

**Funktionelle Analyse von RNF6, einer  
RLIM-ähnlichen Ubiquitin-Ligase  
bei Vertebraten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

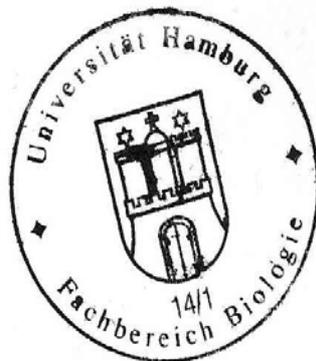
vorgelegt von  
Anne Schlüter  
aus Hamburg

Hamburg  
Juli 2004

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. I. BACH  
Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH

Tag der Disputation: 27. August 2004

Hamburg, den 13. August 2004



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Arno Frühwald".

Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

---

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. LIM-Proteine .....</b>	<b>6</b>
2.1.1. Nukleäre LIM-Proteine .....	7
2.1.2. Cytoplasmatische LIM-Proteine .....	10
2.1.3. Kofaktoren.....	14
<b>2.2. Ubiquitinierungen .....</b>	<b>19</b>
2.2.1. Ubiquitinkaskade.....	19
2.2.2. Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3-Enzyme) .....	20
2.2.3. Funktion von Ubiquitinierungen .....	22
<b>2.3. Problemstellung.....</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIALIEN .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. Bezugsquelle der verwendeten Substanzen.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Liste der gebräuchlichen Medien und Lösungen .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3. Bakterienstämme.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4. Zelllinien.....</b>	<b>29</b>
<b>3.5. Vektoren.....</b>	<b>29</b>
<b>3.6. Antikörper.....</b>	<b>31</b>
3.6.1. primäre Antikörper und Phalloidin .....	31
3.6.2. sekundäre Antikörper und Protein A.....	33
<b>3.7. Oligonukleotide.....</b>	<b>34</b>
<b>4. METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Arbeiten mit DNA und RNA .....</b>	<b>35</b>
4.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Mini-Präparation).....	35
4.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Maxi-Präparation).....	35
4.1.3. Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	36
4.1.4. Herstellung kompetenter Bakterien.....	36
4.1.5. Transformation von Bakterien mit DNA .....	36
4.1.6. Restriktionsverdau.....	37
4.1.7. Elektrophorese in Agarosegelen.....	37
4.1.8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	38
4.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren .....	38
4.1.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
4.1.11. Klonierung von PCR-Fragmenten.....	39
4.1.12. Zielgerichtete Mutagenese .....	40
4.1.13. Sequenzierung von DNA .....	40

---

4.1.14.	Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden.....	40
4.1.15.	Markierung von DNA-Molekülen durch „Random-Primer“ .....	41
4.1.16.	Northern-Blot-Analyse.....	42
<b>4.2.</b>	<b>Proteinbiochemische Arbeiten .....</b>	<b>43</b>
4.2.1.	Expression von Proteinen in Bakterien .....	43
4.2.2.	Aufreinigung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen .....	45
4.2.3.	Proteinbestimmung nach Bradford .....	46
4.2.4.	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
4.2.5.	Färbung von SDS-PAGE-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau.....	47
4.2.6.	Elektrophoretischer Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot).....	47
4.2.7.	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen .....	48
4.2.8.	GST-Interaktionsexperimente .....	49
4.2.9.	Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen <i>in vitro</i> .....	49
4.2.10.	<i>In Vitro</i> -Ubiquitinierungen.....	50
4.2.11.	Herstellung polyklonaler Antikörper .....	50
<b>4.3.</b>	<b>Methoden der Zellkultur .....</b>	<b>51</b>
4.3.1.	Zucht von Säugerzellen.....	51
4.3.2.	Lagerung von Säugerzellen.....	52
4.3.3.	Transfektion mit Polyethanolimin (PEI).....	52
4.3.4.	Immuncytochemische Detektion von Proteinen in Säugerzellen.....	52
<b>4.4.</b>	<b>Arbeiten mit Gewebeschnitten.....</b>	<b>53</b>
4.4.1.	Präparation von Gewebe-Kryoschnitte .....	53
4.4.2.	Präparation von Gewebe-Vibratomschnitte .....	53
4.4.3.	Immunhistochemie mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern.....	54
4.4.4.	Immunhistochemie mit biotinylierten Antikörpern.....	54
4.4.5.	<i>In situ</i> -Hybridisierungen .....	55
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1.</b>	<b>Sequenzvergleich RLIM/RNF6.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2.</b>	<b>Klonierung von murinem Rnf6.....</b>	<b>58</b>
<b>5.3.</b>	<b>mRNA-Expression von Rnf6 und Rnf12 im Vergleich.....</b>	<b>59</b>
<b>5.4.</b>	<b>Funktion von RNF6 im Vergleich mit RLIM .....</b>	<b>63</b>
5.4.1.	Interaktionspartner im Zellkern.....	63
5.4.2.	RNF6 und RLIM als Ubiquitin-Ligasen .....	65
5.4.3.	Abbau transfizierter Proteine in HEK 293T-Zellen durch RNF6 und RLIM .....	71
<b>5.5.</b>	<b>Herstellung von RNF6-spezifischen Antikörpern .....</b>	<b>73</b>
<b>5.6.</b>	<b>Expressionsvergleich der Proteine.....</b>	<b>76</b>
<b>5.7.</b>	<b>Funktion von RNF6 im Cytoplasma.....</b>	<b>78</b>
5.7.1.	Interaktion von RNF6 und RLIM mit LIMK .....	78
5.7.2.	Ubiquitinierung von LIMK .....	80
5.7.3.	Abbau transfizierter cytoplasmatischer Proteine in HEK 293T-Zellen .....	80
5.7.4.	Abbau endogener LIMK durch RNF6 in HEK 293T-Zellen.....	83

---

<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>88</b>
<b>6.1. RLIM und RNF6 – eine Protein-Familie? .....</b>	<b>88</b>
<b>6.2. Expression von RNF6 in Geweben .....</b>	<b>89</b>
6.2.1. Expression der mRNA von RNF6.....	89
6.2.2. Expression der Proteine.....	90
6.2.3. zelluläre Expression von RNF6.....	90
<b>6.3. Die Rolle von RNF6 in unterschiedlichen Zellkompartimenten.....</b>	<b>91</b>
6.3.1. RNF6 im Cytoplasma.....	91
6.3.2. RNF6 im Zellkern .....	94
<b>6.4. Ubiquitin-Ligase-Aktivität und Proteinabbau durch RNF6.....</b>	<b>96</b>
<b>6.5. Die Rolle von RNF6 für menschliche Krankheiten.....</b>	<b>99</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>101</b>
<b>7.1. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>101</b>
7.1.1. Allgemeine Abkürzungen .....	101
7.1.2. Abkürzungen von Substanzen und Puffern.....	102
7.1.3. Spezielle Abkürzungen .....	103
<b>7.2. Liste der verwendeten Oligonukleotide.....</b>	<b>105</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>106</b>
<b>9. DANKSAGUNG .....</b>	<b>122</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren (LIM-HD-Proteine) spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung unterschiedlicher Spezies von *Caenorhabditis elegans* bis zum Menschen. Sie gehören zur Familie der LIM-Proteine. Allen LIM-Proteinen gemein ist die LIM-Domäne, die aus zwei tandemartig wiederholten Zinkfinger-Strukturen besteht. Die LIM-Domäne ist eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, über die Multiproteinkomplexe mit verschiedenen Proteinen aufgebaut werden können. Außer den LIM-HD-Proteinen gehören noch die LIM-only-Proteine (LMOs) zum nukleären LIM-Protein-Netzwerk. Reguliert werden LIM-HD-Proteine über die positiv wirkenden Kofaktoren der CLIM-Familie und den negativ wirkenden Kofaktor RLIM. Alle Kofaktoren binden an LIM-Domänen. Auch die LMOs regulieren die LIM-HD-Proteine, indem sie mit diesen um die Kofaktoren konkurrieren. Außer den eben beschriebenen nukleären LIM-Proteinen gibt es eine ganze Reihe cytoplasmatischer LIM-Proteine. Dazu zählen die LIM-Kinasen (LIMK), die im Cytoplasma eine entscheidende Rolle für die Aktin-Dynamik spielen.

Da von LIM-HD-Proteinen und CLIM-Kofaktoren in Säugetieren immer zwei sehr nahe verwandte Proteine vorkommen, war es Ziel dieser Arbeit ein zu RLIM homologes Protein zu identifizieren und seine Funktion im Vergleich mit RLIM zu untersuchen.

Sequenzvergleiche mit der NCBI-Datenbank zeigten, dass RNF6 dasjenige Protein ist, das die stärkste Homologie zu RLIM aufweist. Daher wurde die cDNA von RNF6 der Maus kloniert. Es wurden spezifische polyklonale Antikörper gegen RNF6 generiert, mit denen RNF6 überraschend als vorwiegend cytoplasmatisches Protein identifiziert werden konnte. In funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass RNF6, wie RLIM, eine RINGfinger-abhängige Ubiquitin-Ligase ist. Auf der Suche nach cytoplasmatischen Substratproteinen von RNF6 konnte LIMK als RNF6-Interaktionspartner bestimmt werden. Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, dass RNF6 in axonalen Projektionen mit LIMK kolokalisiert vorliegt. Weiterhin konnte LIMK als Substratprotein für RNF6-vermittelte Polyubiquitinierungen identifiziert werden, die einen proteasomalen

Abbau von LIMK vermitteln. Es ist bekannt, dass unter anderem die LIMK-Konzentration im Cytoplasma die Aktin-Dynamik steuert. Da RNF6 als Ubiquitin-Ligase von LIMK die Konzentration von LIMK reguliert, ist RNF6 maßgeblich in diesen wichtigen zellulären Prozess involviert.

Die gewonnenen Daten identifizieren RNF6 und RLIM als Kofaktorfamilie von LIM-Protein-Netzwerken des Cytoplasmas und des Zellkerns. Beide Proteine sind Ubiquitin-Ligasen, die zentrale zelluläre Prozesse in unterschiedlichen Kompartimenten steuern. RLIM steuert, als negativer Koregulator, die Regulation der Transkription im Zellkern, während RNF6 die Aktin-Dynamik im Cytoplasma reguliert.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. LIM-Proteine

Die Familie der LIM-Proteine ist eine große und sehr diverse Gruppe von Proteinen, deren gemeinsames Merkmal eine oder mehrere LIM-Domänen darstellen. Die LIM-Domäne ist eine Cystein-reiche Region aus zwei Zinkfingern, die durch einen Abstand von 2 Aminosäuren getrennt sind (Dawid et al., 1995; Jurata & Gill, 1998). Das LIM-Motiv (xxCxxCx<sub>17-19</sub>HxxCxxCxxCx<sub>16-20</sub>Cxx[D/H/C]x) (Freyd et al., 1990; Karlsson et al., 1990; Taira et al., 1995) ähnelt zwar strukturell den Zinkfingern vom GATA-Typ (Perez-Alvarado, 1994), bindet jedoch im Gegensatz zu diesen keine DNA, sondern ist als Protein-Protein-Interaktionsdomäne bekannt (Schmeichel & Beckerle 1994; Bach 2000). Es konnte allerdings bisher kein allgemeines LIM-bindendes Motiv identifiziert werden (Khurana et al., 2002). Der Name bezieht sich auf die drei zuerst entdeckten für LIM-Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren (LIM-HD-Proteine) codierenden Gene *lin11*, *Isl1* und *mec-3*. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass LIM-Proteine sowohl in Hefe, als auch in tierischen und pflanzlichen Organismen vorkommen.

Aufgrund der hohen Diversität der Proteine ist es schwierig sie zu klassifizieren. Es gibt unterschiedliche Modelle, die sich entweder an der Sequenzhomologie der LIM-Domänen, der Gesamtstruktur, oder an anderen in den Proteinen vorhandenen funktionellen Domänen orientieren. Im wesentlichen gibt es vier verschiedene Typen von LIM-Domänen (A-D); dazu kommen wenige Außenseiter, die in diesem Modell nicht unterzubringen sind (Dawid et al., 1995). Des Weiteren werden die LIM-Proteine in drei Gruppen unterteilt (Dawid et al., 1998). LIM-Proteine der Gruppe 1 enthalten LIM-Domänen des A- oder B-Typs, die als Tandem-Wiederholungen vorkommen (Dawid et al., 1998). Hierzu zählen LIM-HD-Proteine, nukleäre LIM-only-Proteine (LMOs) und LIM-Kinasen (LIMKs). Mit Ausnahme der LIMKs befinden sich diese Proteine primär im Zellkern. LIMKs kommen überwiegend im Cytoplasma, aber auch im Zellkern vor. Bei LIM-Proteinen der Gruppe 2 handelt es sich um vorwiegend cytoplasmatische Proteine, die außer LIM-Domänen keine anderen funktionellen Domänen aufweisen. Die LIM-Domänen dieser Klasse gehören zum Typ C (Dawid, 1998). Die 3. Gruppe von LIM-Proteinen ist am wenigsten homogen und umfasst meist Proteine mit LIM-Domänen des D-

Typs. Auch die Proteine der Gruppe 3 sind vorwiegend cytoplasmatisch. Für das Verständnis dieser Arbeit ist es sinnvoll, nukleäre von cytoplasmatischen LIM-Proteinen zu unterscheiden, was im wesentlichen einer Gegenüberstellung der Gruppe 1 LIM-Proteine mit den LIM-Proteinen der Gruppen 2/3 entspricht. Da die LIMKs auch größtenteils im Cytoplasma vorkommen, werden sie hier in dem Kapitel "Cytoplasmatische LIM-Proteine" vorgestellt.

### **1.1.1. Nukleäre LIM-Proteine**

Zwei verschiedene Typen von LIM-Proteinen kommen vorwiegend im Zellkern vor, die LIM-Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren (LIM-HD-Proteine) und die LIM-only-Proteine (LMO-Proteine).

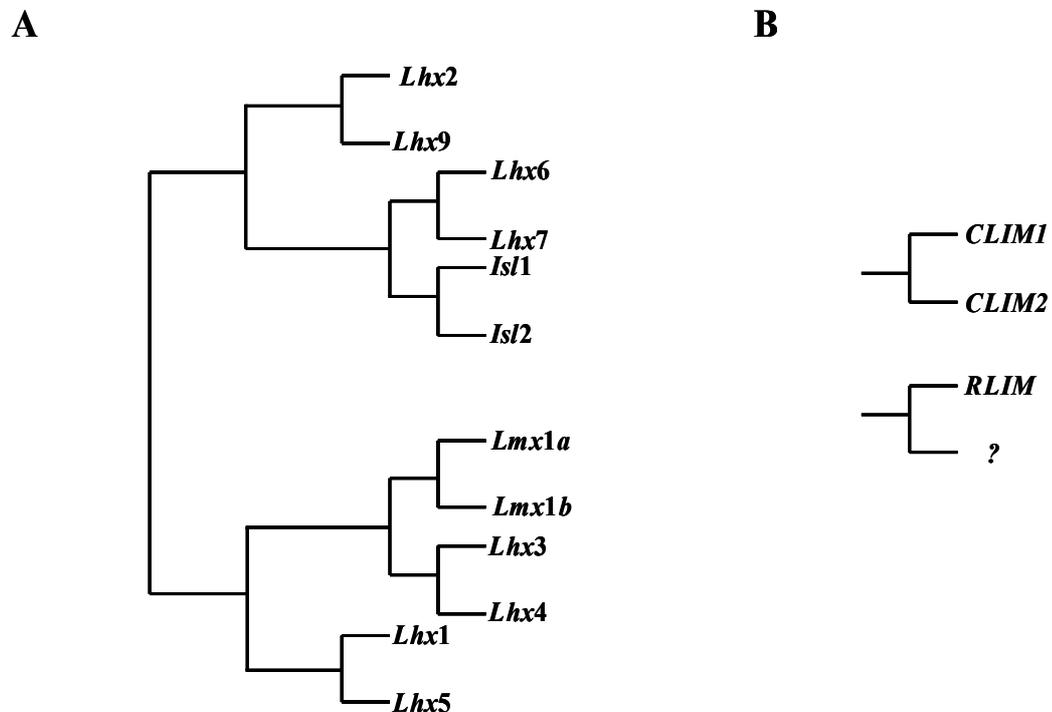
Eukaryotenzellen sind in bemerkenswertem Umfang in der Lage Gene selektiv zu exprimieren. Sowohl die verschiedenen Zelltypen eines mehrzelligen Organismus als auch seine unterschiedlichen Entwicklungsstadien und die Tatsache, dass der Organismus auf verschiedene Umwelteinflüsse reagieren kann, verlangen selektive Expression von einem in jeder Zelle identischen Genrepertoire. Diese selektive Expression unterliegt sehr umfangreichen und fein abgestimmten Regulationsmechanismen. Transkriptionsfaktoren sind Proteine die an Promotor- oder Enhancerregionen binden und mit diesen interagieren können. Auf diese Weise tragen sie zur Aktivierung oder Repression der Transkription eines bestimmten Genes bei (Gilbert, 2000). Alle Transkriptionsfaktoren haben sowohl eine DNA-Bindedomäne, die meist spezifische DNA-Sequenzen erkennt, als auch eine Transaktivierungsdomäne, die für die Aktivierung oder die Repression desjenigen Gens zuständig ist, dessen Promotor oder Enhancer gebunden wurde. Üblicherweise ermöglicht diese Domäne eine Interaktion mit Proteinen, die in die Bindung von RNA-Polymerase involviert sind, wie z.B. TFIIB oder TFIIE (Gilbert, 2000; Sauer et al., 1995). Zusätzlich besitzen sehr viele Transkriptionsfaktoren eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, über die die Bindung an andere Proteine, die ihre Aktivität beeinflussen können, ermöglicht wird.

Aufgrund der Struktur ihrer DNA-Bindedomäne werden Transkriptionsfaktoren in Familien unterteilt, deren wichtigsten Vertreter die Homeodomänen-, die Basic helix-loop-helix- (bHLH), die Basic leucine zipper- (bZip) und die Zinkfinger-Proteine) sind.

LIM-HD-Transkriptionsfaktoren gehören zu der großen Familie der Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren, die die Hox-, die POU-, die LIM- und die Pax-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren umfaßt. Das gemeinsame Merkmal der Homöodomänen-Proteine ist die etwa 60 Aminosäuren lange Homöobox, ein Helix-turn-Helix-Motiv ("Helix-Knick-Helix"). Helix 1 und Helix 2 sind antiparallel angeordnet, während die dritte Helix dazwischen liegt und an die große Furche der DNA bindet. Zusätzlich bindet der N-terminal vor der 1. Helix gelegene Teil der Proteine die kleine Furche der DNA. Abgesehen von den beschriebenen Domänen unterscheiden Homöodomänen-Proteine sich oft drastisch. Als Transkriptionsfaktoren können sie sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken. Sie spielen bei der Expression von Genen, die die Entwicklung regulieren eine entscheidende Rolle.

LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren enthalten neben den beiden LIM-Domänen die familientypischen DNA-bindende Homöodomäne und eine Transaktivierungsdomäne. Die tandemartig wiederholten LIM-Domänen liegen im N-terminalen Teil der Proteine, während die Transaktivierungsdomäne C-terminal lokalisiert ist. Sie spielen eine fundamentale Rolle bei verschiedenen wichtigen biologischen Prozessen, wie z.B. der Organogenese und der neuronalen Entwicklung (Hobert & Westphal, 2000; Bach, 2000). In jüngerer Zeit konnte auch ihre Rolle beim Auswachsen von Axonen gezeigt werden (Sharma et al., 1998; Kania et al., 2000; Segawa et al., 2001). Durch "knock out" Experimente wurde deutlich, dass *Isl1* für die Entwicklung bestimmter Moto- und Interneurone sowie dem pankreatischen Mesenchym, den Islet-Zellen des Pankreas und der Entwicklung der Hypophyse unerlässlich ist (Pfaff et al., 1996, Ahlgren, 1997). Ein "knock out" von *Lhx2* führt zu Frontalhirndefekten, dem Fehlen von Augen, einer gestörten Erythropoese und ist embryonal letal (Porter et al., 1997). Von jedem LIM-HD-Protein kommen in Säugern jeweils zwei durch Genduplikation entstandene Vertreter vor, die einer Subklasse zugeordnet werden (z.B. *Lhx1/Lhx5*, *Lhx3/Lhx4*, *Lhx6/Lhx7*; Abb.1A). *D. melanogaster* und *C. elegans* gibt es dagegen jeweils nur ein LIM-HD-Protein jeden Typs und in Zebrafischen, aufgrund einer zusätzlichen Genduplikation, jeweils mehr als zwei (Hobert & Westphal, 2000). LIM-HD-Proteine werden nach einem sehr streng umrissenen Muster exprimiert. Sie können in ihrem Expressionsmuster während der Embryogenese räumlich und zeitlich überlappen. Diese kombinatorische LIM-Protein-Kodierung ermöglicht es unter

anderem auch verschiedenen Subklassen von Motoneuronen gezielt Informationen wahrzunehmen, die den Axonen den Weg zu ihren muskulären Zielen weisen (Tsuchida et al., 1994).



**Abb. 1 LIM-HD-Transkriptionsfaktoren und deren Kofaktoren.** (A) LIM-HD-Transkriptionsfaktoren sind in Säugetieren immer durch zwei besonders gut konservierte, wahrscheinlich durch Genduplikation entstandene, Proteine vertreten. (B) Auch die Kofaktorfamilie CLIM besteht aus den beiden sehr gut konservierten Proteinen CLIM1 und CLIM2. Ob es auch für RLIM ein Homolog gibt, muss noch untersucht werden

Nukleäre LMO-Proteine sind relativ kleine, vorwiegend aus zwei tandemartig angeordneten LIM-Domänen bestehende Proteine, die bisher in Säugern am besten untersucht worden sind. Aufgrund dieser beiden Protein-Protein-Interaktionsdomänen und dem Fehlen anderer funktioneller Domänen werden LMOs als Adapterproteine verstanden, die bei dem Aufbau von Multiproteinkomplexen wichtig sind und in diesem Sinne eine essentielle Rolle für verschiedene grundlegende biologische Prozesse spielen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass LMOs, wenn sie durch chromosomale Translokation oder Mutation gestört sind, in onkogenetische Prozesse involviert sind (Rabbitts, 1998; Bach, 2000; Rétaux & Bachy, 2002). LMO1 und LMO2 beispielsweise wurden zuerst in T-Zell-Leukämie Patienten entdeckt, wo diese an Translokations-Bruchstellen ("translocation breakpoints") lokalisiert sind. Eine Überexpression dieser Proteine in transgenen

Tieren führt zu T-Zell-Transformationen (Larson et al., 1995, 1996). LMO2 spielt bei der Erythropoese eine wichtige Rolle. LMO2 deletierte Mäuse sind embryonal letal, da keine reifen Erythrocyten entwickelt werden können (Warren et al., 1994). Außerdem konnten die beiden LMO-Proteine LMO3 und LMO4 identifiziert werden. Für LMO4 konnte kürzlich gezeigt werden, dass Mäuse, denen LMO4 oder das Partnerprotein Deaf-1 fehlt, Defekte beim Schließen des Neuralrohres zeigen (Hahm et al., 2004).

### **1.1.2. Cytoplasmatische LIM-Proteine**

Da den LIM-Kinasen in dieser Arbeit große Bedeutung zukommt, werden sie ausführlich in einem eigenen Unterkapitel behandelt (2.1.2.2.). Zunächst werden die übrigen cytoplasmatischen LIM-Proteine eingeführt und werde im Anschluss daran die LIM-Kinasen.

#### **2.1.2.1. Weitere cytoplasmatische LIM-Proteine**

Wie schon erwähnt, bestehen die cytoplasmatischen LIM-Proteine aus den cytoplasmatischen LIM-only-Proteinen, wie z.B. CRP (cytoplasmic cysteine-rich protein) und CRIP und einer sehr diversen Gruppe von Proteinen, deren Mitglieder eine unterschiedliche Anzahl von LIM-Domänen sowie teilweise auch andere funktionelle Domänen aufweisen. Bei dieser Gruppe sind die LIM-Domänen im C-Terminus lokalisiert, während sie sonst üblicherweise N-terminal liegen. Zu dieser Gruppe zählen z.B. die Proteine Zyxin, Paxillin und Enigma. Die cytoplasmatischen LIM-only-Proteine enthalten außer einer (CRIP) oder zwei (CRP, MLP) LIM-Domänen keine weiteren funktionellen Domänen.

Cytoplasmatische LIM-Proteine werden ganz überwiegend mit dem Cytoskelett und der Myogenese assoziiert. Das Cytoskelett spielt eine wichtige Rolle für Zell-Zell- sowie Zell-Substrat-Kontakte, für die Cytokinese und für das Auswachsen und Steuern der Axone neuronaler Zellen (Khurana et al. 2002).

Wie die nukleären LMOs können auch die cytoplasmatischen LIM-only-Proteine bei der Vernetzung verschiedener Proteine eine Rolle spielen. CRP1 beispielsweise bindet sowohl sich selber (Homodimer) als auch Heterodimere mit Zyxin (Schmeichel und Beckerle, 1994) und  $\alpha$ -Aktinin (Feuerstein, 1994; Pomiès et al. 1997; Dawid 1998).  $\alpha$ -Aktinin ist ein Protein, das für den Aufbau des Aktin-

Cytoskeletts von großer Bedeutung ist, da es einzelne Aktinmoleküle miteinander vernetzen kann. Auch CRP3/MLP kann sowohl Homodimere ausbilden als auch  $\alpha$ -Aktintin binden. Es bindet zusätzlich an LMO1, Apterous und MyoD (Arber & Caroni, 1996; Kong et al., 1997). CRPs spielen bei der Differenzierung von Muskelzellen eine Rolle (Arber et al., 1997; Khurana et al., 2002). Zyxin ist ein Phosphoprotein, das für die Organisation von Aktin-Filamenten wichtig ist (Beckerle, 1997) und das durch eine seiner 3 N-terminalen LIM-Domänen mit CRPs interagieren kann. Auch Enigma wird mit dem Cytoskelett assoziiert. Vermutlich fungiert es als Adapterprotein, das andere Proteine zum Aktinskelett von Muskelzellen rekrutiert. Es enthält zusätzlich eine Proteininteraktionsdomäne, die PDZ-Domäne, über die es mit dem an Aktin bindenden Protein Tropomyosin aus Skelettmuskel interagiert und an LIM-Domänen binden kann (Guy et al., 1999; Khurana et al., 2002). Die ebenfalls größtenteils im Cytoplasma lokalisierten FHL-Proteine ("four and a half LIM"-Domänen Proteine) sind auch für die Myogenese von Bedeutung. Dasselbe gilt für die LIM-Proteine Paxillin (quergestreifte und glatte Muskulatur) und Hic-5 (glatte Muskulatur) (Yuminamochi et al., 2003). Für FHL-Proteine konnte darüber hinaus Kofaktor-Aktivität gezeigt werden. FHL3 bindet an den Basic Krüppel-like Factor 3 / Krüppel-like Factor 3 (BKLF/KLF3), ein Zinkfinger-Protein sowie an dessen Korepressor C-terminal-binding-Protein 2 (Turner et al., 2003). Eine Expression von BKLF/KLF3 verstärkt eine nukleäre Lokalisation von FHL3, das sowohl cytoplasmatisch wie nukleär exprimiert sein kann. FHL-Proteine scheinen weder primär Koaktivatoren noch Korepressoren zu sein, sondern sie fungieren als Adapter-Proteine in Komplexen verschiedener Funktion (Turner et al., 2003).

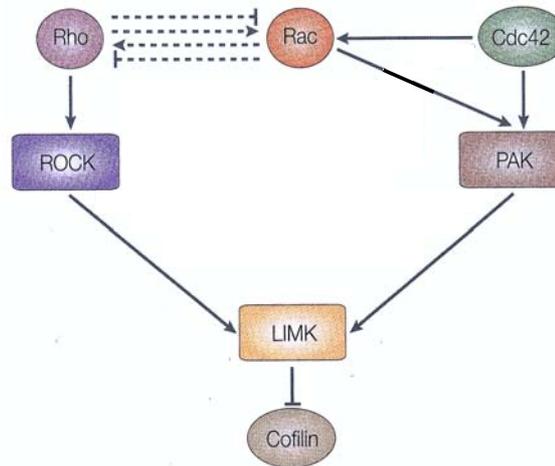
"Focal Adhesions" sind dynamische Cytoskelettstrukturen aus vielen verschiedenen Proteinen über die feste Kontakte zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix entstehen. In der Zelle assoziieren sie mit dem zellulären Aktin-Netzwerk. Sie entstehen in adhären Zellen in Zellkultur, wurden aber auch in der Niere und der Prostata zwischen Zellen und Basallamina sowie in epidermalen Zellen gefunden (Sarkar, 1999). In "Focal Adhesions" kommen strukturelle Proteine wie Vinculin, Talin und  $\alpha$ -Aktinin und regulatorische Proteine wie Focal Adhesion Kinase (FAK) und die LIM-Proteine Zyxin und Paxillin vor.

In jüngerer Zeit hat sich herausgestellt, dass erstaunlich viele Mitglieder der cytoplasmatischen LIM-Protein-Familien nicht ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert sind, sondern sich teilweise auch im Zellkern befinden können, sie pendeln zwischen beiden Kompartimenten. Zu dieser wachsenden Gruppe von Pendelproteinen („Shuttleproteinen“) gehören Zyxin, Ajuba und die LIM-Kinasen (Beckerle, 1997; Nix & Beckerle, 1997; Kanungo et al., 2000). Am besten untersucht ist Zyxin. Wie auch Ajuba hat es eine NES (nukleare Export-Sequenz), um dem Protein die Möglichkeit zu geben, wieder in das Cytoplasma zurückzukehren. Für Zyxin wird vermutet, dass es je nach Stimulus entweder eine Rolle für die Bildung des Cytoskeletts spielt oder für die innerzelluläre Kommunikation zwischen Zelloberfläche und Zellkern zuständig ist (Beckerle, 1997).

#### **2.1.2.2. LIM-Kinasen und ihre Rolle für das Cytoskelett**

Es sind zwei Serin-/Threonin-Kinasen der LIM-Kinase-Familie bekannt, die als LIMK1 und LIMK2 bezeichnet werden. Diese Kinasen sind die einzigen bekannten katalytischen LIM-Proteine. Beide Proteine sind hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, kommen jedoch auch im Zellkern vor. Es handelt sich um Proteine, die zwei LIM-Domänen und eine PDZ-Domäne zur Protein-Protein-Interaktion enthalten und in die Regulation des Cytoskeletts involviert sind (Riento & Ridley, 2003). LIMK2 ist ubiquitär exprimiert, während LIMK1 eine stark in Neuronen exprimierte Serin-/Threonin-Kinase ist, deren Überexpression in Zellkultur zur Anreicherung von F-Aktin führt (Sumi et al., 1999; Stanyon & Bernard, 1999). Man unterscheidet monomeres G-Aktin und filamentöses F-Aktin, das unter anderem zum Aufbau des Cytoskeletts, z.B. von Filopodien und Lamellopodien während des Axonwachstums benötigt wird. Das Cytoskelett muß sehr dynamisch sein, um den Ansprüchen von Zellen allen voran der Axone bei ihrem Auswachsen gerecht zu werden. Die Dynamik wird ganz entscheidend über ständig polymerisierendes und depolymerisierendes Aktin gewährleistet, was wiederum unter anderem durch den Depolymerisierungsfaktor Cofilin geschieht. Durch eine Phosphorylierung des Aktin-bindenden Depolymerisierungsfaktors Cofilin am Serin-3 durch LIMK1, kommt es zu einer Anreicherung von F-Aktin. Cofilin ist im phosphorylierten Zustand nicht aktiv, dann also nicht mehr in der Lage F-Aktin zu depolymerisieren und dieses wird angereichert (Arber et al., 1998). Um Cofilin zu phosphorylieren muss LIM-Kinase allerdings aktiv sein. Hierbei spielen die kleinen GTPasen (Rac,

Rho und Cdc42) eine wichtige Rolle (Abb.2). LIMK1 wird über eine durch Rac oder Cdc42 induzierte Phosphorylierung von Pak1 und die anschließende Phosphorylierung von LIMK1 am Thr508 aktiviert (Ohashi et al., 2000, Riento &



**Abb. 2 Signale, die die Aktivität von LIMK beeinflussen.** Die Kinasen ROCK und PAK phosphorylieren LIMK, die dann in der Lage ist Cofilin zu phosphorylieren, welches dadurch inaktiviert wird. ROCK und PAK selber werden von den kleinen GTPasen Rho, bzw. Rac und Cdc42 phosphoryliert. Modifiziert nach Riento & Ridley, 2003

Ridley, 2003). Eine Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung von LIMK2 am Thr505 (Sumi et al., 2001, Riento & Ridley, 2003) entsteht durch eine Phosphorylierung von ROCK-Kinase, die wiederum von Rho oder Cdc42 selber phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von LIMK1 und Cofilin wird durch Rac-GTP (wie Rho eine kleine GTPase) unterstützt, während Rac-GDP und PMA (Protein Kinase C Aktivator) hemmend wirken (Stanyon & Bernard, 1999). Es wurde auch publiziert, dass LIMK1 und LIMK2 jeweils sowohl am Thr505 als auch am Thr508 phosphoryliert werden und das Rho vermittelte Phosphorylierungen nicht nur zu einer Aktivierung von LIMK2 sondern auch zu einer Aktivierung von LIMK1 führen können (Maekawa, 1999; Roovers et al., 2003). Die Spezifität der beschriebenen Reaktionen ist folglich noch unklar. Es kann zu weiteren Phosphorylierungen von LIMK1 (und vermutlich auch LIMK2) an verschiedenen Serinen kommen, die eine stärkere Aktivierung zur Folge haben (Yoshioka et al., 2003).

Die Überexpression von LIMK1 ohne LIM-Domänen führt in Zellkultur zu einer noch stärkeren Akkumulation von F-Aktin, weiterhin verstärkt wird dieser Effekt wenn die Kinase-Domäne allein exprimiert wird (Arber et al., 1998, Stanyon & Bernard, 1999). Dominant-negatives Rac kann diese Effekte der isolierten Kinase-

Domäne nicht verhindern (Arber et al., 1998). Die Cofilin-Aktivierung von LIMK wird durch die Kinasedomäne gesteuert, während die LIMK-Lokalisation von anderen Domänen bestimmt wird.

Die LIMKs sind auch in verschiedene Krankheitsbilder involviert. Individuen, die hemizygot für LIMK1 sind, leiden am Williams-Syndrom, das mit einer leichten mentalen Retardierung einhergeht. Vermutlich sind die niedrigen neuronalen LIMK1-Proteinmengen dafür verantwortlich (Stanyon & Bernard, 1999). Außerdem ist LIMK1 in invasiven humanen Tumoren, wie Brust-, Ovarien-, Lungen- und Prostatumoren sowie in Melanomen stark exprimiert (Yoshioka, 2003). Besonders stark invasive Tumorzelllinien (Ras-transformierte NIH 3T3-Zellen) zeigen stärkere LIMK1-Expression als normale 3T3-Zellen. Auch die Aktin-abhängige Migration von T-Zellen nimmt mit steigender Aktivität von LIMK1 zu (Nishita et al., 2002), was für Invasion von Tumoren und Metastasenbildung von größter Bedeutung ist. Da, wie ein "knock-out"-Experiment in Mäusen zeigt, LIMK1 nicht lebensnotwendig ist (Meng et al., 2002), ist diese Kinase ein interessantes Ziel für die Entwicklung von Medikamenten, die die Metastasenbildung und die Invasion von Tumoren bekämpfen sollen (Yoshioka, 2003). Ein "knock-out"-Experiment von LIMK2 in Mäusen zeigt, dass auch die LIMK2<sup>-/-</sup>-Mäuse lebensfähig sind und keinen abweichenden Phänotyp bezüglich Wachstum und Entwicklung aufweisen. Allerdings zeigen diese Tiere eine gestörte Spermatogenese (Takahashi et al., 2002).

### **1.1.3. Kofaktoren**

Viele Transkriptionsfaktoren rekrutieren Regulatoren, sogenannte Kofaktoren um ihre Aktivität zu modulieren. Es gibt negativ und positiv wirkende Kofaktoren, die oft intrinsisch enzymatische Aktivität zeigen (Turner & Crossley, 2001). Häufig entstehen riesige Proteinkomplexe, die sich aus der basalen Transkriptionsmaschinerie und zusätzlich rekrutierten Proteinen zusammensetzen und auf äußerst komplizierte Weise zusammenspielen um den Ansprüchen an die Regulation der Genexpression der verschiedenen Zelltypen mehrzelliger Organismen gerecht zu werden. Die entstehenden Multiproteinkomplexe können sich je nach Zelltyp und Zeitpunkt in der Entwicklung unterschiedlich zusammensetzen. Für diese Arbeit spielen nur die Kofaktoren des LIM-Protein-Netzwerkes eine Rolle. Daher soll im Folgenden nur auf diese Kofaktoren eingegangen werden.

