

**Funktionen der Ubiquitinligasen RLIM und Rnf6  
in der Regulation von LIM-Domänen  
Proteinnetzwerken**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

**vorgelegt von  
Marvin Alexander Peters  
aus Bremen**

Hamburg, 2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Zentrum für Molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg (ZMNH) in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Ingolf Bach in der Zeit von Oktober 2000 bis Juni 2004 durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. U.Hahn  
PD Dr. I.Bach

Tag der Disputation: 05. November 2004

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Expression eukaryontischer Gene</b> .....	<b>5</b>
2.1.1	Organisation des Chromatins .....	5
2.1.2	Die Struktur eukaryontischer Gene.....	6
2.1.3	Transkriptionsfaktoren.....	6
2.1.4	Koaktivatoren und Korepressoren der Transkription.....	7
<b>2.2</b>	<b>LIM-Proteinnetzwerk</b> .....	<b>10</b>
2.2.1	LIM-Homeodomänen (LIM-HD) Transkriptionsfaktoren .....	12
2.2.2	LMO Proteine .....	14
2.2.3	LIM-Kinase (LIMK).....	15
2.2.4	Protein-Protein-Wechselwirkungen der LIM-Domäne .....	16
2.2.4.1	CLIM Kofaktoren .....	18
2.2.4.2	RLIM .....	19
2.2.4.3	RNF6.....	20
<b>2.3</b>	<b>Ubiquitinierung und proteasomaler Abbau</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Kerntransportsignale</b> .....	<b>24</b>
<b>2.5</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Eine RINGfinger Proteinfamilie bestehend aus RLIM und Rnf6</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Funktionelle Untersuchung von RLIM und Rnf6 als transkriptionelle Korepressoren</b> .....	<b>29</b>
3.2.1	Einfluss von RLIM auf die Aktivität von LIM-HD Transkriptions-faktoren.....	29
3.2.2	Einfluss von Rnf6 auf die Aktivität von LIM-HD Transkriptions-faktoren .....	32
<b>3.3</b>	<b>RNA-Bindung von RLIM in EMSA-Experimenten</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4</b>	<b>Funktion von RLIM und Rnf6 als Ubiquitinligase</b> .....	<b>36</b>
3.4.1	Autoubiquitinierungsaktivität von RLIM und RNF6.....	36
3.4.2	Ubiquitinierung von Substratproteinen durch RLIM.....	37
<b>3.5</b>	<b>Proteinabbau durch RLIM und Rnf6</b> .....	<b>39</b>
3.5.1	Abbau von endogenem CLIM durch RLIM.....	39
3.5.1.1	Abbau von CLIM nach Transfektion mit RLIM und RLIM $\Delta$ 9as .....	40
3.5.1.2	RNA Interferenz Experimente zur Untersuchung endogener RLIM Proteine .....	42
3.5.2	Abbau der LIM-Kinase durch Rnf6 .....	44
3.5.2.1	Abbau von LIMK nach Transfektion mit Rnf6 $\Delta$ RING Expressionsvektoren .....	46
<b>3.6</b>	<b>Subzelluläre Lokalisation von RLIM und Rnf6</b> .....	<b>47</b>
3.6.1	Endogene RLIM und Rnf6 Lokalisation.....	47
3.6.2	RLIM und Rnf6 Lokalisation in transfizierten Zellen.....	49

<b>3.7</b>	<b>Charakterisierung des NLS .....</b>	<b>50</b>
3.7.1	RLIM besitzt ein funktionelles NLS .....	51
3.7.2	Rnf6 besitzt ebenfalls ein funktionelles NLS .....	53
<b>3.8</b>	<b>Charakterisierung des NES in RLIM und Rnf6 .....</b>	<b>55</b>
3.8.1	NES vermittelter Export durch den CRM1-Rezeptor .....	57
<b>3.9</b>	<b>Abbau von HDAC2 durch RLIM .....</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Evolution des LIM-Proteinnetzwerks .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Mechanismus der transkriptionellen Repression vermittelt durch RLIM und Rnf6 .....</b>	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>Funktionen der RNA-Bindung .....</b>	<b>69</b>
<b>4.4</b>	<b>Analyse der zellulären Lokalisation von RLIM und Rnf6 .....</b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b><i>in vivo</i> Zielmoleküle der Ubiquitinligasen RLIM und Rnf6 .....</b>	<b>72</b>
4.5.1	Ist CLIM ein <i>in vivo</i> Zielmolekül von RLIM? .....	73
4.5.2	Ist LIMK ein <i>in vivo</i> Zielmolekül von Rnf6? .....	75
4.5.3	HDAC2 – ein weiteres <i>in vivo</i> Substrat von RLIM ? .....	77
<b>4.6</b>	<b>Substratspezifität der Ubiquitinligasen .....</b>	<b>77</b>
<b>4.7</b>	<b>Abbau von RLIM durch TSA .....</b>	<b>79</b>
<b>4.8</b>	<b>Ubiquitinligasen als Regulatorproteine im Zellkern .....</b>	<b>80</b>
<b>4.9</b>	<b>LIM-Proteinnetzwerk und menschliche Erkrankungen .....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>85</b>
<b>5.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>85</b>
5.1.1	Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen .....	85
5.1.2	Spezielle Chemikalien und Hilfsmittel sind im Folgenden aufgeführt: .....	85
5.1.3	Liste der gebräuchlichen Medien und Lösungen .....	86
5.1.4	Bakterienstämme .....	86
5.1.5	Vektoren .....	87
5.1.6	Zelllinien .....	87
5.1.7	Oligonukleotide .....	87
5.1.8	Antikörper .....	88
5.1.8.1	Primäre Antikörper .....	88
5.1.8.2	Sekundäre Antikörper und HRP-Portein A .....	88
5.1.9	Zellkulturmedien .....	89
<b>5.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>89</b>
5.2.1	Arbeiten mit DNA und RNA .....	89
5.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Mini-Präparation) .....	89
5.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Maxi-Präparation) .....	90
5.2.1.3	Phenol-/Chloroform-Extraktion .....	90
5.2.1.4	Ethanol-fällung .....	90
5.2.1.5	Dephosphorylierungen von 5'-Enden .....	91
5.2.1.6	Isolierung von DNA-Fragmenten mit Whatman DE81-Papier .....	91
5.2.1.7	Hybridisierung von Synthetischen Oligonukleotiden .....	91

