzyklusabhängige Abbau von HIPK2 wird durch die Ubiquitinligase SIAH-1 vermittelt. In Zellen ohne SIAH Proteine ist das Zellwachstum verlangsamt (Abbildung 32). Da eine leichte Erhöhung der HIPK2 Proteinmenge zu einer Inhibition der Proliferation führt (Abbildungen 18, 34), kann diese Proliferationsinhibition auf höhere HIPK2 Menge zurückgeführt werden. Wieso die Zellen ohne SIAH Proteine eine veränderte Morphologie aufweisen, ist unklar. Da die Inhibition der HIPK2-Kinasefunktion zur Ausbildung deformierter Kerne führt, könnte eine unterbleibende Degradation von HIPK2, also eine Erhöhung der HIPK2-Kinaseaktivität, andere morphologische Konsequenzen haben. Da aber neben HIPK2 auch andere Proteine durch SIAH-1 und SIAH-2 degradiert werden, kann diese morphologische Veränderung auf die Funktion eines anderen Proteins zurückzuführen sein.

SIAH wurde in verschiedenen Veröffentlichungen als Zielgen für p53 induzierte Genaktivierung beschrieben und beschreiben ebenfalls, dass die Expression von SIAH die p53 induzierte Zellzyklusinhibition und Apoptose auszulösen vermag (Amson, R.B., et al., *PNAS*, 1996; Hu, G., et al., *Genomics*, 1997; Liu, J., et al., *Molecular Cell*, 2001; Maeda, A., et al., *FEBS Letters*, 2002; Relaix, F., et al. *PNAS*, 2000; Roperch, J.P. et al,

PNAS, 1999; Susini, L., et al., PNAS, 2001 ; Matsuzawa S., et al; EMBO, 1998). HIPK2 konnten wir als p53 Kinase für Serin 46 identifizieren, die zusätzlich die transkriptionelle Aktivität erhöhen kann. Eine mögliche weitere funktionelle Verbindung zwischen HIPK2 und SIAH könnte auch aus diesem Signalweg erwachsen. Nach UV induzierter, HIPK2 vermittelter Serin 46 Phosphorylierung von p53 wird die Menge an SIAH Proteinen durch eine verstärkte Transkription des Gens erhöht. Eine Erhöhung der SIAH Menge könnte dann verstärkt HIPK2 degradieren und in einer Art der negative Rückkopplungsreaktion die Abschaltung des Signals bewirken. Gegen diese Abschaltung des Signals kann HIPK2 möglicherweise durch eine anhaltenden Aktivierung, etwa durch Phosphorylierung, durch den noch nicht behobenen Schaden geschützt sein. Damit würde die SIAH Menge so lange erhöht, bis einerseits ein Schwellenwert überschritten wird, oder aber die Zelle nach zu langer Arretierung nach dem UV induzierten Schaden die Apoptose einleitet. Jedoch zeigen erste Experimente, die in diese Richtung unternommen wurden, zeigen aber keinen Effekt von SIAH Expression auf die HIPK2 vermittelte p53 Serin 46 Phosphorylierung oder eine Veränderung der UV Antwort in SIAH negativen Zellen (Daten nicht gezeigt). Neue Untersuchungen an SIAH Knockout Zellen und Mäusen belegen auch, dass p53 aktivierende Stimuli, etwa UV,  $\gamma$ -Irridation, Doxyrubicin oder Endostatin, nicht die SIAH Proteinmengen erhöhen. Ebenfalls sind die p53 Phosphorylierung und Acetylierung und die transkriptionelle Antwort durch p53 in diesen Zellen im Vergleich zum Wildtyp komplett unverändert (Frew, et al., 2002). Somit bleibt der funktionelle Zusammenhang zwischen p53 und HIPK2 / SIAH-1 fraglich.

Eine weitere bislang ungeklärte Frage, aufgrund welcher Signale die HIPK2 Proteinmenge innerhalb des Zellzyklus reguliert wird. Bei Zellzyklus-regulierten Proteinen sind diese Signale häufig Phosphorylierungen durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs). HIPK2 besitzt 6 CDK Erkennungssequenzen und 15 mögliche CDK-Phosphorylierungsstellen (Daten nicht gezeigt). Im zellulären Kontext ist es somit denkbar, dass HIPK2 von einem bestimmten oder verschiedenen Cyclin/CDK Komplexen erkannt wird und abhängig von der Zellzyklusphase phosphoryliert wird.



**Modell 2.** HIPK2 wird durch die Interaktion mit SIAH-1 reguliert. Der C-Terminus von HIPK2 interagiert mit dem C-Terminus von SIAH-1. Für die Degradation von HIPK2 ist eine funktionelle RING Domäne von SIAH-1 notwendig. Es bleibt zu untersuchen, inwieweit die SUMOlierung von HIPK2 an Lysin 25 Einfluss auf die Stabilität von HIPK2 beziehungsweise die Degradation von durch SIAH-1 ausübt. Auch die Zellzyklus vermittelten Degradationssignale, beispielsweise durch Phosphorylierung von HIPK2 durch CDKs, bleibt zu beantworten.

Dieses Signal könnte dann die Bindungseigenschaften von HIPK2 an SIAH verstärken und den Transfer von Ubiquitin und die proteasomale Degradation initiieren. Dieser Mechanismus könnte die Selektivität der HIPK2 Degradation in speziellen Zellzyklusphasen erklären. Vorläufige Ergebnisse mit spezifischen CDK Inhibitoren zeigten, dass die Degradation von HIPK2 in dessen Gegenwart verringert ist.