### 2.1.3.1. CLIM

Die Homodimer-bildende CLIM-Kofaktorfamilie besteht aus CLIM1/Ldb2 und CLIM2/NLI/Ldb1 (Agulnick et al., 1996; Jurata et al., 1996; Jurata et al. 1998; Bach et al. 1997). CLIM-Kofaktoren sind Bestandteile von Multiproteinkomplexen, die außer LIM-HD-Transkriptionsfaktoren auch bHLH-, GATA- und Otx-Transkriptionsfaktoren enthalten können (Agulnick et al., 1996; Mukhopadhyay et al., 2003). CLIM-Proteine sind positive Koregulatoren der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren, die von *Drosophila* bis zum Menschen sehr gut konserviert sind (Bach, 2000). Sie sind sehr weit verbreitet exprimiert, am stärksten allerdings in postmitotischen Zellen des embryonalen Neuralrohres und anderen Regionen des sich entwickelnden zentralen Nervensystems (Jurata et al., 1998). Darüberhinaus ist bekannt, dass CLIM-Proteine mit LIM-HD-Transkriptionsfaktoren koexprimiert werden (Jurata et al., 1998; Milan & Cohen, 1999; Becker et al., 2002). Sie interagieren mit den LIM-Domänen der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren und der nukleären LMO-Proteine, nicht aber mit LIM-Domänen cytoplasmatischer LIM-Proteine (Jurata et al., 1998). Mit LIM-HD-Proteinen interagieren CLIM-Kofaktoren über ihre LIM-Interaktionsdomäne. Ihre Dimerisierungsdomäne vermittelt die Bildung von Homodimeren, so dass ein tetramerer Komplex aus zwei CLIM- und zwei LIM-HD-Proteinen entstehen kann. Jurata et al. (1998) konnten zeigen, dass auf diese Weise sowohl zwei gleiche als auch zwei unterschiedliche LIM-HD-Proteine (z.B. *Lhx3* mit *Isl1* oder *Isl2*) verbunden werden können. Die Autoren schlagen vor, dass Enhancer-gebundene Transkriptionsfaktoren mit Promotor-gebundenen Transkriptionsfaktoren interagieren könnten und so der Enhancer in räumliche Nähe des Promotors rückte. Das wiederum könnte zur Folge haben, dass weitere Enhancer-gebundene Faktoren, unter anderem Histon-Acetylasen, helfen könnten, die Transkription zu aktivieren. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass CHIP (CLIM-Homolog) außer mit LIM-Proteinen auch mit anderen Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren (z.B. Bicoid) interagiert und deren Aktivität potenziert (Torigoi et al., 2000). Hierzu wird nicht die LIM-Interaktionsdomäne, sondern die OID ("other interaction domain") genutzt. Das erklärt warum in *Drosophila* CHIP-Deletionsmutanten die Segmentierung gestört ist, obwohl LIM-HD-Transkriptionsfaktoren nicht für die Segmentierung zuständig sind. Überexpression einer dominant-negativen Mutante von CLIM in Zebrafischen, die zwar zur

Interaktion mit LIM-Domänen, nicht aber zur Dimerisierung fähig ist, zeigte mehrere gravierende Phänotypen (Becker et al., 2002). So war in diesen Tieren die Entwicklung der Augen und der Grenzstruktur zwischen Stammhirn und Hinterhirn sowie das Auswachsen peripherer Axone von Rohon Beard Neuronen gestört. Interessant ist, dass auch *Lhx2*<sup>-/-</sup>-Mäuse Augendefekte und Defekte in der Entwicklung der Grenzstruktur zwischen Stamm- und Hinterhirn zeigen (Porter et al., 1997).

Mäuse in denen CLIM2 deletiert wurde zeigen verschiedene gravierende Defekte während der Gastrulation (Mukhopadhyay et al., 2003). Sie haben keine Herz-Anlage und die Kopf-Strukturen sind vor dem Hinterhirn trunkiert. Auch einige vom Mesoderm abstammende Strukturen sind gestört. Die Autoren vermuten, dass dieses breite Spektrum von Phänotypen auf unterschiedliche Transkriptionsfaktoren zurückzuführen ist, die alle CLIM2 als Kofaktor verwenden (Mukhopadhyay et al., 2003).

Für die *in vivo*-Aktivität von LIM-HD-Proteinen sind CLIM-Kofaktoren von ganz entscheidender Bedeutung. In *C. elegans* wurde ein CLIM-Ortholog gefunden, das für LIM-HD-Protein-vermittelte neuronale Funktionen benötigt wird (Cassata et al., 2000). Außerdem konnte der synergistische Effekt von CLIM-Kofaktoren auf die Genaktivität im Zusammenhang mit *Lhx3* auf dem  $\alpha$ -GSU-Promotor und ihr inhibitorischer Effekt für *Lmx1* auf dem Insulin-Promotor gezeigt werden (Bach et al., 1997; Jurata & Gill, 1997). Für *Drosophila* ist bekannt, dass die relative Menge exprimierten Apterous- und CLIM/CHIP-Proteins entscheidend für die dorso-ventrale Entwicklung der Flügel ist (Fernandez-Funez et al., 1998; Milán & Cohen, 1999). Wenn die LIM-Domäne von Apterous durch die Dimerisierungsdomäne von CLIM ersetzt wird, ist das Protein genauso funktionell wie Wildtyp-Apterous, was zeigt, dass CLIM/CHIP für die Aktivität von Apterous notwendig ist (Milán & Cohen, 1999; van Meyel et al., 1999). LMOs konkurrieren mit den LIM-HD-Transkriptionsfaktoren um CLIM-Kofaktoren, daher kann die Funktion von LIM-HD-Proteinen durch eine Überexpression von LMOs inhibiert werden (Milan & Cohen 1999; van Meyel, 1999).

CLIM-Kofaktoren werden mit der Pathogenese akuter T-Zell-Leukämie assoziiert (Valge-Archer et al, 1998). In den Patienten sind LMO1 und LMO2 besonders stark exprimiert. Es wird angenommen, dass aus diesem Grund LMO4 aus seinem

Komplex mit CLIM-Kofaktoren verdrängt wird und so die T-Zell Differenzierung vor dem Auftreten von Tumoren beeinflusst wird (Grutz et al., 1998).

### 2.1.3.2. RLIM (Rnf12) und das nukleäre LIM-Proteinnetzwerk

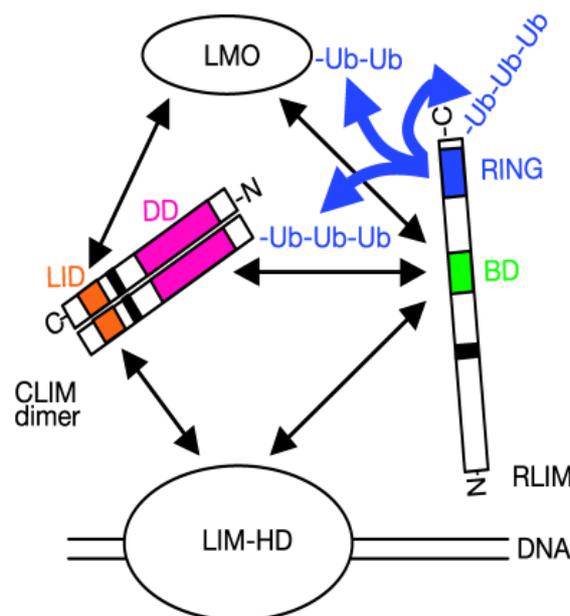
Ein weiterer Kofaktor im LIM-Systems ist das Protein RLIM ("RINGfinger LIM-domain-binding protein"), dessen codierendes Gen als Rnf12 bezeichnet wird und bei Maus und Mensch auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Auf der C-terminalen Seite von RLIM ist ein H2-Zinkfinger lokalisiert, in dem zwei Zinkatome von je vier Aminosäureresten koordiniert werden. Das RINGfinger-Motiv ist definiert als:  $CX_2CX_{9-39}CX_{1-3}HX_{2-3}C/HX_2CX_{4-48}CX_2C$  (Freemont, 2000; Joazeiro and Weissman, 2000). RLIM ist, wie CLIM, ubiquitär exprimiert und bindet an LIM-Domänen von LIM-HD-Proteinen, von LMOs und LIMKs sowie an den Kofaktor CLIM. An cytoplasmatische LIM-Proteine bindet RLIM nur sehr schwach oder gar nicht (Bach et al., 1999). RLIM wurde über seine Interaktion mit *Lhx3* gefunden (Bach et al., 1999). Das über *in situ*-Hybridisierungen identifizierte Expressionsmuster von RLIM ähnelt dem von CLIM2 extrem (Bach et al, 1999). Die gravierenden Phänotypen von CLIM2<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde oben beschrieben. Aufgrund dieser Daten und der Tatsache dass RLIM und CLIM aneinander binden überrascht es nicht, dass Mäuse in denen RLIM deletiert wurde nicht lebensfähig sind (Bossenz, 2004). An einem konditionellen „knock-out“ zur besseren Analyse wird in unserem Labor gearbeitet. *In vitro* wird der TATA- und CCAAT-box freie RLIM Promotor sowohl von ubiquitären (z.B. SP1) als auch von speziellen (z.B.RBP-J) Transkriptionsfaktoren gebunden (Ostendorff et al., 2000). RBP-J ist in die Notch-Signal-Kaskade involviert, von der gezeigt werden konnte, dass sie für die Entwicklung verschiedener Gewebe und Organe, die LIM-HD-Proteine exprimieren, wichtig ist (Diaz-Benjumea & Cohen, 1993; Ahlgren et al., 1997).

Wird RLIM *in vivo* überexprimiert, so entstehen bezüglich der Flügelentwicklung im Huhn Phänotypen, die denen ähneln, die durch eine Inhibition von *Lhx2* oder eine Überexpression von einer dominant negativen CLIM-Mutante entstehen (Bach, 1999). Diese Daten führten zu dem Schluss, dass RLIM *in vivo* ein negativer Regulator von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren ist. In transienten Kotransfektionen inhibiert RLIM die Transkriptionsaktivität von *Lhx2* und *Lhx3*. Der negative Effekt auf die Transkription wird unter anderem auf die Bindung von RLIM an die

Histondeacetylase Sin3A und den damit verbundenen Korepressorkomplex zurückgeführt.

In jüngerer Zeit konnte außerdem von unserem Labor eine Ubiquitinligaseaktivität von RLIM gezeigt werden. Diese Erkenntnis führte zu einem neuen Modell bezüglich des nukleären LIM-Protein-Netzwerkes, das auf Abb.3 dargestellt ist (Ostendorff et al., 2002). RLIM ist sowohl zur Autoubiquitinierung als auch zur Ubiquitinierung von LMOs und CLIM fähig. CLIM bindet als positiver Regulator an LIM-HD-Proteine, die wiederum an DNA binden, kann aber von RLIM ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt werden, wodurch RLIM nun selber seine negative Regulationswirkung entfalten kann ("Cofactor exchange").

Wie auch andere E3-Ubiquitin-Ligasen wird eine veränderte RLIM-Expression mit der Entstehung von Tumoren assoziiert (Scanlan et al., 1999).



**Abb. 3 Das LIM-Protein-System im Nukleus.** Schwarze Pfeile stehen für Proteininteraktionen, blaue Pfeile zeigen Ubiquitinierungsaktivität an. Ubiquitinierungen sind durch blaue Ubiquitinketten markiert (Ub). Diese Abbildung zeigt, dass RLIM sich selber, LMO-Protein und CLIM ubiquitiniert, nicht aber LIM-HD-Proteine. Aus Ostendorff et al., 2002.

Weder in *Drosophila* noch in *C.elegans* konnte bisher ein RLIM-Homolog gefunden werden. Eventuell gibt es ein funktionelles Homolog, das in der Sequenz stark von RLIM abweicht und daher noch nicht als solches identifiziert werden konnte. Oder die Regulation ist in diesen einfacheren Organismen noch weniger vielschichtig als in Vertebraten (Hobert & Westphal, 2000).

### 2.1.3.3. RNF6

RNF6 ist ein weiteres RING-H2-Zinkfinger-Protein über das noch wenig bekannt ist. Da die Sequenz von RNF6 der von RLIM auf DNA- und Protein-Ebene sehr ähnlich ist, kommt es als Kandidat für ein RLIM-ähnliches Protein in Frage (Abb.1B).

Rnf6 wurde 1999 von MacDonald et al. kloniert und konnte auf dem Chromosom 13 (13q12.2) lokalisiert werden (MacDonald et al., 1999). Die Gruppe um MacDonald hat Northern Blots mit einer Sonde gegen Rnf6 durchgeführt und eine schwache auf der Höhe von 3,4 kb laufende Bande in peripherem Blut, Milz, Prostata, Eierstöcken und Hoden gefunden. Eine andere Gruppe hat bei demselben Experiment eine auf der Höhe von 3,2 kb laufende Bande die in Hoden stark und in Gehirn schwach ausgeprägt ist gefunden (Lopez et al. 2002). Diese Gruppe fand außerdem eine stärkere mRNA-Expression während der Meiose und eine Kolo-kalisation von RNF6 mit PML und Daxx. Beide Proteine werden mit "PML-bodies" im Zellkern assoziiert. Darüber hinaus zeigen Lopez et al. eine Bindung von RNF6 an den *Inha*-Promotor. Das *Inha*-Gen codiert für die  $\alpha$ -Untereinheit von Inhibin, einem Protein, das lokal in Sertoli-Zellen von Mäusen als Tumorsuppressor wirkt und in Tumoren runterreguliert ist. Sertoli-Zellen sind die somatischen Stützzellen der männlichen Keimzellen. RNF6 hat laut Lopez et al. eine aktivierende Wirkung auf *Inha*, die Tumorwachstum entgegenwirken könnte. Auch Lo et al. beschreiben RNF6 als mögliches Tumorsuppressorprotein (Lo et al., 2002), da RNF6 in Speiseröhren-Karzinomen ("esophageal squamous cell carcinoma") häufig mutiert ist. Die Funktion und Lokalisation von RNF6 ist noch sehr schlecht untersucht und genauere Angaben sind in der Literatur nicht zu finden.

## 1.2. Ubiquitinierungen

### 1.2.1. Ubiquitinkaskade

Ubiquitin ist ein 76 kDa großes Protein, das als Fusionsprotein synthetisiert wird und prozessiert werden muss, bevor es in eine Ubiquitinierungsreaktion eingehen kann. Ubiquitin ist stark konserviert; nur 3 Aminosäuren des Ubiquitins von Hefe unterscheiden sich vom menschlichen Ubiquitin (Weissman, 2001).

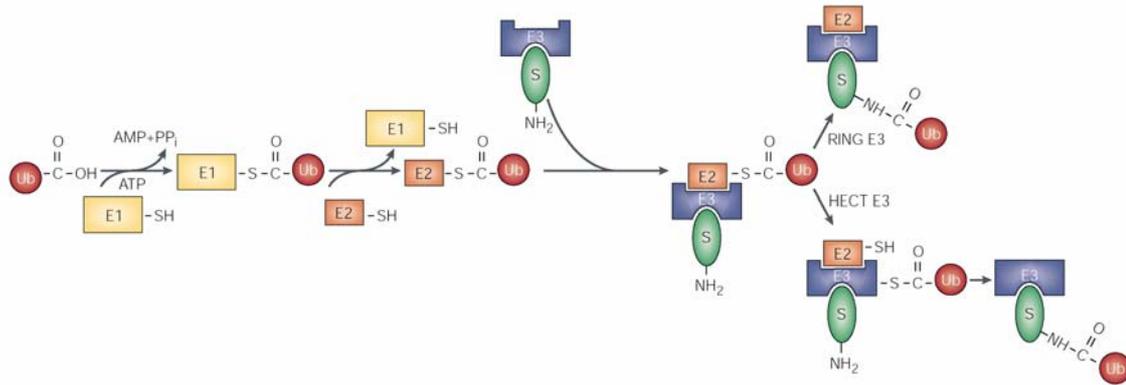
Schon lange Zeit ist bekannt, dass Proteine, die dem proteasomalen Abbau zugeführt werden sollen, ubiquitiniert werden. Unter einer Ubiquitinierung versteht man die kovalente Bindung eines Ubiquitins an das Lysin eines Substratproteins, wobei auch Ubiquitin als Substrat dienen kann. Die Ubiquitinierungsreaktion ist eine Kaskade enzymatischer Reaktionen, für die mindestens die drei Enzyme E1, E2 und E3 benötigt werden (Pickart, 2001). Das erste benötigte Enzym ist das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1). E1 bildet ATP-abhängig eine Thioesterbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und einem Cystein des E1-Enzyms. In einer als Transthilierung bezeichneten Reaktion übernimmt das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) das Ubiquitin, das wieder an ein Cystein gehängt wird. Auch die Verbindung zwischen E2 und Ubiquitin ist eine Thioesterbindung. Das dritte benötigte Enzym ist die Ubiquitin-Protein-Ligase (E3), die eine Isopeptidbindung zwischen Ubiquitin und einem Lysin des Substratproteins herstellt. Diese wichtige und sehr umfangreiche Proteingruppe wird im Folgenden Kapitel besprochen. Die Ubiquitinkaskade ist auf Abb.4 dargestellt.

Es ist nur ein E1 mit zwei Isoformen bekannt, während in Hefen bisher 13 E2s und in Säugern mindestens 25 E2s (Weissman, 2001) entdeckt worden sind. Noch wesentlich umfangreicher ist die große Gruppe der beschriebenen Ubiquitin-Ligasen, die ständig wächst. Bisher konnte für alle daraufhin untersuchten RINGfinger Proteine eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität festgestellt werden. Daher sind es auch die E3-Enzyme die der Ubiquitinierung Spezifität verleihen. Einzelne E3s können mehrere Substrate ubiquitinieren, ein Substrat kann aber auch von unterschiedlichen E3s ubiquitiniert werden (Bach & Ostendorff, 2003).

### **1.2.2. Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3-Enzyme)**

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen HECT-Domänen ("homologous to E6-AP carboxy terminus") und RING-finger ("really interesting new gene") E3s.

HECT-Domänen E3s wurden im Zusammenhang mit dem humanen Papillomavirus (HPV) entdeckt. Das Virus codiert für ein als E6 bezeichnetes Protein, das den Tumorsuppressor p53 inaktiviert. E6-AP ("E6-associated protein"), ein Partnerprotein von E6, katalysiert die Ubiquitinierung von p53 (Scheffner et al., 1993). Mutationen im E6-AP-Gen führen zum Angelman Syndrom. Inzwischen konnten viele weitere E3s gefunden werden, die E6-AP in einer ca. 350 Aminosäurereste langen C-terminalen Region, die als HECT-Domäne bezeichnet



**Abb. 4 Die Ubiquitin-Kaskade.** Freies Ubiquitin (Ub) wird ATP-abhängig durch eine Thioester-Bindung zwischen dem Carboxyterminus des Ubiquitins und E1 aktiviert. Ubiquitin wird auf E2 übertragen. E2s assoziieren mit E3s. Bei HECT-Domänen E3s wird das Ubiquitin nun auf ein Cystein der HECT-Domäne und danach auf das Substrat übertragen. RINGfinger E3s übertragen das Ubiquitin direkt auf das Substrat. Aus Weissman, 2001.

wird, ähneln. Ubiquitin-Ligasen mit einer HECT-Domäne bilden Thioester-Zwischenverbindungen mit Ubiquitin bevor dieses auf das Substrat übertragen wird (Jackson et al., 2000; Pickart, 2001; Abb.4).

Diese Zwischenverbindungen sind von der größeren Gruppe der Ubiquitin-Ligasen, den RINGfinger-Proteinen, nicht bekannt. RINGfinger E3s transferieren das Ubiquitin von der E2 auf das Substratprotein, ohne selber eine direkte Verbindung mit dem Ubiquitin einzugehen (Abb.4). Allen RINGfinger-Proteinen gemeinsam ist die ca. 70 Aminosäurereste lange RINGfinger-Domäne, die schon in Kapitel 2.1.3.2. beschrieben wurde. Man unterscheidet einzelne Ringfinger E3s und solche, die aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind. Ein Beispiel für einzelne RINGfinger-E3s ist das oben beschriebene RLIM. Ein weiteres prominentes Beispiel ist das Protein BRCA1 (breast and ovarian cancer susceptibility gene1). Mutationen in diesem Gen korrelieren mit der Wahrscheinlichkeit an Eierstock- und Brustkrebs zu erkranken (Miki et al., 1994; Hashizume et al., 2001; Ruffner et al., 2001). BRCA1 bildet mit BARD1 ein Heterodimer, das eine stärkere E3-Ligase-Aktivität zeigt als ein BRCA1/BRCA1-Homodimer (Baer & Ludwig, 2002). Ein anderes Beispiel ist das Oncoprotein Mdm2, das eine Ubiquitin-Ligase des Tumor-Suppressors p53 ist (Fang et al., 2000; Freemont, 2000). Die Regulation von Mdm2 ist, verglichen mit anderen RINGfinger Ubiquitin-Ligasen, schon recht genau bekannt. Mdm2 reguliert sich selber durch Autoubiquitinierung. Darüberhinaus blockiert eine Phosphorylierung von p53 die Interaktion mit Mdm2 und verhindert damit einen Abbau über das Proteasom. Das Protein p19<sup>ARF</sup> kann stromaufwärts des RINGFingers an Mdm2 binden. Dadurch wird ein Nukleolus-Lokalisations-Signal

exponiert. Auf diese Weise wird Mdm2 von p53 getrennt und der Abbau von p53 verhindert (Weissmann, 2001). Bildet Mdm2 ein Heterodimer mit MdmX, einem verwandten RINGfinger-Protein, ist seine Ubiquitin-Ligase-Aktivität ebenfalls inhibiert (Sharp et al., 1999).

Komplizierter und zum jetzigen Zeitpunkt noch schlechter untersucht sind die aus verschiedenen Untereinheiten aufgebauten RINGfinger-E3s. Die Aufgaben die bei einzelnen E3s von den verschiedenen Protein-Domänen übernommen werden, werden hier von Proteinuntereinheiten übernommen. Alle enthalten ein kleines RINGfinger Protein und ein Protein der Cullin-Familie sowie weitere Untereinheiten für die Substraterkennung. Zuerst entdeckt wurde SCF, das das kleine RINGfinger-Protein Rbx1 sowie das Cullin-Protein Cdc53 enthält. Dieser Komplex verwendet Ubc3 als E2. SCF E3s ubiquitinieren eine diverse Gruppe Phosphoproteine, wobei die Aufgabe der Substraterkennung F-Box-Proteine übernehmen (Bai et al, 2000; Weissman, 2001).

### **1.2.3. Funktion von Ubiquitinierungen**

Die Markierung eines Proteins mit Ubiquitin kann ganz unterschiedliche Folgen haben. Ubiquitinierungsreaktionen sind bei sehr vielen Aufgaben der Zelle von Bedeutung; dazu zählen: Zellzyklussteuerung, Organellen-Biogenese, Apoptose, Regulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Qualitätskontrollen im ER, Proteintransport, Entzündungsprozesse, DNA-Reparatur, Transkription, synaptische Plastizität und die Stressantwort der Zelle (Weissman, 2001; Hedge & DiAntonio, 2002; Bach & Ostendorff 2003). Ubiquitinierungen erfüllen wichtige Aufgaben sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern.

Die Anzahl der kovalent mit dem Substrat verbundenen Ubiquitine und die Lysine, über die die einzelnen Ubiquitine miteinander verbunden sind, unterscheiden sich. Ein Protein kann an einem oder mehreren Lysinen mit einem Ubiquitin modifiziert werden, was als Monoubiquitinierung bezeichnet wird. Es können sich aber auch lange Ketten aus Ubiquitin bilden, indem weitere Ubiquitine über die Ubiquitin internen Lysine angehängt werden, was als Polyubiquitinierung bezeichnet wird. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die Lysine K11, K29, K48 und K63 des Ubiquitins ubiquitiniert werden können. Abhängig von der Art der Ubiquitinierung unterscheidet sich die biologische Konsequenz.

Am bekanntesten ist, dass Ubiquitinketten von mindestens vier Ubiquitinen (Polyubiquitinierungen) über das Lysin 48 (K48) des Ubiquitins zur Degradation des Substrates über das 26S-Proteasom führen. Das 26S-Proteasom besteht aus einem "Core"-Enzym von 20S, das aus 28 Untereinheiten aufgebaut ist und zwei 19S-Kappen, die unter anderem Deubiquitinasen enthalten, die die entstandenen Polyubiquitinketten vor dem Eintritt des markierten Proteins in das Proteasom wieder spalten (Weissman, 2001; Orłowski & Wilk, 2003).

Ubiquitinierungen über das K63 dienen nicht dem proteasomalen Abbau, sondern sind unter anderem für DNA-Reparatur wichtig. In diesem Zusammenhang wird PCNA, induziert durch DNA-Schäden, über K63-Ubiquitinierungen mit Hilfe des E2s Rad6 polyubiquitiniert (Hoege et al., 2002). Inhibiert wird die Ubiquitinierung vermutlich durch eine Sumoylierung von PCNA an demselben Lysin (Hoege et al., 2002).

Monoubiquitinierungen an einem oder mehreren Lysinen eines Substratproteins werden mit Histon-Regulation, Endocytose und dem Knospen von Retroviren in Zusammenhang gebracht (Hicke, 2001).

Für die Histon-Regulation ist ein Modell bekannt geworden, das als „Histon-Code“ bezeichnet wird. Histone können an ihren C-terminalen Enden modifiziert werden, was Veränderungen der Chromatin-Struktur und der Gen-Expression bewirken kann (Näär et al., 2001; Berger, 2002; Bach & Ostendorff, 2003). Bekannte Modifikationen sind Phosphorylierungen, Methylierungen, Acetylierungen und Ubiquitinierungen. Man geht davon aus, dass posttranslational modifizierte Histone von anderen Histonen und weiteren Proteinen abgelesen werden können und es dadurch zu einer Aktivierung oder Inhibierung der Transkription kommen kann (Jenuwein et al., 2001). Darüber hinaus kann eine Modifikation eine weitere initiieren. Eine Ubiquitinierung von K123 des H2B beispielsweise hat eine Methylierung des H3 zur Folge, was eine Inhibierung der Expression bewirkt (Dover et al., 2002).

In *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass fast alle Plasmamembran-Proteine an ihren cytoplasmatischen Domänen ubiquitiniert werden, bevor sie internalisiert werden können (Rotin et al., 2000; Hicke 2001).

Das Protein Gag, das allen Retroviren gemein ist, wird von der E3 Nedd4 monoubiquitiniert. Diese Ubiquitinierung scheint notwendig zu sein, um ein

erfolgreiches Knospen der Viren von der Plasmamembran zu ermöglichen (Strack, et al., 2000).

Wie es E3s gelingt von Monoubiquitinierung (Ubiquitinierung eines Substrates) auf Polyubiquitinierung (Ubiquitinierung eines Ubiquitins) umzuschalten ist noch nicht genau bekannt, aber eine Gruppe von als E4 bezeichneten Proteinen scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Koegl et al., 1999). Für das Überleben von Zellen unter Stressbedingungen sind E4s von Bedeutung (Koegl et al., 1999). E3s scheinen nicht spezifisch nur bestimmte Lysine zu ubiquitinieren; es gibt diesbezüglich aber Ausnahmen (Pickart, 2001).

### **1.3. Problemstellung**

Aufgrund der Tatsache, dass LIM-HD-Transkriptionsfaktoren sowie deren aktivieren wirkende Kofaktoren CLIM1 und CLIM2 in Säugetieren mit jeweils zwei Proteinen sehr hoher Sequenzhomologie vertreten sind (Abb.1), lag es nahe auch für den reprimierend wirkenden Kofaktor RLIM nach einem Partnerprotein zu suchen. Eine Suche in der Datenbank (NCBI) ergab, dass RNF6 aufgrund seiner hohen Sequenzhomologie zu RLIM als RLIM-Homolog in Frage kam.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein RNF6 zu klonieren und zu überprüfen, ob es tatsächlich eine Rolle für die Regulation des LIM-Protein-Netzwerkes spielt und wenn ja, welche Aufgaben es übernimmt. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob RNF6 die RLIM ganz oder teilweise funktionell substituieren kann. Zunächst sollte zur Klärung dieser Frage herausgefunden werden, ob RNF6 Proteine des LIM-Systems binden kann. Es stellte sich die Frage, ob auch RNF6, wie RLIM, eine Ubiquitin-Ligase ist und wenn ja welche Substrate von RNF6 ubiquitiniert werden und ob diese Ubiquitinierungen einen Abbau der jeweiligen Substrate zur Folge haben können.

Desweiteren sollten Erkenntnisse über die Expressionsmuster von RNF6 auf RNA- und Proteinebene gewonnen werden. Um dieses Ziel verfolgen zu können, wurden Antikörper benötigt, die RNF6 spezifisch erkennen. Diese sollten, um spätere

Koexpressionsstudien zu ermöglichen, in zwei verschiedenen Spezies generiert werden.

## 2. MATERIALIEN

### 2.1. Bezugsquelle der verwendeten Substanzen

Alle verwendeten Chemikalien und molekularbiologischen Reagenzien, die für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente benutzt wurden, sind von den im Folgenden aufgeführten Firmen bezogen worden:

AppliChem, Darmstadt  
Amersham Pharmacia, Freiburg  
Beckton Dickinson & Company, Sparks (USA)  
Boehringer, Mannheim  
Clontech, Palo Alto (USA)  
Franke, Hamburg  
Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe  
Greiner, Nürtingen  
Invitrogen, Karlsruhe  
MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot  
Merck, Darmstadt  
Quiagen, Hilden  
Roche, Mannheim  
Roth, Karlsruhe  
Schleicher & Schüll, Dassel  
Sigma Aldrich Chemicals GmbH, Schnelldorf  
Stratagene, La Jolla (USA)  
Whatman, Maidstone (USA)

Spezielle Chemikalien und Hilfsmittel, die von anderen Firmen bezogen wurden, sind im Folgenden aufgeführt:

Filme:

Biomax MR und X-Omat Blue XB-1

Eastman Kodak Company,  
USA

Hyperfilm™ ECL	Amersham-Pharmacia, GB
L- <sup>35</sup> S-Methionin	Amersham-Pharmacia, GB
Milchpulver (fettfrei)	Albertsons, USA
Nickel-NTA-Agarose	Quiagen, Hilden
α- <sup>32</sup> P-dCTP	Amersham-Pharmacia, GB
γ - <sup>32</sup> P - dATP	Amersham-Pharmacia, GB
Zellkulturschalen und Pipetten	Renner GmbH, Dannstadt

## 2.2. Liste der gebräuchlichen Medien und Lösungen

6x DNA-Sucrose-Ladepuffer	40% Sucrose 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylen-Cyanolblau
2x Laemmli Stop Puffer	62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8 2% SDS 10% Glycerol 100 mM DTT 0,001% Bromphenolblau
3x Laemmli Puffer	360 mM Tris-HCl; pH 6,8 6% SDS 30% Glycerol 5% β-Mercaptoethanol 0,05% Bromphenolblau
LB-Agar	LB-Medium 15 g/l Agar
LB(Luria-Bertani)-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefeextrakt 0,5% NaCl

PBS	0,14 M NaCl 2,7 mM KCl 3,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST	PBS 1 ml/l Tween
PBT	PBS 0,1% Triton X-100
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl; pH 8,3 190 mM Glycin 0,1% SDS
20x SSC Puffer	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0
TBE Puffer	90 mM Tris-HCl 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA; pH 8,3
TE Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA; pH 8,0
Western-Blot Transfer-Puffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 20% Methanol 0.01% SDS

### 2.3. Bakterienstämme

Klonierungsexperimente wurden mit den *Escherichia coli*-Stämmen (*E. coli*) DH5 $\alpha$ : F-*gyrA96*(Nal<sup>r</sup>) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *glnV44 deoR*  $\Delta$  (*lacZYA-argF*) U169 [ $\Phi$  80d  $\Delta$ (*lacZ*)M15] (Fermentas Life Sciences) (Woodcock et al., 1989) und DH5 $\alpha$ IQ+ (erhalten von M.G. Rosenfeld) durchgeführt.

Zur Expression von Proteinen wurden die Bakterienstämme BL21 (DE3): *hsdS<sub>B</sub>* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dcm* ( $\lambda$  *cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1*) (New England Biolabs) (Studier und Mofatt, 1986) und BL21 Codon Plus (DE3)-RIL strain<sup>a</sup>: BF<sup>-</sup>*ompT hsdS* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm* + Tet<sup>r</sup> *gal* $\lambda$  (DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>*] (Stratagene) verwendet. Der BL21 Codon Plus-Stamm verfügt über zusätzliche tRNA-Gene, deren Genprodukte die Codons AGA und AGG für Arginin, das Codon CUA für Leucin und das Codon AUA für Isoleucin erkennen. Damit ist dieser Bakterienstamm besonders geeignet für die Expression AT-reicher eukaryotischer Gene.

### 2.4. Zelllinien

HEK293T-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen; SV Antigen fehlt (Pierce, Rockford, USA)
CHO-K1-Zellen	Chinese Hamster Ovary-Zellen
COS7-Zellen	African Green Monkey-Zellen

### 2.5. Vektoren

C-terminal p3xFlag-CMV-14	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV Promotor, in welchem ein 3-facher Flag-Epitop an das zu exprimierende Protein gehängt wird
---------------------------	---

pBluescript KS+/SK-	Klonierungsvektor (Stratagene) abgeleitet von pUC19, induzierbarer lac-Promotor (ermöglicht Blau-/Weißselektion) T3 und T7 RNA-Promotoren
pCDNA3	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor (Invitrogen)
pCR2.1TOPO-TA	Klonierungsvektor (Invitrogen) mit T7-Promotor, Blau-/Weißselektion möglich
pCS2MT	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor, in welchem N-terminal ein 6x-myc-Epitop an das zu exprimierende Protein gehängt wird (im Labor vorhanden, erhalten von C. Kintner)
pET22b	bakterieller Expressionsvektor mit T7 Promotor, in welchem C-terminal 6 Histidinreste an das zu exprimierende Protein gehängt werden (His-Tag)
pGEX-KGK	bakterieller Expressionsvektor mit tac-Promotor, in welchem C-terminal Glutathion-S-Transferase (GST) als Fusionsprotein an das einklonierte Protein gehängt wird (im Labor vorhanden, erhalten von M.G. Rosenfeld)

## 2.6. Antikörper

### 2.6.1. primäre Antikörper und Phalloidin

anti-RNF6 (Kaninchen)	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen; dieser Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt (siehe Methoden und Ergebnisse); im Western-Blot und sowohl in immuncyto- als auch in immunhistochemischen Experimenten wurde er 1 : 200 - 1 : 500 verdünnt eingesetzt
anti-RNF6 (Meerschweinchen)	polyklonaler Antikörper aus Meerschweinchen; dieser Antikörper wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit entwickelt (siehe Methoden und Ergebnisse); im Western-Blot wurde er 1 : 1000 verdünnt und sowohl in immuncyto- als auch in immunhistochemischen Experimenten wurde er 1 : 500 - 1 : 1000 verdünnt eingesetzt
anti-CLIM	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen; im Western-Blot 1 : 3000 und in immunhistochemischen Experimenten 1 : 5000 (Maus-Gewebe), bzw. 1 : 10000 (Hühner-Gewebe) eingesetzt (Ostendorff, 2002)
anti-RLIM	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen; im Western-Blot 1 : 3000 verdünnt und in immunhistochemischen Experimenten 1 : 5000 (Maus-Gewebe), bzw. 1 : 10000 verdünnt (Hühner-Gewebe) eingesetzt (Ostendorff, 2002)

anti-RLIM	polyklonaler Antikörper aus Meerschweinchen; im Western-Blot und in immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 verdünnt eingesetzt
anti-c-myc	Kaninchen IgG; Santa Cruz (sc-789); sowohl im Western-Blot als auch in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 verdünnt eingesetzt
anti-HA.11	monoklonaler Antikörper aus Maus; IgG; BAbCO; im Western-Blot 1 : 1000 verdünnt eingesetzt
anti-LIMK	monoklonaler Antikörper aus Ratte; erhalten von O. Bernard; sowohl in Western-Blots als auch in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 500 verdünnt eingesetzt
anti-LIMK	monoklonaler Antikörper aus Maus; Transduction Laboratories; sowohl in Western-Blots als auch in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 verdünnt eingesetzt
anti-Flag M2	monoklonaler Antikörper aus Maus; Sigma; in Western-Blots 1 : 1000 verdünnt eingesetzt
anti-Aktin	monoklonaler Antikörper aus Maus; Sigma; in Western-Blots 1 : 1000 verdünnt eingesetzt
anti-Ubiquitin	monoklonaler Antikörper aus Maus; Sigma; in Western-Blots 1 : 1000 eingesetzt

Phalloidin zum Färben von Aktin; Toxin aus dem grünen Knollenblätterpilz

### 2.6.2. sekundäre Antikörper und Protein A

HRP-anti-Maus polyklonaler Antikörper aus Ziege; Bio-Rad; in Western-Blots 1 : 3000 - 1 : 5000 verdünnt eingesetzt

Cy3-anti-Kaninchen IgG aus Ziege; Jackson Laboratories; in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 verdünnt eingesetzt

Cy3-anti-Meerschweinchen IgG aus Ziege; Vector Alexis; in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 verdünnt eingesetzt

Cy3-anti-Maus IgG aus Ziege; Dianova; in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 verdünnt eingesetzt

Alexa Fluor 546-anti-Ratte IgG aus Ziege; Molecular Probes; in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 verdünnt eingesetzt

Alexa Fluor 546-anti-Kaninchen IgG aus Ziege; Molecular Probes; in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 verdünnt eingesetzt

Alexa 488-anti-Kaninchen IgG aus Ziege; MoBiTec; in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 verdünnt eingesetzt

Alexa 488-anti-Meerschweinchen	IgG aus Ziege; Vector Alexis; in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 verdünnt eingesetzt
biotinyliert anti-Kaninchen	IgG aus Ziege; Vector Alexis; in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 - 1 : 3000 verdünnt eingesetzt
biotinyliert anti-Meerschweinchen	IgG aus Ziege; Vector Alexis; in immuncyto- und immunhistochemischen Experimenten 1 : 1000 - 1 : 3000 verdünnt eingesetzt
HRP-Protein A	42 kDa Polypeptid aus der Zellwand von <i>Staphylococcus aureus</i> ; bindet an den F <sub>C</sub> -Teil der primären Antikörper und ist mit HRP konjugiert; Bio-Rad; in Western-Blots 1 : 3000 - 1 : 5000 verdünnt eingesetzt

## 2.7. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide findet sich im Anhang dieser Arbeit.

## 3. METHODEN

### 3.1. Arbeiten mit DNA und RNA

#### 3.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Mini-Präparation)

2 ml antibiotikahaltiges LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen 2 min bei 14.000 Upm sedimentiert. Die Zellen wurden danach in 200µl Lösung 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 200 µl Lösung 2 (200 mM NaOH; 1% SDS) dazugegeben und vermischt. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 3 (2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1) wurde abermals gemischt. In diesem Schritt werden Proteine und SDS gefällt. Um diese zu eliminieren wurde 10 min bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 1 Vol Isopropanol versetzt. Um die Plasmid-DNA zu sedimentieren wurde 10 - 20 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 200 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach Abkippen des Ethanols wurde die DNA trocknen gelassen, anschließend in 30 - 50 µl TE oder derselben Menge ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C gelagert.

#### 3.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Maxi-Präparation)

Um eine größere Menge Plasmid-DNA herzustellen wurden zunächst 2 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von dieser Vorkultur wurden ca. 100 µl verwendet, um 150 ml antibiotikahaltiges LB-Medium zu inokulieren. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit einem Kit der Firma Machery-Nagel (Plasmid Purification Nucleobond AX PC500) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend in TE oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### 3.1.3. Bestimmung von DNA-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen wurden photometrisch durch Messen der optischen Dichte (OD) bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht etwa 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA. Die DNA-Lösung wurde 1 : 100 verdünnt und anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Photometer bestimmt. Die Konzentration wurde errechnet, indem die  $OD_{260}$  mit 0,05 multipliziert wurde. Das Produkt entspricht der DNA-Konzentration in  $\text{mg/ml}$ .