5.2.1.8	Radioaktive End-Markierung von DNA .....	92
5.2.1.9	Radioaktive Markierung von RNA .....	92
5.2.1.10	Isolierung radioaktiv markierter DNA .....	92
5.2.1.11	Bestimmung von DNA-Konzentrationen .....	92
5.2.1.12	Restriktionsverdau .....	92
5.2.1.13	Elektrophorese in Agarosegelen .....	93
5.2.1.14	Elektrophorese in nativen Polyacrylamidgelen .....	93
5.2.1.15	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	94
5.2.1.16	Präparation von Vektoren .....	94
5.2.1.17	Klonierung von PCR-Fragmenten .....	94
5.2.1.18	Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren .....	95
5.2.1.19	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	95
5.2.1.20	Zielgerichtete Mutagenese .....	96
5.2.1.21	Sequenzierung von DNA .....	96
5.2.1.22	Herstellung kompetenter Bakterien .....	96
5.2.1.23	Transformation von Bakterienzellen .....	97
5.2.2	Proteinbiochemische Arbeiten .....	97
5.2.2.1	Expression von Proteinen in Bakterien .....	97
5.2.2.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen .....	98
5.2.2.3	Aufreinigung von Proteinen aus eukaryontischen Zellen .....	98
5.2.2.4	Proteinbestimmung nach Bradford .....	99
5.2.2.5	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	99
5.2.2.6	Färbung von SDS-PAGE-Gelen mit Coomassie Brilliant Blau .....	99
5.2.2.7	Elektrophoretischer Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot) .....	100
5.2.2.8	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen .....	100
5.2.2.9	Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen <i>in vitro</i> .....	100
5.2.2.10	<i>In Vitro</i> -Ubiquitinierungen .....	101
5.2.3	Methoden der Zellkultur .....	101
5.2.3.1	Kultur von Säugerzellen .....	101
5.2.3.2	Lagerung von Säugerzellen .....	102
5.2.3.3	Transfektion der Säugerzellen mit Polyethanolimin (PEI) .....	102
5.2.3.4	Transfektion der Säugerzellen mit Lipofektionsreagenzien .....	102
5.2.3.5	Transfektion der Säugerzellen in RNAi-Experimenten .....	102
5.2.3.6	Immunocytochemische Detektion in Säugerzellen .....	102
5.2.3.7	Luziferase-Test .....	103
5.2.3.8	Gelshift (Electrophoretic Mobility Shift Assay) .....	103
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>117</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	117
7.2	Liste der verwendeten Oligonukleotide .....	119
7.2.1	RNA-EMSA-Oligonukleotide .....	119
7.2.2	RNAi-Oligonukleotide .....	119
7.2.3	RLIM und Rnf6-Oligonukleotide für Klonierungen .....	119

# 1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation eines zu RLIM homologen Proteins, sowie die Charakterisierung der molekularen Mechanismen der Wirkungsweise von RLIM und seines Homolog im LIM-Proteinnetzwerk.

LIM-Domänen Proteine wurden im Zellkern und Cytoplasma gefunden und besitzen Schlüsselfunktionen für die Entstehung komplexer Organismen. So sind nukleäre LIM-Homeodomänen Transkriptionsfaktoren (LIM-HD) unter anderem in die Spezifizierung von neuronalen Zelltypen bei der Entwicklung des Nervensystems involviert, während die cytoplasmatische LIM Kinase (LIMK) ein wichtiger Regulator des Aktin-Cytoskeletts ist. Die LIM-Domäne vermittelt Protein-Protein-Wechselwirkungen und da meist mehrere LIM-Domänen in einem Protein auftreten, ermöglichen LIM Proteine die Bildung von Multi-Proteinkomplexen. Im Zellkern wurden neben den LIM-HD und den LIM-only Onkoproteinen (LMO) auch die LIM-Domänen bindende Familie der CLIM/Ldb/NLI/Chip-Kofaktoren und RLIM gefunden. Die Interaktion der CLIM Kofaktoren ist für die biologische Aktivität, die durch die LIM-HD Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, essentiell. RLIM hingegen hemmt die Aktivität der LIM-HD Proteine.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte RLIM als eine Protein Ubiquitinligase identifiziert werden, die sich selbst, CLIM Kofaktoren und LMO-Proteine ubiquitinieren kann. RLIM ist in der Lage das LIM-HD Proteinnetzwerk durch zwei unterschiedliche Mechanismen zu reprimieren: es rekrutiert den Histondeacetylase-Korepressorkomplex (HDAC) und kann den Abbau der CLIM Kofaktoren vermitteln. Da auch HDAC2 als Substratprotein für eine RLIM-vermittelte Ubiquitinierung und Abbau diente, konnte eine weitere Funktion von RLIM gefunden werden.

Es gelang mir das RINGfinger Protein Rnf6 aufgrund hoher Sequenzhomologien als RLIM-Homolog zu identifizieren. Mit Hilfe spezifischer Antiseren konnte gezeigt werden, dass RLIM hauptsächlich im Zellkern, Rnf6 jedoch im Cytoplasma lokalisiert ist. Ein nukleäres Kernsignal (NLS) und ein nukleäres Exportsignal (NES) wurden sowohl auf RLIM als auch auf Rnf6 identifiziert. Detaillierte Analysen ergaben, dass RLIM und Rnf6 zwischen dem Kern und dem Cytoplasma hin und her transportiert werden können. Als entscheidend für die Lokalisation von RLIM und Rnf6 konnten die Sequenzen des NLS bzw. NES in Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenzumgebung charakterisiert werden. Für RLIM konnte außerdem zusätzlich die Fähigkeit zur RNA-Bindung nachgewiesen und diese auf die NLS-Region eingegrenzt werden.

Im Cytoplasma konnte die LIMK als Substratprotein von Rnf6 identifiziert werden. Ihr Abbau wird nur durch Rnf6 vermittelt. Diese Daten weisen auf eine Beteiligung von Rnf6 an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts hin. Daher werden vermutlich die Funktionen von RLIM hauptsächlich im Zellkern und die von Rnf6 im Cytoplasma ausgeübt. Die Befunde, dass es durch RLIM und Rnf6 bei unterschiedlichen Substraten zum Abbau kommt, tragen entscheidend zum Verständnis der Regulation des LIM-Proteinnetzwerks durch die Proteinfamilie RLIM/Rnf6 bei.

Diese Ergebnisse zeigen zentrale Funktionen der Proteinfamilie RLIM/Rnf6 für die Regulation von nukleären und cytoplasmatischen LIM-Proteinnetzwerken auf. Damit werden solch wichtige zelluläre Prozesse wie die Regulation der Transkription und der Aktindynamik kontrolliert.

## Summary

The goal of this research project was to elucidate the molecular mechanisms of the RING finger protein RLIM in the regulation of the LIM protein network and to compare this regulation with that of Rnf6, a protein with high sequence homology to RLIM.

LIM-domain proteins are found in the cell nucleus and cytoplasm and possess key functions during the development of complex organisms. Indeed, the nuclear LIM homeodomain transcription factors (LIM-HD) specify neuronal cell identity during central nervous system development, whereas the cytoplasmic LIM kinase (LIMK) plays a central role in the organization of the actin cytoskeleton. The LIM-domain is a protein-protein interaction motif, mediating interactions with a variety of proteins and thereby promoting the formation of multiorder protein complexes. In addition to the LIM-HD transcription factors and the LIM only oncoproteins (LMO), two classes of LIM domain-interacting cofactors can be found in the nucleus: CLIM/Ldb/NLI/Chip cofactors and RLIM. The interaction of the CLIM cofactor family with LIM domains is important for the biological activity conferred by LIM-HD transcription factors, while RLIM inhibits this activity.