Diese Inhibition findet in abgeschwächten Maße auch in p53 defizienten Tumorzellen, wie den H1299 Non-small Lung Carcinomazellen, statt. Zu zeigen bleibt, ob eine selektive HIPK2 Expression sich auch in Organismen negativ auf die Tumorprogression auswirkt. Andererseits gibt es auch den Bedarf, die Zellproliferation lokal oder zeitlich begrenzt zu erhöhen. Dies kann zum Beispiel bei Wundverschluss bei großen Verletzungen oder Geweberegeneration der Fall sein. Für diesen Ansatz bleibt in weiteren Experimenten zu zeigen, ob die negative Regulation von HIPK2 wiederum eine Beschleunigung der Proliferation zur Folge hat. So könnte die gezielte Verringerung der HIPK2 Proteinmenge, etwa durch Erhöhung von SIAH-1, die Zellen schneller proliferieren lassen.

Die in der Arbeit gefundenen funktionellen Interaktionen von HIPK2 mit p53, SP100, CBP und SIAH-1, kombiniert mit den Erkenntnissen anderer Wissenschaftler legen die Vermutung nahe, dass HIPK2 in einem Netzwerk dieser Proteine an wichtigen zelluläre Regulationsprozesse beteiligt ist und gleichzeitig von diesen kontrolliert wird. Dabei scheint HIPK2 in einem Wechselspiel mit p53, SP100 und CBP vorrangig die Signalweitergabe nach UV Induktion und eventuell nach Interferon  $\gamma$  Stimulierung zu regulieren. Diese haben einen direkten Einfluss auf die Arretierung des Zellzyklus, vermittelt unter anderem durch p21<sup>Waf-1</sup>. Andererseits können sie auf p53-abhängigen und unabhängigen Wegen die Apoptose der Zelle herbeiführen. Diese beiden Mechanismen sind wesentlich für die Vermeidung von Tumorerkrankungen. Durch diese regulierende Funktion von HIPK2 für diese Signalwege kann HIPK2 als Tumorsuppressor eingestuft werden. Die Identifikation weiterer Mitglieder dieser Signalwege wird zu einer genaueren Definition der HIPK2 Tumorsuppressorfunktion führen, und mit diesen Daten können dann HIPK2 basierenden Therapeutika entworfen und in Mausmodellen getestet werden.

Die funktionelle Interaktion mit SIAH Proteinen führt in der Balance zu einer Kontrolle der Proliferation. Die Störung dieser Wege kann wiederum zu Krebserkrankungen oder zu langsamer Geweberegeneration führen. Außerdem konnte für HIPK2 ein starker Einfluss für die Genexpression demonstriert werden. Die aktivierende Funktion von HIPK2 konnte durch SIAH Expression negiert werden. Damit steht also SIAH auch im direkten Zusammenhang mit dieser Effektorfunktion von HIPK2 und die genauere

Charakterisierung des Einflusses des Zellzyklus auf die funktionelle HIPK2 / SIAH Interaktion wird die möglichen Mechanismen der Beeinflussung in pathogenen Situationen darstellen.

## V. Zusammenfassung

Das Ziel meiner Arbeit war es, die Lokalisation und Regulation der Serin/Threonin Kinase HIPK2 zu untersuchen.

Die räumliche Distribution des HIPK2 Proteins wurde durch Immunfluoreszenzanalysen bestimmt. HIPK2 lag überwiegend in einer gepunkteten Verteilung im Zellkern vor. Da es keine Kolo­kalisierung mit bekannten nukleären Kompartimenten aufwies, wurden diese Akkumulationsorte als HIPK2 Domänen neu definiert. Diese Konzentration in HIPK2 Domänen war von der Kinasefunktion abhängig, da die kinasedefiziente HIPK2 K221A Mutante über das ganze Nukleoplasma diffus verteilt war. Die Expression dieser Mutante führte zusätzlich zur Ausbildung einer stark deformierten Kernmorphologie bis hin zu mehreren Nuklei in einer Zelle.

Des weiteren konnte eine nur partielle Kolo­kalisierung zwischen HIPK2 Domänen und PML Nuclear Bodies (PML-NBs) gefunden werden. Die Expression von PML-IV oder Stimulation von Zellen mit UV/As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> führte zu einer Erhöhung der HIPK2-Menge in PML-NBs, in denen HIPK2 dann mit dem Tumorsuppressor p53 und der Histonacetylase CBP kolo­kalisierte und interagierte. Diese Rekrutierung in PML-NBs beeinflusste hingegen nicht die durch Expression von HIPK2 induzierte Inhibition der Zellproliferation.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass HIPK2 mit dem konstitutiven PML-NB Protein SP100 kolo­kalisierte und interagierte. SP100 verstärkte die HIPK2-vermittelte p53-abhängige Genexpression, wodurch für SP100 eine neue Funktion als transkriptioneller Koaktivator für HIPK2 beschrieben werden konnte. Für diese Koaktivierung war die Kinasefunktion von HIPK2 notwendig. Dagegen hatte die Koexpression von Sp100 keinen Einfluss auf die HIPK2-abhängige Inhibition der Zellproliferation.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde mittels konfokaler Mikroskopie lebender Zellen und biochemischer Analysen beobachtet, dass HIPK2 zum Ende der S-Phase abgebaut und zu Beginn der G1 Phase wieder synthetisiert wird. Auf der Suche nach dem Abbaumechanismus wurde das RING-Finger Protein SIAH-1 als neuer Interaktionspartner von HIPK2 identifiziert. SIAH-1 ist eine E3 Ubiquitinligase, deren ektoische Expression zu einer Ubiquitylierung und proteasomalen Abbau von endogener und exogener HIPK2 führte. Die SIAH-1 vermittelte Degradation von HIPK2 bewirkte die Aufhebung der genaktivierenden Funktion von HIPK2.