### 3.1.4. Herstellung kompetenter Bakterien

Es wurde eine Ausstrichkultur eines *E. coli*-Stammes der Wahl (siehe Kap.3.3.) aus einer Glycerolkultur auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie wurden ca. 3 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am Folgenden Tag wurden 150 ml LB-Medium, das 10 mM  $\text{CaCl}_2$  enthielt, mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft. Die Bakterienkultur wurde solange bei 37°C geschüttelt, bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten, was bei einer  $OD_{600}$  von 0,4 - 0,5 der Fall ist. Die Suspension wurde dann bei 4°C und 5000 Upm 5 min zentrifugiert (Zentrifuge J2-21 M/E Rotor JA10 oder JA 14, Beckmann). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment in 50 ml eiskaltem 100mM  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert und 30 min unter gelegentlichem Rühren auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 5 - 10 min bei 2000 Upm zentrifugiert (Minifuge RF, Haereus). Das Sediment wurde in 10 ml eiskaltem 100 mM  $\text{CaCl}_2$  mit 15% Glycerin resuspendiert und über Nacht im 4°C-Raum auf Eis inkubiert, anschließend aliquotiert, auf Trockeneis gefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.1.5. Transformation von Bakterien mit DNA

50  $\mu\text{l}$  - 100  $\mu\text{l}$  der bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit bis zu 0,5  $\mu\text{g}$  DNA oder bis zu 20  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz versetzt. Die Zellen wurden im Folgenden 30 min auf Eis inkubiert und danach in einem Wasserbad bei 42°C für 45 - 60 sec (bei 50  $\mu\text{l}$ , bzw. 100  $\mu\text{l}$  eingesetzten kompetenten Zellen) einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend wurde der Transformationsansatz nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 350  $\mu\text{l}$  antibiotikafreiem LB-Medium

wurden die Zellen 45 min bei 37°C geschüttelt, um ihnen die Gelegenheit zur Expression der für die Antibiotikaresistenz zuständigen Proteine zu geben. Nach Ablauf der 45 min wurden die Zellen auf zwei antibiotikahaltigen Platten (100 µl des Ansatzes und der Rest) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.1.6. Restriktionsverdau**

Restriktionsverdau wurden, je nach Menge der zu verdauenden DNA, in einem Volumen von 20 µl - 50 µl durchgeführt. Jedem Ansatz wurde der vom Hersteller für das jeweilige Enzym empfohlene Puffer zugefügt. Die DNA wurde mit 1-2 U Enzym/µg DNA verdaut. Ein Unit Enzym verdaut 1 µg DNA pro Stunde. Die Fragmentierung erfolgte in einem Wasserbad bei 37°C in einem Zeitraum von 1 h - über Nacht.

### **3.1.7. Elektrophorese in Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA ist aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandert daher im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare. Je höher die gewählte Agarosekonzentration, desto geringer ist die Porengröße und damit die Wanderungsgeschwindigkeit. Kleinere DNA-Fragmente werden daher bei höheren Agarosekonzentrationen aufgetrennt. Ich habe in meiner Arbeit, wenn nicht anders angegeben, 1%-ige Agarosegele verwendet (1g Agarose pro 100 ml TBE-Puffer wurden durch Aufkochen in einem Mikrowellenofen gelöst). Nach einer kurzen Abkühlphase wurde die noch flüssige Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Dieses Gemisch wurde in den Gelträger einer horizontalen Gelkammer gegossen. Das erhärtete Gel wurde mit TBE-Puffer überschichtet. Den Proben wurde jeweils 20% Ladepuffer zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei etwa 5 V/cm.

Unter UV-Licht wurden die durch interkaliertes Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden photographisch dokumentiert (UV-Gel Dokumentationssystem von Herolab, Wiesloch).

### 3.1.8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierende DNA-Bande wurde unter langwelligem UV-Licht mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Gelfragmente wurden dann mit Hilfe des DNA-Gel-Extraktions-Kits der Firma Genomics durch einen Zentrifugationsschritt nach Angaben des Herstellers über eine Säule gereinigt.

### 3.1.9. Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren

Es wurden lineare, aufgereinigte Vektor-DNA und lineare, aufgereinigte DNA-Fragmente eingesetzt. Um eine Religation der Vektoren zu vermeiden wurden die Vektoren mit zwei verschiedenen Enzymen linearisiert. Die Ligation wurde durch die T4-DNA-Ligase (Roche) katalysiert. Dazu wurden ca. 50 ng Vektor mit einem drei-fünffachen molaren Überschuss des zu ligierenden Fragmentes mit 2 µl 10x T4 Ligase Puffer und 1 µl T4 Ligase in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei 16°C ligiert. Teilweise wurde die Reaktion auch 3 - 5 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden 5 - 20 µl des Ansatzes in kompetente DH5α-Zellen oder DH5αIQ<sup>+</sup>-Zellen transformiert (siehe Kap.3.3. und Kap.4.1.5.).

### 3.1.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen, die zwischen zwei Regionen bekannter Sequenz liegen. Diese Methode wurde ursprünglich von Saiki et al. (1988) beschrieben. Es werden DNA-Polymerasen aus hitzestabilen Organismen, wie z.B. *Thermus aquaticus*, verwendet, die ein automatisiertes Verfahren zulassen.

In einer zyklischen Abfolge werden hier doppelsträngige DNA-Fragmente (Template-DNA) denaturiert und an den entstehenden komplementären DNA-Einzelsträngen zwei Oligonukleotidprimer, die die zu amplifizierende Ziel-DNA Region flankieren, hybridisiert und das dazwischenliegende Fragment, ausgehend von den Oligonukleotidprimern, synthetisiert. Die zyklische Wiederholung dieser Schritte führt zu einer exponentiellen Anreicherung der Ziel-DNA.

Im Allgemeinen enthielt ein 50 µl Ansatz 1 - 20 ng Plasmid-DNA oder 0,2 - 2 µg genomische DNA, 5 µl 10 x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl;

0,8% NP-40), 2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, ca. 500 ng jedes Primers, 5 µl 2 mM dNTP-Mix sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Gibco-BRL) und wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Zur Durchführung der Reaktion wurde ein PTC-2000 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) benutzt. Der Ansatz wurde, wenn nicht anders angegeben, 30 sec auf 94°C erhitzt und hat anschließend 30x den Folgenden Zyklus durchlaufen:

Denaturierung:	94°C	30 sec
Annealing:	(je nach verwendeten Primern)	30 sec
Elongation:	72°C	1,5 – 2 min (je nach Länge Des Ziel-Fragmentes)

Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei 72°C inkubiert, um die Synthese der gerade synthetisiert werdenden Stränge abzuschließen und auf 4°C gekühlt.

### 3.1.11. Klonierung von PCR-Fragmenten

Amplifizierte PCR-Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend, wie in Kap. 4.1.8. beschrieben, isoliert. Die PCR-Primer wurden so entwickelt, dass sie endständige Schnittstellen für Restriktionsenzyme hatten. Die PCR-Produkte konnten so nach Verdau mit den entsprechenden Enzymen (siehe auch Kap.4.1.6.) erneut über Gelelektrophorese und Isolation aus dem Gel aufgereinigt und anschließend in eine Ligation mit einem Vektor, der mit denselben Enzymen behandelt worden war, eingesetzt werden. Da Enzyme lineare DNA-Fragmente mit endständigen Restriktionsstellen häufig nicht effizient schneiden, habe ich alternativ das TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen verwendet (nach Angaben des Herstellers). Hier kloniert man das PCR-Fragment in den pCR2.1-TOPO-Vektor zwischen, um im Folgenden eine leichtere Restriktion zu erreichen. Die Taq-Polymerase hängt einzelne Desoxyadenosinreste an die 3'Enden von PCR-Produkten. Der linearisierte pCR2.1-TOPO-Vektor hat einzelne überhängende Thymidinreste, die eine effiziente Ligation der PCR-Produkte mit dem Vektor erlauben und gleichzeitig die Gefahr einer Religation des Vektors verringern. Nach anschließender Transformation, der Herstellung von Mini-Präparationen sowie deren Analyse kann der TOPO-Vektor verdaut und das Fragment in ein Plasmid der Wahl kloniert werden.

### 3.1.12. Zielgerichtete Mutagenese

Um zielgerichtete Mutagenesen einer Protein-codierenden DNA-Sequenz zu erreichen, wurde mit dem Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene gearbeitet. Hierbei werden 20 - 40 ng Template DNA, 5µl 10x Reaktionspuffer, 125 ng der beiden Primer, die zentral die gewünschte Mutation enthalten, 1 µl 10 mM dNTPs und 2,5 U Pfu Turbo DNA-Polymerase vermischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein totales Volumen von 50 µl gebracht. Mit dem gesamten Ansatz wurde anschließend in einem Thermocycler folgendes Programm durchgeführt: 1 min 95°C, 20x (1 min 95°C, 1 min 55°C, 14 min 68°C), 10 min 4°C. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes wurde dieser mit 1 U *DpnI* versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. *DpnI* verdaut die methylierte, nicht mutierte DNA, nicht aber die neu entstandene, nicht methylierte DNA. Der Ansatz wurde danach transformiert, Mini-Präparationen wurden angefertigt und mittels Sequenzierung wurde überprüft, ob die Mutagenese erfolgreich war.

### 3.1.13. Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden im ZMNH von der von Dr. Kullman und Frau Däumigen geführten Sequenzier-Servicegruppe durchgeführt. Ich habe jeweils Ansätze, die ca. 0,6 - 0,75 µg DNA und 15 pmol Primer enthielten und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 8 µl gebracht worden waren, abgegeben.

### 3.1.14. Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden

Ich habe Digoxigenin (DIG)-markierte *antisense*-Sonden gegen mRNA von Rnf12 und Rnf6 mittels *in vitro*-Transkription hergestellt. Zudem wurde eine Rnf6-*sense*-Sonde als Negativkontrolle generiert. Hierbei wird während einer *in vitro*-Transkription ein mit dem Digoxigenin-Steroid markiertes UTP in die RNA eingebaut. DIG wird aus *Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata* gewonnen (Ibelgauf, 1990). Es wurde das DIG RNA Labeling Kit von Boehringer Mannheim nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Template-DNA wurde zunächst vollständig linearisiert, d.h. der Restriktionsverdau wurde mindestens 3 h, meist aber über Nacht durchgeführt und auf einem Agarosegel wurde er auf seine Vollständigkeit hin überprüft. Zur Herstellung der Rnf12-Sonde wurde das

Bluescript/Rnf12-Plasmid (Bach et al., 1999) mit *NsiI* linearisiert und als Template für eine T3-gesteuerte RNA-Synthese benutzt. Eine 545 Nukleotide lange *antisense*-Sonde konnte hergestellt werden. Sonden gegen Rnf6 wurden synthetisiert, indem das Plasmid pcDNA3/Rnf6 mit dem Restriktionsenzym PpuMI linearisiert wurde. Mit T3-Polymerase konnte dann eine *antisense*-Sonde und mit T7 Polymerase eine *sense*-Sonde gegen Rnf6 synthetisiert werden. Die *in vitro*-Transkription erfolgte wie von Boehringer Mannheim empfohlen. Die Reaktion wurde mit 2 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Der Ansatz wurde auf Eis gestellt und 2,5 µl LiCl (in DEPC-H<sub>2</sub>O) und 75 µl Ethanol zugefügt. Nach Fällung der RNA über Nacht bei -80°C wurde diese bei 4°C 15 min mit 14.000 Upm sedimentiert. Das Sediment wurde nach vorsichtigem Waschen mit 70%-igem Ethanol in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Es sollten mindestens 10x soviel RNA wie DNA in der Suspension enthalten sein. Um das zu testen, wurde ein Aliquot von 3 µl über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Sonden wurden aliquotiert, bei -80°C gelagert und im Folgenden für *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt.

### 3.1.15. Markierung von DNA-Molekülen durch „Random-Primer“

Diese Methode erzeugt markierte DNA mit besonders hoher spezifischer Aktivität. 20 - 40 ng DNA wurden mit sterilem H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 22 µl gebracht und durch 4-minütiges Kochen denaturiert. Schnelles Abkühlen auf 0°C verhinderte ein Rehybridisieren der Einzelstränge. Der Lösung wurden anschließend je 2 µl 0,5 mM dATP, dGTP und dTTP, 15 µl Random Primer Puffer (enthält einen Mix aus degenerierten Primern), 5 µl α-<sup>32</sup>P-dCTP, sowie 1 µl (3 U) Klenow-Enzym zugefügt. Die degenerierten Hexamer Primer binden an die denaturierte DNA, was der Klenow-Polymerase ermöglicht den Rest aufzufüllen. Es wurde das Random Primer Labelling Kit (Gibco-BRL) benutzt. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über eine „Spin-Column“ gereinigt (mini Quick Spin Columns, Boehringer Mannheim). Diese Sephadex-Gel-Filtrations-Säule, die nicht inkorporierte freie Nukleotide von der markierten doppelsträngigen DNA trennt, wurde nach Herstellerinstruktionen verwendet. Der Erfolg des Einbaus radioaktiven dCTPs in die gereinigte DNA wurde anschließend mit Hilfe eines Scintillationsmessers gemessen. Es wurden nur Sonden mit mindestens 800.000 cpm eingesetzt.

Ich habe Sonden für die Detektion von Rnf6-, Rnf12-, Clim1-, Clim2- und  $\beta$ -Aktin-mRNA hergestellt. Die Rnf6-Sonde wurde hergestellt, indem das pCS2MT/Rnf6-Plasmid mit *NcoI* und *NsiI* verdaut wurde. Das 475 bp lange entstehende Fragment wurde über ein Agarosegel gereinigt und als DNA-Template in der oben aufgeführten Reaktion verwendet. Für die Rnf12-Sonde wurde ein mit *SacI* aus pBKS/Rnf12 geschnittenes 600 bp langes, gereinigtes Fragment benutzt. Für die Clim-Sonden wurde ein Bereich aus der 3'UTR-Region verwendet, da die kodierenden Bereiche beider Gene zu ähnlich sind, um sicherzugehen, dass nur eines der Gene von der Sonde erkannt wird. Es wurden 500bp lange Bereiche der 3'-UTR-Region aus Maus in pCR2.1-TOPO-TA kloniert. Die Plasmide wurden mit *EcoRI* verdaut, aus dem Gel eluiert und gereinigt und anschließend als DNA-Template verwendet. Für die  $\beta$ -Aktin-Sonde wurde humane  $\beta$ -Aktin-DNA verwendet, die als Kontrolle mit den Blot-Membranen (siehe Kap.4.1.16.) mitgeliefert worden war.

### 3.1.16. Northern-Blot-Analyse

Es wurden 2 Northern-Blot-Membranen der Firma Clontech verwendet. Auf dem Mouse Embryo MTN-Blot war mRNA von Mäuse-Embryonen der Embryonalstage 7, 11, 15 und 17 (E7, E11, E15 und E17) immobilisiert worden, während auf dem Mouse MTN-Blot mRNA verschiedener adulter Mausgewebe (Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden) immobilisiert worden war.

Um unnötige Hintergrundreaktionen zu vermeiden, wurden die Membranen nach dem Überführen in Glasröhrchen 30 min bei 68°C mit ExpressHyb (Clontech) in einem Hybridisierungs-ofen unter ständiger Rotation vorinkubiert. Die gesamte Sonde (siehe Kap. 4.1.15.) wurde 5 min bei 95°C denaturiert und in 25 ml ExpressHyb aufgenommen. Nach Abgießen der zum Vorinkubieren benutzten ExpressHyb-Lösung, wurde dieses Gemisch auf die Blots gegeben und diese 1 h unter ständiger Rotation bei 68°C hybridisiert. Nach Abkippen der Sonde wurden die Membranen mehrmals in Waschpuffer 1 (2x SSC; 0,05% SDS) gewaschen. Anschließend wurde 40 min mit Waschpuffer 2 (0,1% SSC; 0,1% SDS) gewaschen. Die Membranen wurden danach in Frischhaltefolie eingeschlagen, in eine Filmkassette gelegt und ein Kodak Biomax Film wurde über Nacht bei -80°C exponiert. Falls ein starkes Hintergrundsignal zu sehen war, wurde die Membran anschließend abermals in Waschpuffer 2 gewaschen und erneut exponiert. Bei Auftreten eines zu schwachen Signals wurde ein neuer Film entsprechend länger exponiert.

Bevor eine weitere Sonde mit der mRNA auf den Blot-Membranen hybridisiert wurde, wurden die alte Sonde von den Blots gewaschen. Der "Strippuffer" (0,5% SDS) wurde auf 100°C erhitzt und auf die Membranen gegeben. Nach ca. 2 min war die benutzte Sonde abgewaschen. Um sicherzugehen, dass die gesamte Sonde abgewaschen worden war, wurde ein Film für 3 Tage bei -80°C exponiert. Wenn kein Signal mehr zu sehen war, wurde die Membran mit einer neuen Sonde hybridisiert oder zunächst in Cellophan-Folie bei -20°C gelagert.

## **3.2. Proteinbiochemische Arbeiten**

### **3.2.1. Expression von Proteinen in Bakterien**

Proteine wurden in den *Escherichia coli*-Stämmen BL21 (DE3) und BL21 Codon Plus (DE3) RIL exprimiert (Kap.3.3.). Es wurden die Vektoren pET22b (6x Histidin-Fusionsproteine/His-Tag) und pGEX-KGK (Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine) verwendet. Die Zellen wurden mit den gewünschten Expressionskonstrukten transformiert, auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine 5 ml Vorkultur aus einem gewachsenen Klon in antibiotikahaltigem LB-Medium gezogen. 2 ml der Vorkultur wurden in 200 ml frisches antibiotikahaltiges Medium gegeben und die Bakterien wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 (mittlere logarithmische Wachstumsphase) schüttelnd bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten Wachstumsphase wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Die Suspension wurde weitere 5 - 8 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Bei der Expression längerer Proteine (RLIM und RNF6) wurden die Kulturen alternativ 5 h - über Nacht bei 20°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei 4°C und 9500 Upm zentrifugiert (Zentrifuge J2-21M/E, JA-10 Rotor, Beckmann). Im Folgenden wurde verfahren wie in Kap. 4.2.1.1. und Kap. 4.2.1.2. beschrieben.

### 3.2.1.1. Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen

Um die Proteine mit His-Tag (6 C-terminal angehängte Histidine, die in diesem Vektor an das gewünschte Protein fusioniert werden) aus dem gesamten Bakterienlysat aufzureinigen, wurde  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose-beads verwendet (Quiagen). Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

Die -wie in Kap. 4.2.1. beschrieben- erhaltenen Bakteriensedimente wurden in kaltem PBS resuspendiert, in Falkongefäße überführt und erneut zentrifugiert (4500 Upm, 10 min). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,9; 0,1 M KCl; 1% Triton X-100; 12,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Ultraschall lysiert (3 x 30 sec mit 60 Watt) und das Lysat anschließend durch Zentrifugation in einer Beckmann Zentrifuge (9500 Upm, 30 min, Rotor JA-20) von Zellresten gereinigt. Der Überstand enthält die Fraktion löslicher Proteine. Bei unlöslichen oder teilweise unlöslichen Proteinen wurde das Pellet in 8 M Harnstoff aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 9500 Upm wurde der Überstand als unlösliche Fraktion aufgehoben. Die Fraktion löslicher Proteine wurde mit der nach Angaben des Herstellers equilibrierten  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose 2 - 4 h unter ständiger Rotation inkubiert. Bei dem Auftreten eines starken Hintergrundes wurde dem Ansatz in diesem Schritt 10 mM Imidazol hinzugefügt. Die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose, die nun die His-Tag-Proteine gebunden hatte, wurde zweimal mit Waschpuffer (50 mM Tris, pH 7,9; 300 mM NaCl, 10% Glycerol; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin) gewaschen und anschließend wurden die rekombinanten Proteine mit 2 ml Elutionspuffer (Waschpuffer mit 500 mM Imidazol) von der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose eluiert.

Lösliche und unlösliche Fraktionen der Proteine, sowie Aliquots der Zwischenschritte wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

### 3.2.1.2. Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteine wurden mit Hilfe von Glutathion-Agarose (Sigma) aus dem Bakterienlysat gereinigt. Auch hier wurden alle Schritte

bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensedimente (siehe Kap. 4.2.1.) wurden in Lysispuffer (400 mM NaCl; 100 mM HEPES, pH 8,0; 10% Glycerol; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin) resuspendiert und in ein 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Die Proben wurden 3 x 30 sec mit 60 Watt beschallt und anschließend 30 min bei 9500 Upm in einer Beckmann Zentrifuge (Rotor JA-20) zentrifugiert. Zu dem Überstand wurden 750 µl Glutathion-Agarose (nach Angaben des Herstellers equilibriert) gegeben. Überstand und Glutathion-Agarose wurden 2 - 4 h unter ständiger Rotation inkubiert. Das durch die anschließende Zentrifugation (1000 Upm, 5 min, Haereus-Zentrifuge) erhaltene Sediment wurde 3x 5 - 10 min mit ca. 10 ml Lysispuffer gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde wie vorher zentrifugiert, der Lysispuffer dekantiert und neuer Lysispuffer zugegeben. Anschließend wurden die GST-Proteine mit dem Elutionspuffer (Lysispuffer mit 250 mM Glutathion) unter ständiger Rotation über Nacht von der Glutathion-Agarose eluiert.

Auch hier wurden die erhaltenen Fraktionen und gegebenenfalls Aliquots der Zwischenschritte mit Hilfe einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels analysiert.

### **3.2.2. Aufreinigung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen**

24 h nach einer Transfektion in HEK 293T-Zellen wurden Zellextrakte zur Gewinnung der Proteine hergestellt. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm verwendet. Die im Folgenden angegebenen Mengen beziehen sich auf Zellkulturschalen dieser Größe. Alle Schritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Nachdem das PBS vollständig abgesaugt worden war, wurden 900 µl Puffer A (10 mM Hepes, pH 7,9; 10 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 1 µg/µl Aprotinin; 1 µg/µl Leupeptin; 2 mM DTT) dazugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 45 µl 20%-igem NP-40 versetzt. Nach der Zugabe von 126 µl KCl wurden die Proben 15 min im Kühlraum rotiert. Nachdem die Zellextrakte 10 min bei 14000 Upm zentrifugiert worden waren, konnte man die aus Zellwänden und DNA bestehenden Sedimente entfernen. Dem die löslichen Proteine enthaltenden

Überstand wurden 105 µl Glycerol zugefügt und die Proben wurden bei -80°C gelagert.

### **3.2.3. Proteinbestimmung noch Bradford**

Die quantitative Bestimmung der aus den eukaryotischen Zellen gewonnenen Proteine erfolgte nach einer Methode von Bradford (1976). Es wurde Bradford-Reagenz (Roti-Quant) der Firma Roth verwendet. Je 200 µl Reagenz wurden mit 1 µl Zellextrakt versetzt und gemischt. Zusätzlich wurde eine Eichreihe aus 200 µl Bradford-Reagenz mit 1 - 10 µg BSA pipettiert. Beides wurde in eine Mikrotiter-Platte mit 96 Mulden pipettiert. Die Proteinkonzentration konnte nach einer Extinktionsmessung bei 595 nm mit Hilfe der erstellten Eichgerade berechnet werden.

### **3.2.4. Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970).

Das zugesetzte Natriumdodecylsulfat lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an die aufzutrennenden Proteine an. Es ist negativ geladen und bewirkt somit, dass nun alle Proteine zur Anode wandern. Da die Proteine zudem durch vorheriges 5-minütiges Aufkochen unter Zusatz von 3x Laemmli-Puffer denaturiert worden waren, wanderten sie entsprechend ihrer molaren Masse. Als Längenmarker wurden Proteine bekannter Masse aufgetragen (Benchmark Prestained Protein Ladder, Invitrogen).

Alle verwendeten Glasplatten wurden vor dem Versuch mit 70%-igem Ethanol gereinigt. Nach dem Zusammenbau der Apparatur wurde das Trenngel in die Gelkassette gegossen. Je nach gewünschtem Auftrennungsbereich wurden 10%-ige, 12,5%-ige oder 15%-ige Trenngele (375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 10%, 12,5% bzw. 15% Polyacrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5 : 1); 0,1% SDS; 0,1% APS und 0,01% TEMED) gegossen. Das Trenngel wurde mit 0,1% SDS überschichtet, um eine glatte, blasenfreie Oberfläche zu erhalten. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das 0,1%-ige SDS abgegossen und die Geloberfläche mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wurde das Trenngel mit einem 5%-igen Sammelgel (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5% Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5 : 1); 0,1% SDS;

0,1% APS und 0,02% TEMED) überschichtet. In das Sammelgel wurde ein Kamm mit der gewünschten Taschenzahl gesteckt, in welche nach Entfernen des Kammes die Proben pipettiert wurden. Das untere und das obere Pufferreservoir der Gelkammer wurden mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Beide Reservoirs stehen über das Gel miteinander in Verbindung. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 V/cm und wurde gestoppt, wenn die Ionenfront mit dem Bromphenolblau die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

Das Gel wurde zur Sichtbarmachung nichtradioaktiver Proteine entweder Coomassie gefärbt (siehe Kap.4.2.5.) oder auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und einer Western-Blot-Analyse unterzogen (siehe Kap.4.2.6. und Kap.4.2.7.) und zur Sichtbarmachung radioaktiver Proteine wurde das Gel getrocknet und in eine Filmkassette gelegt, in der ein Biomax-Film der Firma Kodak exponiert werden konnte.

### **3.2.5. Färbung von SDS-PAGE-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau**

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden in dem Gel durch 30 - 60-minütiges Schwenken bei RT in Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (0,2% Coomassie Brilliant Blue R-250; 50% Methanol; 7,5% Essigsäure) sichtbar gemacht. Zum Entfernen der Hintergrundfärbung wurde das Gel mit Entfärbelösung (50% Methanol; 10% Essigsäure) behandelt. Die Lösung wurde mehrfach gewechselt. Anschließend wurde das Gel auf 3 MM Whatman-Papier gelegt, mit Cellophanfolie bedeckt und in einem Vakuumtrockner bei 80°C 45 - 60 min getrocknet.

### **3.2.6. Elektrophoretischer Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)**

Durch einen Western-Blot werden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und immobilisiert. Wir verwenden im Labor die Technik des „Semi-Dry-Blottings“.

Es wurden zwei Lagen 3 MM Whatman-Papier in Transfer-Puffer (siehe Kap.2.2.) getränkt und auf die der Kathode zugewandten Seite der Blotapparatur gelegt. Darauf wurde das Gel und darüber die zuvor mit Transferpuffer benetzte Nitrocellulosemembran gelegt. Auf die Membran wurden abermals zwei Schichten

in Transferpuffer getränktes 3 MM Whatman-Papier gelegt. Nach Auflegen der Anodenplatte erfolgte der Transfer bei  $1 \text{ mA/cm}^2$  über 1 - 1,5 h.

Anschließend wurde die Membran kurz in Ponceaurot (Ponceau S, Applichem) geschwenkt, um zu überprüfen, ob der Transfer gleichmäßig erfolgt ist. Wenn das der Fall war, wurden die Proteine mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht (siehe Kap.4.2.7.). Die Ponceaurot-Färbung wurde durch mehrmaliges Schwenken in PBS entfernt.

### **3.2.7. Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen**

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurden die individuellen Proteine indirekt durch einen sekundären Antikörper nachgewiesen.

Mit einer Blockierungslösung (PBS; 3% fettfreies Milchpulver) wurde mindestens 30 min die freie Proteinbindungskapazität der Membran abgesättigt. Wie auch alle weiteren Schritte erfolgte das Blockieren bei Raumtemperatur unter konstantem Schwenken der Membran in der entsprechenden Lösung. Nach dem Blockieren wurde der gegen das gesuchte Protein gerichtete Antikörper (primärer Antikörper) in Blockierungslösung verdünnt (Verdünnung siehe Kap.3.6.1.) und die Membran mindestens 1 h 20 min darin geschwenkt. Falls verschiedene Proteine nachgewiesen werden sollten, wurden mehrere Antikörper gleichzeitig eingesetzt. Voraussetzung dafür ist, dass die Größe der nachzuweisenden Proteine bekannt ist, um sie später voneinander unterscheiden zu können. Um nicht gebundene, sowie nicht spezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde diese 3x in PBS-T (PBS; 0,1% Tween-20) (1 min, 5 min, 10 min) und anschließend 3x in PBS (1 min, 5 min, 10 min) gewaschen. Im Folgenden wurde die Membran mindestens 20 min mit Blockierungslösung, die den sekundären Antikörper (Verdünnung siehe Kap.3.6.2.) enthält behandelt. Die sekundären Antikörper sind an Meerrettichperoxidase gekoppelt und erkennen den  $F_c$ -Teil der primären Antikörper. Teilweise wurde auch Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Protein A (siehe sekundäre Antikörper) eingesetzt. Auch hier wurden bei Bedarf mehrere sekundäre Antikörper gemischt eingesetzt. Die oben beschriebenen Waschschritte (3x PBS, 3x PBS-T) wurden wiederholt. Die Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte mit dem ECL-Reagenz (Enhanced Chemiluminescence) der Firma Amersham-Pharmacia. Die Membran wurde 1 min in der nach Angaben des Herstellers angesetzten ECL-Lösung inkubiert, in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine

Filmkassette gelegt. Es wurde ein Hyperfilm ECL aufgelegt und nach 30 sec - 1 h entwickelt. Zur Größenbestimmung diente ein vorgefärbter Proteingrößenmarker.

### 3.2.8. GST-Interaktionsexperimente

Um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, wurden GST-Interaktionsexperimente durchgeführt. Die GST-Proteine (Kap.4.2.1.2.) wurden zu diesem Zweck nicht von der Glutathion-Agarose eluiert. Zuerst wurden die GST-Proteine mit PPI-Puffer (20 mM HEPES, pH 7,9; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0,02% NP-40; 10% Glycerol) äquilibriert, mit 1 mg/ml BSA versetzt und als 50% GST-Protein-Agarose / 50% PPI-Puffer-Mix aufgenommen. Für die Negativkontrolle (GST allein) wurde GST-Peptid mit Glutathion-Agarose-Mix auf 50 µl Volumen gebracht. Die Protein-Mengen wurden vorher mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten Gels angeglichen.

Im Interaktionsexperiment wurden 50 µl GST-Protein-Mix (bzw. GST-Peptid) mit 5 µl TNT-Protein und 5 µl PPI-Puffer vermischt. Die Proteine wurden 20 min bei 37°C unter ständiger Bewegung inkubiert, um ihnen die Gelegenheit zum Binden zu geben. Anschließend wurde 3x 10 min mit 500 µl PPI-Puffer bei 37°C gewaschen. Nach dem Abpipettieren des überschüssigen PPI-Puffers wurde den Proben 10 µl 3x Laemmli-Puffer zugefügt, 5 min gekocht und der gesamte Ansatz über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurde noch eine "Input"-Spur mit 0,5 µl TNT-Protein geladen. Um sicherzugehen, dass vergleichbare Mengen der verschiedenen GST-Proteine geladen worden waren, wurde das SDS-Gel kurz mit Coomassie gefärbt, bevor ein Film (Biomax-MR) aufgelegt wurde.

### 3.2.9. Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen *in vitro*

Ich habe das TNT-*in vitro*-Translations-Kit von Promega verwendet, um radioaktiv markierte Proteine *in vitro* herzustellen. In diesem Versuch werden Transkription und Translation gekoppelt. Die Translation wurde entweder in RRL (rabbit reticulocyte lysate) oder in WG (wheat germ extract) durchgeführt. Es wurden jeweils 25 µl RRL bzw. WG, 1 µg Plasmid-DNA, 1 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin, 2 µl L-[<sup>35</sup>S] Methionin, 2 µl Puffer, 1 µl Polymerase (T7 oder SP6, je nach Vektor, der die zu translatierende DNA enthält), sowie 18 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt

und der Ansatz wurde 90 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Ein Aliquot von 2 µl der fertigen Proben wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt, getrocknet und ein Film (Biomax-MR oder X-Omat Blue XB-1) wurde exponiert. Anhand eines Proteinlängenstandards konnte überprüft werden, ob Protein der erwarteten Größe hergestellt worden war.

### 3.2.10. *In Vitro*-Ubiquitinierungen

Für RNF6- oder RLIM-abhängige *in vitro* Ubiquitinierungen wurden als Substrat 2 - 5 µl <sup>35</sup>S- markiertes TNT-Protein (Kap.3.2.9.) in Gegenwart von 50 ng E1, 50 ng bakteriell exprimiertem E2 (UbcH5, UbcH6, UbcH7 oder UbcH8), 6 µg Ubiquitin (Sigma), 2 mM DTT, 4 mM ATP, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl und 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit GST-RLIM oder GST-RNF6 (Kap.3.2.1.2.) 2 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 50 µl 2x Laemmli gestoppt, 5 min gekocht und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden 30 min in 40% Methanol mit 10% Essigsäure fixiert und anschließend 15 min in Amplify Lösung (Amersham) inkubiert. Nachdem die Gele getrocknet worden waren, wurde über Nacht ein Kodak Biomax Film aufgelegt.

Autoubiquitinierungen wurden entweder mit <sup>35</sup>S-RLIM/RNF6 durchgeführt (ohne GST-E3-Proteine), oder es wurde GST-RLIM/RNF6 verwendet und in einem Western-Blot mit gegen RLIM, RNF6 oder Ubiquitin gerichteten Antikörpern eine Ubiquitinierung nachgewiesen.

### 3.2.11. Herstellung polyklonaler Antikörper

Es wurden spezifisch RNF6 erkennende polyklonale Antikörper hergestellt. Hierzu wurde der Mittelteil des murinen RNF6-Proteins verwendet, der sich von RLIM am stärksten unterscheidet. Es wurden die Primer anti-M-Rnf6-5' Bam und anti-M-Rnf6-3' Xho verwendet, die im Anhang näher beschrieben sind. Das bei einer PCR mit diesen Primern entstehende Rnf6-Fragment ist 143 Aminosäuren lang und umfasst den Teil, der für die Aminosäuren 220 bis 363 codiert. Dieses Fragment wurde in dem pCR2.1.-TOPO-TA-Vektor zwischenkloniert und dann über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in den Vektor pET22b kloniert. pET22b hängt 6 Histidinreste an das zu exprimierende Fragment von Rnf6. Über diese Histidine kann das bakteriell exprimierte Protein aufgereinigt werden (Kap.4.2.1. und Kap.4.2.1.1.). Die

Proteinmenge wurde auf einem SDS-Gel anhand einer BSA-Eichreihe ermittelt. Da die erzielte Proteinkonzentration sehr gering war, wurden sehr große Mengen der Protein-Präparationen angefertigt und diese dann über eine 12,5%-ige SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde in 250 mM eiskaltem KCl geschwenkt, bis die Proteine als milchig-weiße Banden sichtbar wurden. Anhand des Proteinlängenstandards konnte die Bande, die die Proteine der gewünschten Größe enthielt, identifiziert werden. Diese Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und bei -80°C aufbewahrt.

Mit den Proteinen wurden ein Meerschweinchen und ein Kaninchen injiziert. Pro Injektion wurden 150 µg des Proteins verwendet. 150 µg Protein (im SDS-Gel) wurden homogenisiert, 1 : 1 mit Freund's Complete Adjuvants (Sigma) vermischt und den Tieren injiziert. Es folgten 5 erneute Injektionen (Boosts) der Tiere im Abstand von 4 - 6 Wochen, bei denen dieselbe Menge Protein, in diesem Fall aber 1 : 1 mit Freund's Incomplete Adjuvants (Sigma) vermischt und injiziert worden waren. Nach dem vierten Boost wurde eine Blutprobe der Tiere genommen und das Serum auf seine Rnf6 erkennenden Spezifität hin überprüft. 10 Tage nach dem fünften Boost wurden die Tiere getötet und ihnen das Blut entnommen. Nach einigen Stunden konnte das klare Serum abpipettiert werden. Das Serum wurde bei -20°C aufbewahrt. Vor der 1. Injektion war außerdem eine Blutprobe entnommen worden, aus der Serum gewonnen worden war, um diese später als Negativkontrolle verwenden zu können.

### **3.3. Methoden der Zellkultur**

#### **3.3.1. Zucht von Säugerzellen**

Die verwendeten HEK 293T-Zellen und die COS7-Zellen wurden in Dulbecco's MEM High Glucose Medium ohne Pyruvat in Gegenwart von 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gezüchtet. CHO-Zellen wurden in HAM's F12 Medium mit denselben Zusätzen und unter denselben Bedingungen gehalten. Alle 3 - 4 Tage wurden die Zellen 1 : 10 verdünnt. Zum Ablösen der Zellen von der Schale wurde Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco-BRL) verwendet.

### **3.3.2. Lagerung von Säugerzellen**

Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin-EDTA von den Schalen gelöst und in FCS/Medium/DMSO (5 : 4 : 1) aufgenommen und in Aliquots von 1 ml auf Einfrierröhrchen verteilt. Diese wurden in einer Styroporkiste langsam auf -80°C abgekühlt und danach in flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.3.3. Transfektion mit Polyethanolimin (PEI)**

HEK 293T-Zellen wurden auf 10 cm Schalen ausgesät und wachsen gelassen, bis eine Konfluenz von 60 - 70% erreicht war. 1 h vor der Transfektion wurde das gesamte Medium (10 ml) abgesaugt und durch nur 5 ml neues Medium ersetzt. Der Transfektionsansatz pro Schale enthielt 5 µg DNA und 240 µl PBS. In einem anderen Gefäß wurden 42 µl des organischen Makromoleküls PEI mit 240 µl PBS vermischt, dieses Gemisch zu dem Transfektionsansatz gegeben und 10 sec gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurden die verschiedenen Ansätze langsam und vorsichtig auf die einzelnen Platten pipettiert. Nach einer 3,5 - 5-stündigen Inkubation der Platten bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und 10 ml neues Medium dazugegeben. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und Zellextrakte hergestellt (Kap.4.2.2.).