In the course of this doctoral thesis I first investigated the molecular mechanism of RLIM's inhibitory action on the LIM-HD system. It could be demonstrated that RLIM is a ubiquitin protein ligase, capable of mediating ubiquitination of CLIM cofactors leading to proteasomal degradation. Additional data measuring LIM-HD mediated gene activation in transient transfections indicated that RLIM can exert its repressive function on LIM-HD transcription by two mechanisms: either by recruiting histone deacetylase corepressor proteins (HDAC) or by the degradation of positive CLIM cofactors. A novel function of RLIM was elucidated showing that it is capable of targeting not only CLIM, but also the HDAC2 proteins, for proteasome-mediated degradation.



Furthermore, the RING finger protein Rnf6 was identified as a close homologue to RLIM. Using specific antibodies I showed that RLIM was found primarily in the nucleus whereas Rnf6 was detected in the cytoplasm of cultured cells. Both functional nuclear localisation signals (NLS) and nuclear export signals (NES) were identified on both proteins which allow RLIM and Rnf6 to shuttle between the nucleus and cytoplasm. Additionally, I demonstrated that the NLS of RLIM, but not of Rnf6, is capable of binding RNA.

LIMK was identified during the search for cytoplasmic Rnf6 substrate proteins. Subsequently, it could be demonstrated that Rnf6 targets cellular LIMK for proteasomal degradation. These results indicate a role for Rnf6 in the regulation of cellular actin dynamics with important consequences for cell motility and development of neuronal projections, and tumour cell metastasis. It can be concluded that RLIM acts primarily in the nucleus while Rnf6 acts in the cytoplasm. The different subcellular localization of RLIM and Rnf6 results in their mediating the degradation of different proteins, thus shedding light on the individual roles of RLIM and Rnf6 in the LIM protein network.

Taken together, these results show that the RLIM/Rnf6 family of ubiquitin ligases occupy central positions in the regulation of nuclear and cytoplasmic LIM-associated protein networks. Thus, the RLIM/Rnf6 family is a central position to regulate crucial cellular functions in different cellular compartments such as transcription and actin dynamics.

## 2 Einleitung

### 2.1 Expression eukaryontischer Gene

Die Expression der Gene in Eukaryontenzellen ist einer genauen Regulation unterworfen. Viele dieser Gene, die so genannten „housekeeping genes“, werden in allen Zellen transkribiert, da sie für jede Zelle lebenswichtig sind. Andere Gene sind jedoch nur in bestimmten Zellen oder zu bestimmten Zeitpunkten aktiv. Gene, die zelltyp- oder entwicklungspezifisch angeschaltet werden, sind von entscheidender Bedeutung für den Organismus, da sie den verschiedenen Zelltypen ihren unterschiedlichen Charakter verleihen. Die selektive Genexpression unterliegt einem sehr strikten und fein abgestimmten Regulationsmechanismus.

#### 2.1.1 Organisation des Chromatins

Der Zellkern enthält nahezu das gesamte Erbmateriale einer Zelle. Hochkomprimiert und verpackt liegt die Erbsubstanz in einer Mischung von Proteinen und DNA vor, dem so genannten Chromatin. Mikroskopisch lassen sich zwei unterschiedlich stark kondensierte Formen des Chromatins unterscheiden. Auf der einen Seite steht das locker verpackte Euchromatin, an welchem Gene transkribiert werden. Auf der anderen Seite gibt es das stark kondensierte Heterochromatin, ein transkriptionell inaktiver Ort. Die Grundeinheiten des Chromatins sind die Nukleosomen, bei denen etwa 150 Basenpaare um einen Proteinkern aus acht Histonen gewickelt sind, einem Oktamer aus je zwei kleinen basischen Proteinen der Histonklassen H3 und H4 sowie H2A und H2B. Dieser Gesamtkomplex wird als „Core“-Nukleosom bezeichnet. Zwei benachbarte Core-Nukleosomen werden von einem DNA Abschnitt, der „Linker“-DNA, verbunden. Das Histon H1 bindet sowohl das Nukleosom als auch die Linker-DNA, des Weiteren binden auch andere kleine basische Proteine, z.B. HMG-Proteine (high mobility group), oder SIR (silent information regulator) Proteine und tragen zur weiteren Verpackung bei.

### 2.1.2 Die Struktur eukaryontischer Gene

Die Struktur eines eukaryontischen Gens besteht typischerweise aus einer Promotorregion, einem Transkriptionsstartsignal und einem Translationsstartsignal, mehreren Exons und Introns, einem Translationsstoppsignal und einer 3'-nichttranslatierten Region (Alberts et al., 1994; Gilbert, 2000; Lee and Young, 2000; Lewin, 1997; Näär et al., 2001; Warren et al., 1994).

Vor dem Transkriptionsstartsignal sind Promotorelemente angeordnet, an denen die RNA-Polymerase II binden und die Transkription initiieren kann. Das Translationstartsignal, meistens ATG, repräsentiert den Proteinanfang am ersten Exon. Weiter stromaufwärts befinden sich andere Promotorelemente, die Bindungsstellen für spezifische DNA-bindende Faktoren, die so genannten Transkriptionsfaktoren sind. Transkriptionsfaktoren sind für die effiziente Transkription in allen Zelltypen verantwortlich (Lewin, 1997). Zusätzlich zu den Promotorelementen konnten bei Eukaryonten noch andere Regulationselemente, „Enhancer“ und „Silencer“, identifiziert werden. Enhancer aktivieren die Transkription und besitzen variable Positionen und Orientierungen. Sie bewirken eine Erhöhung bzw. Verminderung der Aktivität eines Promotors, obwohl sie selbst keine Promotoraktivität besitzen. Transkriptionsfaktoren erkennen Consensus-Sequenzen in den Promotor-, Enhancer- und Silencerbereichen. Es gibt etliche Sequenzelemente, die in vielen Promotoren vorkommen und konstitutiv genutzt werden. Andere wiederum sind spezifisch für die Regulation bestimmter Gen-Klassen. An der Funktionalität eines Promotors kann eine Vielzahl von Sequenzelementen beteiligt sein, essentiell ist jedoch oft keines dieser Elemente (Khoury and Gruss, 1983). Vor allem durch das komplexe Zusammenspiel dieser Regulationselemente mit den Transkriptionsfaktoren wird die eukaryontische Genexpression reguliert.