Die zellzyklusabhängige Reduktion der HIPK2-Menge kam in Zellen ohne funktionelles SIAH Protein nicht mehr vor, so dass der S-Phasen spezifische Abbau von HIPK2 durch SIAH vermittelt wird. Damit konnte erstmals eine Regulation für HIPK2 auf Proteinebene gezeigt werden.

## VI. Literaturverzeichnis

Ahn,J.H., Brignole,E.J., III und Hayward,G.S. (1998). **Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML.** Mol. Cell Biol. (18), 4899-4913.

Alcalay,M., Tomassoni,L., Colombo,E., Stoldt,S., Grignani,F., Fagioli,M., Szekely,L., Helin,K. und Pelicci,P.G. (1998). **The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein.** Mol. Cell Biol. (18), 1084-1093.

Altabef,M., Garcia,M., Lavau,C., Bae,S.C., Dejean,A. und Samarut,J. (1996). **A retrovirus carrying the promyelocyte-retinoic acid receptor PML-RARalpha fusion gene transforms haematopoietic progenitors in vitro and induces acute leukaemias.** EMBO J. (15), 2707-2716.

Amson,R.B., Nemani,M., Roperch,J.P., Israeli,D., Bougueleret,L., Le,G., I, Medhioub,M., Linares-Cruz,G., Lethrosne,F., Pasturaud,P., Piouffre,L., Prieur,S., Susini,L., Alvaro,V., Millasseau,P., Guidicelli,C., Bui,H., Massart,C., Cazes,L., Dufour,F., Bruzzoni-Giovanelli,H., Owadi,H., Hennion,C., Charpak,G., Telerman,A. und . (1996). **Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A (93), 3953-3957.

Andersen,J.S., Lyon,C.E., Fox,A.H., Leung,A.K., Lam,Y.W., Steen,H., Mann,M. und Lamond,A.I. (2002). **Directed proteomic analysis of the human nucleolus.** Curr. Biol. (12), 1-11.

Ascoli,C.A. und Maul,G.G. (1991). **Identification of a novel nuclear domain.** J. Cell Biol. (112), 785-795.

- Bischof,O., Kim,S.H., Irving,J., Beresten,S., Ellis,N.A. und Campisi,J. (2001). **Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage.** J. Cell Biol. (153), 367-380.
- Bloch,D.B., Nakajima,A., Gulick,T., Chiche,J.D., Orth,D., de La Monte,S.M. und Bloch,K.D. (2000). **Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator.** Mol. Cell Biol. (20), 6138-6146.
- Boddy,M.N., Howe,K., Etkin,L.D., Solomon,E. und Freemont,P.S. (1996). **PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia.** Oncogene (13), 971-982.
- Boehm,J., He,Y., Greiner,A., Staudt,L. und Wirth,T. (2001). **Regulation of BOB.1/OBF.1 stability by SIAH.** EMBO J. (20), 4153-4162.
- Boisvert,F.M., Hendzel,M.J. und Bazett-Jones,D.P. (2000). **Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA.** J. Cell Biol. (148), 283-292.
- Boisvert,F.M., Kruhlak,M.J., Box,A.K., Hendzel,M.J. und Bazett-Jones,D.P. (2001). **The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body.** J. Cell Biol. (152), 1099-1106.
- Borden,K.L. (2000). **RING domains: master builders of molecular scaffolds?** J. Mol. Biol. (295), 1103-1112.
- Borden,K.L. (2002). **Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies.** Mol. Cell Biol. (22), 5259-5269.
- Bruzzoni-Giovanelli,H., Faille,A., Linares-Cruz,G., Nemani,M., Le Deist,F., Germani,A., Chassoux,D., Millot,G., Roperch,J.P., Amson,R., Telerman,A. und Calvo,F. (1999). **SIAH-1 inhibits cell growth by altering the mitotic process.** Oncogene (18), 7101-7109.

- Busch,H., Narayan,K.S. und Hamilton,J. (1967). **Isolation of nucleoli in a medium containing spermine and magnesium acetate.** Exp. Cell Res. (47), 329-336.
- Carmo-Fonseca,M., Mendes-Soares,L. und Campos,I. (2000). **To be or not to be in the nucleolus.** Nat. Cell Biol. (2), E107-E112.
- Carthew,R.W. und Rubin,G.M. (1990). **seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the Drosophila eye.** Cell (63), 561-577.
- Chakravarti,D., LaMorte,V.J., Nelson,M.C., Nakajima,T., Schulman,I.G., Juguilon,H., Montminy,M. und Evans,R.M. (1996). **Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling.** Nature (383), 99-103.
- Chang,H.C., Solomon,N.M., Wassarman,D.A., Karim,F.D., Therrien,M., Rubin,G.M. und Wolff,T. (1995). **phyllopod functions in the fate determination of a subset of photoreceptors in Drosophila.** Cell (80), 463-472.
- Chelbi-Alix,M.K., Pelicano,L., Quignon,F., Koken,M.H., Venturini,L., Stadler,M., Pavlovic,J., Degos,L. und de The,H. (1995). **Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells.** Leukemia (9), 2027-2033.
- Choi,C.Y., Kim,Y.H., Kwon,H.J. und Kim,Y. (1999). **The homeodomain protein NK-3 recruits Groucho and a histone deacetylase complex to repress transcription.** J. Biol. Chem. (274), 33194-33197.
- Ciechanover,A., Finley,D. und Varshavsky,A. (1984). **Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85.** Cell (37), 57-66.
- Cremer,T., Cremer,C., Baumann,H., Luedtke,E.K., Sperling,K., Teuber,V. und Zorn,C. (1982). **Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments.** Hum. Genet. (60), 46-56.