### **3.3.4. Immuncytochemische Detektion von Proteinen in Säugerzellen**

Um transfizierte oder endogene Proteine in Säugerzellen nachzuweisen, wurden immuncytochemische Experimente durchgeführt. Die Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit 12 Mulden ausgesät, in die zuvor Deckgläschen gelegt worden waren. So wuchsen die Zellen auf den Deckgläschen. Wenn die Zellen 60 - 70% konfluent waren wurde, wenn gewünscht, wie in Kap.4.3.3. beschrieben, transfiziert. Nach 24 h oder, bei nicht transfizierten Zellen, nach Erreichen einer Konfluenz von 90 - 100%, wurden die Zellen 20 min bei 4°C in 4% PFA fixiert, 2x mit PBS gewaschen und anschließend 5 min in 0,5% PBT inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten in PBS wurden die Zellen 1 h in einer Blockierlösung (PBT, 1% BSA) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Nach dem Blockieren wurden die Zellen mit dem in PBT mit 0,1% BSA verdünnten primären Antikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 4°C, oder bei

Raumtemperatur mindestens 1 h. Nach weiteren 3 Waschschrritten mit PBS, wurde ein Fluoreszenz-markierter sekundärer Antikörper (in PBT; 0,1% BSA) dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 - 2 h im Dunkeln wurden die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen. Im letzten Waschschrritt wurde, wenn gewünscht, dem PBS 1 : 1000 DAPI zugegeben. Mit DAPI erreicht man eine Zellkerngegenfärbung, die mit UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. So ist es später leichter möglich echte, intakte Zellen auszumachen. Es folgten 2 Waschschrritte mit ddH<sub>2</sub>O. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den Zellen auf Objektträger gebracht. Hierzu wurde Vectashield Mounting Medium (Vector) verwendet. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Färbung der Zellen wurde mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops (Leica DM IRBE, Heidelberg) mit Scanner (Leica TCS SPII, Heidelberg) dokumentiert.

### **3.4. Arbeiten mit Gewebeschnitten**

#### **3.4.1. Präparation von Gewebe-Kryoschnitte**

Maus- oder Hühnerembryonen wurden präpariert und in 4% PFA in PBS (pH 7,4) mindestens 2 h und höchstens 16 h bei 4°C leicht schwenkend fixiert. Anschließend wurden die Embryonen in PBS gewaschen und über Nacht in 30 % Sucrose/PBS inkubiert. Danach wurden sie in Tissue Tec O.C.T. (optimal cutting temperatur compound) Einbettmedium eingebettet und bei -80°C gelagert. Nach beliebig langer Lagerzeit wurden die Embryonen mit dem Kryostat in 12 µm dicke Sektionen geschnitten. Auch die geschnittenen Sektionen wurden bei -80°C gelagert.

#### **3.4.2. Präparation von Gewebe-Vibratonschnitte**

Vibratonschnitte wurden nur von Mausgewebe angefertigt. Dazu wurden die Embryonen ebenfalls in 4% PFA in PBS (pH 7,4) über Nacht fixiert. Nach einer anschließenden Inkubation über Nacht in 30% Sucrose/PBS wurden die Embryonen durch folgende Alkoholreihe geführt: 20% Ethanol, 40% Ethanol, 60% Ethanol, 80% Ethanol, 100% Ethanol, 80% Ethanol, 60% Ethanol, 40% Ethanol, 20% Ethanol. In jedem Alkoholbad erfolgte eine Inkubation von 15 min. Die Embryonen können in 100% Ethanol bei 4°C gelagert werden und wurden meist so bis zum Gebrauch

aufbewahrt. Anschließend wurden sie in PBS gewaschen und in 6% Agarose in PBS eingebettet. Nach Erhärten der Agarose konnten die Embryonen mit einem Vibratom in einem PBS-Bad geschnitten werden. Die Schnittdicke betrug zwischen 60 und 80  $\mu\text{m}$ . Aufgrund der größeren Dicke dieser Schnitte, verglichen mit den Kryostat-Schnitten, sind Vibratomschnitte stabiler und können für "free-floating"-Immunohistochemie verwendet werden. Hierbei werden die Schnitte nicht auf Objektträger aufgezogen, sondern in kleinen flüssigkeitsdurchlässigen Körbchen in den jeweiligen Lösungen inkubiert.

### **3.4.3. Immunhistochemie mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern**

Für immunohistochemische Experimente wurden die Kryoschnitte aufgetaut und mit einem wasserabweisenden Stift umzirkelt. Zunächst wurden die Schnitte in PBT mit 2% NGS oder 2% NHS mindestens 15 min bei Raumtemperatur blockiert, anschließend wurde der in Blockierlösung verdünnte primäre Antikörper (siehe Kap.3.6.) auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach 3 Waschschritten von jeweils 5 min in PBS wurde der ebenfalls in Blockierlösung verdünnte Fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper auf die Schnitte gegeben und 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde 3 Mal mit PBS gewaschen, wobei dem PBS im 1. dieser Waschschrritte 1 : 1000 DAPI zugesetzt wurde, um die Zellkerne zu färben. Die Schnitte wurden dann mit Vectashield Mounting Medium (Vector) eingedeckelt und die Färbung mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops (Leica DM IRBE, Heidelberg), sowie dem zugehörigen Scanner (Leica TCS SPII) dokumentiert.

### **3.4.4. Immunhistochemie mit biotinylierten Antikörpern**

Hier wurde verfahren, wie in Kap. 4.4.3. beschrieben. Anstelle von Kryoschnitten wurden aber Vibratomschnitte verwendet und "free-floating"-Experimente durchgeführt. Es wurden biotinylierte sekundäre Antikörper verwendet und die Inkubation darin auf 4 h bis über Nacht verlängert. Im Anschluß an 3 Waschschrritte in PBS von jeweils 5 min, wurden die Schnitte 1,5 h in ABC-Lösung (Vectastain ABC-Kit, Vector Laboratories) inkubiert. Die ABC-Lösung (Avidin-Biotin-Komplex) wurde 30 min vor Gebrauch nach Angaben des Herstellers angesetzt. Hier wird die starke, praktisch irreversible Bindung zwischen Biotin und Avidin

ausgenutzt. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin und ist in diesem Kit an Meerrettichperoxidase H gekoppelt. Die Schnitte wurden 1,5 - 2 h in der ABC - Lösung inkubiert, abermals 2x 10 min in PBS und 3x 10 min in 50 mM Tris (pH 7,6) gewaschen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation in DAB-Präinkubationslösung (50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,5 mg/ml DAB; 10 mM Imidazol; 0,3% Ammoniumnickelsulfat), gefolgt von der Inkubation in DAB-Inkubationslösung (5 ml DAB-Präinkubationslösung mit 10 µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Inkubation erfolgte bis die Färbung unter dem Binokular ausreichend erschien und wurde dann in 50 mM Tris (pH 7,6) gestoppt. Nach zwei weiteren Waschschritten in Tris (pH 7,6) wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und mit Hilfe eines Lichtmikroskops und einer angeschlossenen Kamera fotografisch dokumentiert.

### 3.4.5. *In situ*-Hybridisierungen

*In situ*-Hybridisierungen wurden im Wesentlichen durchgeführt wie beschrieben (Strahle et al., 1994). Mäuse- oder Hühnerembryokryoschnitte wurden aufgetaut und mit einem wasserabweisenden Stift umzirkelt. Über Nacht wurden sie mit den gewünschten, aufgekochten Sonden (siehe Kap.4.1.14.) bei 65°C in einem Hybridisierungssofen hybridisiert. Die Sonden wurden 1 : 100 - 1 : 200 in Hybridisierungspuffer (0,2 M NaCl; 10 mM NaPO<sub>4</sub>; 5 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50% Formamid; 10% Dextransulfat; 1 mg/ml tRNA (Gibco); 1x Denhardt's) verdünnt. Anschließend wurden die Schnitte 4 - 5 Mal 30 min bei 65°C in 1x SSC, 50% Formamid und 0,1% Tween-20 gewaschen. Zwei weitere Waschschrritte in MABT (100 mM Maleinsäure, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20) folgten (je 30 min bei RT). Danach wurden die Schnitte in MABT mit 2% Blocking Reagent (Roche) und 20% durch Hitze inaktiviertem Ziegenserum blockiert. Ein Alkalische-Phosphatase-(AP)-konjugierter anti-DIG-Antikörper (Roche) wurde 1 : 2500 in Blockierungslösung verdünnt und die Schnitte über Nacht darin inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 5x 20 min in MABT und zwei Mal 10 min in AP-Puffer (100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM Tris-HCl, pH 7,9; 0,1% Tween-20; 0,5 mg/ml Levimasol) gespült. Nun folgte der Färbeschritt, indem AP-Puffer mit je 3,5 µl/ml NBT und BCIP auf die Schnitte gegeben wurde. Die Färbung erfolgte je nach Intensität 30 min - 24 h. Anschließend wurden Fotos der Schnitte durch ein Mikroskop angefertigt.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Sequenzvergleich RLIM/RNF6

Der Kofaktor RLIM wurde in unserem Labor als RINGfinger abhängige Ubiquitin-Ligase identifiziert und spielt als negativer Regulator eine wichtige Rolle in der Regulation des LIM-Protein Netzwerkes (Ostendorff et al., 2002). RLIM kann sich selbst ubiquitinieren und katalysiert eine Polyubiquitinierung von CLIM sowie eine Oligoubiquitinierung von LMO-Proteinen. LIM-HD-Transkriptionsfaktoren werden nicht durch RLIM ubiquitiniert. Es konnte im Labor gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung von CLIM sowohl dann stattfindet, wenn CLIM an *Lhx3* gebunden ist, als auch dann, wenn ein ternärer Komplex aus DNA, *Lhx3* und CLIM besteht (Ostendorff et al., 2002).

Phylogenetische Studien haben gezeigt, dass es in Säugetieren in der Regel immer zwei LIM-HD-Transkriptionsfaktoren gibt, die einander besonders ähnlich sind, wie z.B. *Lhx1* und *Lhx5*, sowie *Lhx2* und *Lhx9* (Abb.1; Dawid, et al., 1998; Hobert & Westphal, 2000). Teilweise können sie sich auch funktionell ersetzen, wie das bei *Lhx3* und *Lhx4* der Fall ist (Hobert & Westphal, 2000). Auch die CLIM-Kofaktoren erscheinen mit CLIM1 und CLIM2 als Paar. Für den Kofaktor RLIM dagegen konnte bisher kein Homolog identifiziert werden. Eine Suche in der Datenbank (NCBI) ergab, dass RNF6 dasjenige RINGfinger Protein ist, dass mit RLIM die größten Sequenzhomologien aufweist und somit als weiterer Kofaktor im LIM-Protein Netzwerk in Frage kommt. Beide murinen Proteine zeigen eine Aminosäureidentität von ca. 45%. Besonders hoch konserviert sind in beiden Proteinen die funktionellen Domänen: die N-terminalen Leucin-Zipper-ähnliche Domäne, die Basischen Domäne 2 (Bindestelle für CLIM und LIM-Domänen), eine potentielle NES (nukleare Export-Sequenz) und der C-terminalen RINGfinger (Abb.5). Die höchste Homologie zeigen die Leucin-Zipper-ähnliche Domäne mit ca. 78 % und die RINGfinger Domäne mit ca. 75 % Aminosäureidentität. RLIM und RNF6 unterscheiden sich vor allem darin, dass die Region die in RLIM als NLS (nukleare Lokalisations-Sequenz) fungiert in RNF6 nicht gut konserviert ist. Allerdings enthält auch RNF6 eine basische Region, die den Transport in den Zellkern vermittelt. Diese als "Basische Domäne 1" bezeichnete Region wurde in unserem Labor als NLS

identifiziert. Auch die NES-Regionen von RLIM und RNF6 wurden näher analysiert. Die Untersuchungen zu NES und NLS hat mein Kollege Marvin Peters durchgeführt.

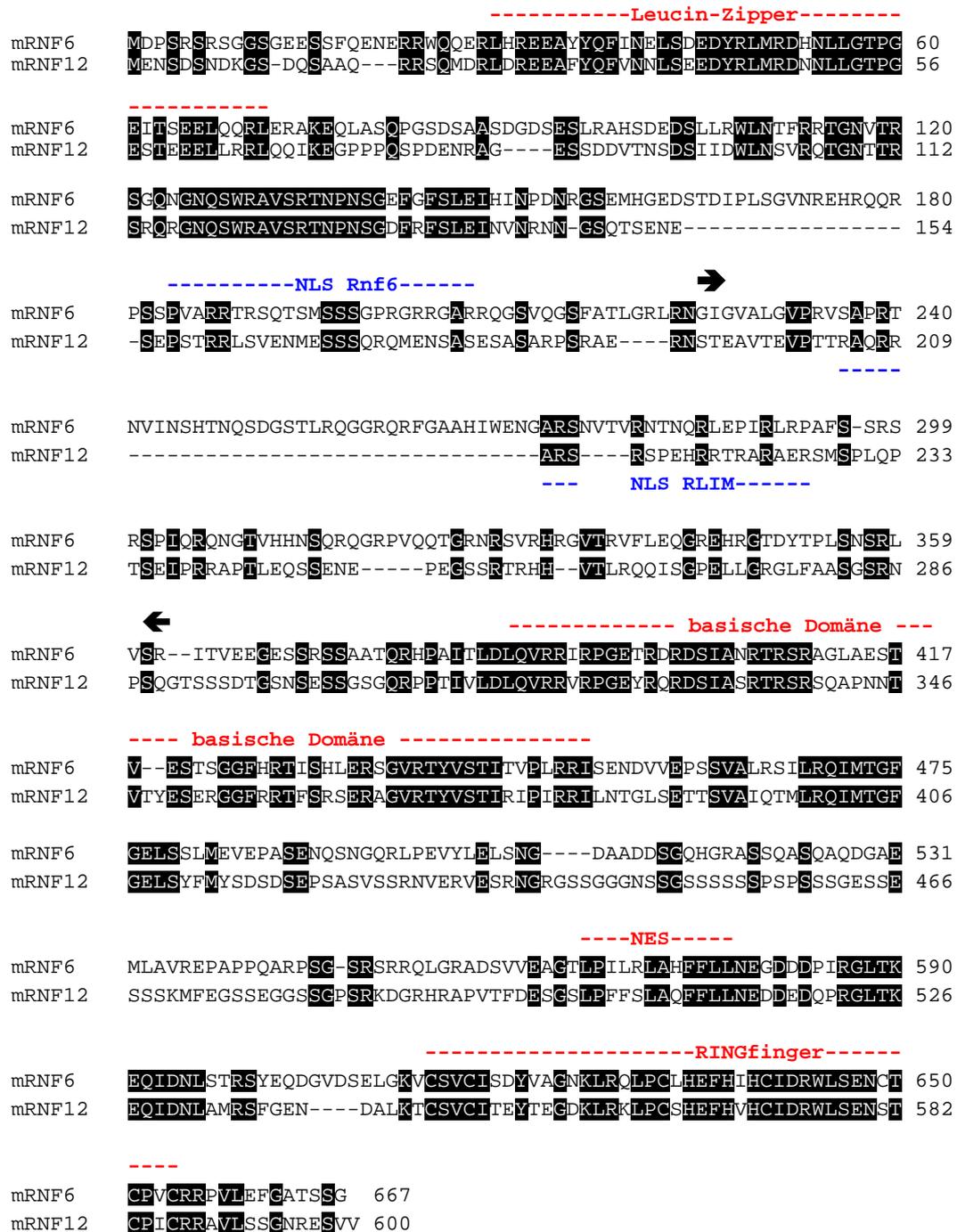


Abb. 5 Alignment der Aminosäuresequenzen von mRNF6 und mRLIM (Rnf12)

Abbildung 5 zeigt ein Alignment der Aminosäuresequenzen von RNF6 und RLIM aus der Maus. Die konservierten funktionellen Domänen sind über den Sequenzen rot markiert, während die Domänen, die sich stärker unterscheiden, hier blau markiert sind. Zwischen den Pfeilen ist der Teil der RNF6-Sequenz markiert, der für die Gewinnung spezifischer Antikörper gegen RNF6 als Antigen verwendet wurde (siehe Kap.5.5.).

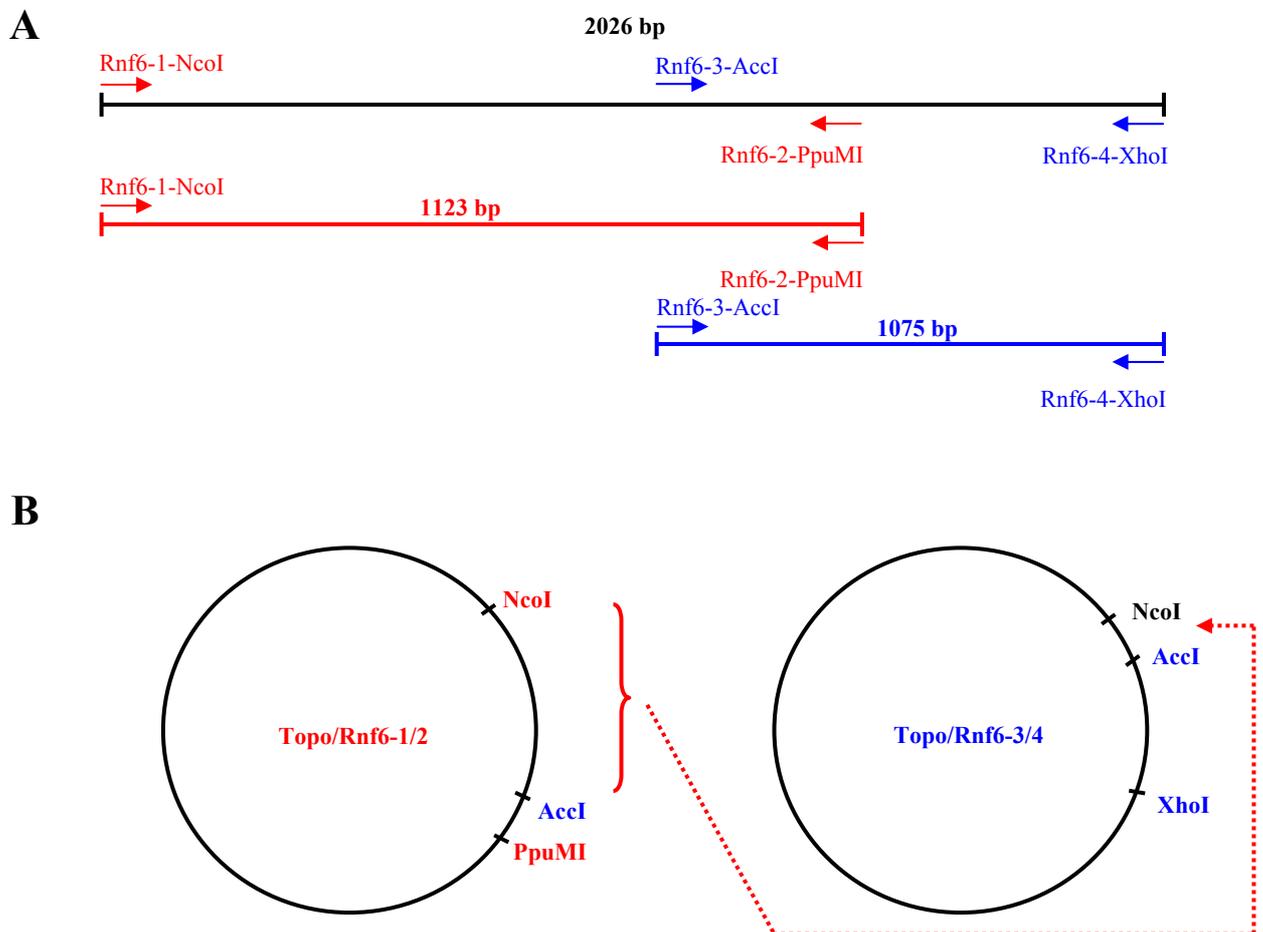
Die Ähnlichkeit von RLIM und Rnf6 in funktionellen Regionen ist so groß, dass es für uns interessant war beide Proteine in ihrer regulativen Funktion im LIM-Protein-Netzwerk zu vergleichen. Daher wurde die murine cDNA die für Rnf6 kodiert kloniert.

#### 4.2. Klonierung von murinem Rnf6

Mittels PCR auf einer cDNA-Bank aus embryonalen Maushirnen wurden zwei überlappende Teilstücke der Rnf6 cDNA amplifiziert und diese anschließend zusammengefügt, um die cDNA voller Länge zu erhalten. Das N-terminale Teilstück mit einer Länge von 1123 bp wurde mit den Primern Rnf6-1-*NcoI* und Rnf6-2-*PpuMI* amplifiziert, das C-terminale Teilstück, das eine Länge von 1075 bp hat, wurde mit den Primern Rnf6-3-*AccI* und Rnf6-4-*XhoI* amplifiziert. Die Teilstücke überschneiden sich in einem Bereich von 172 bp (Abb.6A). Beide PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR2.1-TOPO-TA kloniert. Nun konnte mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *AccI* ein Teilstück des N-terminalen Teils (1123bp - 172 bp = 951 bp) herausgeschnitten werden und in den mit denselben Enzymen verdauten pCR2.1-TOPO-TA Vektor, der den C-terminalen Teil enthielt, eingefügt werden (Abb.6B). Nach der Ligation beider Teile wurde mit Hilfe eines Verdau mit den Enzymen *NcoI* und *XhoI* überprüft, ob ein Fragment von 2026 bp, was der Gesamtlänge von Rnf6 entspricht, vorhanden war. Anschließend wurde Rnf6 in die pro- und eukaryotischen Expressionsvektoren pGEX-KGK, pCS2MT und pcDNA3 kloniert.

Um zu zeigen, dass die cDNA fehlerfrei amplifiziert und kloniert worden war und RNF6-Protein der gesamten Länge abgelesen werden kann, wurden die Plasmide sequenziert und die Proteine *in vitro* (siehe Kap.4.2.10., TNT-Proteine) hergestellt (Abb.7). Wie auf Abb.7 zu sehen ist, wird RNF6-Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht hergestellt. Zum Vergleich ist neben der Spur mit RNF6-Protein (Spur 2) eine Spur mit RLIM-TNT-Protein (Spur 1) aufgetragen. Beide Proteine laufen hier bei ca. 95 kDa. Obwohl der für RLIM kodierende ORF etwas kürzer ist als der von Rnf6, läuft RNF6 etwas niedriger im SDS-Gel. Alle Proteine wurden von

pCS2MT-Vektoren abgelesen, die ein 6-faches myc-Epitop (240 bp) an die Proteine hängen. Dementsprechend laufen sie ca. 9 kDa höher als ohne Markierung.

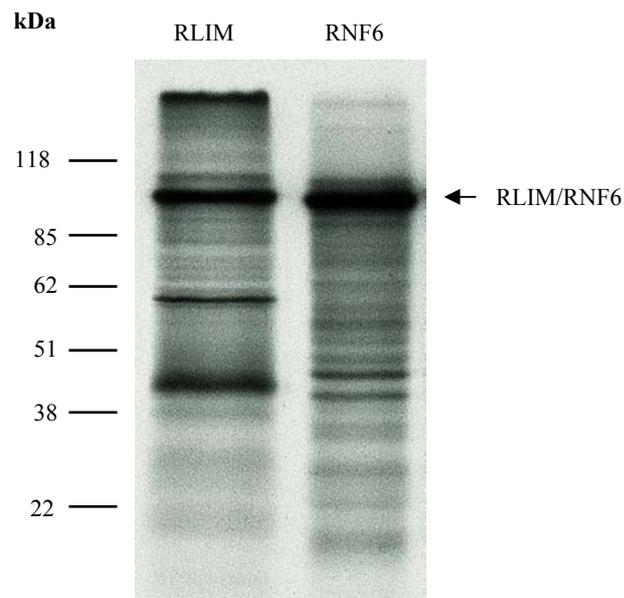


**Abb. 6 Klonierungsstrategie für RNF6-mRNA.** (A) RNF6 wurde in zwei Teilstücken kloniert. Das erste Teilstück mit dem hier rot markierten Primerpaar und das zweite mit dem hier blau markierten Primerpaar. Die Länge der Teilstücke ist jeweils angegeben. (B) Die beiden Teilstücke wurden in den Vektor pCR2.1-TOPO-TA kloniert und mit NcoI und AccI verdaut. Die rote Klammer zeigt das Stück des ersten Teilstücks das in den Vektor, der das zweite Teilstück enthält kloniert wurde.

#### 4.3. mRNA-Expression von Rnf6 und Rnf12 im Vergleich

Die auf Abb.8 dargestellten Northern-Blots zeigen, dass sowohl mRNA von Rnf6 als auch von Rnf12 (das für RLIM kodierende Gen heißt Rnf12) bereits am Embryonaltag 7 (E7) der Maus und auch an allen drei anderen getesteten Embryonaltagen (E11, E15 und E17) exprimiert wird (Abb.8A und 8B). Rnf6-mRNA läuft auf einer Höhe von 3,8 kb, während Rnf12-mRNA auf einer Höhe von

7,7 kb läuft. Die mRNA-Expression beider Gene ist am E11 etwas geringer als an den anderen untersuchten Tagen und steigt anschließend wieder an. Es handelt sich immer um denselben Northern-Blot, der nacheinander mit verschiedenen Sonden hybridisiert worden ist. Um zu überprüfen, ob dieselben Mengen mRNA aufgetragen worden waren, wurde der Blot mit einer  $\beta$ -Aktin-Sonde hybridisiert (Abb.8C). Auf

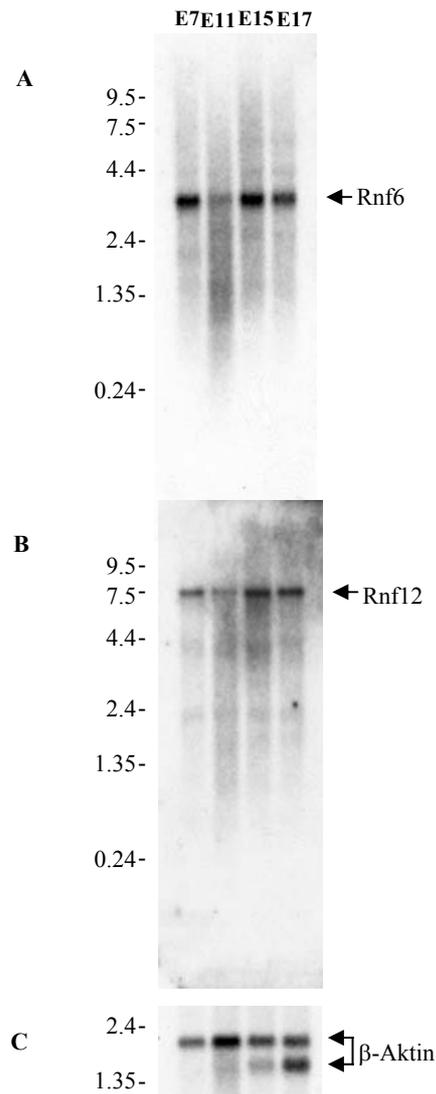


**Abb. 7 Expression von RLIM- und RNF6-Proteinen voller Länge.** Die Abbildung zeigt *in vitro* hergestelltes,  $^{35}\text{S}$ -markiertes RLIM und RNF6 voller Länge. Beide Proteine laufen bei ca. 95kDa.

den Northern-Blots, die die Expression in verschiedenen adulten Mausgeweben zeigen (Abb.9A-C), ist zu sehen, dass Rnf6 weiter verbreitet und stärker exprimiert ist als Rnf12, so ist Rnf6 in Herz, Gehirn, Leber, Niere und Hoden stark exprimiert, in Lunge etwas schwächer und in Milz und Skelettmuskel kaum. Rnf12 dagegen ist nur in Herz, Niere und Hoden stark exprimiert, sehr viel schwächer dagegen in Gehirn, Milz und Leber. Die Rnf12-Expression in Lunge und Skelettmuskel ist kaum nachweisbar. Auffällig ist auch, dass die Rnf12-Bande in Hoden auf einer Höhe von ca. 2,4 kb läuft, was z.B. auf alternatives Spleißen oder alternativ benutzte Promotoren hinweisen könnte.

Sowohl die mRNA von Rnf6 als auch die von Rnf12 werden ubiquitär exprimiert, zeigen jedoch in einigen Organen eine stärker Expression.

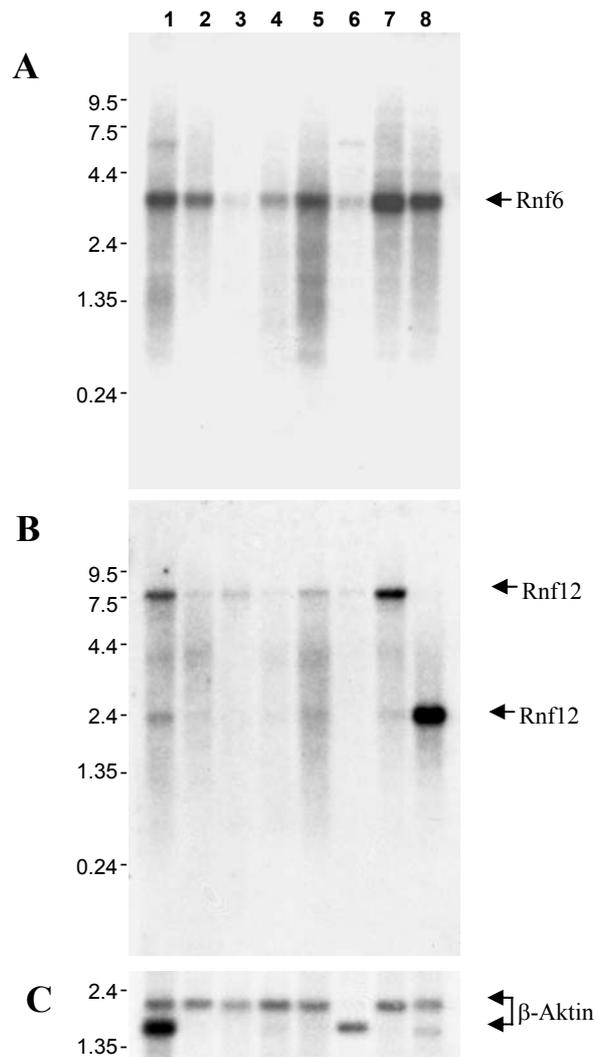
Um die mRNA-Expression in embryonalen Geweben zu untersuchen, wurden *in situ*-Hybridisierungen mit Schnitten von E11,5 Mäuseembryonen durchgeführt.



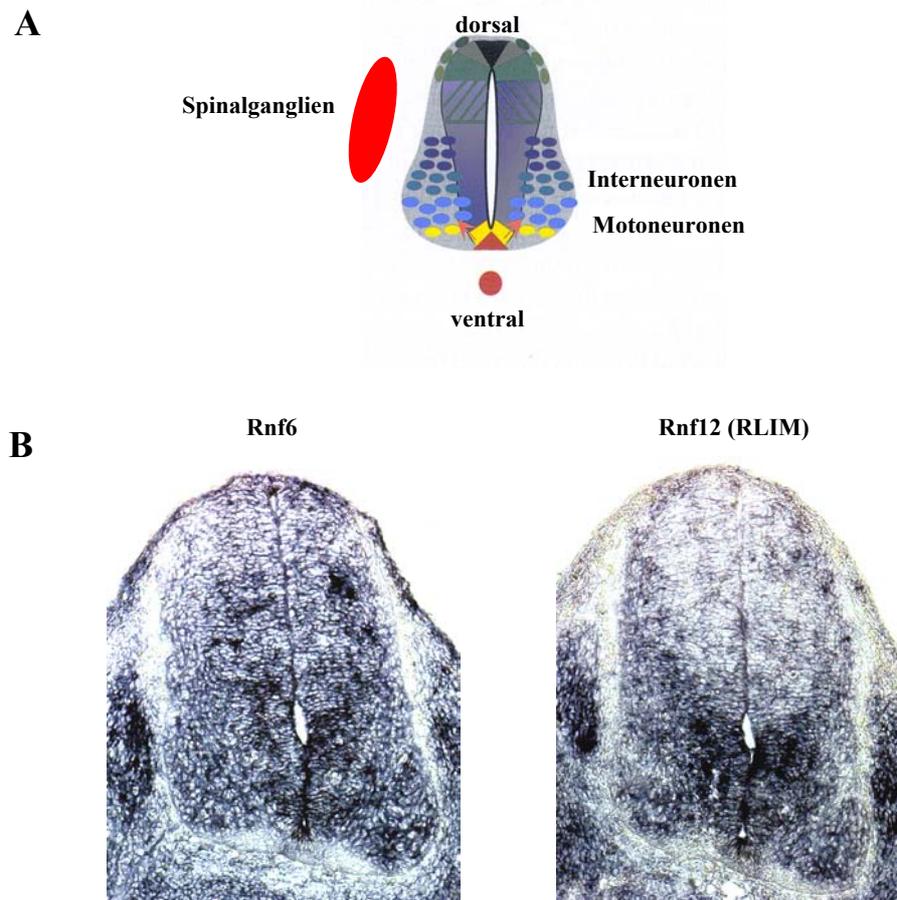
**Abb. 8 Verteilung von Rnf6- und Rnf12-mRNA in Mäuseembryonen.** Northern-Blot Analyse der gesamten mRNA von Mäuseembryonen der Embryonalage E7, E11, E15 und E17. **(A)** Die Rnf6-mRNA-Bande läuft auf einer Höhe von ca. 3,8 kb und hybridisiert spezifisch mit der  $^{32}\text{P}$ -markierten Rnf6-Sonde. **(B)** Die Bande der Rnf12-mRNA läuft auf einer Höhe von ca. 7,7 kb und hybridisiert spezifisch mit der  $^{32}\text{P}$ -markierten Rnf-12-Sonde. **(C)** zeigt die Verteilung der  $\beta$ -Aktin-mRNA als Kontrolle.

Insbesondere wurde das Neuralrohr sowie die angrenzenden Spinalganglien ("dorsal root ganglia", DRG) betrachtet, da LIM-HD-Proteine hier exprimiert werden und wichtige Rollen für die Entwicklung spezifischer Neuronenpopulationen spielen. Die verwendeten Schnitte sind Folgeschnitte aus demselben Embryo. Sowohl Rnf6-mRNA als auch Rnf12-mRNA wird ubiquitär im gesamten Neuralrohr exprimiert

(Abb.10B), wobei die Expressionsstärke der Rnf6-mRNA noch homogener zu sein scheint. Die Expression ist in beiden Fällen im ventralen Bereich des Neuralrohres etwas stärker als im dorsalen Bereich. Beide mRNAs werden auch stark in den DRGs exprimiert. Zum besseren Verständnis ist ein Modell des Neuralrohres, sowie der angrenzenden DRGs eines Mäusembryos an E11,5 auf Abb.10A dargestellt.



**Abb. 9 Verteilung von Rnf6- und Rnf12-mRNA in der adulten Maus.** Northern Blot Analyse der gesamten mRNA einer adulten Maus. Die Ziffern über dem Blot stehen für unterschiedliche Gewebe: Herz (1), Gehirn (2), Milz (3), Lunge (4), Leber (5), Skelettmuskel (6), Niere (7) und Hoden (8). **(A)** zeigt die Rnf6-mRNA-Bande, die spezifisch mit der  $^{32}\text{P}$ -markierten Rnf6-Sonde hybridisiert. **(B)** zeigt die Bande der Rnf12-mRNA, die spezifisch mit der  $^{32}\text{P}$ -markierten Rnf-12-Sonde hybridisiert. **(C)** zeigt die Verteilung der  $\beta$ -Aktin-mRNA als Kontrolle.



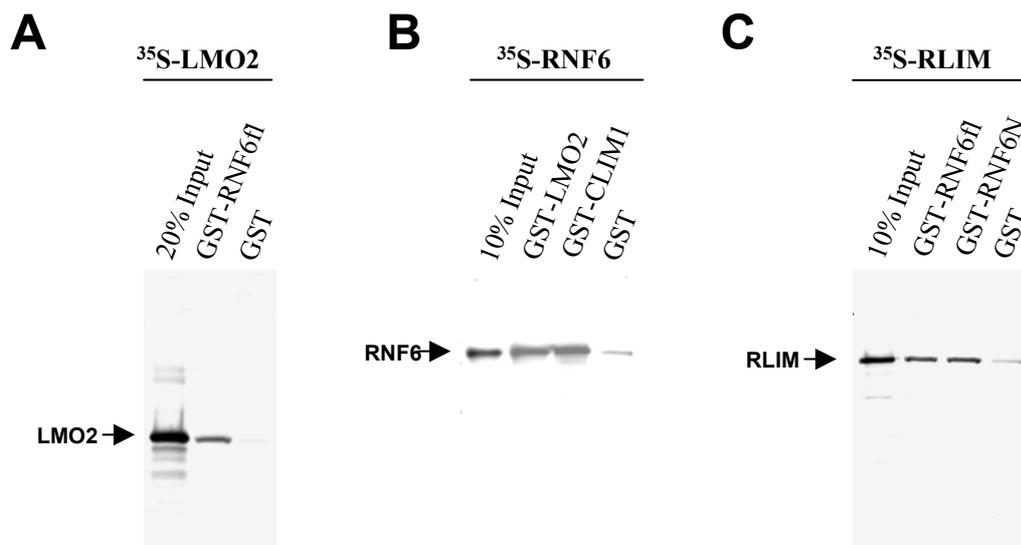
**Abb. 10** Muster der *Rnf6*- und *Rnf12*-mRNA-Expression im Neuralrohr eines Mäusembryos am Embryonaltag 11,5. (A) Das hier dargestellte Modell zeigt, zur besseren Orientierung, das embryonale Neuralrohr der Maus und die angrenzenden Spinalganglien schematisch. (B) Für diese *in situ*-Hybridisierungen wurden 12 µm dicke Kryoschnitte der Thoraxregion von Mäuseembryonen am E11,5 verwendet. Es wurden die in Kap. 4.1.14. beschriebenen Sonden verwendet.

#### 4.4. Funktion von RNF6 im Vergleich mit RLIM

##### 4.4.1. Interaktionspartner im Zellkern

Um potentielle Interaktionspartner von RNF6 im LIM-Protein Netzwerk zu finden wurden GST-Interaktionsexperimente durchgeführt. Zunächst wurden Proteine betrachtet, von denen eine Interaktion mit RLIM aus früheren Arbeiten bekannt war (Bach et al. 1999), wie z.B. CLIM und LMO-Proteine. Beide interagieren mit der Basischen Domäne 2 von RLIM. Da diese Domäne bei RLIM und RNF6 konserviert ist lag es nahe zu überprüfen, ob auch RNF6 mit CLIM und LMOs interagieren kann.