### 2.1.3 Transkriptionsfaktoren

Bei den Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Proteine, die durch Bindung an Promotorregionen und Enhancer sowie durch Interaktionen mit anderen Proteinen auf die Transkription von bestimmten Genen aktivierend oder inhibierend einwirken können (Gilbert, 2000; Lewin, 1997; Ryan and Rosenfeld, 1997). Neben einer Domäne, mit denen

sie in sequenzspezifischerweise DNA-Abschnitte binden, enthalten Transkriptionsfaktoren einen Abschnitt mit transaktivierender Funktion (Transaktivierungsdomäne), mit dem sie in der Lage sind, die Transkription zu aktivieren bzw. inhibieren. Diesen Domänen sind in der Regel gut abgrenzbaren Abschnitten in der Proteinsequenz zuzuordnen. Die DNA-bindenden Domänen wurden im Laufe der Evolution besonders stark konserviert und daher erlauben sie eine Einteilung in verschiedene Gruppen. Zu nennen sind beispielsweise die Zinkfingerprotein-Familie, die basische Helix-Loop-Helix (bHLH)-Protein-Familie, die Leucizipper-Familie, die POU Proteine und die Homeodomänen-Familie.

Transkriptionsfaktoren besitzen wichtige entwicklungsbiologische Funktionen. MyoD, ein Vertreter der Helix-Loop-Helix (bHLH)-Protein-Familie, ist sowohl bei der Muskel- als auch bei der Nervenspezifizierung wichtig. Verschiedene Hox-Gene der Homeodomänenfamilie sind Schlüsselfaktoren für die Körperachsenbildung (Burdine and Schier, 2000). Der Pax-Transkriptionsfaktor Pax6 wird u.a. für die Bildung der Augen und für die Ausbildung des Nervensystems benötigt (Gilbert, 2000).

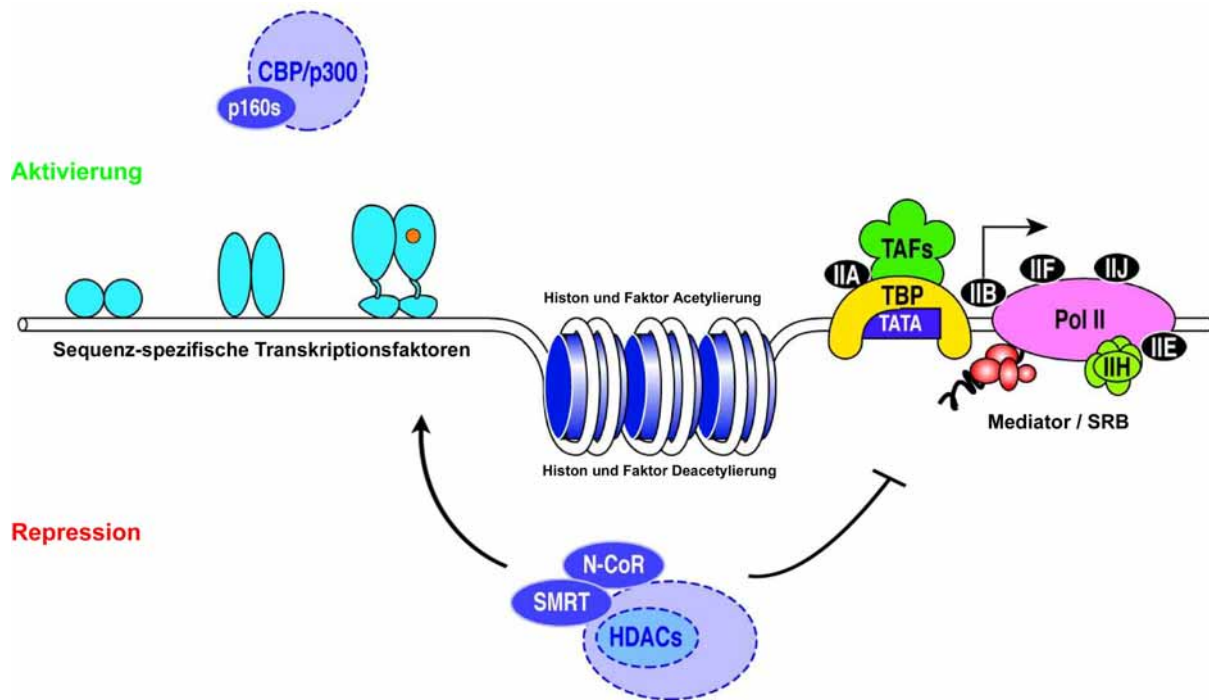
In der Homeodomänen-Familie werden Proteine zusammengefasst, die eine Sequenz von 180 bp, die so genannte Homeobox, enthalten. Eine Bindung an DNA wird über ein Helix-Turn-Helix Motiv erreicht. Bei den POU-Domänen Proteinen findet man zwei separate DNA-Bindungsmotive, hier ist eine Homeodomäne mit einer POU-spezifischen Domäne gepaart. Das POU-Protein Pit1 wird spezifisch in dem Hypophysenvorderlappen exprimiert und sorgt dort für Spezifizierung in somatropo, laktotrope und thyrotrope Zelllinien.

#### **2.1.4 Koaktivatoren und Korepressoren der Transkription**

Bei den Kofaktoren handelt es sich um genregulatorische Proteine, die selbst nicht an DNA binden, sondern an Transkriptionsfaktoren. Kofaktoren vermitteln entweder eine Bindung der Transkriptionsfaktoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie oder unterstützen Aktivatoren und den Transkriptionsapparat bei der Umsetzung ihrer Aufgaben am Chromatin. Allgemein lassen sich Kofaktoren in zwei Gruppen einteilen. Auf der einen Seite gibt es Adaptoren, die direkt Aktivatoren oder Repressoren an den

Transkriptionsapparat bringen. Auf der anderen Seite gibt es Chromatin-remodulierende oder -modifizierende Proteine, wie z.B. die Histonacetyltransferasen (HAT) oder die Histondeacetylasen (HDAC). Kofaktoren sind häufig Bestandteile von großen multifunktionalen Komplexen (Lee and Young, 2000). Koaktivatoren sind in der Lage durch Bildung eines Komplexes mit der basalen Transkriptionsmaschinerie oder Proteinen mit Acetyltransferase Aktivität effektiv die Transkription zu aktivieren. Korepressoren inhibieren diese Transkriptionsaktivität, einerseits durch direkte Bindung des Transkriptionsapparats, andererseits durch Bildung von inhibierenden Proteinkomplexen. Es entsteht somit ein homeostatisch reguliertes Gleichgewicht aus aktivierenden und inaktivierenden Kofaktoren (Hermanson et al., 2002).

Ein genereller Mechanismus zur Repression der Transkription wird der Verpackung der DNA mit Histon-Proteinen zugeschrieben. Wie schon erwähnt liegen definierte genomische Regionen als Euchromatin oder transkriptionell inaktiv als kondensiertes Heterochromatin vor. Die Histone, die zusammen mit der DNA die Nukleosome bilden, können postranslational acetyliert werden. Eine Acetylierung von Histonen reduziert deren positive Ladung, so dass die Affinität zur DNA herabgesetzt wird. Die Folge ist eine aufgelockerte Nukleosomenstruktur, in der Gene transkribiert werden können. Die Gegenspieler dieser Histonacetyltransferasen sind die Histondeacetylasen, die die Acetylgruppen von den Histonen wieder entfernen. Eine Deacetylierung der Histone resultiert hingegen in einer kompakteren DNA Konfiguration im Nukleosom und bewirkt somit eine Repression der Transkription, da transkriptionelle Aktivatoren keinen Zugang mehr zur DNA finden. Viele Koaktivatoren und Korepressoren wurden in Komplexen mit HAT- oder HDAC-Aktivität gefunden (Abb. 2-1).