- Croft,J.A., Bridger,J.M., Boyle,S., Perry,P., Teague,P. und Bickmore,W.A. (1999). **Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus.** J. Cell Biol. (145), 1119-1131.
- D'Orazi,G., Cecchinelli,B., Bruno,T., Manni,I., Higashimoto,Y., Saito,S., Gostissa,M., Coen,S., Marchetti,A., Del Sal,G., Piaggio,G., Fanciulli,M., Appella,E. und Soddu,S. (2002). **Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis.** Nat. Cell Biol. (4), 11-19.
- de The,H., Lavau,C., Marchio,A., Chomienne,C., Degos,L. und Dejean,A. (1991). **The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR.** Cell (66), 675-684.
- Degos,L. (1994). **Is acute promyelocytic leukemia a curable disease? Treatment strategy for a long-term survival.** Leukemia (8), 911-913.
- Deng,C., Zhang,P., Harper,J.W., Elledge,S.J. und Leder,P. (1995). **Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control.** Cell (82), 675-684.
- Dent,A.L., Yewdell,J., Puvion-Dutilleul,F., Koken,M.H., de The,H. und Staudt,L.M. (1996). **LYSP100-associated nuclear domains (LANDs): description of a new class of subnuclear structures and their relationship to PML nuclear bodies.** Blood (88), 1423-1426.
- Deshaies,R.J. (1999). **SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. (15:435-67.), 435-467.
- Dickins,R.A., Frew,I.J., House,C.M., O'Bryan,M.K., Holloway,A.J., Haviv,I., Traficante,N., de Kretser,D.M. und Bowtell,D.D. (2002). **The ubiquitin ligase component Siah1a is required for completion of meiosis I in male mice.** Mol. Cell Biol. (22), 2294-2303.

- Doucas,V., Tini,M., Egan,D.A. und Evans,R.M. (1999). **Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A (96), 2627-2632.
- Everett,R.D., Freemont,P., Saitoh,H., Dasso,M., Orr,A., Kathoria,M. und Parkinson,J. (1998). **The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms.** J. Virol. (72), 6581-6591.
- Everett,R.D., Earnshaw,W.C., Pluta,A.F., Sternsdorf,T., Ainsztein,A.M., Carmena,M., Ruchaud,S., Hsu,W.L. und Orr,A. (1999). **A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins.** J. Cell Sci. (112), 3443-3454.
- Everett,R.D. (2001). **DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies.** Oncogene (20), 7266-7273.
- Ferbeyre,G., de Stanchina,E., Querido,E., Baptiste,N., Prives,C. und Lowe,S.W. (2000). **PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence.** Genes Dev. (14), 2015-2027.
- Fogal,V., Gostissa,M., Sandy,P., Zacchi,P., Sternsdorf,T., Jensen,K., Pandolfi,P.P., Will,H., Schneider,C. und Del Sal,G. (2000). **Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform.** EMBO J. (19), 6185-6195.
- Gall,J.G. (2000). **Cajal bodies: the first 100 years.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. (16:273-300.), 273-300.
- Garrett,S., Menold,M.M. und Broach,J.R. (1991). **The Saccharomyces cerevisiae YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle.** Mol. Cell Biol. (11), 4045-4052.
- Germani,A., Bruzzoni-Giovanelli,H., Fellous,A., Gisselbrecht,S., Varin-Blank,N. und Calvo,F. (2000). **SIAH-1 interacts with alpha-tubulin and degrades the kinesin Kid by the proteasome pathway during mitosis.** Oncogene (19), 5997-6006.

- Giaccia,A.J. und Kastan,M.B. (1998). **The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals.** Genes Dev. (12), 2973-2983.
- Goodman,R.H. und Smolik,S. (2000). **CBP/p300 in cell growth, transformation, and development.** Genes Dev. (14), 1553-1577.
- Grande,M.A., van,d.K., I, van Steensel,B., Schul,W., de The,H., van der Voort,H.T., de Jong,L. und van Driel,R. (1996). **PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components.** J. Cell Biochem. (63), 280-291.
- Grignani,F., Fagioli,M., Alcalay,M., Longo,L., Pandolfi,P.P., Donti,E., Biondi,A., Lo,C.F., Grignani,F. und Pelicci,P.G. (1994). **Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment.** Blood (83), 10-25.
- Grisolano,J.L., Wesselschmidt,R.L., Pelicci,P.G. und Ley,T.J. (1997). **Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences.** Blood (89), 376-387.
- Grotzinger,T., Jensen,K. und Will,H. (1996). **The interferon (IFN)-stimulated gene Sp100 promoter contains an IFN-gamma activation site and an imperfect IFN-stimulated response element which mediate type I IFN inducibility.** J. Biol. Chem. (271), 25253-25260.
- Hershko,A. und Ciechanover,A. (1998). **The ubiquitin system.** Annu. Rev. Biochem. (67:425-79.), 425-479.
- Hoffmann,K., Dreger,C.K., Olins,A.L., Olins,D.E., Shultz,L.D., Lucke,B., Karl,H., Kaps,R., Muller,D., Vaya,A., Aznar,J., Ware,R.E., Sotelo,C.N., Lindner,T.H., Herrmann,H., Reis,A. und Sperling,K. (2002). **Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huet anomaly).** Nat. Genet. (31), 410-414.
- Hofmann,T.G., Mincheva,A., Lichter,P., Droge,W. und Lienhard,S.M. (2000). **Human homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) is a member of the DYRK**

**family of protein kinases and maps to chromosome 7q32-q34.** *Biochimie* (82), 1123-1127.

Hofmann,T.G., Moller,A., Sirma,H., Zentgraf,H., Taya,Y., Droge,W., Will,H. und Schmitz,M.L. (2002). **Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2.** *Nat. Cell Biol.* (4), 1-10.