In Interaktionsexperimenten mit radioaktiv markiertem LMO2 (Herstellung radioaktiv markierter TNT-Proteine siehe Kap.4.2.9.) zeigte sich, dass das GST-RNF6-Fusionsprotein LMO2 präzipitieren kann, die Kontrolle mit GST-Protein allein weist keine Präzipitation auf (Abb.11A). Eine Präzipitation zeigt, dass beide Proteine miteinander interagieren können. Der umgekehrte Ansatz mit radioaktiv markiertem RNF6 und GST LMO2 zeigt dasselbe Ergebnis. Außerdem ist zu erkennen, dass auch GST-CLIM1 mit RNF6 interagiert (Abb.11B). In einem mit radioaktiv markiertem RLIM durchgeführten Experiment konnte gezeigt werden, dass RLIM sowohl von dem GST-RNF6-Protein in voller Länge, als auch von dem N-terminalen Teil von RNF6, nicht aber mit dem GST-Kontroll-Protein interagiert (Abb.11C). In der N-terminalen Region von RLIM und RNF6 befindet sich die Leucin-Zipper-ähnliche Region, die als Protein-Protein-Bindedomäne bekannt ist. Insofern liegt eine mögliche Bindung von RLIM und RNF6 im Bereich dieser



**Abb. 11 RNF6 bindet an LMO2, CLIM1 und RLIM.** (A) GST-RNF6fl (voller Länge) bindet an  $^{35}\text{S}$ -markiertes LMO2, die GST-Kontrolle dagegen nicht. (B) GST-LMO2 und GST-CLIM1 binden an  $^{35}\text{S}$ -markiertes RNF6, die GST-Kontrolle dagegen nur extrem schwach. (C) GST-RNF6fl (voller Länge) und der N-terminale Teil von RNF6 (RNF6N) binden an  $^{35}\text{S}$ -markiertes RLIM, die GST-Kontrolle dagegen nur extrem schwach.

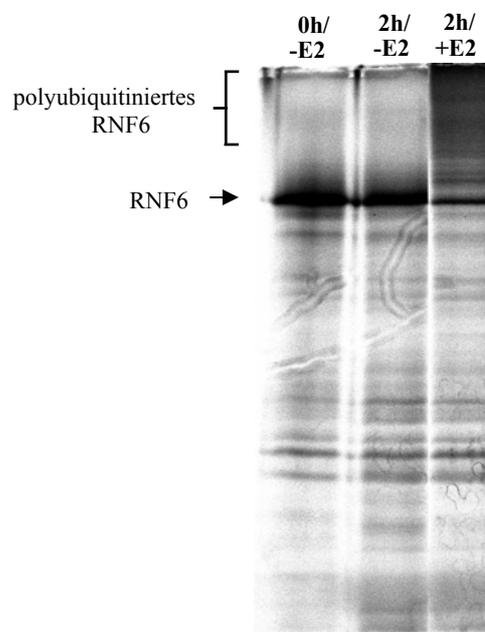
Domäne nahe. In allen Experimenten wurde das Gel vor dem Trocknen und dem Exponieren des Films kurz mit Coomassie gefärbt, um die Proteinmengen der GST-Konstrukte untereinander und mit denen der Kontrolle zu vergleichen (Daten nicht gezeigt). Es wurden nur Versuche verwendet, bei denen mindestens soviel GST-Kontroll-Protein aufgetragen worden war wie andere GST-Fusions-Proteine. Die Mengen der anderen GST-Proteine waren immer untereinander vergleichbar.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass RNF6 mit CLIM- und LMO-Proteinen interagiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass RLIM und RNF6 miteinander interagieren.

#### 4.4.2. RNF6 und RLIM als Ubiquitin-Ligasen

##### 4.4.2.1. Autoubiquitinierungsaktivität von RNF6

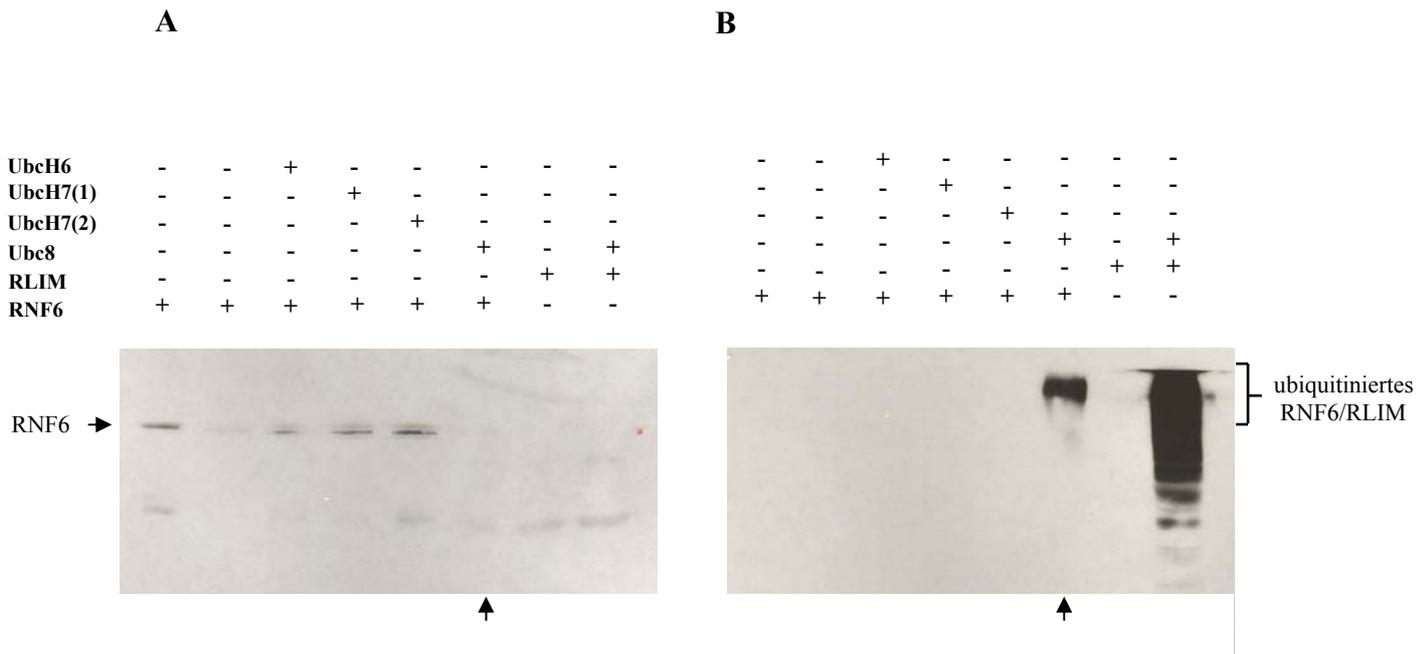
Sowohl RLIM als auch RNF6 haben ein C-terminales RING-H2 Zinkfingermotiv. RINGfinger-Proteine wurden in jüngerer Zeit mit Ubiquitin-Ligaseaktivität in Verbindung gebracht (Joazeiro & Weissman, 2000). Unsere Gruppe konnte bereits zeigen, dass RLIM eine RINGfinger-abhängige Ubiquitin-Ligase (E3) ist, die sich selbst, CLIM und LMO-Proteine ubiquitinieren kann. CLIM und RLIM werden polyubiquitiniert, während LMO-Proteine nur mono- oder oligoubiquitiniert werden (Ostendorff et al., 2002). Da RNF6 mit RLIM hohe Sequenzhomologien im RINGfinger aufweist, lag es nahe zu vermuten, dass auch RNF6 eine ähnliche Funktion haben könnte.



**Abb. 12 RNF6 ist eine Ubiquitin-Ligase.** <sup>35</sup>S-markiertes, *in vitro*-translatiertes RNF6 wurde 2 Stunden mit Ubc8 inkubiert. Polyubiquitinierte Formen von RNF6 sind gekennzeichnet.

Um festzustellen, ob RNF6 E3-Aktivität besitzt, wurde RNF6 auf seine Fähigkeit zur Autoubiquitinierung hin untersucht, da RINGfinger-Ubiquitin-Ligasen generell zu

E2-abhängiger Autoubiquitinierung in der Lage sind (Lorick et al., 1999). Zunächst wurden TNT-RNF6-Proteine hergestellt und überprüft, ob unter Zusatz von E2 (Ubc8) eine Ubiquitinierung zu erkennen ist, die ohne E2 nicht festzustellen ist. Abbildung 12 zeigt das Auftreten von hochmolekularen RNF6-Formen, wenn dem Ansatz E2 zugefügt wurde, folglich ist RNF6 zur E2-abhängigen Autoubiquitinierung in der Lage.

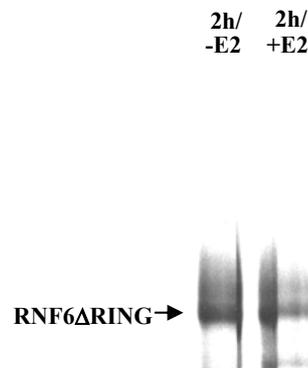


**Abb. 13 RNF6 ist eine Ubc8 –abhängige Ubiquitin-Ligase.** Bakteriell erzeugtes RNF6 (Spuren 1-6) oder bakteriell erzeugtes RLIM (Spuren 7 + 8) wurde 2 Stunden mit den jeweils durch ein + gekennzeichneten E2s inkubiert. Die Ansätze wurden über ein SDS-Gel getrennt, anschließend wurde ein Western-Blot durchgeführt und die Membranen wurden mit  $\alpha$ -RNF6-Antikörper (A), bzw mit  $\alpha$ -Ubiquitin-Antikörper (B) behandelt. Die Pfeile unter den Membranen kennzeichnen Spur 6, in der RNF6 mit Ubc8 inkubiert worden ist.

Da TNT-Proteine in eukaryotischem Zelllysat hergestellt werden und alle eukaryotischen Zellen auch andere E3-Enzyme enthalten, besteht die Möglichkeit, dass eine andere E3 RNF6 ubiquitiniert, wenn dem Ansatz ausreichende Mengen von E2 zugefügt werden. Daher wurde eine zweite Methode zur Überprüfung der Autoubiquitinierungsfähigkeit von RNF6 angewendet. Es wurde in diesem Fall nicht mit TNT-Proteinen, sondern mit in Bakterien hergestelltem GST-RNF6 gearbeitet. Eine RNF6-Präparation also, die keine anderen E3 Enzyme enthalten kann. Darüber hinaus wurde in diesem Versuchsansatz getestet welche E2 als die für RNF6 zuständige E2 in Frage kommt. Es lag nahe, dass Ubc8 die Ubiquitin-Konjugase der Wahl sein könnte, da Ubc8 als für RLIM zuständige E2 agiert (Ostendorff et al.,

2002) und zudem in dem auf Abb.12 dargestellten Versuch funktioniert hat. Nach der Ubiquitinierung und einer SDS-PAGE wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Derselbe Blot wurde einmal mit dem aus Meerschweinchen stammenden RNF6-Antiserum und nach entsprechender Behandlung anschließend mit einem gegen Ubiquitin gerichteten Antikörper behandelt (Abb.13). Es bestätigte sich, dass RNF6 autoubiquitinieren kann, wenn Ubc8 zugefügt wird (Spur 6), nicht aber, wenn UbcH6 oder UbcH7 zur Verfügung gestellt werden (Spuren 3, 4 und 5). In Spur 7 und 8 ist als Kontrolle derselbe Versuch mit RLIM dargestellt. Auch hier ist unter Zusatz von Ubc8 eine starke Autoubiquitinierungsaktivität festzustellen. Aufgrund der polyubiquitinierungsbedingten Verschiebung der Bande nach oben und dem damit verbundenen Verlust einer distinkten Bande, ist RNF6 in Spur 6 mit dem RNF6-Antiserum nicht zu erkennen. RLIM wird von diesem Antikörper ebenso wenig erkannt.

Im Folgenden wurde überprüft, ob auch die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von RNF6 an das Vorhandensein eines intakten RINGfingers gebunden ist. Zu diesem Zweck wurde eine Deletionsmutante von RNF6 eingesetzt, in der der RINGfinger deletiert ist. Abb.14 zeigt, dass eine Autoubiquitinierung von RNF6 nicht mehr möglich ist, wenn eine RINGfinger-deletierte Mutante verwendet wird.

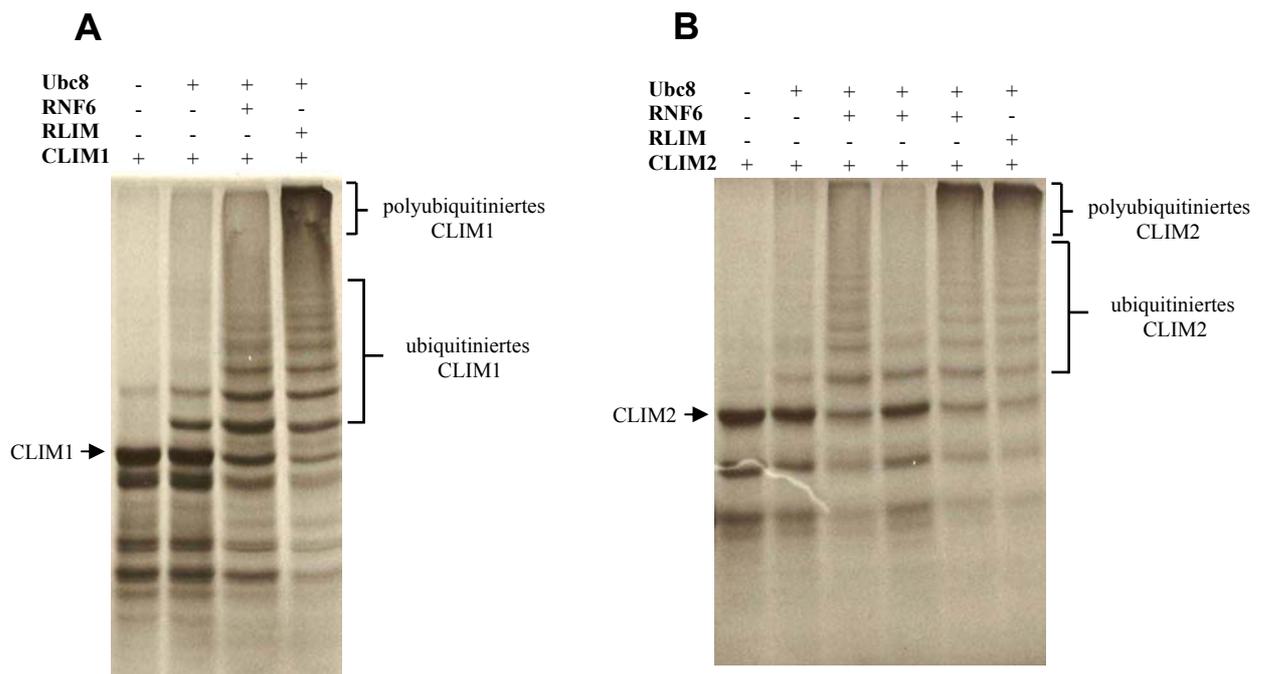


**Abb. 14 RNF6 ist eine RINGfinger –abhängige Ubiquitin-Ligase.** RNF6 zeigt bei Zugabe von Ubc8 nicht mehr die in Abb. 12 und 13 gezeigte Ubiquitin-Ligase-Aktivität, wenn der RINGfinger deletiert ist.

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass auch RNF6 eine RINGfinger-abhängige Ubiquitin-Ligase ist, die, wie RLIM, Ubc8 als E2 benötigt.

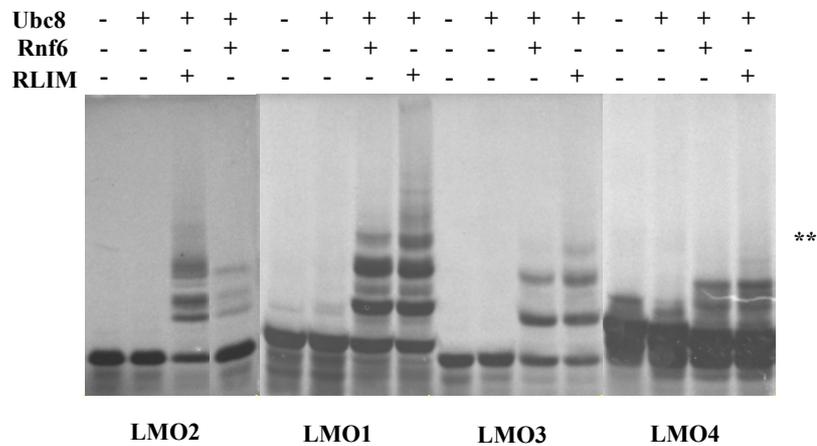
#### 4.4.2.2. Ubiquitinierung anderer Substratproteine durch RNF6 und RLIM

Zunächst wurde die Ubiquitinierung von Proteinen des LIM-Protein Netzwerkes, die von RLIM ubiquitiniert werden können (CLIM und LMOs), *in vitro* betrachtet. Die Folgenden Daten zeigen die Ubiquitinierung dieser Proteine durch bakteriell exprimiertes GST-RLIM im Vergleich zu einer Ubiquitinierung durch bakteriell exprimiertes GST-RNF6.



Wie bereits in Ostendorff et al. (2002) gezeigt wurde, kann RLIM sowohl TNT-CLIM1 als auch TNT-CLIM2 in Anwesenheit von Ubc8 ubiquitinieren. Auf Abb.15 ist dargestellt, dass auch RNF6 in der Lage ist beide Proteine unter Zuhilfenahme derselben E2-Konjugase zu ubiquitinieren (Abb.15A, Spur 3; Abb.15B, Spuren 3-5). Als Negativkontrollen für diese Versuche dienten jeweils die Substrat-TNT-Proteine in dem für Ubiquitinierungen verwendeten Puffer ohne E2 (siehe Kap.4.2.10.) und ohne E3, jeweils in der 1. Spur dargestellt, sowie derselbe Ansatz mit E2 aber ohne E3, jeweils in Spur 2 dargestellt. In dem auf Abbildung 15 dargestellten Versuch

wurden drei verschiedene bakteriell exprimierte RNF6-Präparationen getestet, da es unterschiedlich aktive Protein-Präparationen geben kann. Als Kontrolle wurde der Versuch auch mit RLIM durchgeführt (15A, Spur 4, 15B, Spur 6).

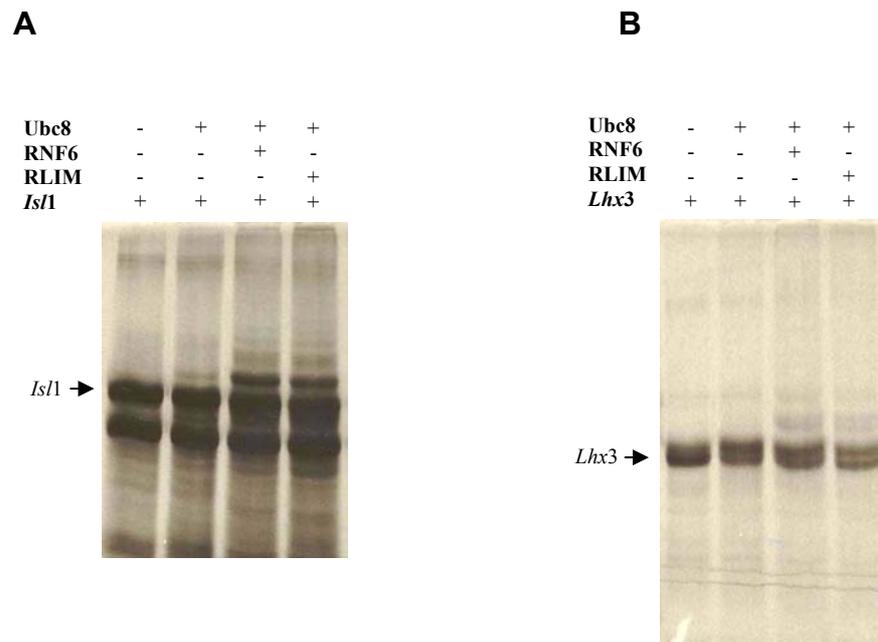


**Abb. 16 RNF6 kann, wie RLIM, die LMO1, LMO2, LMO3 und LMO4 oligoubiquitinieren.** Durch + oder – wird angezeigt, was dem in der entsprechenden Spur aufgetragenen Ansatz, zusätzlich zu dem in Kap. 4.2.10. beschriebenen Ubiquitinierungspuffer, zugefügt worden ist. Bakteriell exprimiertes GST-RLIM und GST-RNF6 können <sup>35</sup>S-markiertes, *in vitro*-translatiertes LMO1, LMO2, LMO3, LMO4 oligoubiquitinieren.

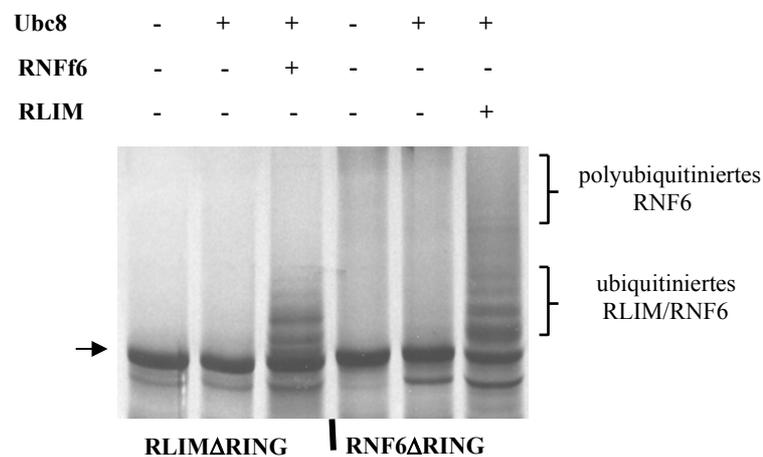
Ein Vergleich der Ubiquitinierung von TNT-LMO-Proteinen durch beide hier untersuchten E3-Ubiquitin-Ligasen zeigt, dass sich auch hier RNF6 ähnlich verhält wie RLIM (Abb.16). Sowohl RLIM (LMO2 in Spur 4, LMO1, 3 und 4 in Spur 3) als auch RNF6 (LMO2 in Spur 3, LMO1, 3 und 4 in Spur 4) oligoubiquitinieren alle vier TNT-LMO-Proteine. Keine der beiden Ubiquitin-Ligasen kann jedoch eine effiziente Polyubiquitinierung vermitteln. Die Oligoubiquitinierung durch RLIM scheint jeweils stärker zu sein, als die durch RNF6 vermittelten Ubiquitinierungen.

Abbildung 17 zeigt, dass eine Polyubiquitinierung der LIM-HD-Proteine *Is1* und *Lhx3* weder durch RLIM noch durch RNF6 möglich ist. In beiden Fällen kommt es zu einer leichten Oligoubiquitinierung, die jedoch deutlich schwächer ausfällt als zuvor für LMO-Proteine gezeigt wurde.

Da gezeigt werden konnte, dass RLIM und RNF6 miteinander interagieren, wurde zudem untersucht ob RLIM und RNF6 sich gegenseitig ubiquitinieren können. Abbildung 18 zeigt, dass beide Proteine das jeweils andere ubiquitinieren können. RLIM kann RNF6 polyubiquitinieren, während RNF6 RLIM nur mono- oder oligoubiquitiniert.



**Abb. 17 Weder RLIM noch RNF6 können die LIM-HD-Proteine *Is1* und *Lhx3* ubiquitinieren.** Durch + oder – wird angezeigt, was dem in der entsprechenden Spur aufgetragenen Ansatz, zusätzlich zu dem in Kap. 4.2.10. beschriebenen Ubiquitinierungspuffer, zugefügt worden ist. **(A)** Weder bakteriell exprimiertes GST-RLIM noch bakteriell exprimiertes GST-RNF6 können <sup>35</sup>S-markiertes, *in vitro*-translatiertes *Is1* ubiquitinieren. **(B)** Weder bakteriell exprimiertes GST-RLIM noch bakteriell exprimiertes GST-RNF6 können <sup>35</sup>S-markiertes, *in vitro*-translatiertes *Lhx3* ubiquitinieren.

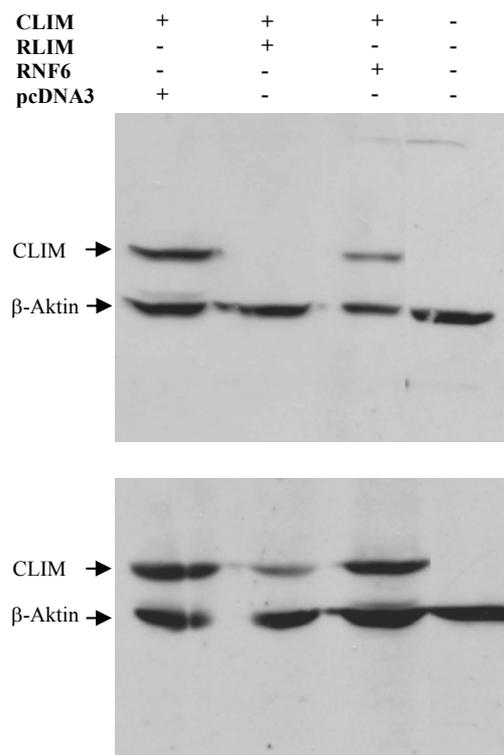


**Abb. 18 Gegenseitige Ubiquitinierung von RLIM und RNF6.** Durch + oder – wird angezeigt, was dem in der entsprechenden Spur aufgetragenen Ansatz, zusätzlich zu dem in Kap. 4.2.10. beschriebenen Ubiquitinierungspuffer, zugefügt worden ist. Bakteriell exprimiertes GST-RNF6 kann <sup>35</sup>S-markiertes, *in vitro*-translatiertes RLIMΔRING oligoubiquitinieren (Spur 3). Bakteriell exprimiertes GST-RLIM kann <sup>35</sup>S-markiertes, *in vitro*-translatiertes RNF6ΔRING oligo- und polyubiquitinieren (Spur 6).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass das *in vitro*-Ubiquitinierungsmuster beider E3-Enzyme sehr ähnlich ist. Beide Proteine können eine Polyubiquitinierung von CLIM-Kofaktoren vermitteln, während LMO-Proteinen oligoubiquitiniert werden können. Auffällige Unterschiede der E3-Ligase-Aktivität zwischen RLIM und RNF6 gibt es in diesen *in vitro*-Experimenten, mit Ausnahme der gegenseitigen Ubiquitinierungen, nicht.

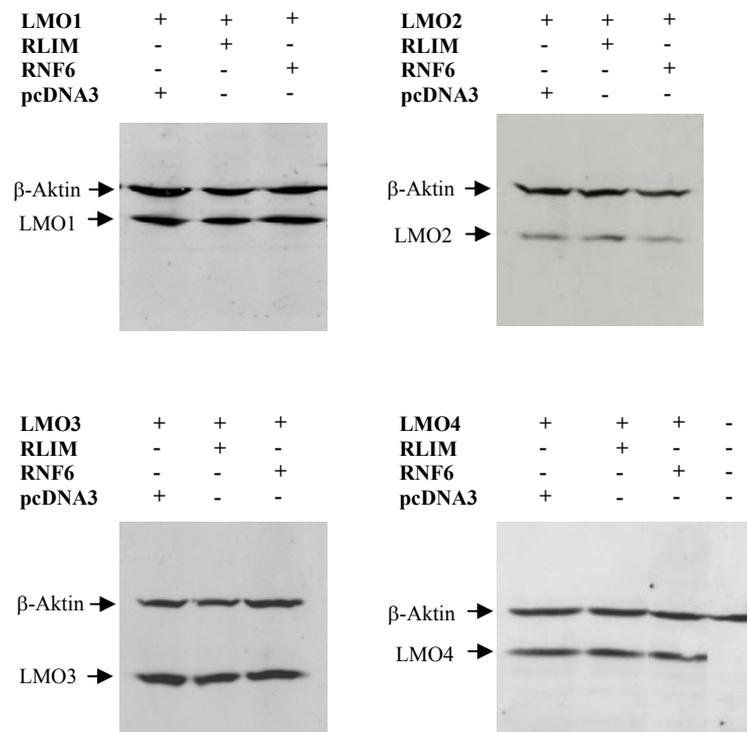
#### 4.4.3. Abbau transfizierter Proteine in HEK 293T-Zellen durch RNF6 und RLIM

Da Ubiquitinierungen unterschiedlichen Zwecken dienen und unter anderem zum Abbau der Proteine führen können, wurde im Folgenden überprüft, ob die von RLIM und RNF6 ubiquitinierten Proteine auch dem Abbau zugeführt werden. Um das zu untersuchen wurden transiente Kofunktions in HEK 293T-Zellen durchgeführt.



**Abb. 19 RLIM vermittelt den Abbau von CLIM, RNF6 dagegen nicht.** Western Blots auf Gesamtproteinextrakten aus HEK-Zellen, die mit den jeweils durch ein + markierten Konstrukten kofunktionsiert worden sind, wurden mit myc-Antikörpern behandelt, da die CLIM-Konstrukte myc-markiert sind. Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Ladens der Proteinextrakte wurde außerdem  $\beta$ -Aktin mit Hilfe eines  $\beta$ -Aktin-Antikörpers sichtbar gemacht.

Es wurden jeweils RLIM/RNF6, teilweise auch deren dominant-negative Formen als  $\Delta$ RING-Konstrukte und Kontrollplasmide zusammen mit dem jeweils abzubauenen Protein kotransfiziert. Die dominant-negativen Konstrukte sind aufgrund des fehlenden RINGfingers nicht mehr in der Lage als Ubiquitin-Ligasen zu wirken. Im Western-Blot wurde außerdem ein weiteres Protein angefärbt (in der Regel  $\beta$ -Aktin), um zu zeigen, dass vergleichbare Zellextrakt-Mengen geladen worden waren. Alternativ wurde ein GFP exprimierendes Plasmid kotransfiziert, das ermöglichte, sowohl durch Fluoreszenzmikroskopie der noch lebenden Zellen, als auch später im Western-Blot der Zelllysate die Transfektionseffizienz auf den unterschiedlichen Zellkulturschalen zu vergleichen. Einem Teil der Zellkulturschalen wurde 6h vor der Ernte MG132 zugesetzt. MG132 ist ein Proteasominhibitor, der den Abbau über den 26S-Proteasom-Stoffwechselweg blockiert. Sollte also der Abbau über eine Ubiquitin-vermittelte Markierung für den 26S-Proteasom-Stoffwechselweg stattfinden, so ist dieser Abbauweg und damit die Degradation durch RLIM/RNF6 zumindest teilweise blockiert.



**Abb. 20 Weder RLIM noch RNF6 können den Abbau von LMO-Proteinen vermitteln.** Western Blots auf Gesamtproteinextrakten aus HEK-Zellen, die mit den jeweils durch ein + markierten Konstrukten kotransfiziert worden sind, wurden mit myc-Antikörpern behandelt, da die LMO-Konstrukte myc-markiert sind. Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Ladens der Proteinextrakte wurde außerdem  $\beta$ -Aktin mit Hilfe eines  $\beta$ -Aktin-Antikörpers sichtbar gemacht.

Da unsere Arbeitsgruppe in Ostendoff et al. 2002 gezeigt hat, dass RLIM CLIM-Kofaktoren nicht nur ubiquitinieren, sondern auch deren Abbau initiieren kann, wurden Experimente mit diesen Substratproteinen begonnen. Abbildung 19 zeigt deutlich, dass die Kotransfektion von RLIM mit CLIM zu einem Abbau der CLIM-Proteine führt. Eine Kotransfektion von RNF6 mit CLIM führt nicht oder nur in sehr viel schwächerem Maße zu einem Abbau von CLIM-Kofaktoren. Ich habe diese Experimente wiederholt durchgeführt und beide Ergebnisse mehrfach erhalten. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da vorher gezeigt wurde, dass RNF6, wie RLIM, mit CLIM-Kofaktoren interagiert und diese polyubiquitiniert.

Die Kotransfektion von RNF6 oder RLIM mit LMO-Proteinen hatte keinen Einfluß auf deren Stabilität (Abb.20). Da RLIM und RNF6 LMO-Proteine zwar oligoubiquitinieren können, nicht aber für ihre Polyubiquitinierung zuständig sind (Kap. 5.4.2.2.) ist dieses Ergebnis nicht überraschend.

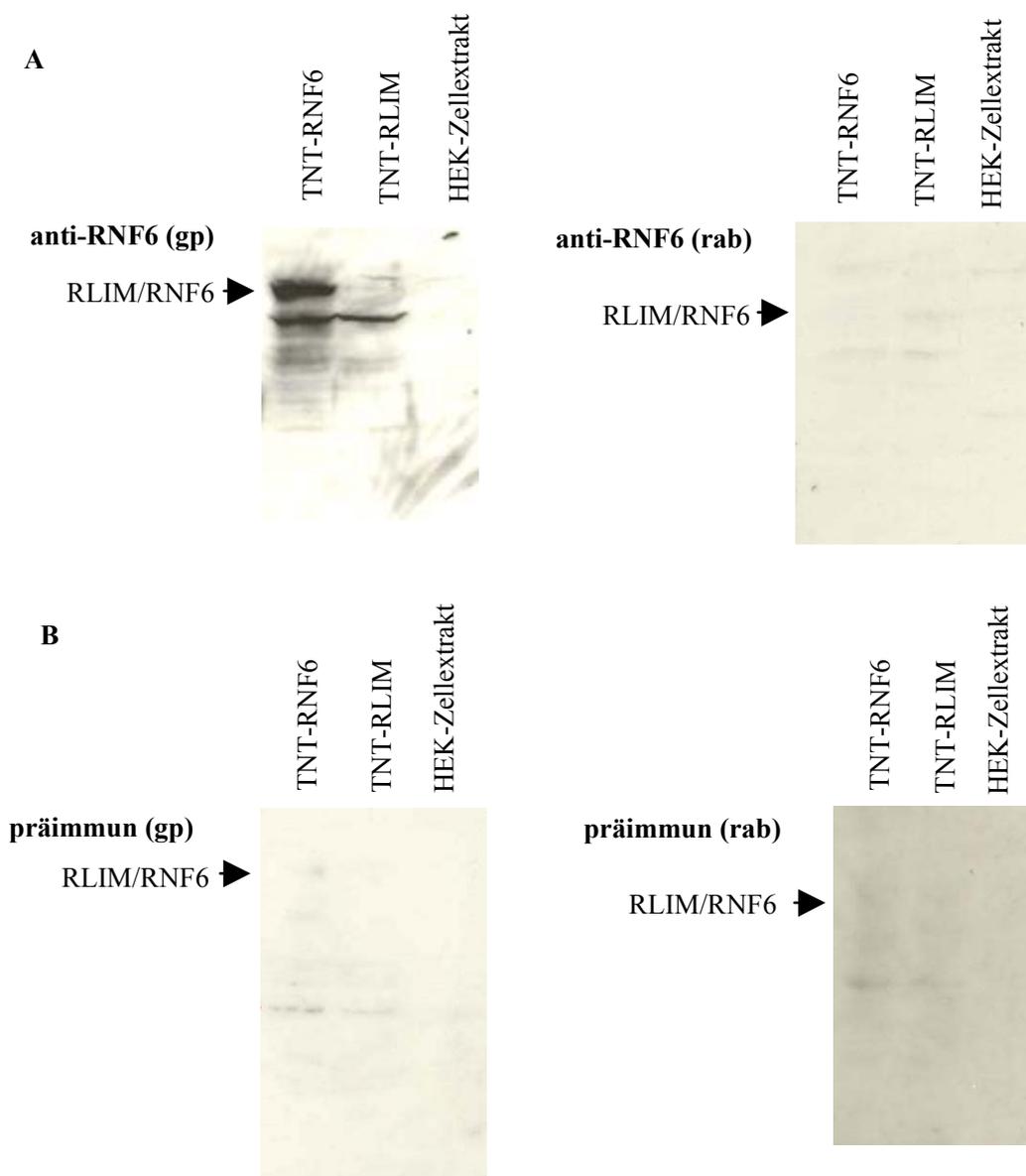
#### **4.5. Herstellung von RNF6-spezifischen Antikörpern**

Um RNF6 auf Proteinebene analysieren zu können, wurden RNF6-spezifische Antikörper benötigt. Um Kreuzreaktionen mit RLIM zu vermeiden wurden polyklonale Antikörper, die gegen den Teil von RNF6 gerichtet sind, der sich am stärksten von RLIM unterscheidet (Aminosäuren 220 - 363), in einem Kaninchen und einem Meerschweinchen generiert (siehe Kap.4.2.12.). Der Teil des RNF6-Proteins, der für die Generierung der Antikörper verwendet wurde, ist auf Abb.5 dargestellt.

Die gewonnenen polyklonalen Antiseren gegen RNF6 wurden zunächst in Western-Blots auf *in vitro*-translatierten Proteinen (RLIM und RNF6) und HEK 293T-Zelllysat getestet (Abb.21A). HEK 293T-Zellen exprimieren endogen RLIM und RNF6. Das Zelllysate enthält, im Unterschied zu den TNT-Proteinen, sehr viel geringere Konzentration von RLIM bzw. RNF6. Zum Vergleich wurde statt der polyklonalen Antiseren das Präimmenserum der Tiere verwendet (Abb.21B). Das aus Kaninchen stammende Antiserum sowie die Präimmenserum zeigen im Western-Blot keine Immunreaktivität. Das Antiserum gegen RNF6, das im Meerschweinchen

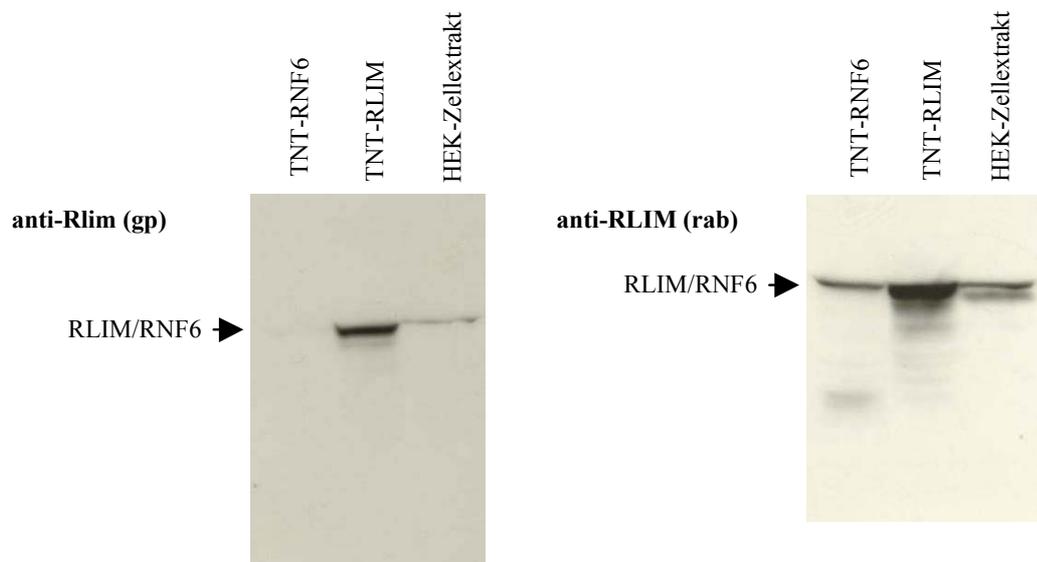
generiert worden war, erkennt RNF6 spezifisch. Endogenes RNF6 der Zellysate wird im Western-Blot nicht erkannt.