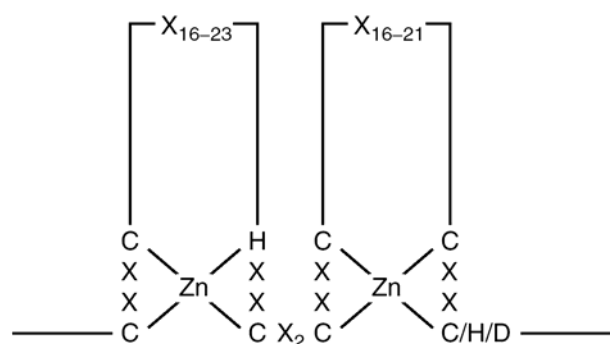
**Abb. 2-1 Koaktivator und Korepressor Komplexe in der Transkription**

Koaktivatoren, die eine transkriptionelle Aktivierung fördern, sind beispielsweise CBP oder p300. Der Korepressorkomplex Sin3/HDAC inhibiert entweder direkt oder über die Korepressoren N-CoR und SMRT die Transkription. Modifiziert nach Glass und Rosenfeld, 2000.

Zu den Kofaktoren, die eine HAT-Aktivität besitzen und somit die Aktivator-abhängige transkriptionelle Aktivierung fördern, gehören beispielsweise CBP (CREB-bindendes Protein), p300 und die p160-Koaktivatorfamilie. Histondeacetylase-Komplexe, die die Transkription inhibieren, wie z.B. der mSin3A-Komplex oder der NuRD (Nucleosome Remodeling and Histone Deacetylation)-Komplex werden über verschiedene Mechanismen an die DNA herangeführt. Einerseits geschieht dies direkt durch DNA-bindende Proteine andererseits indirekt durch Korepressoren, wie z.B. N-CoR (nuclear receptor corepressor) oder SMRT (silencing mediator of retinoic acid and th thyroid hormone receptor), die ihrerseits selbst durch spezifische DNA-bindende Faktoren an die DNA gebracht werden (Lee und Young, 2000).

## 2.2 LIM-Proteinnetzwerk

Die LIM-Domäne, ein konserviertes Zinkfinger Motiv, konnte in einer Vielzahl von Proteinen gefunden werden, z.B. in Transkriptionsfaktoren, Protoonkogenen oder Cytoskelett assoziierten Proteinen. Die LIM-Domäne wurde zuerst bei den Transkriptionsfaktoren Lin11, Isl1 und Mec3 identifiziert und nach ihnen benannt. Die LIM-Domäne besteht aus einer Cystein-Histidin-reichen Doppel-Zinkfinger-Struktur, bei der jeder Zinkfinger um ein zentrales Zinkatom aufgebaut ist (Dawid et al., 1998; Jurata und Gill, 1998). Diese Doppel-Zinkfinger-Struktur weist Ähnlichkeiten zur Doppel-C<sub>4</sub>-Zinkfinger-Struktur der GATA Zinkfinger-Familie auf, jedoch mit dem Unterschied, dass der Abstand zwischen den beiden Zinkfingern geringer ist (Perez-Alvarado et al., 1994; Perez-Alvarado et al., 1996). Ein weiterer grundlegender Unterschied besteht in dem Bindungsverhalten. Während die Zinkfinger der GATA-Familie zur DNA-Bindung dienen, vermitteln die Zinkfinger der LIM-Domänen spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen (Schmeichel und Beckerle, 1994; Feuerstein et al., 1994; Arber und Caroni, 1996). Die LIM-Domäne hat eine Konsensussequenz von CX<sub>2</sub>CX<sub>16-23</sub>HX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>16-21</sub>CX<sub>2</sub>(C/H/D) (Sanchezgarcia and Rabbitts, 1994). In einem Zinkfinger befinden sich zwei benachbarte Cystein- und/oder Histidin- bzw. Asparaginsäurereste, die gemeinsam mit ihren Seitenketten um das Zinkatom koordiniert sind (Abb. 2-2).

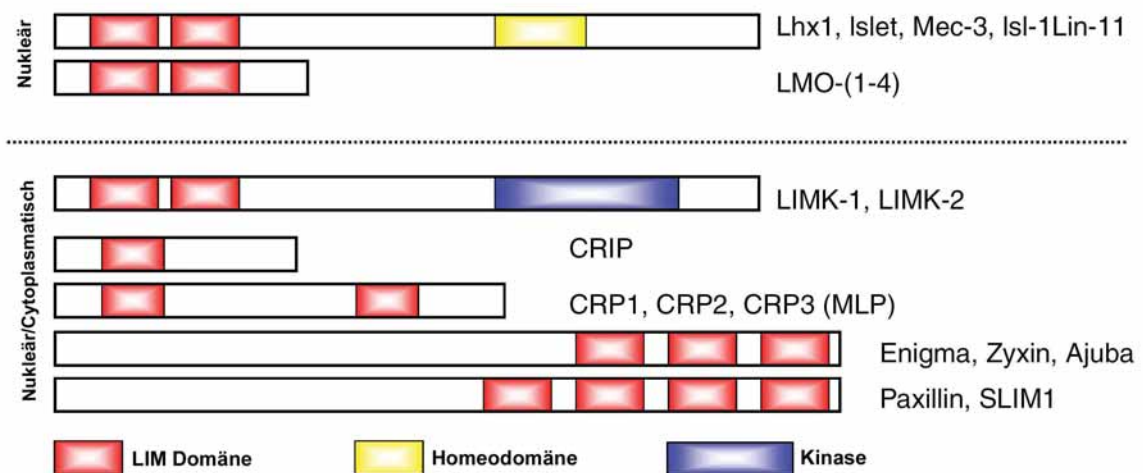


**Abb. 2-2 Allgemeine Struktur der LIM-Domäne.**

Die LIM-Domäne ist eine Doppel-Zinkfinger-Struktur, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Jede Zinkfinger-Struktur ist um ein zentrales Zinkatom aufgebaut. In einem Zinkfinger befinden sich zwei benachbarte Cystein- und/oder Histidin- bzw. Asparaginsäurereste, die gemeinsam mit ihren Seitenketten das Zinkatom koordinieren. Die Aminosäuren-Primärstruktur ist als schwarze Linie dargestellt. X, beliebige Aminosäure; C, Cystein; H, Histidin; D, Asparaginsäure; Zn, Zinkatom. (Modifiziert nach Kontaxis et al., 2004).

LIM-Domänen Proteine sind weit verbreitet in verschiedenen Organismen, wobei sie sich in der Anzahl und Position der LIM-Domänen und im Vorhandensein weiterer funktioneller Domänen, z.B. Homeodomänen oder Kinasedomänen, voneinander unterscheiden können.