Holloway,A.J., Della,N.G., Fletcher,C.F., Largespada,D.A., Copeland,N.G., Jenkins,N.A. und Bowtell,D.D. (1997). **Chromosomal mapping of five highly conserved murine homologues of the Drosophila RING finger gene seven-in-absentia.** *Genomics* (41), 160-168.

Hollstein,M., Shomer,B., Greenblatt,M., Soussi,T., Hovig,E., Montesano,R. und Harris,C.C. (1996). **Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation.** *Nucleic Acids Res.* (24), 141-146.

Hu,G., Zhang,S., Vidal,M., Baer,J.L., Xu,T. und Fearon,E.R. (1997). **Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway.** *Genes Dev.* (11), 2701-2714.

Hu,G., Chung,Y.L., Glover,T., Valentine,V., Look,A.T. und Fearon,E.R. (1997). **Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene.** *Genomics* (46), 103-111.

Hu,G. und Fearon,E.R. (1999). **Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins.** *Mol. Cell Biol.* (19), 724-732.

Huibregtse,J.M., Scheffner,M., Beaudenon,S. und Howley,P.M. (1995). **A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (92), 2563-2567.

Ishov,A.M., Sotnikov,A.G., Negorev,D., Vladimirova,O.V., Neff,N., Kamitani,T., Yeh,E.T., Strauss,J.F., III und Maul,G.G. (1999). **PML is critical for ND10 formation**

**and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1.** *J. Cell Biol.* (147), 221-234.

Jensen,K., Shiels,C. und Freemont,P.S. (2001). **PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif.** *Oncogene* (20), 7223-7233.

Kakizuka,A., Miller,W.H., Jr., Umesono,K., Warrell,R.P., Jr., Frankel,S.R., Murty,V.V., Dmitrovsky,E. und Evans,R.M. (1991). **Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML.** *Cell* (66), 663-674.

Kamitani,T., Kito,K., Nguyen,H.P., Wada,H., Fukuda-Kamitani,T. und Yeh,E.T. (1998). **Identification of three major sentrinization sites in PML.** *J. Biol. Chem.* (273), 26675-26682.

Kim,E.J., Park,J.S. und Um,S.J. (2002). **Identification and characterization of HIPK2 interacting with p73 and modulating functions of the p53 family in vivo.** *J. Biol. Chem.* (277), 32020-32028.

Kim,Y.H., Choi,C.Y., Lee,S.J., Conti,M.A. und Kim,Y. (1998). **Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors.** *J. Biol. Chem.* (273), 25875-25879.

Kim,Y.H., Choi,C.Y. und Kim,Y. (1999). **Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (96), 12350-12355.

Ko,L.J. und Prives,C. (1996). **p53: puzzle and paradigm.** *Genes Dev.* (10), 1054-1072.

Koken,M.H., Puvion-Dutilleul,F., Guillemain,M.C., Viron,A., Linares-Cruz,G., Stuurman,N., de Jong,L., Szostecki,C., Calvo,F., Chomienne,C. und . (1994). **The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion.** *EMBO J.* (13), 1073-1083.

Koken,M.H., Linares-Cruz,G., Quignon,F., Viron,A., Chelbi-Alix,M.K., Sobczak-Thepot,J., Juhlin,L., Degos,L., Calvo,F. und de The,H. (1995). **The PML growth-**

**suppressor has an altered expression in human oncogenesis.** *Oncogene* (10), 1315-1324.

Lain,S., Midgley,C., Sparks,A., Lane,E.B. und Lane,D.P. (1999). **An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs.** *Exp. Cell Res.* (248), 457-472.

Lamond,A.I. und Earnshaw,W.C. (1998). **Structure and function in the nucleus.** *Science* (280), 547-553.

LaMorte,V.J., Dyck,J.A., Ochs,R.L. und Evans,R.M. (1998). **Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (95), 4991-4996.

Lavau,C., Marchio,A., Fagioli,M., Jansen,J., Falini,B., Lebon,P., Grosveld,F., Pandolfi,P.P., Pelicci,P.G. und Dejean,A. (1995). **The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon.** *Oncogene* (11), 871-876.

Lehming,N., Le Saux,A., Schuller,J. und Ptashne,M. (1998). **Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (95), 7322-7326.

Levine,A.J. (1997). **p53, the cellular gatekeeper for growth and division.** *Cell* (88), 323-331.

Lewis,J.D. und Tollervey,D. (2000). **Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus.** *Science* (288), 1385-1389.

Li,S., Li,Y., Carthew,R.W. und Lai,Z.C. (1997). **Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack.** *Cell* (90), 469-478.

Liu,J., Stevens,J., Rote,C.A., Yost,H.J., Hu,Y., Neufeld,K.L., White,R.L. und Matsunami,N. (2001). **Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein.** *Mol. Cell* (7), 927-936.

- Matera,A.G. (1999). **Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space.** Trends Cell Biol. (9), 302-309.
- Matsuo,R., Ochiai,W., Nakashima,K. und Taga,T. (2001). **A new expression cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody.** J. Immunol. Methods (247), 141-151.
- Matsuzawa,S.I. und Reed,J.C. (2001). **Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses.** Mol. Cell (7), 915-926.
- Maul,G.G., Guldner,H.H. und Spivack,J.G. (1993). **Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0).** J. Gen. Virol. (74), 2679-2690.
- Maul,G.G. (1998). **Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication.** Bioessays (20), 660-667.
- Maul,G.G., Negorev,D., Bell,P. und Ishov,A.M. (2000). **Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs.** J. Struct. Biol. (129), 278-287.
- Melnick,A. und Licht,J.D. (1999). **Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia.** Blood (93), 3167-3215.
- Mintz,P.J., Patterson,S.D., Neuwald,A.F., Spahr,C.S. und Spector,D.L. (1999). **Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters.** EMBO J. (18), 4308-4320.
- Missero,C., Pirro,M.T., Simeone,S., Pischetola,M. und Di Lauro,R. (2001). **The DNA glycosylase T:G mismatch-specific thymine DNA glycosylase represses thyroid transcription factor-1-activated transcription.** J. Biol. Chem. (276), 33569-33575.
- Misteli,T. und Spector,D.L. (1998). **The cellular organization of gene expression.** Curr. Opin. Cell Biol. (10), 323-331.