Außerdem wurden die im Labor bereits vorhandenen gegen RLIM gerichteten Antiseren auf ihre Spezifität bezüglich RLIM und RNF6 hin untersucht (Abb.22). Hier zeigt sich, dass beide RLIM-Antiseren (aus Kaninchen und Meerschweinchen) RLIM erkennen. Das im Kaninchen erzeugte Antiserum zeigt aber auch eine schwache Immunreaktivität mit RNF6, während das im Meerschweinchen erzeugte Antiserum RLIM spezifisch erkennt, weshalb im Folgenden mit diesem Antiserum gearbeitet wurde. Beide Antiseren erkennen auch endogenes RLIM des Zellysates.



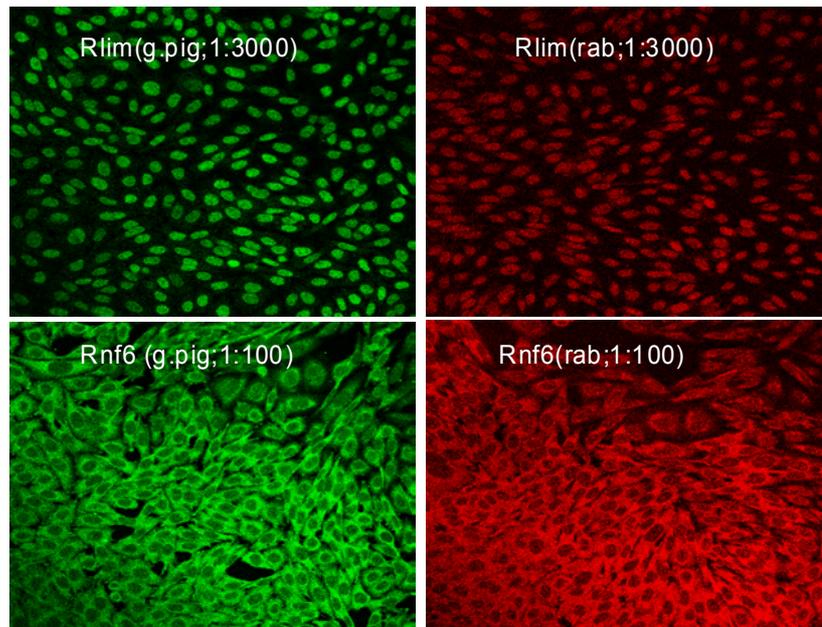
**Abb. 21 Western-Blot Analyse der RNF6-Antiseren.** (A) Die Spezifität der RNF6-Antiseren aus Meerschweinchen (gp) und Kaninchen (rab) wurde in Western-Blots von *in vitro*-exprimiertem RLIM (TNT-RLIM) und RNF6 (TNT-RNF6) voller Länge und HEK293T-Zellextrakten überprüft. (B) Zur Kontrolle wurde das Präimmunserum verwendet.

Im Folgenden wurde mit Hilfe von immunocytochemischen Experimenten mit HEK293T-Zellen überprüft, ob auf diese Weise endogenes RLIM bzw. RNF6 von den Antiseren erkannt wird. Es zeigte sich, dass sowohl beide RLIM-Antiseren als auch beide RNF6-Antiseren in immunocytochemischen Experimenten spezifisch sind. Die Abbildungen 23 und 24 dazu befinden sich in Kapitel 5.6. "Expressionsvergleich der Proteine", da gleichzeitig inhaltliche Aussagen zur Lokalisation der Proteine gemacht werden sollen.



**Abb. 22 Western-Blot Analyse der RLIM-Antiseren.** Die Spezifität der RLIM-Antiseren aus Meerschweinchen (gp) und Kaninchen (rab) wurden in Western-Blots von *in vitro*-exprimiertem RLIM (TNT-RLIM) und RNF6 (TNT-RNF6) voller Länge und HEK293T-Zellextrakten überprüft.

Die beschriebenen Antiseren gegen RNF6 sollten auch in immunhistochemischen Experimenten eingesetzt werden und wurden daher auch auf Kryo- und Vibratomschnitten von Mäuseembryonen getestet. Es stellte sich heraus, dass die Antiseren auf kryo-geschnittenem Gewebe nicht funktional sind (Daten nicht gezeigt), was wahrscheinlich mit dem nötigen Einfrieren des Gewebes bei dieser Methode zusammenhängt. Auf Vibratom-geschnittenem Gewebe, das nicht gefroren werden muss, funktionieren sowohl das in Kaninchen als auch das in Meerschweinchen erzeugte Antiserum gegen RNF6, wobei das aus Meerschweinchen stammende Serum besser (und auch in geringeren Konzentrationen 1 : 500 gegenüber 1 : 200) als das Kaninchenserum arbeitet (Daten nicht gezeigt; RNF6-Antiseren aus Meerschweinchen wurde auf Abb. 25 auf Vibratomschnitten vergewendet).



**Abb. 23 RLIM ist fast ausschließlich im Nukleus exprimiert, RNF6 ganz überwiegend im Cytoplasma.** CHO-Zellen wurden immobilisiert und einer Behandlung mit den RLIM- und RNF6-Antisera aus Meerschweinchen (g.pig) und Kaninchen (rab), sowie Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern unterzogen. Die eingesetzten Verdünnungen der primären Antikörper sind in der Abbildung angegeben. Diese Abbildung zeigt gleichzeitig, dass die verwendeten Antisera in immunocytochemischen Experimenten spezifisch RLIM bzw. RNF6 erkennen. Diese Abbildung wurde mir von Marvin Peters zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass spezifische Antisera gegen RNF6 generiert werden konnten, die nicht mit RLIM kreuzreagieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass die im Labor bereits vorhandenen RLIM-Antisera RLIM in immunocyto- und immunohistochemischen Experimenten spezifisch erkennen. Im Western-Blot erkennt der aus Kaninchen stammende Antiseren RLIM, zeigt aber auch eine, wenn auch deutlich geringere, Immunreaktivität mit RNF6.

#### 4.6. Expressionsvergleich der Proteine

Zunächst wurde die Expression beider Proteine auf immunocytochemischer Ebene in Zelllinien angesehen, um Aussagen über die Lokalisation der jeweiligen Proteine treffen zu können. Wie auf Abb.23, die mir mein Kollege Marvin Peters freundlicher Weise zur Verfügung gestellt hat, zu erkennen ist, erkennen alle vier verwendeten Seren (RLIM- und RNF6-Antisera jeweils aus Meerschweinchen und Kaninchen) die endogenen Proteine in CHO-Zellen. RLIM ist fast ausschließlich im Kern lokalisiert, während RNF6 erstaunlicher Weise vornehmlich im Cytoplasma

lokalisiert ist (Abb.23). Die Präimmunseren aus Meerschweinchen und Kaninchen zeigten keine Immunreaktivität, was auf die Spezifität der Antiseren hinweist (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis war aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen RLIM und RNF6 unerwartet.

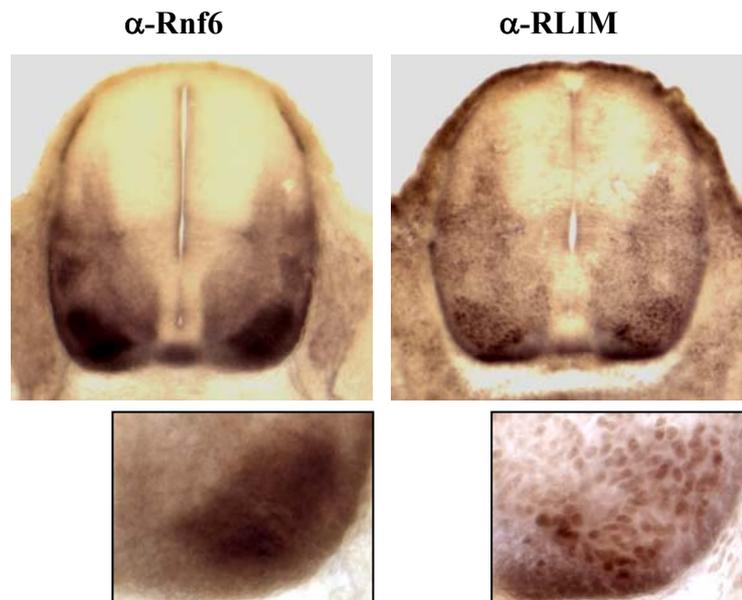
Eine weitere Abbildung von Marvin Peters in CHO-Zellen zeigt, dass RNF6 zwar vor allem im Cytoplasma, aber auch im Zellkern exprimiert wird (Abb.24). Im Zellkern ist RNF6 in kleinen Nukleärkörperchen ("nuclear bodies") exprimiert, die durch distinkte, punktartige Färbungen charakterisiert werden. Diese Daten werden unterstützt von einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um M. Rassoulzadegan (Lopez et al., 2002). Bei den Nukleärkörperchen könnte es sich um "PML-bodies" (promyelotic leukaemia nuclear bodies) handeln (Bloch et al., 1999; Lopez et al., 2002). "PML-bodies" sind Proteinaggregate die unter anderem PML, SP100, Daxx und SUMO enthalten. PML fungiert hierbei als das zentrale Protein ohne das die Bodies zerfallen (Maul et al., 2000). Transfiziert man PML in PML<sup>-/-</sup>-Zelllinien so kommt es zu einer *de novo*-Formation von PML-Bodies (Maul et al., 2000). Sie werden mit transkriptioneller Regulation assoziiert und als "nukleäre Depots" verschiedener Proteine betrachtet (Lopez et al., 2002). Bei akuter promyelotischer Leukämie sind die "PML-bodies" gestört. Die Abwesenheit von PML-bodies führt allerdings nicht zum Krankheitsbild der promyelotischen Leukämie (Maul et al., 2000).



**Abb. 24 RNF6 ist im Cytoplasma und in Nukleärkörperchen im Zellkern exprimiert.** Diese CHO-Zellen wurden immobilisiert und mit RNF6-Antiserum, sowie einem Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper behandelt. Diese Abbildung wurde mir von Marvin Peters zur Verfügung gestellt.

Im Folgenden wurde die Expression von RNF6 im Vergleich mit der Expression von RLIM in embryonalem Mausegewebe betrachtet. Besonderes Augenmerk wurde auf die Expression im Neuralrohr und den DRGs gelegt, da LIM-HD-Proteine dort exprimiert sind und eine für die Entwicklung wichtige Rolle spielen.

Auf der von meinem Kollegen Baris Tursun stammenden Abb.25 ist zu erkennen, dass sowohl RLIM als auch RNF6 stark im ventralen Teil des Neuralrohrs sowie in den DRG exprimiert sind. Andere Bereiche zeigen praktisch keine Expression der Proteine, was deutlich von dem in Kap.5.3. gezeigten mRNA-Muster abweicht. Die Abweichung beider Expressionsmuster deutet auf posttranslationale Regulation der Konzentration der Genprodukte hin.



**Abb. 25 RNF6 und RLIM sind sehr stark im ventralen Teil des Neuralrohrs und in den Spinalganglien exprimiert.** Vibratomschnitte des Neuralrohrs von Mäuseembryonen (E12,5; Thoraxregion) wurden in immunhistochemischen Experimenten mit RNF6 und RLIM-Antiseren behandelt. Die sehr viel distinktere Färbung in dem mit dem RLIM-Antiserum behandelten Schnitt zeigt die Lokalisation von RLIM im Zellkern, während die diffuse RNF6-Färbung auf eine cytoplasmatische Lokalisation hinweist. Diese Abbildung wurde mir von Baris Tursun zur Verfügung gestellt.

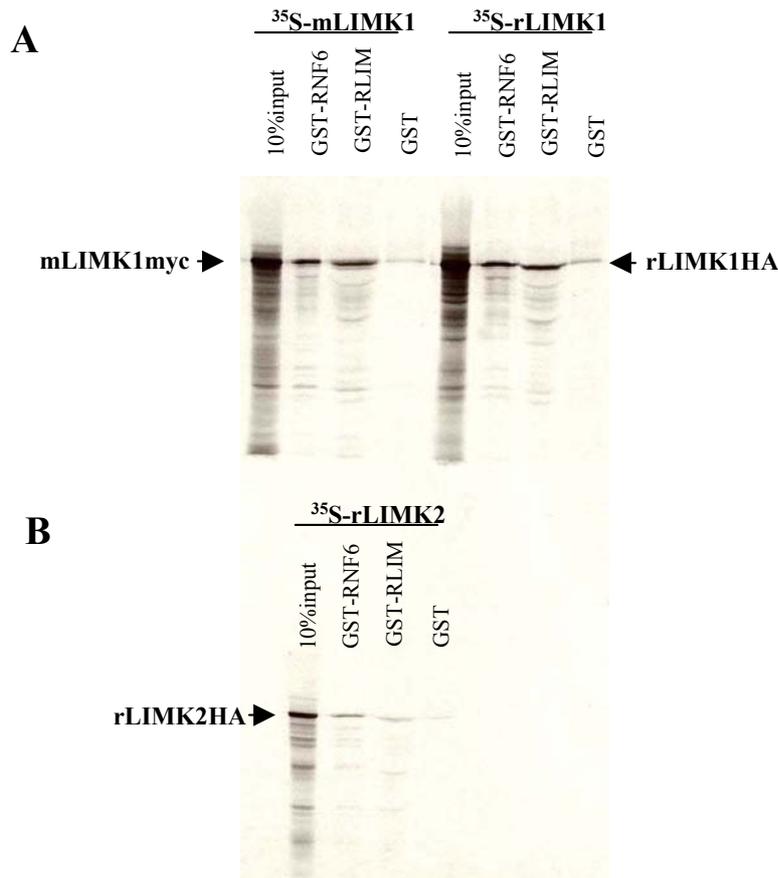
Bei näherem Betrachten der Abb.25 fällt zudem auf, dass die Färbung im Falle von RLIM sehr viel distinkter erscheint als die diffusere Färbung von RNF6. Dies ist zu erklären durch die vornehmlich nukleäre und damit distinkte Lokalisation von RLIM, während das vor allem im Cytoplasma lokalisierte RNF6 diffuser erscheint.

## 4.7. Funktion von RNF6 im Cytoplasma

### 4.7.1. Interaktion von RNF6 und RLIM mit LIMK

Aufgrund der Tatsache, dass RNF6 im Gegensatz zum nukleären RLIM, wie oben dargestellt, vor allem im Cytoplasma lokalisiert ist, wurden im Folgenden auch die Interaktion mit cytoplasmatischen Proteinen betrachtet. Da eine Bindung von RLIM

an LIM-Kinasen bereits gezeigt werden konnte (Bach et al., 1999), wurde mit LIMK1 und LIMK2 begonnen. Wie Abb.26A und Abb.26B zeigen, konnte eine Präzipitation von LIMK1 aus Maus und Ratte und von LIMK2 aus Ratte durch GST-RNF6 und GST-RLIM gezeigt werden. Die Kontrolle mit GST-Protein allein zeigt nur ein sehr schwaches Präzipitat.



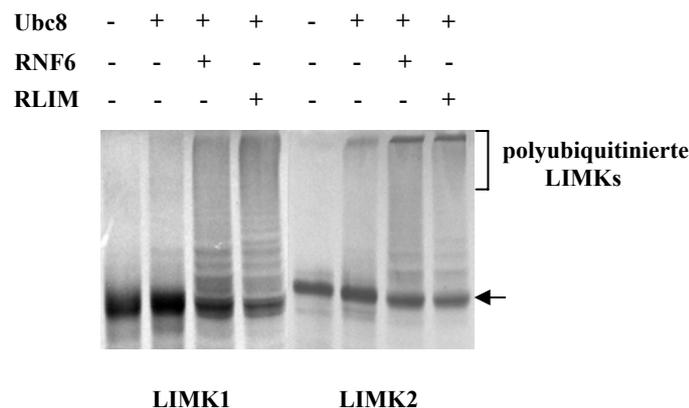
**Abb. 26 RNF6 und RLIM binden an LMK1 aus Maus und Ratte und an LMK2 aus Ratte. (A)** GST-RNF6 und GST-RLIM binden an <sup>35</sup>S-markiertes mLIMK1 (aus Maus) und an <sup>35</sup>S-markiertes rLIMK1 (aus Ratte), die GST-Kontrolle bindet dagegen nur sehr schwach. **(B)** GST-RNF6 und GST-RLIM binden an <sup>35</sup>S-markiertes rLIMK2 (aus Ratte), die GST-Kontrolle dagegen nicht.

Auch bei diesen Experimenten wurde das Gel vor dem Trocknen und dem Exponieren des Films kurz mit Coomassie gefärbt, um die Proteinmengen der GST-Konstrukte untereinander und mit denen der Kontrolle zu vergleichen (Daten nicht gezeigt). Es wurden nur Versuche verwendet, bei denen mindestens soviel GST-Kontroll-Protein aufgetragen worden war wie andere GST-Proteine. Die Mengen der anderen GST-Proteine waren immer untereinander vergleichbar.

Sowohl RLIM als auch RNF6 interagieren mit den cytoplasmatischen LIM-Proteinen LIMK1 und LIMK2.

#### 4.7.2. Ubiquitinierung von LIMK

Da sowohl RLIM als auch RNF6 an LIM-Kinase 1 und LIM-Kinase 2 binden (Kap.5.7.1.), wurde untersucht ob diese Proteine auch Substrate für Ubiquitinierungen sein können. LIMK1 und LIMK2 wurden *in vitro* translatiert und dabei mit  $^{35}\text{S}$  radioaktiv markiert. In den Spuren ohne E3 ist jeweils keine Polyubiquitinierung zu erkennen. Nach Zugabe von RNF6 oder RLIM und einer 2-stündigen Inkubation bei 30°C kommt es zu einer Polyubiquitinierung beider LIM-Kinasen (Abb.27). Aufgrund der Lokalisation in der Zelle kommt RNF6 auch eher als natürliche Ubiquitin-Ligase für LIM-Kinasen in Frage.

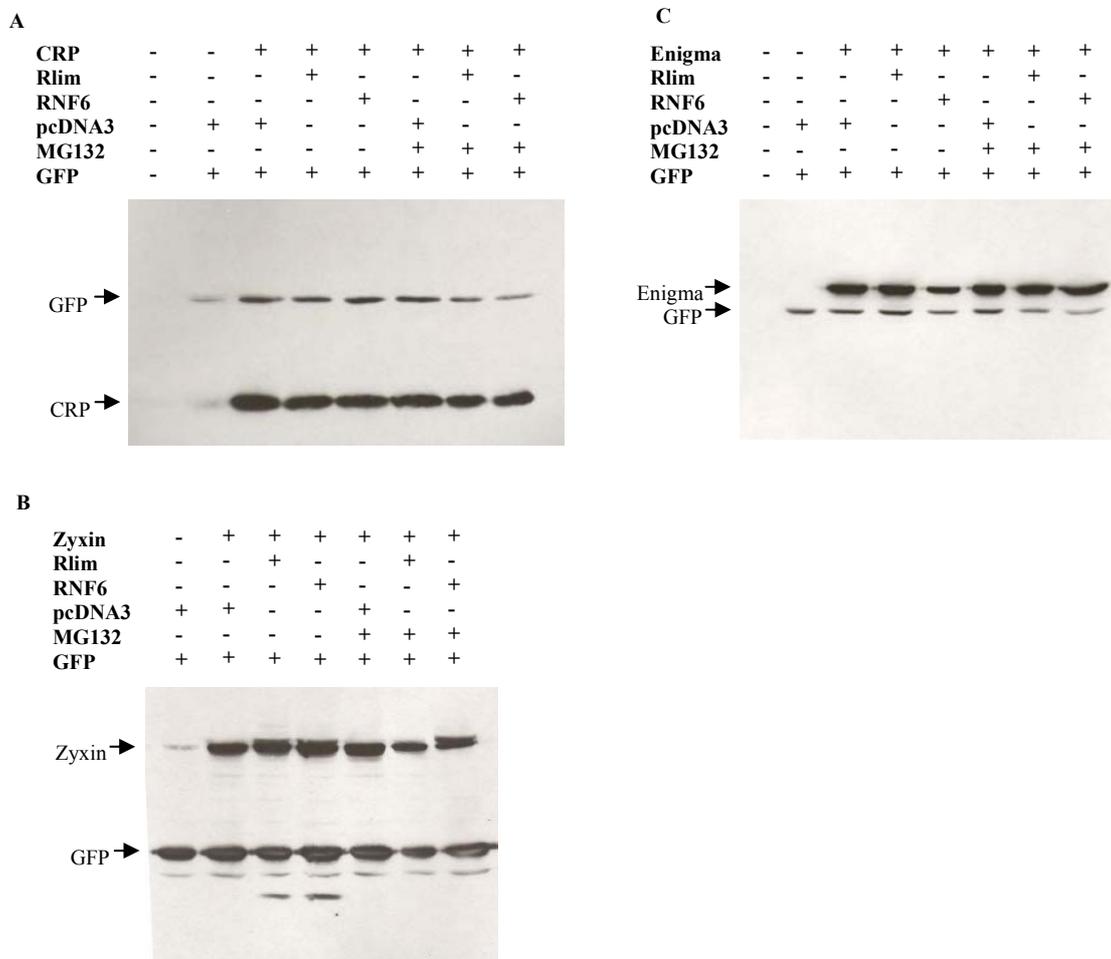


**Abb. 27 RNF6 und RLIM vermitteln in Anwesenheit von Ubc8 eine Polyubiquitinierung von LIMK1 und LIMK2.** Durch + oder – wird angezeigt, was dem in der entsprechenden Spur aufgetragenen Ansatz, zusätzlich zu dem in Kap. 4.2.10. beschriebenen Ubiquitinierungspuffer, zugefügt worden ist. Bakteriell exprimiertes GST-RLIM und GST-RNF6 können  $^{35}\text{S}$ -markiertes, *in vitro*-translatiertes LIMK1 und LIMK2 oligo- und polyubiquitinieren.

#### 4.7.3. Abbau transfizierter cytoplasmatischer Proteine in HEK 293T-Zellen

Da RNF6 vor allem im Cytoplasma lokalisiert ist, wurde sich im Folgenden cytoplasmatischen LIM-Proteinen zugewandt und untersucht, ob es durch kotransfiziertes RNF6/RLIM zu einem Abbau derselben kommen kann. Es wurden LIMK1, LIMK2, CRP (Cysteine-rich protein), Zyxin und Enigma untersucht. Abbildung 28 zeigt, dass es weder bei CRP noch bei Zyxin zu einem Abbau durch RNF6 oder RLIM kommt (Abb. 28A und Abb. 28B). In Abb. 28C sieht man einen

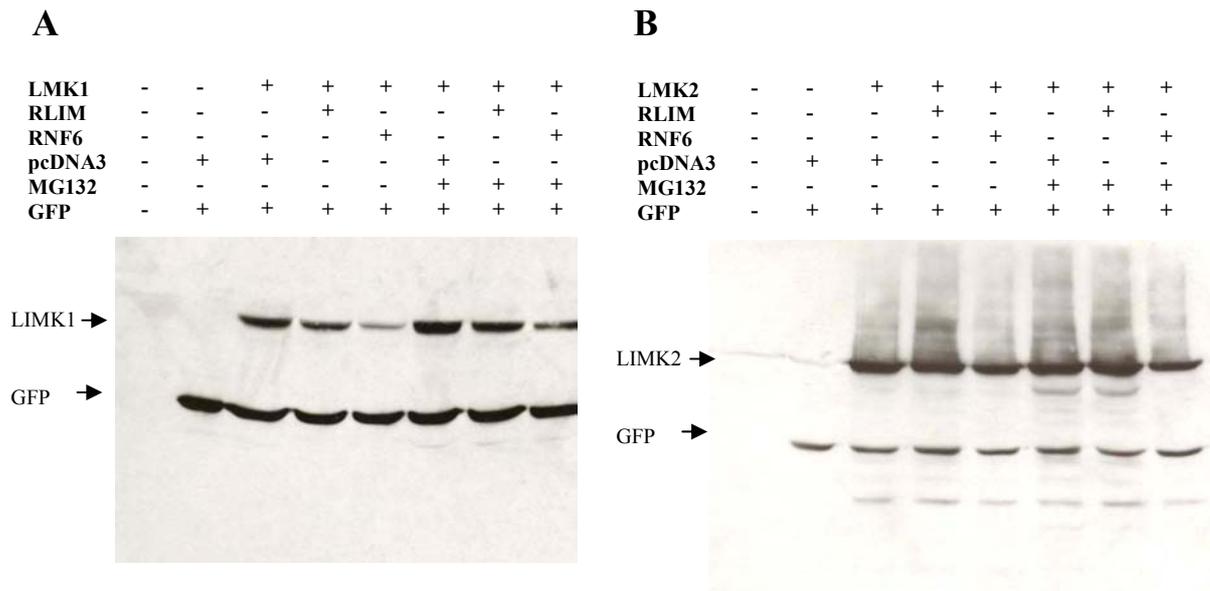
leichten Abbau von Enigma, wenn RNF6 kotransfiziert wurde (Spur 5). In Spur 8, in der der Ansatz augetragen wurde, dem zusätzlich noch der Proteasominhibitor MG132 zugefügt worden war, ist zu erkennen, dass die Bande wieder stärker ist. Das spricht dafür, dass es sich tatsächlich um proteasomalen Abbau handelt.



**Abb. 28 Eine Koexpression mit RNF6 vermittelt eine leichte Degradation von Enigma während CRP und Zyxin nicht abgebaut werden.** (A,B,C) Western Blots auf Gesamtproteinextrakten aus HEK293T-Zellen, die mit den jeweils durch ein + markierten Konstrukten kotransfiziert worden sind, wurden mit myc-Antikörpern behandelt, da die CRP-, Zyxin-, und Enigma-Konstrukte myc-markiert sind. Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Ladens der Proteinextrakte wurde GFP kotransfiziert und mit einem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht. In den letzten drei Spuren aller Membranen ist den Zellkulturschalen 6 h vor dem Ernten der Proteasominhibitor MG132 zugefügt worden. (C) Da Bande in der letzten Spur stärker ist als in Spur 5, ist der hier gezeigte geringfügige Abbau von Enigma tatsächlich proteasomal.

In den Kapiteln 5.7.1. und 5.7.2. ist aufgezeigt, dass RNF6 und RLIM an LIM-Kinasen binden und diese auch polyubiquitinieren können. Interessanterweise stellte sich nun heraus, dass aber nur eine Kotransfektion mit RNF6 auch zu einem effektiven Abbau von LIMK1 führt (Spur 5), während RLIM dieses Protein offenbar

nur polyubiquitinieren kann (Abb. 29A), eine Kotransfektion aber nicht zu einem signifikanten Abbau von LIMK1 führt (Spur 5). Der von RNF6 vermittelte Abbau der LIMK1 kann durch Zugabe des Proteasominhibitors MG132 inhibiert werden (Spur 8). Ein Abbau von LIMK2 ist weder bei einer Kotransfektion mit RNF6 noch mit RLIM deutlich zu erkennen und die Bande des Ansatzes, dem MG132 zugefügt worden war unterscheidet sich nicht von der Bande des Ansatzes ohne MG132 (Abb. 29B, Spur 5 und Spur 8).

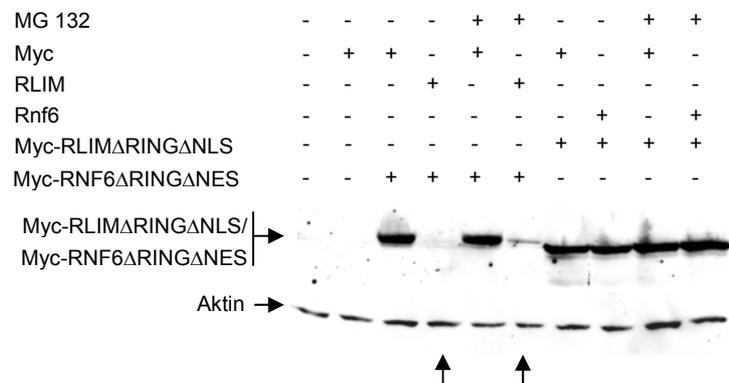


**Abb. 29 RNF6 vermittelt einen Abbau von LIMK1.** (A,B) Western-Blots auf Gesamtproteinextrakten aus HEK-Zellen, die mit den jeweils durch ein + markierten Konstrukten kotransfiziert worden sind, wurden mit HA-Antikörpern behandelt, da die LIMK-Konstrukte HA-markiert sind. Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Ladens der Proteinextrakte wurde GFP kotransfiziert und mit einem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht. In den letzten drei Spuren beider Membranen ist den Zellkulturschalen 6 h vor dem Ernten der Proteasominhibitor MG132 zugefügt worden. (A) Da Bande in der letzten Spur stärker ist als in Spur 5, ist der hier gezeigte Abbau von LIMK1 durch RNF6 tatsächlich proteasomal. (B) Ein Abbau von LIMK2 ist nicht zu erkennen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Kotransfektionsexperimente, dass die Fähigkeit bestimmte Proteine dem 26S-Proteasom-Abbauweg zuzuführen sich bei RLIM und RNF6 durchaus unterscheidet, obwohl das *in vitro*-Ubiquitinierungsmuster ähnlich ist. So führt nur kotransfiziertes RLIM zu einem Abbau von CLIM-Proteinen und nur RNF6 kann LIMK1 dem Abbauweg zuführt, obwohl CLIM und LIMK1 von RLIM und RNF6 polyubiquitiniert werden.

Da RLIM und RNF6 jeweils sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus vorkommen, aber unterschiedliche Schwerpunkte zeigen und beide Proteine

miteinander interagieren sowie sich gegenseitig polyubiquitinieren, lag es nahe zu überprüfen, ob RLIM und RNF6 eine gegenseitige Degradation vermitteln. In Kotransfektionen von RNF6 $\Delta$ RING mit RLIM sowie RLIM $\Delta$ NLS $\Delta$ RING (befindet sich aufgrund der fehlenden NLS, wie endogenes RNF6, im Cytoplasma) mit RNF6 konnte gezeigt werden, dass RLIM, wenn kotransfiziert, tatsächlich zum Abbau von RNF6 führt (Abb. 30, Spur 4). Auch hier konnte über einen Ansatz dem MG132 zugefügt worden war gezeigt werden, dass der vermittelte Abbau über das Proteasom läuft (Abb. 30, Spur 6). Es konnte dagegen nicht gezeigt werden, dass auch RNF6, wenn kotransfiziert, einen Abbau von RLIM bewirken kann (Spur 8). Auffällig ist dass auch die Polyubiquitinierung von RNF6 durch RLIM stärker ist, als umgekehrt.



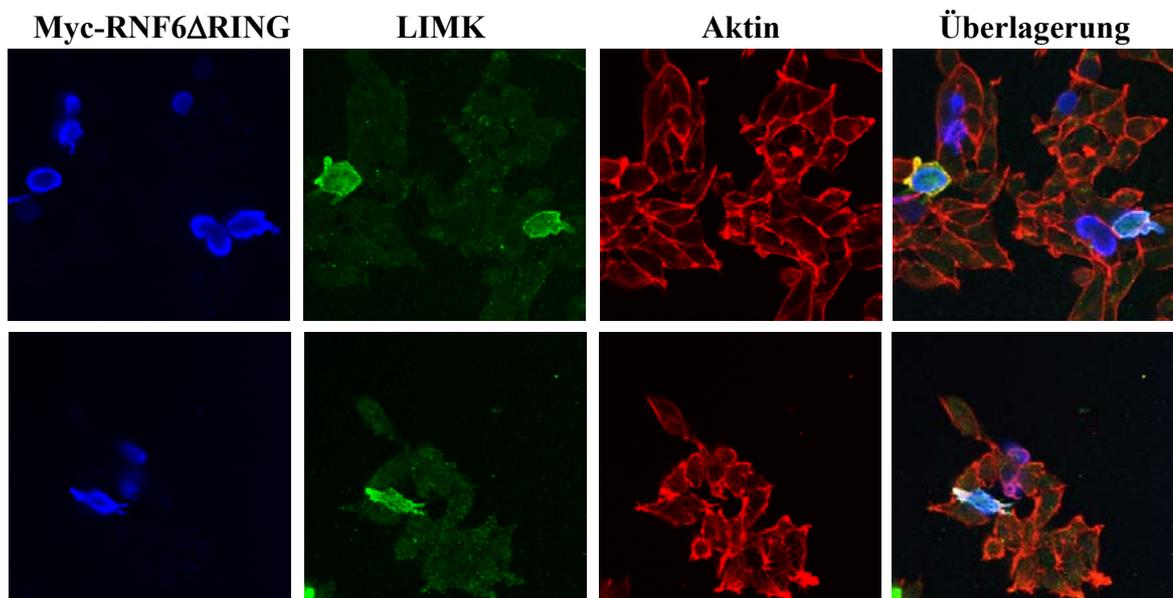
**Abb. 30 RLIM vermittelt einen Abbau von RNF6, aber RNF6 kann keinen Abbau von RLIM vermitteln.** Western-Blots auf Gesamtproteinextrakten aus HEK293T-Zellen, die mit den jeweils durch ein + markierten Konstrukten kotransfiziert worden sind, wurden mit myc-Antikörpern behandelt, da die RLIM $\Delta$ RING $\Delta$ NLS- und RNF6 $\Delta$ RING $\Delta$ NES-Konstrukte myc-markiert sind. Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Ladens der Proteinextrakte wurde außerdem  $\beta$ -Aktin mit Hilfe eines  $\beta$ -Aktin-Antikörpers sichtbar gemacht. In Spur 4 ist der Abbau von RNF6 $\Delta$ RING $\Delta$ NES durch RLIM zu erkennen. Die Bande ist in Spur 6 teilweise wiederhergestellt, was zeigt, dass es sich um einen proteasomalen Abbau handelt. In den Spuren 8 und 10 ist kein Abbau von RLIM $\Delta$ RING $\Delta$ NLS durch RNF6 zu erkennen.

#### 4.7.4. Abbau endogener LIMK durch RNF6 in HEK 293T-Zellen

Um der Situation in der Zelle näher zu kommen als dies der Fall ist, wenn man den Abbau transfizierter Proteine betrachtet, wurde der Abbau endogener LIMK in HEK 293T-Zellen betrachtet.

Aus ähnlich aufgebauten Versuchen zum Abbau endogenen CLIM-Proteins durch RLIM-vermittelte Ubiquitinierung war bekannt, dass der Abbau endogenen CLIM-

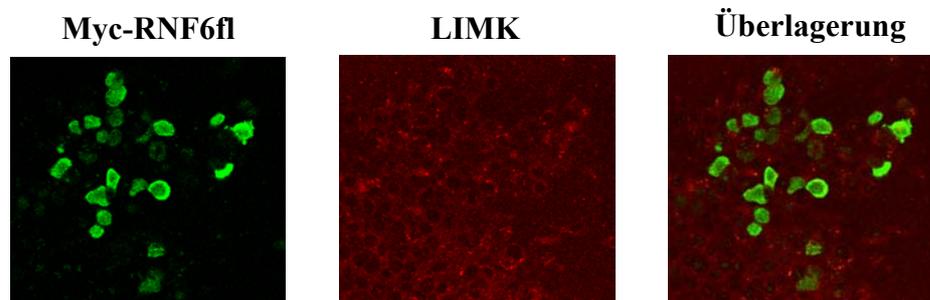
Proteins, welches in relativ geringen Mengen vorkommt, sehr schlecht zu erkennen ist (Ostendorff et al., 2002). Ebenso war bekannt, dass dagegen ein Ansteigen der CLIM-Konzentration deutlich zu sehen war, wenn RLIM $\Delta$ RING transfiziert worden war (Ostendorff et al., 2002). RLIM $\Delta$ RING wirkt dominant negativ, da der die Ubiquitin-Ligase-Aktivität vermittelnde RINGfinger deletiert ist, das Protein seine sonstigen Bindungseigenschaften aber behält. Die Transfektion des dominant-negativen RLIM-Konstruktes verhindert den Abbau der Proteine. Es kommt zu einer Anreicherung von CLIM, die in immuncytochemischen Nachweisen gut zu erkennen ist, da aufgrund des fehlenden RINGfingers keine Ubiquitinierung mehr möglich ist, das überexprimierte Konstrukt aber weiterhin an CLIM bindet und gegenüber nativen RLIM im Überschuss vorhanden ist.



**Abb. 31** Die endogene LIMK-Konzentration von ca. 20 % der mit Myc-RNF6 $\Delta$ RING transfizierten HEK293T-Zellen nimmt zu. HEK293T-Zellen wurden mit Myc-RNF6 $\Delta$ RING transfiziert und die Konzentration von endogener LIMK und endogenem Aktin beobachtet. Neben der LIMK-Konzentration nimmt auch die Anzahl der Aktin-Stressfibrillen in den transfizierten Zellen zu. In einer Reihe ist jeweils derselbe Ausschnitt dargestellt.