LIM-Domänen Proteine können in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden; entweder auf Grundlage der Homologie der Sequenzinformationen der LIM-Domänen (Dawid et al., 1998) oder nach dem Vorhandensein anderer funktioneller Domänen (Retaux and Bachy, 2002). Beide Klassifikationen erlauben eine Unterscheidung in cytoplasmatische und in nukleäre Proteine (Abb. 2-3).



**Abb. 2-3 Schematische Aufbau verschiedener LIM-Domänen enthaltender Proteine**

LIM-Domänen Proteine besitzen meist mehrere LIM-Domänen wie bei den LIM-only-Proteinen (LMO) oder enthalten zusätzlich andere funktionelle Domänen, wie die DNA-bindende Homeodomäne oder die Kinasedomäne. Modifiziert nach Kontaxis et al., 2004.

Im Zellkern befinden sich die LIM-Homeodomänen Transkriptionsfaktoren (LIM-HD), die zusätzlich zu den zwei sich wiederholenden N-terminalen LIM-Domänen noch eine DNA-bindende Homeodomäne besitzen. Dort sind auch die LIM-only-Proteine (LMO) lokalisiert. Diese enthalten zwei LIM-Domänen, haben aber keine Homeodomäne und sind nicht in der Lage DNA zu binden. Im Cytoplasma findet man unter anderem die LIM-Kinasen (LIMK1 und LIMK2). Es handelt sich hierbei um Proteine, die neben den LIM-Domänen noch eine Kinasedomäne besitzen. Darüber hinaus gibt es weitere LIM-



Domänen enthaltende Proteinklassen, die vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert sind z.B. CRIP, Enigma oder Paxillin.

### 2.2.1 LIM-Homeodomänen (LIM-HD) Transkriptionsfaktoren

LIM-HD Proteine übernehmen essentielle Funktionen bei der Differenzierung verschiedener Zelltypen während der Embryogenese und der Entwicklung von Organen. Entdeckt wurden sie in unterschiedlichen Organismen von Ascidien bis zum Menschen. Bekannt sind ein LIM-HD Vertreter bei *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila*, zwei innerhalb der Säugetierarten und drei bei dem Zebrafisch (Hobert and Westphal, 2000). Anhand konservierter Merkmale innerhalb der Homeodomäne werden die Mitglieder der LIM-HD Proteinfamilie in sechs Klassen unterteilt (Tabelle 1), mit jeweils zwei zueinander sehr homologen Proteinen (Hobert and Westphal, 2000). Es scheint so, dass dieses paarweise Auftreten innerhalb der verschiedenen Spezies konserviert ist (Bach, 2000; Hobert and Westphal, 2000).

**Tabelle 1 Unterteilung der LIM-HD Proteinfamilie in sechs Klassen**

LIM-HD Klassen	Ausgesuchte Mitglieder der Klassen
Apterous Gruppe	DM-Apterous, H-Lhx2, C-Lhx2a, C-Lhx2b, M-Lhx2, M-Lhx9
Lhx6/7 Gruppe	M-Lhx6, M-Lhx7, DM-Arrowhead, CE-Lim-4
Islet Gruppe	ZF-Isl1, ZF-Isl2, ZF-Isl3, DM-Islet, C-Isl1, C-Isl2, M-Isl1, M-Isl2
Lmx Gruppe	H-Lmx-1b, C-Lmx-1, MA-Lmx-1-1, MA-Lmx-1-2, M-Lmx-1a
Lim-3 Gruppe	C-Lim-3, XLim-3, M-Lhx4, ZF-Lim-3, M-Lhx3, DM-Lim3
Lin-11 Gruppe	CE-Lin-11, CE-Mec-3, C-Lim1, H-Lim1, M-Lhx5, M-Lim1, XLim-1, ZF-Lim1

C, Huhn; CE, Fadenwurm; DM, Taufliege; H, Mensch; M, Maus; MA, Hamster; X, Krallenfrosch; ZF, Zebrafisch.

Der LIM-HD-Transkriptionsfaktor Lin11 in *Caenorhabditis elegans* ist für die Entwicklung von spezifischen thermoregulatorischen Neuronen wichtig (Hobert et al., 1997; Hobert et al., 1998) und die Ausbildung spezifischer Zellpopulationen der Vulva. Mec3 ist bei der Spezifizierung von mechanosensorischen Neuronen beteiligt (Way und Chalfie, 1988).

Das *Drosophila* LIM-HD Protein Apterous ist essentiell für die Entwicklung der Flügel (Cohen et al., 1992; Diaz-Benjumea und Cohen, 1993; Blair et al., 1994).

LIM-HD-Transkriptionsfaktoren spielen auch in der Embryonalentwicklung von Säugetieren eine Rolle; besonders sind sie notwendig für die Ausbildung spezifischer Zellpopulationen (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2 Biologische Funktionen einiger LIM-HD Faktoren**

LIM-HD Gen	Spezies	Biologische Funktion
Isl1	Vertebraten	Erforderlich für die Entwicklung bestimmter Moto- und Interneurone sowie für die Differenzierung der Hypophyse und des Pankreas
Lhx1	Vertebraten	Essentiell für die Ausbildung der vorderen Kopfstrukturen
Lhx2	Vertebraten	Involviert in die Entwicklung der Augen und des Großhirns sowie in die Erythropoese
Lhx3	Vertebraten	Nötig für die Spezifizierungen von Zelltypen der Adenohypophyse und für die Projektionen spezifischer Motoneurone

In Mäusen führt das Fehlen des Faktors Lhx1 während der Entwicklung zum Verlust der gesamten vorderen Kopfstrukturen (Shawlot and Behringer, 1995). Lhx2 ist wichtig für die Entwicklung der Augen, des Vorderhirns und für die Erythropoese (Pinto do et al., 1998; Porter et al., 1997; Xu et al., 1993) sowie bei Hühnern für die Entwicklung der Extremitäten (Rodriguez-Esteban et al., 1998). Die *Lhx1*- und *Lhx2*-Knockout-Mäuse sind embryonal letal. Für die Entwicklung spezifischer Zelltypen des Hypophysenvorderlappens und bei der Spezifizierung von bestimmten Motoneuronen sind Lhx3/Plim und Lhx4/Gsh4 notwendig (Li et al., 1994; Sharma et al., 1998; Sheng et al., 1996; Sheng et al., 1997; Thor et al., 1999). Die entsprechenden *Lhx3*- und *Lhx4*-

Knockout-Mäuse sind perinatal letal. Beim Menschen spielt Lhx3 eine wichtige Rolle bei der Genexpression der Hypophysenhormone (Netchine et al., 2000).