- Misteli,T. (2000). **Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function.** J. Cell Sci. (113), 1841-1849.
- Misteli,T. (2001). **The concept of self-organization in cellular architecture.** J. Cell Biol. (155), 181-185.
- Muller,S., Matunis,M.J. und Dejean,A. (1998). **Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus.** EMBO J. (17), 61-70.
- Ogryzko,V.V., Kotani,T., Zhang,X., Schiltz,R.L., Howard,T., Yang,X.J., Howard,B.H., Qin,J. und Nakatani,Y. (1998). **Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex.** Cell (94), 35-44.
- Olson,M.O., Dundr,M. und Szebeni,A. (2000). **The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities.** Trends Cell Biol. (10), 189-196.
- Orlando,V. und Jones,K.A. (2002). **Wild chromatin: regulation of eukaryotic genes in their natural chromatin context.** Genes Dev. (16), 2039-2044.
- Papoutsopoulou,S., Nikolakaki,E. und Giannakouros,T. (1999). **SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities.** Biochem. Biophys. Res. Commun. (255), 602-607.
- Park,P.C. und De Boni,U. (1996). **Transposition of DNase hypersensitive chromatin to the nuclear periphery coincides temporally with nerve growth factor-induced up-regulation of gene expression in PC12 cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A (93), 11646-11651.
- Pearson,M., Carbone,R., Sebastiani,C., Cioce,M., Fagioli,M., Saito,S., Higashimoto,Y., Appella,E., Minucci,S., Pandolfi,P.P. und Pelicci,P.G. (2000). **PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras.** Nature (406), 207-210.
- Pearson,M. und Pelicci,P.G. (2001). **PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence.** Oncogene (20), 7250-7256.

- Pederson,T. (1998). **Growth factors in the nucleolus?** J. Cell Biol. (1998;143), 279-281.
- Pickart,C.M. (2001). **Mechanisms underlying ubiquitination.** Annu. Rev. Biochem. (70:503-33.), 503-533.
- Pierantoni,G.M., Fedele,M., Pentimalli,F., Benvenuto,G., Pero,R., Viglietto,G., Santoro,M., Chiariotti,L. und Fusco,A. (2001). **High mobility group I (Y) proteins bind HIPK2, a serine-threonine kinase protein which inhibits cell growth.** Oncogene (20), 6132-6141.
- Pierantoni,G.M., Bulfone,A., Pentimalli,F., Fedele,M., Iuliano,R., Santoro,M., Chiariotti,L., Ballabio,A. und Fusco,A. (2002). **The homeodomain-interacting protein kinase 2 gene is expressed late in embryogenesis and preferentially in retina, muscle, and neural tissues.** Biochem. Biophys. Res. Commun. (290), 942-947.
- Pinkel,D., Landegent,J., Collins,C., Fuscoe,J., Seagraves,R., Lucas,J. und Gray,J. (1988). **Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A (85), 9138-9142.
- Polakis,P. (2001). **More than one way to skin a catenin.** Cell (105), 563-566.
- Polekhina,G., House,C.M., Traficante,N., Mackay,J.P., Relaix,F., Sassoon,D.A., Parker,M.W. und Bowtell,D.D. (2002). **Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling.** Nat. Struct. Biol. (9), 68-75.
- Prives,C. und Hall,P.A. (1999). **The p53 pathway.** J. Pathol. (187), 112-126.
- Quignon,F., De Bels,F., Koken,M., Feunteun,J., Ameisen,J.C. und de The,H. (1998). **PML induces a novel caspase-independent death process.** Nat. Genet. (20), 259-265.
- Relaix,F., Wei,X., Li,W., Pan,J., Lin,Y., Bowtell,D.D., Sassoon,D.A. und Wu,X. (2000). **Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A (97), 2105-2110.

- Rogers,S., Wells,R. und Rechsteiner,M. (1986). **Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis.** *Science* (234), 364-368.
- Scheer,U. und Hock,R. (1999). **Structure and function of the nucleolus.** *Curr. Opin. Cell Biol.* (11), 385-390.
- Scheffner,M., Huibregtse,J.M., Vierstra,R.D. und Howley,P.M. (1993). **The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53.** *Cell* (75), 495-505.
- Seeler,J.S., Marchio,A., Sitterlin,D., Transy,C. und Dejean,A. (1998). **Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (95), 7316-7321.
- Sourisseau,T., Desbois,C., Debure,L., Bowtell,D.D., Cato,A.C., Schneikert,J., Moyse,E. und Michel,D. (2001). **Alteration of the stability of Bag-1 protein in the control of olfactory neuronal apoptosis.** *J. Cell Sci.* (114), 1409-1416.
- Souza,G.M., Lu,S. und Kuspa,A. (1998). **YakA, a protein kinase required for the transition from growth to development in Dictyostelium.** *Development* (125), 2291-2302.
- Spector,D.L. (1993). **Nuclear organization of pre-mRNA processing.** *Curr. Opin. Cell Biol.* (5), 442-447.
- Spector,D.L. (2001). **Nuclear domains.** *J. Cell Sci.* (114), 2891-2893.
- Stadler,M., Chelbi-Alix,M.K., Koken,M.H., Venturini,L., Lee,C., Saib,A., Quignon,F., Pelicano,L., Guillemin,M.C., Schindler,C. und . (1995). **Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element.** *Oncogene* (11), 2565-2573.
- Sternsdorf,T., Jensen,K. und Will,H. (1997). **Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1.** *J. Cell Biol.* (139), 1621-1634.