Analog zu den vorherigen Experimenten wurde jeweils RNF6 oder RNF6 $\Delta$ RING in die Zellen transfiziert und endogene LIM-Kinase und endogenes  $\beta$ -Aktin betrachtet. Wie schon gezeigt, führt RNF6, wenn kotransfiziert, zum Abbau von transfizierter LIMK1. Daher lag die Vermutung nahe, dass RNF6 $\Delta$ RING, wenn man es in HEK 293T-Zellen transfiziert, auch zum Ansteigen endogener LIM-Kinase führen kann. Da LIM-Kinase am Aktin-Skelett lokalisiert ist und dafür bekannt ist den Aktin-bindenden Depolymerisierungsfaktor Cofilin zu phosphorylieren, wurde auch die

Bildung von Aktin-Stressfasern ("stressfibers") in transfizierten Zellen untersucht. Um Cofilin zu phosphorylieren muss LIM-Kinase allerdings aktiv sein (siehe Einleitung). Aufgrund der nötigen Phosphorylierung von LIMK ist dieser Effekt nur

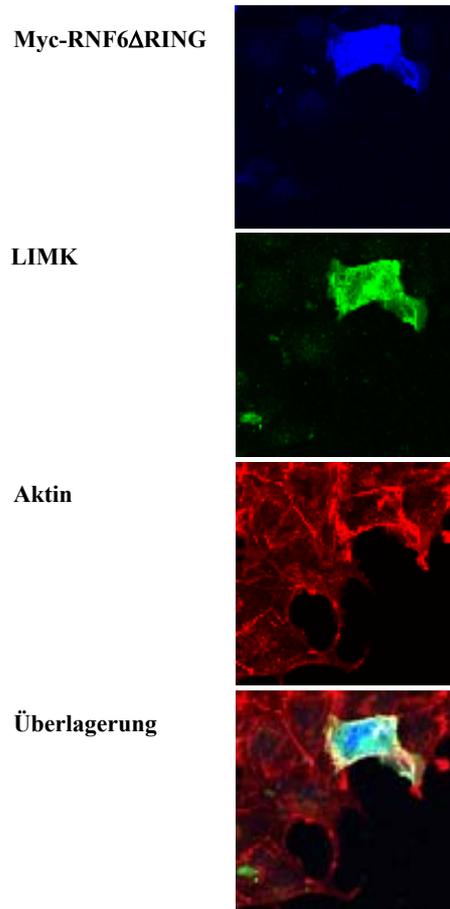


**Abb. 32** Bei einer Transfektion von RNF6 voller Länge nimmt die endogene LIMK-Konzentration nicht zu. HEK293T-Zellen wurden mit Myc-RNF6 voller Länge (Myc-RNF6fl) transfiziert und die Konzentration von endogener LIMK beobachtet. Es ist auf jedem Bild derselbe Ausschnitt dargestellt.

in einigen Zellen zu erwarten. Die folgenden Abbildungen zeigen, dass eine Transfektion mit RNF6 $\Delta$ RING zumindest in ca. 20 % der transfizierten Zellen zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration von LIMK in der Zelle führt (Abb. 31) und dass dies bei einer Transfektion mit RNF6 in voller Länge nicht der Fall ist (Abb. 32). Weniger gut zu erkennen ist auf denselben Abbildungen, dass die Aktinfärbung in einigen der Zellen, in denen die LIM-Kinase-Konzentration steigt, ebenfalls zunimmt, was auf eine Zunahme der Stressfasern schließen lässt. Da die LIMK dafür aktiv sein muss, ist der geringe Prozentsatz zu erwarten. Aufgrund des kleinen Cytoplasmas der HEK293T-Zellen ist dieser Effekt nicht so gut zu erkennen. Daher wurde der Versuch auch in COS7-Zellen durchgeführt. COS7-Zellen verfügen über ein, im Verhältnis zu Zellkern, deutlich größeres Cytoplasma. Auf Abbildung 33 ist zu sehen, dass der Effekt in diesen Zellen deutlicher zu erkennen ist.

Dass es auch im Gewebe von Mäusembryonen zu einer Kolo-kalisation von RNF6 und LIMK kommt, zeigen Experimente meines Kollegen Baris Tursun. Er konnte zeigen, dass beide Proteine im ventralen Neuralrohr und in axonalen Projektionen (Abb. 34) sowie in hippokampalen Neuronen vorkommen. Die Färbung in erb<sup>-/-</sup>-Embryonen zeigt, dass es sich tatsächlich um axonale Projektionen und nicht um Gliazellen handelt, da diese Mutante keine Gliazellen bildet (Riethmacher et al., 1997). Die elektronenmikroskopische Abteilung unseres Hauses konnte zeigen, dass RNF6 besonders stark in den Wachstumskegeln (Abb. 35A) und den Synapsen (Abb. 35B) der axonalen Projektionen exprimiert ist. Auch hier sind LIMK und

RNF6 koexprimiert (Daten nicht gezeigt). Eine Regulation der LIMK-Konzentration durch RNF6 im Mäusembyo ist damit wahrscheinlich.

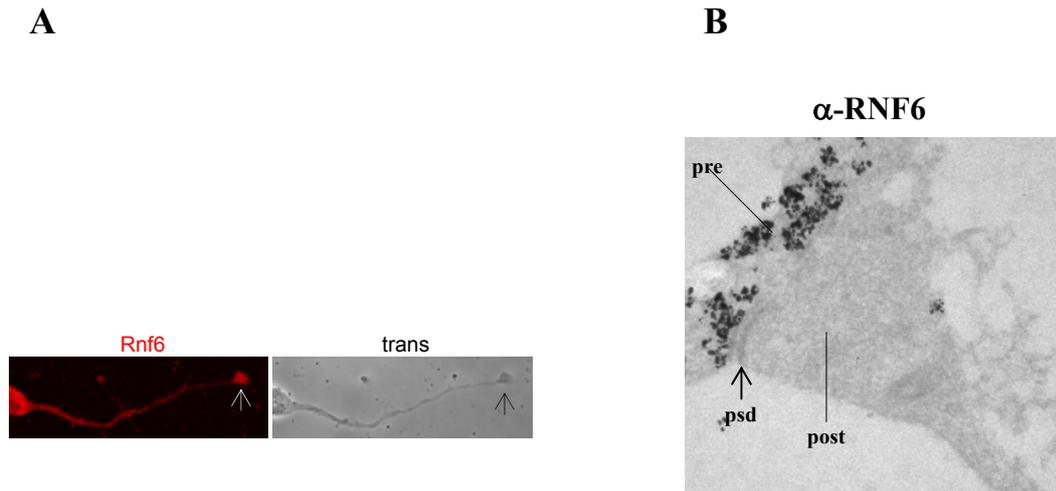


**Abb. 33** Die endogene LIMK-Konzentration und die Menge der Aktin-Stressfibrillen der hier beispielhaft gezeigten mit Myc-RNF6 $\Delta$ RING transfizierten COS7-Zelle nimmt zu. COS7-Zellen wurden mit Myc-RNF6 $\Delta$ RING transfiziert und die Konzentration von endogener LIMK und endogenem Aktin beobachtet. Es ist auf jedem Bild derselbe Ausschnitt dargestellt.



**Abb. 34** RNF6 und LIMK1 kolokalisieren im ventralen Teil des Neuralrohrs und in axonalen Projektionen. Vibratomschnitte des Neuralrohrs von Mäuseembryonen (E12,5, Lumbaregion) wurden in immunhistochemischen Experimenten mit RNF6- und LIMK1-Antisera behandelt. Auf dem letzten Bild wurde eine von PD Dr. D. Riethmacher zur Verfügung gestellte  $erb^{-/-}$ -Maus verwendet, die keine Gliazellen hat. Daher handelt es sich bei den mit einem Pfeil markierten Strukturen tatsächlich um axonale Projektionen. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Baris Tursun durchgeführt. Die Abbildung wurde von Baris Tursun angefertigt.

RNF6 vermittelt die Polyubiquitinierung von LIMK1 und LIMK2, führt aber in Kotransfektionen nur zu einem Abbau von LIMK1. Es konnte auch gezeigt werden, dass ein Abbau endogener LIMK durch eine Transfektion mit einem dominant-negativen RNF6-Konstrukt nicht mehr möglich ist und es daher zu einer Anreicherung kommt, was auch mit einem Anstieg der Aktin-Konzentration korreliert.



**Abb. 35 RNF6 ist besonders stark in Wachstumskegeln und Synapsen von axonalen Projektionen exprimiert.** (A) Fluoreszenz-markierte Antikörper zeigen die Verteilung von RNF6 in einem Axon mit besonders starker Expression im durch einen Pfeil markierten Wachstumskegel. Daneben die Durchlichtaufnahme desselben Axons. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme der RNF6-Expression in Synapsen. Diese Abbildung wurde von der elektronenmikroskopischen Abteilung unseres Hauses aufgenommen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das vorwiegend cytoplasmatisch exprimierte RNF6, wie RLIM, eine Ubiquitin-Ligase ist, die im LIM-Protein-Netzwerk wirkt. LIMKs konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Substrate von RNF6 definiert werden. LIMKs und RNF6 sind im Cytoplasma und in axonalen Projektionen kolokalisiert, was ein ganz anderes Wirkungsspektrum für RNF6 nahelegt, als es für das hauptsächlich im Zellkern wirkende RLIM der Fall ist.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. RLIM und RNF6 – eine Protein-Familie?

Die Familie der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren und auch die CLIM-Kofaktor-Familie mit den beiden Vertretern CLIM1 und CLIM2 treten in Säugetieren, vermutlich aufgrund von Genduplikationen, paarweise auf und können sich teilweise sogar funktionell ersetzen (Dawid, 1998; Hobert & Westphal, 2000; Abb.1). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kofaktoren RLIM und RNF6 eine Familie von RINGfinger-Proteinen definieren.

Eine Suche in der NCBI-Datenbank ergab, dass RNF6 dasjenige Protein ist, das mit ca. 45 % Aminosäureidentität RLIM am ähnlichsten ist. Besonders stark konserviert sind beide Proteine im Bereich der funktionellen Domänen, der N-terminalen Leuzin-Zipper-ähnlichen Domäne, der Basischen Domäne 2, der NES sowie des RINGfingers (Abb.5). Die Region die bei RLIM als NLS definiert werden konnte, ist in RNF6 nicht besonders gut konserviert. Dagegen enthält RNF6 eine andere basische Region, die von meinem Kollegen Marvin Peters als NLS definiert werden konnte und in RLIM schlecht konserviert ist. Aufgrund der hohen Aminosäure-Sequenzhomologie sowie der funktionellen Ähnlichkeit beider Proteine können sie einer Familie zugerechnet werden. Es ist möglich, dass auch diese Familie durch Genduplikation entstanden ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass RLIM und RNF6 sich, wie z.B. *Lhx3* und *Lhx4*, ganz oder zumindest teilweise funktionell ersetzen können ist gering, da sie ihre hauptsächliche Funktion in unterschiedlichen Kompartimenten ausüben.

Analog zu den LIM-HD-Proteinen und den CLIM-Kofaktoren besteht die RLIM/RNF6-Familie aus mindestens zwei Mitgliedern. Möglicherweise gehören zu dieser Familie aber auch noch weitere, bisher noch nicht als solche identifizierte Mitglieder. Ein potentieller Kandidat ist RNF5, ein RINGfinger-Protein, dass als Ubiquitin-Ligase des LIM-Proteins Paxillin identifiziert werden konnte (Didier et al., 2003).

## 5.2. Expression von RNF6 in Geweben

### 5.2.1. Expression der mRNA von RNF6

Northern-Blot-Experimente zeigen, dass Rnf6 und Rnf12 mRNAs ab dem untersuchten Embryonaltag 7 ubiquitär exprimiert sind. In unserem Labor konnte außerdem gezeigt werden, dass schon in ES-Zellen die mRNA beider Gene exprimiert wird. Eine so frühe Expression lässt auf eine sehr wichtige biologische Funktion schließen. Auch *in situ*-Hybridisierungen mit Schnitten durch das Neuralrohr von Mäusen des Embryonaltages 11,5 zeigen eine ubiquitäre Expression der mRNAs beider Gene. Für Rnf12 ist bekannt, dass sowohl ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und RBP-J, als auch spezifische Transkriptionsfaktoren, wie Pu.1 und Sox an den Promotor binden (Ostendorff et al., 2000). Unter anderem diese Kombination wird dafür verantwortlich gemacht, dass RLIM ubiquitär, aber an einigen Stellen stärker exprimiert ist. Auch Enhancer spielen vermutlich eine Rolle, die bisher noch nicht genau geklärt werden konnte. Eine Promotoranalyse von Rnf6 steht noch aus, aber auch für dieses Gen ist aufgrund des sehr breiten mRNA-Expressionsmusters eine Bindung sowohl ubiquitärer als auch spezifischer Transkriptionsfaktoren zu vermuten.

In adulten Tieren zeigt sich ebenfalls ein weitgehend ubiquitäres mRNA-Expressionsmuster, wobei Rnf6 in Milz und Skelettmuskel und Rnf12 in Lunge und Skelettmuskel nur sehr schwach exprimiert sind. LIM-HD-Transkriptionsfaktoren spielen vor allem während der Entwicklung eine große Rolle (Bach, 2000; Hobert & Westphal, 2000). Da Rnf6 und Rnf12 mRNAs, wie die Northern-Blot-Experimenten zeigen, auch im adulten Tier ubiquitär exprimiert sind, ist zu vermuten, dass beide Kofaktoren auch mit Proteinen des Cytoplasmas und des Nukleus interagieren, die anderen Familien zugerechnet werden. Viele Kofaktoren sind in der Lage Transkriptionsfaktoren verschiedener Klassen zu binden. Für CLIM ist beispielsweise eine Bindung an den zur Bicoid-Klasse der Homeodomänen-Proteinen gehörenden Transkriptionsfaktor P-OTX (Pitx1) bekannt (Bach et al., 1997).

### 5.2.2. Expression der Proteine

Das Proteinexpressionsmuster von RLIM und RNF6 während der Embryogenese der Maus (E11,5) unterscheidet sich gravierend von dem der mRNA. Die Proteinexpression ist keineswegs homogen, sondern innerhalb eines Gewebes gibt es Bereiche stärkerer und Bereiche schwächerer Expression. Die abweichenden Muster lassen eine posttranslationale Regulation vermuten. Da RLIM und RNF6 Ubiquitin-Protein-Ligasen mit Autoubiquitin-Ligase-Aktivität sind, ist anzunehmen, dass die Regulation zumindest teilweise durch Autoubiquitinierungen erreicht wird. Es wäre allerdings auch denkbar, dass die Proteinmenge über eine unterschiedliche Translationsrate reguliert wird.

Beide Proteine werden in den hier untersuchten Geweben vor allem im ventralen Neuralrohr und in den Spinalganglien exprimiert. Für spezifische Neuronen des ventralen Neuralrohrs sind LIM-HD-Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *Is1*, von großer Bedeutung (Lee & Pfaff, 2001; Briscoe & Ericson, 2001). Auch RLIM und RNF6 sind in diesen Bereichen besonders stark exprimiert. Für RLIM, wie auch für CLIM konnte eine Kollokalisierung mit *Is1* gezeigt werden (Ostendorff, 2002). Auch RNF6 ist in denselben Zelltypen stark exprimiert. Das öffnet die Möglichkeit, dass sowohl RLIM, über die Regulation von CLIM, als auch möglicherweise RNF6, in die Regulation der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren in diesen Geweben involviert sind. Da RNF6 jedoch im Nukleus nur schwach exprimiert ist, ist unwahrscheinlich, dass dieses Protein in die Regulation der LIM-HD-Transkriptionsfaktoren involviert ist.

RNF6 ist außerdem in axonalen Projektionen sowie in hippocampalen Neuronen exprimiert. Das Protein-Expressionsmuster von RNF6 ähnelt in diesen Regionen dem von den ebenfalls primär cytoplasmatischen LIMKs, was zeigt, dass LIMKs mögliche *in vivo*-Substrate von RNF6 sind.

### 5.2.3. zelluläre Expression von RNF6

Expressionsanalysen mit spezifisch gegen RNF6 bzw. RLIM gerichteten Antikörpern haben ergeben, dass RNF6 vor allem im Cytoplasma vorkommt, während RLIM ein vornehmlich nukleäres Protein ist. Da beide Proteine sowohl eine NES als auch eine NLS enthalten war dieses Ergebnis nicht unbedingt zu erwarten. Marvin Peters

konnte in funktionellen Experimenten zeigen, dass die Wirkung der NLS von RLIM stärker ist als die der NES, während in RNF6 die Wirkung der NES stärker ist. So ist zu erklären, warum die RLIM ein größtenteils nukleäres und RNF6 ein größtenteils cytoplasmatisches Protein ist. Warum NLS und NES unterschiedlich stark sind, konnte bisher nicht genau erklärt werden. Eine Möglichkeit ist, dass unterschiedliche NLS und NES sich aufgrund ihrer Sequenz in ihrer Stärke unterscheiden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Lokalisationssignale unter bestimmten Umständen maskiert und demaskiert werden können und auf diese Weise reguliert werden, was besser erklären würde, dass beide Proteine sich in geringerem Maße auch in dem zweiten Kompartiment befinden. Wir konnten beobachten, dass RNF6 $\Delta$ RING im Nukleus oft stärker exprimiert ist als RNF6 voller Länge. Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass der RINGfinger ein möglicher Inhibitor der NES ist, so dass bei RNF6 $\Delta$ RING die NLS die sonst stärkere NES dominiert. Aufgrund der räumlichen Nähe des RINGfingers und der NES wäre es denkbar, dass eine strukturelle Veränderung des Proteins ohne RINGfinger dazu führt, dass die NES nicht mehr funktionell ist.

### **5.3. Die Rolle von RNF6 in unterschiedlichen Zellkompartimenten**

#### **5.3.1. RNF6 im Cytoplasma**

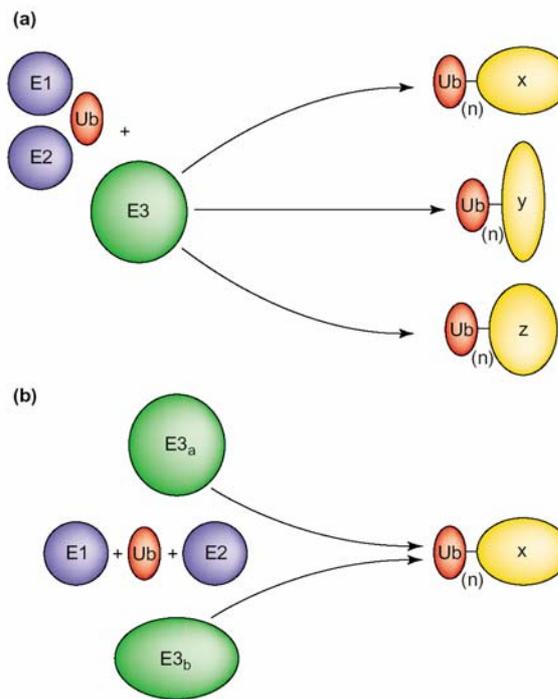
Die auffällig starke Expression von RNF6 im Cytoplasma lässt auf eine wichtige Aufgabe, die dieses Protein in diesem Kompartiment übernimmt, schließen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RNF6 LIMK1 und LIMK2 bindet, polyubiquitiniert und eine Degradation von LIMK1 auslöst. Damit ist RNF6 maßgeblich in die durch LIMK1 beeinflussten cytoplasmatischen Prozesse involviert.

Über die Phosphorylierung von Cofilin durch LIMK wird dieses inaktiv und kann Aktin nicht mehr depolymerisieren. Daher kommt es zu vermehrter Formierung von Aktin-Stressfibrillen, was wiederum eine Reihe von zellulären Konsequenzen hat. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von LIMK1 ohne LIM-Domänen zu einer noch stärkeren Formation von Aktin-Stressfibrillen führt (Arber et al., 1998, Stanyon & Bernard, 1999). Da bereits gezeigt worden ist, dass RLIM die LIM-Domänen der LIMKs bindet, ist anzunehmen, dass auch das mit LIMKs

interagierende RNF6 an die LIM-Domänen der Kinasen bindet. RNF6 könnte an LIMK1 ohne LIM-Domänen dann nicht binden, LIMK1 könnte nicht abgebaut werden und es käme zu einer noch stärkeren Phosphorylierung und der damit verbundenen Inaktivierung von Cofilin, was zu der beschriebenen noch stärkeren Formierung von Aktin-Stressfibrillen führen könnte.

Die Entwicklung des Nervensystems beruht unter anderem darauf, dass das Auswachsen der Neurone gesteuert wird. Die Rho-induzierte Formierung von Aktin-Stressfibrillen führt zu einem Kollaps der Wachstumskegel der Axone, was ein Zurückziehen der Neurone als Antwort auf negative Signale ermöglicht (Gungabissoon & Bamberg, 2003). Der Wachstumskegel der Axone ist eine sehr dynamische Struktur, die in der Lage sein muss, schnell auf Signale zu reagieren, was dadurch erschwert wird, dass der Wachstumskegel weit vom Zellkörper entfernt liegt. Ideale Mechanismen für schnelle und dennoch spezifische Reaktionen bieten unter anderem Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen (Hedge & DiAntonio, 2002). In Wachstumskegeln der *Xenopus* Retina konnten E1, Ubiquitin und Proteasome nachgewiesen werden (Campbell & Holt, 2001). Außerdem konnten die Autoren zeigen, dass fünf Minuten nach der Behandlung mit Signalfaktoren die Menge ubiquitiniertes Proteine im Wachstumskegel verdoppelt ist und dass die Reaktion auf die Signale von funktionsfähigen Proteasomen abhängig ist. Da RNF6 eine Ubiquitin-Protein-Ligase ist, die in den Wachstumskegeln von Axonen stark exprimiert ist, ist RNF6 aller Wahrscheinlichkeit nach auch an Ubiquitinierungsprozessen in dieser Region beteiligt. Richtungswechsel der Axone werden durch schnelles Polymerisieren und Depolymerisieren von Aktinfilamenten und Mikrotubuli gewährleistet. Beides sind polare Strukturen, die an ihrem –Ende depolymerisieren und an ihrem +Ende polymerisieren und so in eine bestimmte Richtung wachsen können (Dent & Gertler, 2003). Axone wechseln dann die Wachstumsrichtung, wenn auf einer Seite des Wachstumskegels negative Signale, die zum Abbau des Cytoskeletts führen eingehen, während auf der anderen Seite positive Signale eingehen, die ein Wachstum in die entsprechende Richtung bewirken (Dickson, 2001). Es gibt zwei verschiedene Modelle, wie die von außen kommenden Signale Einfluss auf die Dynamik des Cytoskeletts nehmen können (Dickson, 2001). Wahrscheinlich werden beide Mechanismen in der Zelle angewendet (Dickson, 2001). Entweder wirken die Signale direkt auf das Aktin-Cytoskelett (permissives Modell), oder die Signale aktivieren Rho und Rac-Kinasen,

die wiederum über den beschriebenen Weg Einfluss auf die Strukturen des Wachstumskegels haben (instruktives Modell). Da Rho- und Rac-Kinasen über ROCK, bzw. PAK die LIMKs phosphorylieren und die Menge der vorhandenen LIMKs über RNF6 gesteuert wird, ist es wahrscheinlich, dass RNF6 von entscheidender Bedeutung für diesen wichtigen entwicklungsbiologischen Prozess ist.



**Abb. 36 Substratspezifität von Ubiquitinligasen. (A)** Eine Ubiquitin-Ligase (grün) kann in Anwesenheit von Ubiquitin (rot), E1 (lila) und E2 (lila) verschiedene Substrate (gelb) ubiquitinieren. **(B)** Ein Substrat kann in Anwesenheit von Ubiquitin, E1 und E2 von unterschiedlichen Ubiquitin-Ligasen modifiziert werden. Aus: Ostendorff & Bach, 2003.

Es ist bekannt, dass Ubiquitin-Ligasen mehrere Substrate haben können (Abb. 36; Bach & Ostendorff, 2003). Als cytoplasmatisches Substrat von RNF6 konnten wir bisher nur die LIMKs identifizieren. Es ist aber wahrscheinlich, dass weitere cytoplasmatische Substrate von RNF6 existieren. Auch das breite Expressionsmuster von RNF6 legt diese Vermutung nahe. Untersuchungen der elektronenmikroskopischen Abteilung unseres Hauses haben gezeigt, dass RNF6 im Cytoplasma von Nervenzellen verstärkt in Synapsen exprimiert wird. Dies Ergebnis ist von großer Bedeutung, da in jüngerer Zeit die Rolle von Ubiquitinierungen in Synapsen bekannt geworden ist (Hedge & DiAntonio, 2002). Es gibt Ubiquitin-Ligasen, die die in Postsynapsen lokalisierten Rezeptoren von Neurotransmittern monoubiquitinieren, was deren Internalisation und den Abbau über den lysosomalen

Weg (statt einem Recycling) zur Folge hat. So werden zum Beispiel die Glutamat- und Glycin-Rezeptoren durch Ubiquitinierungen kontrolliert (Buttner et al., 2001; Burbea et al., 2002). Es besteht auch die Möglichkeit, dass Ubiquitinierungen bei dem Freisetzen von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt eine Rolle spielen. So wird z.B. das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin durch E3-Ubiquitin-Ligasen kontrolliert (Wheeler et al., 2002). Da RNF6 verstärkt in Synapsen exprimiert ist, könnte es noch weitere Substratproteine geben, die in die Regulation der Synapsen involviert sind.

Es konnte in dieser Arbeit auch ein schwacher Abbau des cytoplasmatischen LIM-Proteins Enigma bei einer Koexpression mit RNF6 nachgewiesen werden. Enigma kommt damit als weiteres Substrat von RNF6 in Frage. Enigma wird mit dem Cytoskelett von Muskelzellen assoziiert, in denen es vermutlich als Adapterprotein andere Proteine zum Cytoskelett rekrutiert. Auch RNF6 stellt ein Protein dar, das an verschiedene Proteine binden kann und am Aufbau von Multiproteinkomplexen beteiligt ist. Eventuell ist es nicht nur in den Aufbau von neuronalen, sondern auch von muskulären Cytoskelettstrukturen involviert.

### **5.3.2. RNF6 im Zellkern**

RNF6 konnte auch im Zellkern nachgewiesen werden. Im Cytoplasma konnte eine starke Expression nachgewiesen werden, während im Zellkern wenig RNF6 exprimiert ist. Nukleäres RNF6 ist mit PML-bodies kolokalisiert. Dieses Expressionsmuster bestätigt die Daten von Lopez et al., 2002. Da RLIM vor allem im Zellkern und nur in geringem Maße auch im Cytoplasma exprimiert ist, ist zu vermuten, dass RLIM seine hauptsächliche Funktion im Zellkern ausübt, während RNF6 vor allem im Cytoplasma von Bedeutung sein wird. Die Funktion von RLIM als Ubiquitin-Ligase ist in Ostendorff et al., 2002 beschrieben. Aufgrund der übereinstimmenden Bindungseigenschaften und Substratspezifitäten bei *in vitro*-Ubiquitinierungsreaktionen von RLIM und RNF6 könnte RNF6 im Zellkern mit RLIM um sämtliche Bindungspartner konkurrieren und damit in das nukleäre LIM-Protein-Netzwerk eingreifen. Da RNF6 aber in PML-bodies lokalisiert ist, haben beide Proteine *in vivo* in der Regel wahrscheinlich wenig Kontakt, es sei denn, die PML-bodies werden aufgelöst, und RNF6 wird frei. Die punktförmige Verteilung von PML-bodies im Zellkern löst sich unter der Mitose auf und es kommt zu einer

diffusen intranukleären Verteilung; auch während der Meiose sind PML-bodies nicht nachweisbar (Lopez et al., 2002). RNF6 könnte im Zellkern also auch während Meiose und Mitose benötigt werden. Zu anderen Zeitpunkten wird RNF6 im Zellkern möglicherweise weniger benötigt und lagert in „PML-Depots“. Daxx, ein Repressor des Transkriptionsfaktors PAX3, ist ebenfalls in PML-bodies lokalisiert (Hollenbach et al., 1999; Maul et al., 2000). Die Akkumulation von Daxx in den PML-bodies wird über Sumoylierung von PML gesteuert (Duprez et al., 1999; Muller et al., 1998). Auf diese Weise wird Daxx von anderen Wirkungsorten ferngehalten. In PML<sup>-/-</sup>-Fibroblasten ist Daxx an kondensiertem Chromatin lokalisiert (Maul et al., 2000). Sumoyliertes PML kann Daxx zu den PML-Bodies rekrutieren. Die Lokalisation von RNF6 in den PML-bodies könnte einem ähnlichen Mechanismus unterliegen.

Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass LIMKs auch im Nukleus exprimiert sind. Sie enthalten in ihrer Kinase-Domäne eine NLS und in ihrer PDZ-Domäne zwei nukleare Export-Sequenzen (Yang & Mizuno, 1999). Im Nukleus sind sie für die Repression Rac/Cdc42-abhängiger Cyclin D1 Expression zuständig (Roovers et al., 2003). Cyclin D1 ist ein für die Regulation des Zellzyklus wichtiges Protein. Es reguliert die Aktivierung von Cyclin D-cdk4 und Cyclin E-cdk6, die wiederum für das Fortschreiten der G1-Phase verantwortlich sind. Es gibt zwei Möglichkeiten Cyclin D1 zu induzieren. Entweder über andauernde ERK-Aktivität, die über RTKs (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen), Integrine und Aktin-Stressfibrillen aufrechterhalten wird (Welsh et al., 2001; Roovers & Assoian, 2003), oder über Rac/Cdc42 (Page et al., 1999; Welsh et al., 2001). Für diesen Weg sind nur Integrine und RTKs von Bedeutung, während er Aktin-unabhängig ist. Wenn die Induktion über ERK erfolgt, setzt sie in der mittleren G1-Phase ein, während eine Induktion über den ERK-unabhängigen Weg in der frühen G1-Phase erfolgt, was zu einer frühen Expression von cdk2 und cdk4 und einer insgesamt verkürzten G1-Phase führt (Welsh et al., 2001; Roovers & Assoian, 2003). Rho-Kinase aktiviert LIMK, die wiederum für die Bildung von Aktin-Stressfibrillen nötig ist, was die ERK-abhängige Induktion von Cyclin D1 begünstigt. Wie genau nukleäre LIMKs die Expression von Cyclin D1 inhibieren, muss noch untersucht werden. RNF6 kann LIMKs polyubiquitinieren und dadurch deren Abbau vermitteln. Auf diese Weise kann RNF6 die Konzentration der vorhandene LIM-Kinasen regulieren. Ein verstärkter Abbau von cytoplasmatischen

LIMKs durch RNF6 würde zu einer geringeren Menge an Aktin-Stressfibrillen führen und damit zu einer verkürzten G1-Phase, also Vorgänge im Zellkern regulieren. Eine Funktion von RNF6 im Cytoplasma würde also kompartimentübergreifend regulatorisch im Zellkern wirken. Ob RNF6 auch die LIMKs im Zellkern polyubiquitiniert und deren Abbau vermitteln kann und ob dieser Prozess dann Einfluss auf den Zellzyklus hätte, kann an dieser Stelle noch nicht geklärt werden.

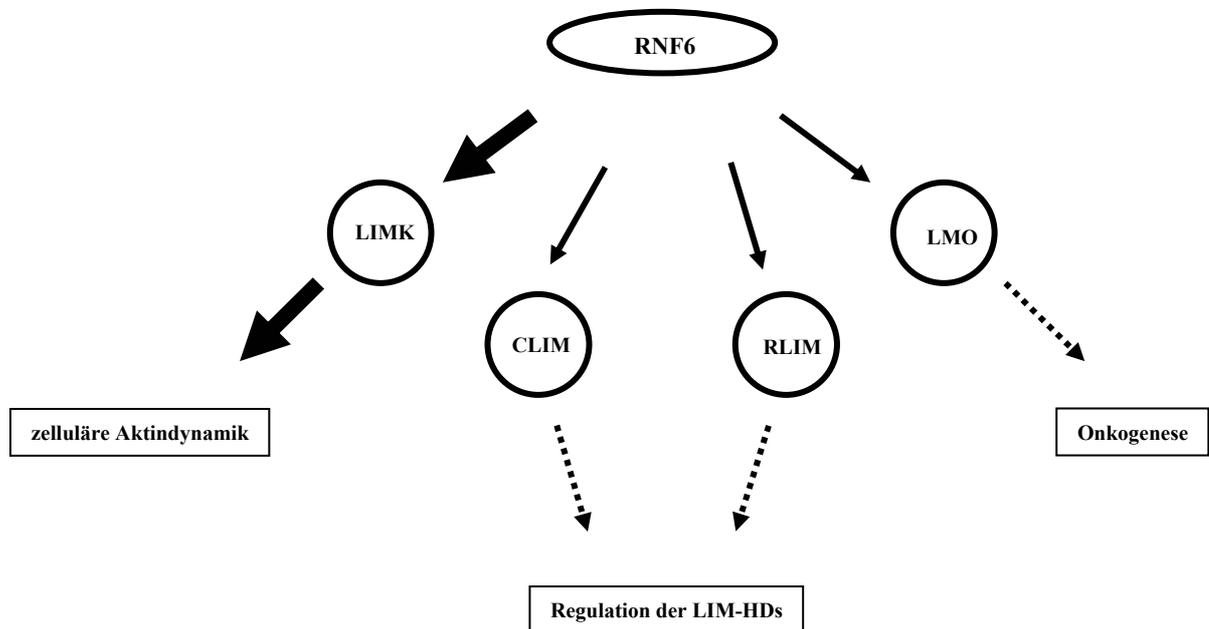
#### 5.4. Ubiquitin-Ligase-Aktivität und Proteinabbau durch RNF6

Es konnte gezeigt werden, dass RNF6 an CLIM, LMO2, RLIM und die LIM-Kinasen bindet. Damit stellt RNF6 einen in dieser Arbeit erstmals als solchen identifizierten Teil des LIM-Protein-Netzwerkes dar. Die vielfältigen zellulären Prozesse auf die RNF6 Einfluss nimmt sind in Abb. 37 dargestellt. Das in der Einleitung in Abb.3 eingeführte Modell des nukleären LIM-Protein-Netzwerkes wird mit diesem neuen Modul noch etwas komplizierter.

Wie RLIM konnte auch RNF6 als RINGfinger abhängige Ubiquitin-Ligase identifiziert werden. RNF6 ist sowohl zur Autoubiquitinierung, als auch zur Polyubiquitinierung von CLIM, RLIM und den LIMKs und zur Mono- oder Oligoubiquitinierung der LMO-Proteine in der Lage. Wie schon beschrieben konkurrieren LMOs und LIM-HD-Transkriptionsfaktoren um die aktivierend wirkenden Kofaktoren CLIM1 und CLIM2. *In vitro* kann RLIM an an LIM-Domänen gebundenes CLIM binden, dieses polyubiquitiniert und es damit für den Abbau markieren. RNF6 könnte aufgrund seiner Fähigkeit CLIM zu binden dieses ebenfalls regulieren. In dieser Arbeit konnte aber gezeigt werden, dass RNF6 CLIM zwar polyubiquitiniert, es aber nicht zu einem Abbau von CLIM kommt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, welche Eigenschaften durch RNF6 polyubiquitiniertes CLIM hat.

Da RNF6, im Gegensatz zu RLIM, ein vornehmlich cytoplasmatisches Protein ist, ist es aber auch möglich, dass RLIM die CLIM-Regulation im Zellkern übernimmt, während RNF6 cytoplasmatisches CLIM reguliert. CLIM könnte auch im Cytoplasma durch eine Bindung an RNF6 vor einem durch RLIM vermittelten Abbau geschützt sein. Ein Mechanismus der dann greifen könnte, wenn RLIM den Zellkern verlässt. Eventuell ist auch die Stabilität von CLIM in ternären Komplexen

(DNA, LIM-HD-Transkriptionsfaktor und CLIM) anders gesteuert, als die von cytoplasmatischem CLIM. Es besteht die Möglichkeit, dass im Cytoplasma ganz andere Proteine für den Abbau von CLIM verantwortlich sind.



**Abb. 37 RNF6 hat Einfluss auf verschiedene wichtige zelluläre Prozesse.** RNF6 ubiquitiniert LIMKs, CLIM-Kofaktoren, RLIM und die LMOs. Die Polyubiquitinierung und der dadurch vermittelte Abbau von LIMKs beeinflusst die Aktin-Dynamik im Cytoplasma. Außerdem ubiquitiniert RNF6 CLIM-Kofaktoren und RLIM. Beide regulieren die LIM-HD-Transkriptionsfaktoren. Ob die Ubiquitinierung der Kofaktoren durch RNF6 einen Einfluss auf diese Regulation hat, muss noch geklärt werden, daher sind die im Modell gezeigten Pfeile gestrichelt. Ob die Ubiquitinierung der LMOs durch RNF6 Einfluss auf deren onkogene Wirkung hat, muss ebenso noch geklärt werden, daher auch hier ein gestrichelter Pfeil.

Als wichtiges Substrat der Ubiquitin-Protein-Ligase RNF6 konnten die LIMKs identifiziert werden. Wie RNF6 sind diese hauptsächlich im Cytoplasma, in geringen Konzentrationen aber auch im Nukleus lokalisiert, erfüllen ihre wichtigste Aufgabe aber im Cytoplasma. RNF6 und RLIM können beide LIMKs polyubiquitinieren, aber nur von RNF6 wird dadurch auch ein Abbau von LIMK1 vermittelt. LIMK2 wird nicht degradiert. In ihrer Ubiquitin-Ligase-Aktivität ähneln sich die beiden Proteine sehr, was umso auffälliger ist, als ihre innerzelluläre Lokalisation sich unterscheidet. Die durchgeführten Ubiquitinierungs-Experimente sind allerdings *in vitro*-Experimente. Eventuell ist in der Zelle eine noch höhere Spezifität notwendig, die *in vitro*, aufgrund des Überangebots von E3-Enzymen, umgangen werden kann. Daher könnten sich die Substrate von RLIM und RNF6 *in vivo* weniger stark überschneiden.

Zwar polyubiquitinieren sowohl RLIM als auch RNF6 CLIM und LIMKs, aber CLIM wird nur dann abgebaut, wenn es mit RLIM koexprimiert wird und umgekehrt ist der Abbau von LIMK1 bei einer Koexpression mit RNF6 deutlich stärker. Auch wenn sich die beiden Ubiquitin-Ligasen RNF6 und RLIM in ihrem *in vitro*-Ubiquitinierungsmuster sehr ähneln, ist die biologische Bedeutung dieser Polyubiquitinierungen in der Zelle unterschiedlich. Für Mdm2, einer E3 von p53 konnte kürzlich gezeigt werden, dass Polyubiquitinierung und Abbau nicht unbedingt gekoppelt sein müssen (O'Keefe et al., 2003). Die Polyubiquitinierung von p53 ist im Cytoplasma am effektivsten, dennoch muss p53 in den Nukleus gelangen, wo offensichtlich ein anderes Signal erzeugt wird, dass den Abbau ermöglicht. Der Abbau selber findet dann wieder im Cytoplasma statt und ist blockiert, wenn der nukleäre Export oder Import gestört ist. Dieser Mechanismus könnte auch bei CLIM und LIMK1 greifen. Eventuell wird CLIM nur abgebaut wenn es von RLIM polyubiquitiniert wurde, weil im Zellkern ein weiteres Signal einen Abbau vermittelt, dass bei cytoplasmatischem CLIM, das als Substrat für RNF6 eher in Frage kommt, nicht vorhanden ist. Umgekehrt könnte im Cytoplasma ein zusätzliches Signal für den Abbau polyubiquitiniertes LIMK1 sorgen, dass im Zellkern nicht vorhanden ist. Außerdem könnten die polyubiquitinierten aber nicht degradierten Substrate *in vitro*-Artefakte sein, die aufgrund eines Überangebotes an nahe verwandten E3s entstehen könnten. Desweiteren könnte es sich Polyubiquitinierungen handeln, die nicht zum Abbau über das 26S-Proteasom führen, sondern andere Folgen haben. An dieser Stelle wäre es interessant, die Art der Kettenverknüpfungen und die beteiligten Lysine näher zu analysieren, wozu jedoch im Rahmen dieser Arbeit kein Raum mehr war. Polyubiquitinierungen über K48 und K29 konnten als Signale für einen Abbau über das Proteasom identifiziert werden, während eine Polyubiquitinierungen über K63 mit anderen Prozesse, wie z.B. der Translation, in Verbindung gebracht werden (Weissmann, 2001; Lindsten et al., 2002; Schwartz & Hochstrasser, 2003).