Lhx5 organisiert die Morphogenese von Strukturen des Hippocampus (Zhao et al., 1999). Das Ausschalten dieses Gens führt zum postnatalen Sterben der Maus. Lhx9 ist wichtig für die murine Gonaden-Entwicklung (Birk et al., 2000). Des Weiteren ist bei diesen Knockout-Mäusen die Bildung des embryonalen Pankreas-Bindegewebes einschließlich dessen Inselzellen beeinträchtigt (Ahlgren et al., 1997). Bei den so genannten Dreher-Mäusen, bei denen Punktmutationen im *Lmx1a*-Gen vorliegen, kommt es zu Störungen bei der Bildung der Neuralplatte und somit nachfolgend zu Störungen bei der Spezifizierung von dorsalen Zellen des ZNS (Chen et al., 1998; Millonig et al., 2000). Eine Mutation im *Lmx1b*-Gen beim Menschen hat das Nagel-Patella-Syndrom zur Folge. Hierbei kommt es u.a. zu Missbildungen mit Fehlen oder deutlicher Rückbildung von Finger- und Zehennägeln (Chen et al., 1998; Dreyer et al., 1998).

### 2.2.2 LMO Proteine

LMO-Proteine sind nur durch zwei konservierte LIM-Domänen charakterisiert. (Dawid et al., 1998; Jurata und Gill, 1998). Die Proteine LMO 1 bis 4 sind vorwiegend im Zellkern lokalisiert, können aber nicht direkt an DNA binden. Sie vermitteln ihre modulatorische und regulierende Aktivität als molekulare Adaptoren (Jurata and Gill, 1997). LMO-Proteine fördern den Aufbau von Proteinkomplexen, indem sie andere Proteine und Faktoren an diese Komplexe heranführen (Lee und Young, 2000).

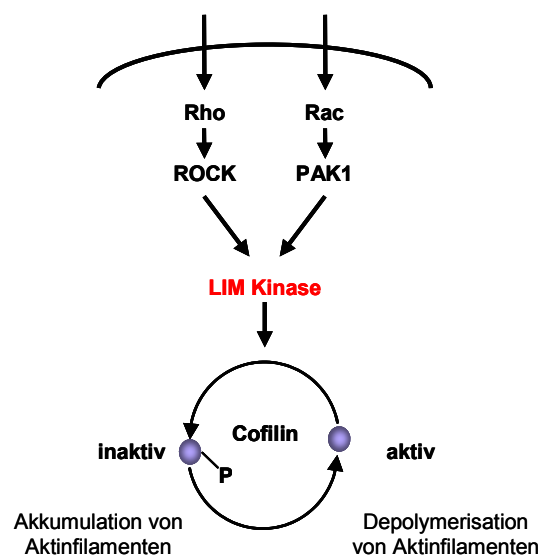
Wie die LIM-HD-Transkriptionsfaktoren sind LMO-Proteine während der Embryogenese von Bedeutung (Rabbitts, 1998). LMO2 ist essentiell für die Erythropoese, aus diesem Grund sind die *LMO2*-Knockout-Mäuse embryonal letal (Warren et al., 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass LMO2 auch für die Hämatopoese in erwachsenen Tieren erforderlich ist (Yamada et al., 1998). LMO-Proteine wurden auch als Onkogene identifiziert, spielen also bei der Tumorentwicklung eine Rolle (Bach, 2000; Lee and Pfaff, 2001; Rabbitts, 1998). Die Gene von LMO1 und LMO2 wurden zuerst aufgrund ihres Vorkommens in Translokationsbruchstellen in der DNA bei Patienten mit T-Zell-Leukämie entdeckt. Diese Translokationen führen zu einer stark erhöhten

Expression von LMO1 und LMO2 im Thymus und in T-Zellen, also in Geweben in denen die beiden LMO-Proteine normalerweise nur in geringen Mengen exprimiert werden. Eine Überexpression von LMO1 oder LMO2 im Thymus von transgenen Tieren führt entsprechend zu einer Transformation der T-Zellen (Larson et al., 1995; Larson et al., 1996). LMO4 ist wichtig für die Entwicklung des Neuralrohrs. Ein Großteil der *LMO4*-Knockout-Mäuse starb während der Embryonalentwicklung, wobei ein Drittel der Mäuse schwere Neuralrohrdefekte zeigte (Tse et al., 2004).

### 2.2.3 LIM-Kinase (LIMK)

Zwei LIM-Kinasen, LIMK1 und LIMK2, sind bisher in Säugetieren identifiziert worden. Diese Proteine weisen neben einer LIM-Domäne am C-Terminus eine Serin-Proteinkinase-Domäne auf (Bernard et al., 1994). LIMK1 wird weit verbreitet in embryonalem und adultem Gewebe exprimiert. Subzellulär wird LIMK1 vorwiegend im Cytoplasma gefunden, ist aber auch in der Lage in den Zellkern zu gelangen (Yang and Mizuno, 1998). In jüngster Zeit wurde eine Kollokalisierung in perinukleären Strukturen um den Zellkern, als Golgi identifiziert, beschrieben (Foletta et al., 2004).

Eine entscheidende Rolle der LIMK ist bei der Organisation des Cytoskeletts zu finden (siehe Abb. 2-2).



**Abb. 2-4 Organisation des Cytoskeletts durch die LIM Kinase**

Nach Rac und Rho Stimulation wird die LIMK aktiviert. Diese phosphoryliert und inaktiviert Cofilin. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Akkumulation von Aktinfilamenten.

Hierbei katalysiert die LIMK1 die Phosphorylierung eines N-terminalen Serinrests auf dem Protein Cofilin (ein Aktin bindendes Protein der Aktin-Depolymerisationsfaktor-Familie). Cofilin wird dadurch inaktiviert und als Resultat kommt es zu einer vermehrten Akkumulation von Aktinfilamenten (Arber et al., 1998; Yang and Mizuno, 1998). Selbst wird die LIMK von der Rho-assoziierten Kinase ROCK phosphoryliert und somit aktiviert (Maekawa et al., 1999).

Auch im Nervensystem spielt die LIMK eine Rolle. *LIMK1*-Knockout-Mäuse zeigten fehlgebildete Synapsenmorphologien (Meng et al., 2002). Gezeigt werden konnte auch, dass eine Deletion der kodierenden LIMK1 Region im Williams Syndrom resultierte, einem angeborenen Nervendefekt, der einhergeht mit abnormaler Kognition und erniedrigtem Intelligenzquotienten (Bellugi et al., 1999).

#### **2.2.4 Protein-Protein-Wechselwirkungen der LIM-Domäne**

Die LIM-Domäne wurde als Protein-Protein-Interaktionsdomäne identifiziert. Für eine Reihe von biologischen Vorgängen spielen diese Protein-Protein-Wechselwirkungen eine bedeutende Rolle (Arber and Caroni, 1996; Feuerstein et al., 1994; Schmeichel and Beckerle, 1994). Proteine, die mit einer LIM-Domäne interagieren können, sind zahlreich und funktionell unterschiedlich, wie z.B. Kinasen, Kofaktoren, Transkriptionsfaktoren oder Cytoskelett bindende Proteine.