Sternsdorf,T., Jensen,K., Reich,B. und Will,H. (1999). **The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers.** J. Biol. Chem. (274), 12555-12566.

Stuurman,N., de Graaf,A., Floore,A., Josso,A., Humbel,B., de Jong,L. und van Driel,R. (1992). **A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies.** J. Cell Sci. (101), 773-784.

Susini,L., Passer,B.J., Amzallag-Elbaz,N., Juven-Gershon,T., Prieur,S., Privat,N., Tuynder,M., Gendron,M.C., Israel,A., Amson,R., Oren,M. und Telerman,A. (2001). **Siah-1 binds and regulates the function of Numb.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A (98), 15067-15072.

Szostecki,C., Krippner,H., Penner,E. und Bautz,F.A. (1987). **Autoimmune sera recognize a 100 kD nuclear protein antigen (sp-100).** Clin. Exp. Immunol. (68), 108-116.

Szostecki,C., Guldner,H.H. und Will,H. (1997). **Autoantibodies against "nuclear dots" in primary biliary cirrhosis.** Semin. Liver Dis. (17), 71-78.

Tang,A.H., Neufeld,T.P., Kwan,E. und Rubin,G.M. (1997). **PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism.** Cell (90), 459-467.

Thomson,S., Clayton,A.L. und Mahadevan,L.C. (2001). **Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction.** Mol. Cell (8), 1231-1241.

Tiedt,R., Bartholdy,B.A., Matthias,G., Newell,J.W. und Matthias,P. (2001). **The RING finger protein Siah-1 regulates the level of the transcriptional coactivator OBF-1.** EMBO J. (20), 4143-4152.

Tollervey,D. und Kiss,T. (1997). **Function and synthesis of small nucleolar RNAs.** Curr. Opin. Cell Biol. (9), 337-342.

- Torii,S., Egan,D.A., Evans,R.A. und Reed,J.C. (1999). **Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs).** EMBO J. (18), 6037-6049.
- Trost,M., Kochs,G. und Haller,O. (2000). **Characterization of a novel serine/threonine kinase associated with nuclear bodies.** J. Biol. Chem. (275), 7373-7377.
- Tsukamoto,T., Hashiguchi,N., Janicki,S.M., Tumbar,T., Belmont,A.S. und Spector,D.L. (2000). **Visualization of gene activity in living cells.** Nat. Cell Biol. (2), 871-878.
- Tumbar,T. und Belmont,A.S. (2001). **Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator.** Nat. Cell Biol. (3), 134-139.
- Varshavsky,A. (1997). **The ubiquitin system.** Trends Biochem. Sci. (22), 383-387.
- von Mikecz,A., Zhang,S., Montminy,M., Tan,E.M. und Hemmerich,P. (2000). **CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus.** J. Cell Biol. (150), 265-273.
- Vousden,K.H. (2000). **p53: death star.** Cell (103), 691-694.
- Wang,Y., Marion,S.E., Li,X., Duttonhofer,I., Debatin,K. und Hug,H. (2002). **HIPK2 associates with RanBPM.** Biochem. Biophys. Res. Commun. (297), 148.
- Wang,Z.G., Delva,L., Gaboli,M., Rivi,R., Giorgio,M., Cordon-Cardo,C., Grosveld,F. und Pandolfi,P.P. (1998). **Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway.** Science (279), 1547-1551.
- Wasylyk,C., Schlumberger,S.E., Criqui-Filipe,P. und Wasylyk,B. (2002). **Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity.** Mol. Cell Biol. (22), 2687-2702.
- Weis,K., Rambaud,S., Lavau,C., Jansen,J., Carvalho,T., Carmo-Fonseca,M., Lamond,A. und Dejean,A. (1994). **Retinoic acid regulates aberrant nuclear**

---

**localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells.** *Cell* (76), 345-356.

Wheeler,T.C., Chin,L.S., Li,Y., Roudabush,F.L. und Li,L. (2002). **Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia.** *J. Biol. Chem.* (277), 10273-10282.

Xie,Y. und Varshavsky,A. (1999). **The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain.** *EMBO J.* (18), 6832-6844.

Zhang,J., Guenther,M.G., Carthew,R.W. und Lazar,M.A. (1998). **Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression.** *Genes Dev.* (12), 1775-1780.

Zhong,S., Salomoni,P. und Pandolfi,P.P. (2000). **The transcriptional role of PML and the nuclear body.** *Nat. Cell Biol.* (2), E85-E90.

Zhong,S., Muller,S., Ronchetti,S., Freemont,P.S., Dejean,A. und Pandolfi,P.P. (2000). **Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation.** *Blood* (95), 2748-2752.

## VII. Abkürzungen

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure (Angabe im Ein-Buchstabencode)
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Arsentrioxid
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ECL	“enhanced chemoluminescence“
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorter)
FCS	fötales Kälberserum
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HIPK2	“Homeodomänen-Interagierende Protein Kinase2 1“
kDa	Kilodalton
mRNA	Boten RNA (messenger RNA)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PI	Propidiumiodid
PML	“Promyelozytische Leukämie Protein“
PML-NB	PML-Nuclear Body
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat

---

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIAH-1	“Seven In Absentia Human Homolog”
SINA	“Seven In Absentia”
siRNA	kleine inhibierende RNA (small interfering RNA)
SUMO-1	“small ubiquitin-related modifier 1“
Ubc9	“ubiquitin-like protein conjugating enzyme 9“
UV	Ultraviolettes Licht
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

## VIII. Publikationsliste

Wesentliche Inhalte dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht beziehungsweise sind zur Veröffentlichung eingereicht:

**Andreas Möller**, Oliver Dienz, Steffen P. Hehner, Wulf Dröge and M. Lienhard Schmitz (2001). **PKC $\theta$  cooperates with Vav1 to induce JNK activity in T-cells.** Journal of Biological Chemistry. 276(23):20022-8

Thomas G. Hofmann, **Andreas Möller**, Steffen P. Hehner, Dominik Welsch, Wulf Dröge, and M.Lienhard Schmitz (2001). **CD95-induced JNK activation signals are transmitted by the death inducing signaling complex (DISC), but not by Daxx.** International Journal of Cancer. 93(2):185-91

Thomas G. Hofmann, **Andreas Möller**, Hüseyin Sirma, Hanswalter Zentgraf, Wulf Dröge, Hans Will, and M. Lienhard Schmitz (2002). **Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain interacting protein kinase 2.** Nature Cell Biology. 4(1):1-10

Dimitry Spitkovsky, Steffen P. Hehner, Thomas G. Hofmann, **Andreas Möller**, M.Lienhard Schmitz (2002). **The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF-kappa B activation by targeting the Ikappa B kinase complex.** Journal of Biological Chemistry. 277(28):25576-82

Oliver Dienz, **Andreas Möller**, Andreas Strecker, Nadja Stephan, Peter H. Krammer, Wulf Dröge, M.Lienhard Schmitz (2002). **SLP-76 and PLC $\gamma$ 1 are required for NF- $\kappa$ B activation and lipid raft recruitment of PKC $\theta$  induced by T cell costimulation.** Journal of Immunology. in press

---

**Andreas Möller**, Hüseyin Sirma, Thomas G. Hofmann, Hannah Staeger, Ekaterina Gresko, Elisabeth Klimczak, Wulf Dröge, Hans Will, M. Lienhard Schmitz. **Sp100 is important for the stimulatory effect of homeodomain-interacting protein kinase-2 on p53-dependent gene expression.** Zur Veröffentlichung eingereicht

**Andreas Möller**, Thomas G. Hofmann, Hüseyin Sirma, Sven Ruffer, Wulf Dröge, Hans Will, M. Lienhard Schmitz. **Homeodomain Interacting Protein Kinase 2 (HIPK2) nuclear bodies: a novel subnuclear compartment that depends on HIPK2 kinase function.** Manuskript in Vorbereitung

**Andreas Möller**, Ian Frew, Michaela Reichenzeller, Lore Florin, Elisabeth Klimczak, Harald Herrmann-Lerdon, David Bowtell, Wulf Dröge, Hans Will, M. Lienhard Schmitz. **Cell cycle-dependent proteolysis of Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2 (HIPK2) is mediated by SIAH-1.** Manuskript in Vorbereitung

## **Danksagungen**

Herrn Prof. Hans Will danke ich für die gute Betreuung und den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz. Die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung haben wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Professor Mühlbach möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme des Dissertationsgutachtens und bei Herrn Prof. Böttger, Herrn Prof. Kranz und Herrn Prof. Harbers für die freundliche Unterstützung als Disputationsvorsitzenden beziehungsweise Disputationsgutachters ganz herzlich bedanken.

Allen Mitgliedern der Abteilung Will, speziell Thomas Hofmann und Hüseyin Sirma, danke ich für all ihre Ratschläge und Unterstützung, die sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Dem Wahlschweizer Lino Schmitz danke ich für die dynamische und gute „Erarbeitung“ und Betreuung meiner Projekte und die Möglichkeit, seine Heidelberger Gruppe zu leiten. Das tolle Laborklima motivierte mich, meine Arbeit in dieser Art zu vollenden.

Am DKFZ Heidelberg möchte ich mich bei Herrn Prof. Dröge für den dort zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit danken. Der ganzen Abteilung Immunchemie danke ich für die klasse Arbeitsatmosphäre. Im Speziellen danke ich Oliver Dienz für die super Zusammenarbeit und die ganzen Spieleabende. Elisabeth „Easy“ Klimczak und Sven Rüffer für die lustigen Momente des grauen Arbeitstages in unserer Miniarbeitsgruppe, sowie Lore, Tarik, Nadja und allen anderen ehemaligen H755ern. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Peter Altevogt möchte ich danken für die gute nachbarschaftliche Zusammenarbeit und Michaela Reichenzeller und Harald Herrmann für ihre hervorragende Unterstützungen bei allen zellbiologischen und mikroskopischen Fragen.

Meiner lieben Freundin Dani gilt mein ganz besonderer Dank. Sie hat es durch ihre Flexibilität überhaupt erst ermöglicht, diese Doktorarbeit in dieser Weise durchzuführen und hat mich die ganze Zeit durch ihre Liebe und Hilfe motiviert, den Weg bis zum Ende zu gehen.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht danken und für ihr stetes Interesse an meiner Arbeit.

## **Lebenslauf**

Diplom-Biologe Andreas Möller

Stahlenstr. 23

53859 Niederkassel

geboren am 05. November 1972 in Schwalmstadt (Hessen)

### **Ausbildung:**

- |                     |   |
|---------------------|---|
| seit 01/2000        | Doktorand am Heinrich-Pette-Institut / Hamburg, Abteilung Prof. Will, und am Deutschen Krebsforschungszentrum / Heidelberg                                |
| 09/1998 bis 09/1999 | Diplomarbeit am Max-Delbrück-Laboratorium des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung Prof. Flügge, Arbeitsgruppe Dr. Schulz |
| 1993 – 1998         | Studium an der Universität zu Köln<br>Fachrichtung: Biologie, Diplom  |
| 30. Juni 1993       | Allgemeine Hochschulreife am Kopernikus Gymnasium in Niederkassel (bei Köln)  |