RLIM und RNF6 binden aneinander. Es besteht daher die Möglichkeit, dass sie sich gegenseitig regulieren. Es konnte gezeigt werden, dass RLIM RNF6 polyubiquitinieren und dessen Abbau vermitteln kann, während RNF6 RLIM nur mono- oder oligoubiquitiniert und kein RNF6-vermittelter Abbau von RLIM nachgewiesen werden konnte. RLIM wird folglich vermutlich eher über seine Autoubiquitin-Ligase-Aktivität und eventuell über weitere E3s reguliert. Diese E3s

könnten aber möglicherweise auf die Mono- und Oligoubiquitinierung von RLIM durch RNF6 reagieren und RNF6 könnte so ein indirekter Regulator von RLIM sein. RLIM könnte RNF6, das in den Zellkern gelangt ist, ubiquitinieren und damit dessen Abbau auslösen. Da RNF6 im Zellkern mit PML-bodies kolokalisiert ist und sonst im Zellkern kaum nachzuweisen ist, könnte man postulieren, dass RNF6 in PML-bodies an andere Proteine gebunden und damit vor dem Abbau durch RLIM geschützt ist. Eine Möglichkeit wäre hier das ebenfalls in PML-bodies lokalisierte LIM-Protein Zyxin. RNF6 könnte hier, vor Abbau geschützt, gelagert werden, bis es im Zellkern, benötigt wird. Auch das UBL-Protein („ubiquitin like molecules“) SUMO dient der Regulation und ist in PML-bodies lokalisiert (Jackson et al., 2000; Maul et al., 2000). Eine Sumoylierung von Mdm2 beispielsweise verhindert dessen Autoubiquitinierung (Buschmann et al., 2000). RNF6 könnte ebenfalls in PML-bodies sumoyliert werden. Sumoylierungen und PML-bodies werden auch mit einer Regulation der Transkription in Verbindung gebracht (Bloch et al., 1999; Muller et al., 2001; Schwartz & Hochstrasser, 2003). Die Kolokalisation von RNF6 und SUMO in PML-bodies könnte auch eine Assoziation von RNF6 mit der Regulation der Transkription bedeuten.

Aufgrund der weit verbreiteten Expression von RNF6 ist wahrscheinlich, dass noch weitere, vermutlich vor allem cytoplasmatische Substrate durch RNF6 ubiquitiniert werden können. Cytoplasmatische Substrate könnten spezifisch durch RNF6 ubiquitiniert werden, da RLIM in diesem Kompartiment aufgrund seiner zellulären Verteilung keine große Rolle spielt und nicht an cytoplasmatische LIM-Domänen, außer die von den LIMKs, bindet.

### **5.5. Die Rolle von RNF6 für menschliche Krankheiten**

Lo et al. beschreiben RNF6 als mögliches Tumorsuppressorprotein (Lo et al., 2002), da RNF6 in Speiseröhren-Karzinomen ("esophageal squamous cell carcinoma") häufig mutiert ist. Auch Lopez et al. assoziieren RNF6 mit Tumoren (Lopez et al., 2002).

Wie RNF6 werden auch die LIMKs mit Tumoren in Verbindung gebracht (siehe Einleitung). So ist LIMK1 sowohl in invasiven humanen Brust-, Ovarien-, Lungen- und Prostata Tumoren als auch in Melanomen und metastatischen Zelllinien besonders

stark exprimiert (Yoshioka, 2003). Eine Überexpression von LIMKs führt zu stärkerer Metastasenbildung und höherer Invasivität von Tumorzellen (Nishita et al., 2002). Die Konzentration der exprimierten LIMKs haben deutlichen Einfluss auf die Malignität von Tumoren. Durch die Regulation der in der Zelle vorhandenen LIMK-Konzentration könnte RNF6 an der Entstehung der mit LIMK assoziierten Tumoren beteiligt sein.

RNF6 könnte auch in andere, durch LIMKs verursachte, Krankheitsbilder involviert sein. Individuen, die hemizygot für LIMK1 sind, leiden am Williams-Syndrom, das mit einer leichten mentalen Retardierung einhergeht. Vermutlich sind die niedrigen neuronalen LIMK1-Proteinkonzentrationen dafür verantwortlich (Stanyon & Bernard, 1999).

"Knock-out"-Experimente in Mäusen haben gezeigt, dass LIMK1 nicht lebensnotwendig ist (Meng et al., 2002). Daher ist diese Kinase ein interessantes Ziel für die Entwicklung von Medikamenten, die die Metastasenbildung und die Invasion von Tumoren bekämpfen sollen (Yoshioka, 2003).

Auch andere Substrate deren Ubiquitinierung RNF6 vermittelt, wie die der Onkoproteine LMO1, LMO2 und LMO4, werden mit Tumoren assoziiert. RNF6 könnte daher sehr vielseitig an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein. Daher könnte auch RNF6 für die Krebstherapie von Interesse sein. Für RLIM konnte bereits gezeigt werden das Trichostatin A (TSA) die RLIM-Konzentration reduziert (Krämer et al., 2003). Ähnliche Medikamente könnten für RNF6 entwickelt werden.

Ein besseres Verständnis der LIM-Protein-Netzwerke und der regulatorischen Prozesse in die RNF6 involviert ist, könnte die Entstehung von Tumoren verständlicher machen und eine Möglichkeit für eventuell neue, verbesserte Krebstherapien öffnen.

## 6. ANHANG

### 6.1. Abkürzungsverzeichnis

#### 6.1.1. Allgemeine Abkürzungen

A, mA	Ampere, Milliampere
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
ca.	circa
Ci, mCi	Curie, Millicurie
cm	Zentimeter
cpm	Impulse pro Minute
g, mg, $\mu$ g	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l, ml, $\mu$ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, $\mu$ M	molar, millimolar, mikromolar
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
RT	Raumtemperatur
U	Unit (enzymatische Wirkungseinheit)
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

### 6.1.2. Abkürzungen von Substanzen und Puffern

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo 4-Chloro 3-Inolyl- Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
DAB	Diaminobenzidin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DIG	Digoxigenin
dNTPs	Desoxyribonuklein-Triphosphate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase
IPTG	Isopropylthio-β-D-Galactosidase
Lys	Lysin
MeOH	Methanol

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
NBT	4-Nitrobluetetrazolium Chlorid
NEM	N-Ethylmaleimide
NGS	normales Ziegenserum
NHS	normales Pferdeserum
NP-40	Nonidet P-40
<sup>32</sup> P	Phosphor-Isotop 32
PBS	Phosphat gepufferte Säure
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
<sup>35</sup> S	Schwefel-Isotop 35
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactosidase

### 6.1.3. Spezielle Abkürzungen

BRCA1	breast and ovarian cancer susceptibility gene 1
CBP	CREB-binding protein
CLIM/Ldb/NLI	cofactor of LIM-hd proteins
CMV	Cytomegalovirus
dn	dominant negativ
DRG	dorsale Wurzelganglien
E	Embryonaltag
E1	Ubiquitin aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin Protein-Ligase
E4	multiubiquitin chain assembly factor

---

gp	Meerschweinchen
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HECT Domäne	homolog zu E6-APC Terminus
HH	Embryonalstadium von Hühnern nach Hamburger & Hamilton
IgG	Immunglobulin G
LIM	konserviertes Interaktionsmotiv von Zinkfinger-Proteinen, abgeleitet von <i>Lin11</i> , <i>Isl-1</i> und <i>Mec-3</i>
LIM-HD	LIM Homeodomänen Protein
LIMK	LIM-Kinase
LMO	LIM-only Proteine
NES	nukleare Export-Sequenz
NLS	nukleare Lokalisations-Sequenz
ORF	offene Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POU	Abkürzung für Pit1, Oct-1/2 und unc86
rab	Kaninchen
RING	really interesting new gene
RLIM	RINGfinger LIM domain-binding protein
Rnf6	das für RNF6 codierende Gen
RNF6	RINGfinger Protein 6
Rnf12	das für RLIM codierende Gen
Siah	seven in absentia homologue
SLB	selective LIM-domain-binding protein
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
TAF	TBP-assozierte Faktoren
TBP	TATA-Bindungsprotein

TF	Transkriptionsfaktor
Ub	Ubiquitin
Ubc/E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym
UBL	Ubiquitin ähnliche Moleküle
UTR	untranslatierter Bereich
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## 6.2. Liste der verwendeten Oligonukleotide

### Rnf6-Klonierung:

RNF6-1-NcoI	5'- ACC ATG GAT CCG TCT AGA TCT AGA TCA GG -3'
RNF6-2-PpuMI	5'- TGA GGA CCT GCT AGA CTC TCC CTC TTC -3'
RNF6-3-AccI	5'- CAG GGT AGA CCA GTA CAG CAA ACG GG -3'
RNF6-4-XhoI	5'- TCT CGA GCA GAC CCC ACC TCT CAC CCA CTG -3'

### Rnf6-Antikörper-Herstellung:

antiM-Rnf6-5'Bam	5'- A GGA TCC GGA AGG TTA AGG AAT GGA ATT - 3'
antiM-Rnf6-3'Xho	5'- TC TCG AGT TCT TGA CAC AAG TCT TGA GTT - 3'

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

AGULNICK, A.D., TAIRA, M., BREEN, J.J., TANAKA, T., DAWID, I.B. & WESTPHAL, H. 1996. Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature*. 384, 270-272.

AHLGREN, U., PFAFF, S.L., JESSELL, T.M., EDLUND, T. & EDLUND, H. 1997. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature*. 385, 257-260.

ARBER, S. & CARONI, P. 1996. Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions *in situ*. *Genes Dev.* 10, 289-300.

ARBER, S., HUNTER, J.J., ROSS, J. Jr., HONGO, M., SANSIG, G., BORG, J., PERRIARD, J.C., CHIEN, K.R. & CARONI, P. 1997. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organisation, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell*. 88: 393-403.

ARBER, S., BARBAYANNIS, F.A., HANSER, H., SCHNEIDER, C., STANYON, C.A., BERNARD, O. & CARONI, P. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*. 393, 805-809.

BACH, I., CARRIÈRE, C., OSTENDORFF, H.P., ANDERSEN, B. & ROSENFELD, M.G. 1997. A family of LIM domain interacting cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeoproteins. *Genes Dev.* 11, 1370-1380.

BACH, I., RODRIGUEZ-ESTEBAN, C., CARRIERE, C., BHUSHAN, A., KRONES, A., ROSE, D.W., GLASS, C.K., ANDERSEN, B., IZPISUA BELMONTE, J.C. & ROSENFELD, M.G. 1999. RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nat. Genet.* 22, 394-399.

BACH, I. The LIM domain: regulation by association. 2000. *Mech. Dev.* 91, 5-17.

BACH, I. & OSTENDORFF, H.P. 2003. Orchestrating nuclear functions: ubiquitin sets the rhythm. *Trends Biochem. Sci.* 28 (4), 189-195.

BAER, R. & LUDWIG, T. 2002. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 86-91.

BAI, C., SEN, P., HOFMANN, K., MA, L., GOEBL, M., HARPER, J.W. & ELLEDGE, S.J. 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell.* 86, 263-274.

BECKER, T., OSTENDORFF, H.P., BOSSENZ, M., SCHLÜTER, A., BECKER, C.G., PEIRANO, R.I. & BACH, I. 2002. Multiple functions of LIM domain-binding CLIM/NLI/Ldb cofactors during zebrafish development. *Mech. Dev.* 117, 74-85.

BECKERLE, M.C. 1997. Zyxin: zinc fingers at sites of cell adhesion. *Bioessays* 19: 949-957.

BERGER, S.L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 142-148.

BLOCH, D.B., CHICHE, J.-D., ORTH, D., DE LA MONTE, S.M., ROSENZWEIG, A. & BLOCH, K. 1999. Structural and functional heterogeneity of nuclear bodies. *Mol. Cell. Biol.* 19 (6), 4423-4430.

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

BRISCOE, J. & ERICSON, J. 2001. Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 43-49.

BUSCHMANN, T., FUCHS, S.Y., LEE, C.G., PAN, Z.Q. & RONAI, Z. 2000. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell*. 101, 753-762.

CAMPBELL, D.S. & HOLT, C.E. 2001. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*. 32, 1013-1026.

CASSATA, G., ROHRIG, S., KUHN, F., HAURI, H.P., BAUMEISTER, R. & BURGLIN, T.R. 2000. The *Caenorhabditis elegans* Ldb/NLI/Clim orthologue ldb-1 is required for neuronal function. *Dev. Biol.*, 226, 45-56.

DAWID, I.B., TOYAMA, R. & TAIRA, M. 1995. LIM domain proteins. *C. R. Acad. Sci. III* 318, 295-305.

DAWID, I.B., BREEN, J.J. & TOYAMA, R. 1998. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.* 14 (4), 156-162.

DIAZ-BENJUMEA, F.J. & COHEN, S.M. 1993. Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal discs directs wing development in *Drosophila*. *Cell*. 75, 741-752.

DIDIER, C., BRODAY, L., BHOUMIK, A., ISRAELI, S., TAKAHASHI, S., NAKAYAMA, K., THOMAS, S.M., TURNER, C.E., HENDERSON, S., SABE, H. & RONAI, Z. 2003. RNF5, a RINGfinger protein that regulates cell motility by targeting Paxillin ubiquitination and altered localization. *Mol. Cell. Biol.* 23 (15), 5331-5345.

DOVER, J. SCHNEIDER, J., TAWIAH-BOATENG, M.A., WOOD, A., DEAN, K., JOHNSTON, M. & SHILATIFARD, A. 2002. Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of H2B by Rad6. *J. Biol. Chem.* 277, 28368-28371.

DUPREZ, E., SAURIN, A.J., DESTERRO, J.M., LALLEMAND-BREITENBACH, V., HOWE, K., BODDY, M.N., SOLOMON, E., DE THE, H., HAY, R.T. & FREEMONT, P.S. 1999. SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: Implications for nuclear localisation. *J. Cell Sci.* 112, 381-393.

FANG, S., JENSEN, J.P., LUDWIG, R.L., VOUSDEN, K.H. & WEISSMAN, A.M. 2000. Mdm2 is a RINGfinger-dependant ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 8945-8951.

FERNANDEZ-FUNEZ, P., LU, C.H., RINCON-LIMAS, D.E., GARCIA-BELLIDO, A. & BOTAS, J. 1998. The relative expression amounts of apterous and its co-factor dLdb/Chip are critical for dorso-ventral compartmentalization in the *Drosophila* wing. *EMBO J.* 17, 6846-6853.

FEUERSTEIN, R., WANG, X., SONG, D., COOKE, N.E. & LIEBHABER, S.A. 1994. The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerisation domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 10655-10659.

FREEMONT, P.S. 2000. RING for destruction? *Curr. Biol.* 10, R84-R87.

FREYD, G., KIM, S.K. & HORVITZ, H.R. 1990. Novel cystein rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature.* 344, 876-879.

GILBERT, S.F. 2000. *Developmental Biology*. 6th edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.

GRUTZ, G., FORSTER, A. & RABBITTS, T.H. 1998. Identification of the LMO4 gene encoding an interaction partner of the LIM-binding protein LDB1/NLI: a candidate for displacement by LMO proteins in T cell acute leukaemia. *Oncogene.* 17, 2799-2803.

GUY, P.M., KENNY, D.A. & GILL, G.N. 1999. The PDZ domain of the LIM protein enigma binds to beta-tropomyosin. *Mol. Biol. Cell* 10: 1973-1984.

GUNGABISSOON, R.A. & BAMBURG, J.R. 2003. Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/Cofilin. *J. Histochem. Cytochem.* 54 (4), 411-420.

HAHM, K., SUM, E.Y.M., FUJIWARA, Y., LINDEMAN, G.J., VISVADER, J.E. & ORKIN, S.H. 2004. Defective neural tube closure and anteroposterior patterning in mice lacking the LIM protein LMO4 or its interacting partner Deaf-1. *Mol. Cell. Biol.* 24 (5), 2074-2082.

HASHIZUME, R., FUKUDA, M., MAEDA, I., NISHIKAWA, H., OYAKE, D., YABUKI, Y., OGATA, H., & OHTA, T. 2001. The RING Heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J. Biol. Chem.* 276 (18), 14537-14540.

HEDGE, A.N. & DiANTONIO, A. 2002. Ubiquitin and the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 854-861.

HICKE, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 195-201.

HOBERT, O. & WESTPHAL, H. 2000. Functions of LIM-homeobox genes. *Trends Genet.* 16 (2), 75-83.

HOEGE, C., PFANDER, B., MOLDOVAN, G.L., PYROWOLAKIS, G. & JENTSCH, S. 2002. RAD6-dependant DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature.* 419, 135-141.

HOLLENBACH, A.D., SUBLETT, J.E., McPHERSON, C.J. & GROSVELD, G. 1999. The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx. *EMBO J.* 18, 3702-3711.

IBELGAUFTS, H. 1992. *Gentechnologie von A bis Z*. 1. korrigierter Nachdruck, Studienausgabe. VHC Verlagsgesellschaft mbH Weinheim.

JACKSON, P.K., ELDRIDGE, A.G., FREED, E., FURSTENTHAL, L., HSU, J.Y., KAISER, B.K. & REIMANN, J.D. 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10, 429-439.

JENUWEIN, T. & ALLIS, C.D. 2001. Translating the histone code. *Science.* 293, 1074-1080.

JOAZEIRO, C.A. & WEISSMAN, A.M. 2000. RINGfinger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell.* 102, 549-552.

JURATA, L.W., KENNY, D.A. & GILL, G.N. 1996. Nuclear LIM interactor NLI mediates homo- and heterodimerisation of LIM-domain transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 3152-3157.

JURATA, L.W. & GILL, G.N. 1997. Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. *Mol. Cell Biol.* 17, 5688-5698.

JURATA, L.W. & Gill, G.N. 1998. Structure and function of LIM domains. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 228, 75-113.

KANIA, A., JOHNSON, R.L. & JESSELL, T.M. 2000. Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell.* 102, 161-173.

KANUNGO, J., PRATT, S.J., MARIE, H. & LONGMORE, G.D. 2000. Ajuba, a cytosolic LIM protein, shuttles into the nucleus and affects embryonal cell proliferation and fate decisions. *Mol. Biol. Cell.* 11, 3299-3313.

KARLSSON, O., THOR, S., NORBERG, T., OHLSSON, H. & EDLUND, T. 1990. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature.* 344, 879-882.

KHURANA, T., KHURANA, B. & NOEGEL A.A. 2002. LIM proteins: association with the actin cytoskeleton. *Protoplasma*. 219: 1-12.

KNIPPERS, R. 1997. *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

KOEGL, M., HOPPE, T., SCHLENKER, S., ULRICH, H.D., MAYER, T.U. & JENTSCH, S. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*. 96, 635-644.

KONG, Y., FLICK, M.J., KUDLA, A.J. & KONIECZNY S.F. 1997. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4750-4760.

KRÄMER, O.H., ZHU, P., OSTENDORFF, H.P., GOLEBIEWSKI, M., TIEFENBACH, J., PETERS, M.A., BRILL, B., GRONER, B., BACH, I., HEINZEL, T. & GÖTTLICHER, M. 2003. The histone deacetylase inhibitor valporic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J.* 22 (13), 3411-3420.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

LARSON, R.C., OSADA, H., LARSON, T.A., LAVENIR, I. & RABBITTS, T.H. 1995. The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. *Oncogene* 11, 853-862.

LARSON, R.C., LAVENIR, I., LARSON, T.A., BAER, R., WARREN, A.J., WADMAN, I., NOTTAGE, K. & RABBITTS, T.H. 1996. Protein dimerisation between Lmo2 (RBTN2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 15, 1021-1027.

LEE, S.K. & PFAFF, S.L. 2001. Transcriptional networks regulation neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat. Neurosci.* 4 Suppl., 1183-1191.

LEWIN, B. 1997. Genes VI. 1997. Oxford University Press.

LINDSTEN, K., DE VRIJ, F.M., VERHOEF, L.G., FISCHER, D.F., VON LEEUWEN, F.W., HOL, E.M., MASUCCI, M.G., DANTUMA, M.P. 2002. Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation. *J. Cell Biol.* 157, 417-427.

LO, H.S., HU, N., GERE, S., LU, N., SU, H., GOLDSTEIN, A.M., TAYLOR, P.R. & LEE, M.P. 2002. Identification of somatic mutations of the *RNF6* gene in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 62, 4191-4193.

LOPEZ, P., VIDAL, F., MARTIN, L., LOPEZ-FERNANDEZ, L.A., RUAL, J.F., ROSEN, B.F., CUZIN, F. & RASSOULZADEGAN, M. 2002. Gene control in germinal differentiation: RNF6, a transcription regulator protein in the mouse sertoli cell. *Mol. Cell Biol.* 22 (10), 3488-3496.

LORICK, K.L., JENSEN, J.P., FANG, S., ONG, A.M., HATAKEYAMA, S. & WEISSMAN, A.M. 1999. RINGfingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependant ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 11364-11369.

MACDONALD, D.H., LAHIRI, D., SAMPATH, A., CHASE, A., SOHAL, J. & CROSS, N.C. 1999. Cloning and characterization of RNF6, a novel RING finger gene mapping to 13q12. *Genomics.* 58 (1), 94-97.

MAEKAWA, M., ISHIZAKI, T., BOKU, S., WATANABE, N., FUJITA, A., IWAMATSU, A., OBINATA, T., OHASI, K., MIZUNO, K. & NARUMIA, S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 285, 895-898.

MAUL, G.G., NEGOREV, D., BELL, P & ISHOV, A.M. 2000. Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML Bodies, or PODs. *J. Struct. Biol.* 129, 278-287.

MENG, Y., ZHANG, Y., TREGOUBOV, V., JANUS, C., CRUZ, L., JACKSON, M., LU, W.Y., MacDONALD, J.F., WANG, J.Y., FALLS, D.L. & JIA, Z. 2002. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK1 KO mice. *Neuron*. 35, 121-133.

MIKI, Y., SWENSEN, J., SHATTUCK-EIDENS, D., FUTREAL, P.A., HARSHMAN, K., TAVTIGIAN, S., LIU, Q., COCHRAN, C., BENNET, L.M., DING, W., BELL, R., ROSENTHAL, J., HUSSEY, C., TRAN, T., McCLURE, M., FRYE, C., HATTIER, T., PHELPS, R., HAUGEN-STRANO, A., KATCHER, H., YAKUMO, K., GHOLMAI, Z., SHAFFER, D., STONE, S., BAYER, S., WRAY, C., BOGDEN, R., DAYANANTH, P., WARD, J., TONIN, P., NAROD, S., BRISTOW, P.K., NORRIS, F.H., HELVERING, L., MORRISON, P., ROSTECK, P., LAI, M., BARRETT, J.C., LEWIS, C., NEUHAUSEN, S., CANNON-ALBRIGHT, L., GOLDGAR, D., WISEMAN, R., KAMB, A. & SKOLNICK, M.H. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 266, 66-71.

MILÁN, M. & COHEN, S.M. 1999. Regulation of LIM homeodomain activity *in vivo*: A tetramer of dLDB and Apterous confers activity and capacity for regulation by dLMO. *Mol. Cell*. 4, 267-273.

MULLER, S., MATUNIS, M.J. & DEJEAN, A. 1998. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J*. 17, 61-70.

MULLER, S. HOEGE, C. PYROWOLAKIS, G. & JENTSCH, S. 2001. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2, 202-210.

NÄÄR, A.M., LEMON, B.D. & TJIAN, R. 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Annu. Rev. Biochem*. 70, 475-501.

NISHITA, M., AIZAWA, H. & MIZUNO, K. 2002. Stromal cell-derived factor 1 alpha activates LIM kinase1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis. *Mol. Cell. Biol*. 22, 774-783.

NIX, D.A. & BECKERLE, M.C. 1997. Nuclear-cytoplasmic shutteling of the focal contact protein, zyxin: A potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J. Cell Biol.* 138, 1139-1147.

OHASHI, K., NAGATA, K., MAEKAWA, M., ISHIZAKI, T., NARUMIYA, S. & MIZUNO, K. 2000. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* 275, 3577-3582.

O'KEEFE, K., LI, H. & ZHANG, Y. 2003. Nucleocytoplasmic shutteling of p53 is essential for MDM2-Mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination. *Mol. Cell Biol.* 23, 6396-6405.

ORLOWSKI, M. & WILK, S. 2003. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch. of Biochem. Biophys.* 415, 1-5.

OSTENDORFF, H.P., BOSSENZ, M., MINTCHEVA, A., COPELAND, N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A., LICHTER, P. & BACH, I. 2000. Functional characterisation of the gene encoding RLIM the corepressor of LIM Homeodomain Factors. *Genomics.* 69, 120-130.

OSTENDORFF, H.P. 2002. Regulation of the LIM homeodomain transcription factor network by RLIM (RING finger LIM domain-binding protein) during vertebrate development. Dissertation. Universität Hamburg.

OSTENDORFF, H.P., PEIRANO, R.I., PETERS, M.A., SCHLÜTER, A., BOSSENZ, M., SCHEFFNER, M. & BACH, I. 2002. Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature.* 416, 99-103.

PAGE, K., LI, J., HODGE, J.A., LIU, P.T., VANDEN HOEK, T.L., BECKER, L.B., PESTELL, R.G., ROSNER, M.R. & HERSHENSON, M.B. 1999. Characterisation of a Rac1 signaling pathway to cyclin D(1) expression in airway smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274, 22065-22071.

PFAFF, S.L., MENDELSON, M., STEWARD, C.L., EDLUND, T. & JESSELL, T.M. 1996. Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependant step in interneuron differentiation. *Cell*. 84, 309-320.

PEREZ-ALVARADO, G.C., MILES, C., MICHAELSON, J.W., LOUIS, H.A., WINGE, D.R., BECKERLE, M.C. & SUMMERS, M.F. 1994. Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cystein rich protein CRP. *Nat. Struct. Biol.* 1, 388-398.

PICKART, C.M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 503-533.

POMIÈS, P., LOUIS, H.A. & BECKERLE, M.C. 1997. CRP1, a LIM domain, protein implicated in muscle differentiation, interacts with alpha-actinin. *J. Cell Biol.* 139, 157-168.

PORTER, F.D., DRAGO, J., XU, Y., CHEEMA, S.S., WASSIF, C., HUANG, S.-P., LEE, E., GRINBERG, A., MASSALAS, J.S., BODINE, E., ALT, F. & WESTPHAL, H. 1997. *Lhx2*, a LIM homeodomain gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development*. 124, 2035-2944.

RABBITTS, T.H. 1998. LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev.* 12, 2651-2657.

RÈTAUX, S. & BACHY, I. 2002. A short history of LIM domains (1993-2002). *Mol. Neurobiol.* 26 (2-3), 269-281.

RIENTO, K. & RIDLEY, A.J. 2003. ROCK: Multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 446-456.

RIETHMACHER, D., SONNENBERG-RIETHMACHER, E., BRINKMANN, V., YAMAAI, T., LEWIN, G.R. & BIRCHMEIER, C. 1997. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*. 389, 725-730.

ROOVERS, K. & ASSOIAN, R.K. 2003. Effects of Rho kinase and actin stress fibers on sustained ERK activity and activation of G1 phase cyclin-dependant kinases. *Mol. Cell Biol.* 23, 4283-4294.

ROOVERS, K., KLEIN, E.A., CASTAGNINO, P. & ASSOIAN, R.K. 2003. Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of Cyclin D1 expression. *Dev. Cell.* 5, 273-284.

ROTIN, D., STAUB, O. & HAGUENAUER-TSAPIS, R. 2000. Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: Role of Nedd4/Rsp5p family of Ubiquitin-protein ligases. *J. Membr. Biol.* 1786, 1-17.

RUFFNER, H., JOAZEIRO, C.A.P., HEMMATI, D., HUNTER, T. & VERMA, I.M. 2001. Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: Loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (9), 5134-5139.

SAIKI, R.K., GELFAND, D., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. & ERLICH H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487-491.

SARKAR, S. 1999. Focal adhesions. *Curr. Biol.* 9 (12), R428.

SAUER, F.J.D., FONDELL, Y., OHKUMA, R.G., ROEDER, M. & JÄCKLE, H. 1995. Control of transcription by Krüppel through interactions with TFIIB and TFIIE. *Nature.* 375: 162-165.

SCANLAN, M.J., GORDAN, J.D., WILLIAMSON, B., STOCKERT, E., BANDER, N.H., JONGENEEL, V., GURE, A.O., JAGER, D., JAGER, E., KNUTH, A.,

CHEN, Y.T. & OLD, L.J. 1999. Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 83, 456-464.

SCHMEICHEL, K.L. & BECKERLE, M.C. 1994. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell.* 79: 211-219.

SCHWARTZ, D.C. & HOCHSTRASSER, M. 2003. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem. Sci.* 28 (6), 321-328.

SEGAWA, H., MIYASHITA, T., HIRATE, Y., HIGASHIJIMA, S., CHINO, N., UYEMURA, K., KIKUCHI, Y. & OKAMOTO, H. 2001. Functional repression of Islet-2 by disruption of complex with Ldb impairs peripheral axonal outgrowth in embryonic zebrafish. *Neuron.* 30, 423-436.

SHARMA, K., SHENG, H.S., LETTIERI, K., LI, H., KARAVANOV, A., POTTER, S., WESTPHAL, H. & PFAFF, S.L. 1998. LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell.* 95, 817-828.

SHARP, D.A., KRATOWICZ, S.A., SANK, M.J. & GEORGE, D.L. 1999. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J. Biol. Chem.* 274, 38189-38196.

SHIRASAKI, R. & PFAFF, S.L. 2002. Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 251-281.

STANYON, C.A. & BERNARD, O. 1999. LIM-Kinase1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 389-394.

STRAHLE, U., BLADER, P., ADAM, J. & INGHAM, P. W. 1994. A simple and efficient procedure for non-isotopic in situ hybridisation to sectioned material. *Trends Genet.* 10, 75-76.

STRACK, B., CALISTRI, A., ACCOLA, M.A., PALÚ, G. & GÖTTLICHER, H.G. 2000. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 13063-13068.

STUDIER, F.W. & MOFFATT, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.

SUMI, T., MATSUMOTO, K., TAKAI, Y. & NAKAMURA, T. 1999. Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by Rho- and Cdc42-activated LIM-Kinase 2. *J. Cell Biol.*, 147 (7), 1519-1532.

SUMI, T., MATSUMOTO, K. & NAKAMURA, T. 2001. Specific activation of Lim kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependant protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 670-676.

TAIRA, M., EVRARD, J.-L., STEINMETZ, A. & DAWID, I.B. 1995. Classification of LIM proteins. *Trends Genet.* 11 (11), 431-432.

TAKAHASHI, H., KOSHIMIZU, U., MIYAZAKI, J. & NAKAMURA, T. 2002. Impaired spermatogenic ability of testicular germ cells in mice deficient in the LIM-kinase 2 gene. *Dev. Biol.* 241, 259-272.

TORIGOI, E., BENNANI-BAITI, I.M., ROSEN, C., GONZALES, K., MORCILLO, P., PTASHNE, M. & DORSETT, D. 2000. Chip interacts with diverse homeodomain proteins and potentiates Bicoid activity *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (6), 2686-2691.

TSUCHIDA, T., ENSINI, M., MORTON, S.B., BALDASSARE, M., EDLUND, T., JESSELL, T.M. & PFAFF, S.L. 1994. Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell.* 79, 957-970.

TURNER, J., NICHOLAS, H., BISHOP, D., MATTHEWS, J.M. & CROSSLEY, M. 2003. The LIM Protein FHL3 binds Basic Krüppel-like Factor/Krüppel-like Factor 3

and its co-repressor C-Terminal-Binding Protein 2. *J. Biol. Chem.* 278 (15), 12786-12795.

VALGE-ARCHER, V., FORSTER, A. & RABBITTS, T.H. 1998. The LMO1 and LDB2 proteins interact in human T cell acute leukaemia with the chromosomal translocation t(11;14)(p15;q11). *Oncogene*. 17, 3199-3202.

VAN MEYEL, D.J., O'KEEFE, D.D., JURATA, L.W., THOR, S., GILL, G.N. & THOMAS, J.B. 1999. Chip and Apterous physically interact to form a functional complex during *Drosophila* development. *Mol. Cell*. 4, 259-265.

VOET, D. & Voet, J.G. 1994. *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

WARREN, A.J., COLLEDGE, W.H., CARLTON, M.B., EVANS, M.J., SMITH, A.J. & RABBITTS, T.H. 1994. The oncogenic cystein-rich LIM domain protein *rbtn2* is essential for erythroid development. *Cell*. 78, 45-57.

WEISSMAN, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitinylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 169-178.

WELSH, C.F., ROOVERS, K., VILLANUEVA, J., LIU, Y., SCHWARTZ, M.A. & ASSOIAN, R.K. 2001. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat. Cell Biol.* 3, 950-957.

WOODCOCK, D.M, CROWTHER, P.J., DOHERTY, J., JEFFERSON, S., DECRUZ, E., NOYER-WEIDNER, M., SMITH, S.S., MICHAEL, M.Z. & GRAHAM, M.W. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17, (9): 3469-3478.

YANG, N. & MIZUNO, K. 1999. Nuclear export of LIM-kinase 1, mediated by two leucine-rich nuclear-export signals within the PDZ domain. *Biochem. J.* 338, 793-798.

YOSHIOKA, K., FOLETTA, V., BERNARD, O. & ITOH, K. 2003. A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (12), 7247-7252.

YUMINAMOUCHI, T., YATOMI, Y., OSADA, M., OHMORI, T., ISHII, Y., NAKAZAWA, K., HOSOGAYA, S. & OZAKI, Y. 2003. Expression of the Lim Proteins Paxillin and Hic-5 in Human Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 51 (4), 513-521.

## 8. DANKSAGUNG

Ich würde mich gerne an dieser Stelle bei allen ganz herzlich bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Allen voran möchte ich mich bei PD Dr. Ingolf Bach, unter dessen Anleitung ich diese Arbeit durchgeführt habe, bedanken. Bedanken möchte ich mich bei ihm nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch dafür, dass er jederzeit bereit war engagiert über Daten zu diskutieren und mir mit vielen guten Ideen zur Seite stand. Sein Enthusiasmus hat sicher geholfen schwierige Phasen dieser Arbeit zu überwinden.

Auch bei Herrn Prof. Dr. Peter Mühlbach möchte ich mich ganz herzlich für seine freundliche Bereitschaft bedanken die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen, sowie für sein Interesse und seine Hilfsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank geht selbstverständlich an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Bach, die mich die letzten Jahren „in guten und in schlechten Zeiten“ begleitet haben. Das wirklich gute und freundschaftliche Klima im Labor und die Tatsache, dass alle immer sehr hilfsbereit waren hat dafür gesorgt, dass ich mich immer gern an die Zeit meiner Doktorarbeit erinnern werde. Ein ganz besonderer Dank geht hier an Birte, die mir besonders in der Zeit meiner Schwangerschaft ganz besonders geholfen hat. Ein ganz herzlicher Dank auch an viele viele Kollegen aus anderen Arbeitsgruppen, die mir oft unter die Arme gegriffen haben. Vielen Dank an Yolanda (auch wenn die Hühnerdaten hier nun doch keinen Platz mehr hatten) – und Michaela, die oft in aussichtslosen Lagen noch ein paar Tips für mich hatten. Besonders hervorheben möchte ich auch die netten Mittagsrunden im Kreise vieler netter Kollegen, die auch dem grauesten Tag mit etwas Klatsch und Tratsch und noch ein kleines Highlight abgewinnen ließen.

Abgesehen von all diesen Laborkollegen möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mich schon während meines Studiums (davor natürlich auch) und nun während dieser Arbeit auf jeder Ebene voll unterstützt haben. Liebe Mama, Dir noch einen riesigen Applaus für Deine aufopfernde Hilfe beim Zusammenschreiben, was mit Hannah ohne Dich nicht, oder nur sehr sehr viel langsamer, möglich gewesen wäre. Vielen Dank!!!

Auch bei Tim möchte ich mich für seine liebevolle Unterstützung bedanken und dafür, dass er mich an vielen anstrengenden Tagen ertragen hat und viel Zeit in Gespräche über diese Dr. Arbeit und das „Drumherum“ investiert hat.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle meine Freunde in Hamburg, die sicher auch froh sind, dass ich nun wieder etwas weniger gestresst sein werde...

## PUBLIKATIONSLISTE

Schlüter, A., Peters, M.A., Tursun, B., Ostendorff, H.P., Viehweger, B., Johnson, S.A., Drung, A., Schweizer, M., Bernard, O. & Bach, I. 2004. Coordinated cytoplasmic and nuclear regulation mediated by a family of RLIM-like ubiquitin-ligases. Eingereicht.

Becker, T., Bossenz, M., Tursun, B., Schlüter, A., Peters, M.A., Becker, C.G. & Bach, I. 2003. Comparing protein stabilities during zebrafish embryogenesis. **Methods Cell Sci.** (1-2): 85-89.

Becker, T., Ostendorff, H.P., Bossenz, M., Schlüter, A., Becker, C.G., Peirano, R.I. & Bach, I. 2002. Multiple functions of LIM domain-binding CLIM/NLI/Ldb cofactors during zebrafish development. **Mech. Dev.** 117, 74-85.

Ostendorff, H.P., Peirano, R.I., Peters, M.A., Schlüter, A., Bossenz, M., Scheffner, M. & Bach, I. 2002. Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. **Nature.** 416, 99 - 103.

Schlüter, A., Wiesgigl, M., Hoyer, C., Fleischer, S., Klaholz, L., Schmetz, C. & Clos, J. 2000. Expression and subcellular localization of cpn60 protein family members in *Leishmania donovani*. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1491, 65 - 74.

Schlüter, A., Parzefall, J. & Schlupp, I. 1998. Female preference for symmetrical bars in male sailfin mollies. **Animal Behaviour.** 56, 147 - 153.