Etlliche LIM-Domänen-Proteine liegen an das Cytoskelett einer Zelle assoziiert vor, z.B. CRP, Zyxin oder Paxillin. CRP-Proteine dimerisieren miteinander über eine Wechselwirkung ihrer LIM-Domänen (Feuerstein et al., 1994) und binden an Elemente des Aktin-Cytoskeletts durch eine Bindung mit  $\alpha$ -actinin und Zyxin (Feuerstein et al., 1994; Louis et al., 1997).  $\alpha$ -Actinin und Zyxin sind wichtige Regulatoren für die Organisation des Aktin-Cytoskeletts. Eine Wechselwirkung von Zyxin und CRP1 mit sogenannten „adhesion plaques“ wird durch die N-terminale LIM-Domäne von Zyxin hervorgerufen (Schmeichel and Beckerle, 1994). Paxillin ist ein Adaptor-Protein, das eine Rolle bei der Regulation von „focal adhesions“ (einer charakteristischen Proteinakkumulation) spielt. Untersuchungen zeigten, dass die LIM-Domäne 2 und 3 des Paxillin-Proteins als Bindestellen und Substrat von Serin/Threonin-Kinasen fungiert

(Brown et al., 1998). Die Phosphorylierung der Paxillin-LIM-Domäne reguliert die Integration in „focal adhesions“.

LIM-Domänen-Proteine können auch mit diversen Transkriptionsfaktoren interagieren. Untersuchungen der LIM-Domäne von LMO2 zeigten, dass eine Interaktion mit Vertretern von mindestens zwei Transkriptionsfaktor Klassen, GATA1/2 und dem bHLH Transkriptionsfaktor Tal1/Scl, möglich ist. Dies wurde durch Knockout-Experimente bestätigt. Knockout-Mäuse jedes dieser drei Gene zeigten einen ähnlichen Phänotyp, nämlich eine Inhibition der Erythropoese (Rabbitts, 1998). Während der Pankreasentwicklung konnte eine Interaktion von Lmx1 mit dem bHLH Faktor E47 des Insulinpromotors gezeigt werden, welche zu einer synergistischen Genaktivierung führt (German et al., 1992). Lhx3/Plim interagiert beispielsweise während der Entwicklung des Hypophysenvorderlappens mit dem POU-Domänen-Transkriptionsfaktor Pit1. Diese Interaktion führt zu einer synergistischen Aktivierung von Promotor- und Enhancerregionen einiger spezifischer Hypophysen-Gene (Bach et al., 1995; Meier et al., 1999). Darüber hinaus kann die LIM-Domäne von Lhx3/Plim auch direkt mit der Homeodomäne von Isl1 interagieren. Die Interaktionen innerhalb des Lhx3-Isl1-Komplexes können durch den LIM-Kofaktor CLIM (auch bekannt als NLI und Ldb) gestört werden (Jurata et al., 1998). Lhx3 bindet direkt an CLIM unter Bildung eines tetrameren Komplexes, bestehend aus zwei Lhx3 und zwei CLIM Proteinen. Dies resultiert in die Differenzierung der V2-Interneurone im Rückenmark. In Motoneuronen hingegen wird Lhx3 durch Isl1 von den C-terminalen LIM-Interaktionsdomänen des CLIM-Kofaktors verdrängt und stattdessen an eine Bindungsstelle in der C-terminalen Region von Isl1 gebunden, wodurch ein hexamerer Komplex gebildet wird. Durch die Verlagerung von Lhx3 durch spezifische Proteininteraktionen innerhalb des Lhx3-CLIM-Isl1-Komplexes wird aus dem Interneuronen-fördernden Faktor ein Motoneuronen-fördernder Faktor. Die zelltypspezifischen Protein-Protein-Interaktionen des LIM-HD Faktors Lhx3 tragen somit zur Spezifizierung von Moto- und Interneuronen bei (Thaler et al., 2002). Diese Studien zeigen, dass Interaktionen mit nukleären LIM Proteinen an der Bildung von Multiproteinkomplexen beteiligt sind und die Transkription beeinflussen.

Die LIM-Domänen von LIM-HD- und LMO-Faktoren vermitteln auch die Protein-Protein-Interaktionen mit den Kofaktoren der CLIM-Familie (siehe 2.2.4.1), mit RLIM (siehe 2.2.4.2) und mit Rnf6 (siehe 2.2.4.3).

#### **2.2.4.1 CLIM Kofaktoren**

Die vorwiegend im Kern lokalisierten LIM-Proteine interagieren mit ihren LIM-Domänen nicht nur mit Transkriptionsfaktoren, sondern auch mit Kofaktoren, die nicht an DNA binden können. Zu diesen Kofaktoren gehört auch die konservierte Familie der CLIM (cofactors of LIM-HD proteins) Kofaktoren, bestehend aus CLIM1/Ldb2 und CLIM2/Ldb1/NLI/Chip. Verschiedene Arbeitsgruppen demonstrierten, dass sie mit hoher Affinität an nukleäre LIM-Proteine binden können (Agulnick et al., 1996; Bach et al., 1997; Jurata et al., 1996; Morcillo et al., 1997; Visvader et al., 1997). Expressionsuntersuchungen zeigten, dass die größten Mengen von *CLIM1*- und *CLIM2*-Transkripten in Regionen mit spezifischer LIM-HD-Genexpression gefunden wurden (Bach et al., 1997; Jurata et al., 1996; Toyama et al., 1998; Visvader et al., 1997). CLIM-Kofaktoren können Homodimere bilden und binden an alle getesteten LIM-Domänen der LMO- und LIM-HD-Proteine (Bach et al., 1997; Bach et al., 1999; Jurata et al., 1996; Jurata et al., 1998). Die CLIM-Kofaktoren interagieren mit Vertretern verschiedener Transkriptionsfaktorklassen und bilden Multiprotein-Komplexe, die neben den LIM-HD-Faktoren auch LMO-, Pitx-, bHLH- und GATA-Faktoren enthalten (Agulnick et al., 1996; Bach et al., 1997; Breen et al., 1998; Jurata et al., 1996; Jurata and Gill, 1997; Jurata et al., 1998; Morcillo et al., 1997; Visvader et al., 1997; Wadman et al., 1997). Dies zeigt, dass die Bildung von Multiprotein-Komplexen eine wesentliche Eigenschaft der CLIM Kofaktoren ist.

CLIM Kofaktoren sind von essentieller Bedeutung für die transkriptionelle und biologische Aktivität von LIM-HD-Proteinen während der Embryogenese und abhängig vom Promotor zeigen sie synergistische oder inhibitorische Eigenschaften. Eine synergistische Aktivierung der Transkription wurde für den  $\alpha$ GSU-Promotor mit Lhx3 und P-OTX gefunden (Bach et al., 1999; Milan and Cohen, 1999; van Meyel et al., 1999), für den gooseoid-Promotor mit Otx2 und Xlim1 (Mochizuki et al., 2000). In *Drosophila* wurde gezeigt, dass die relativen Mengen der Apterous- und CLIM/Chip-Proteine

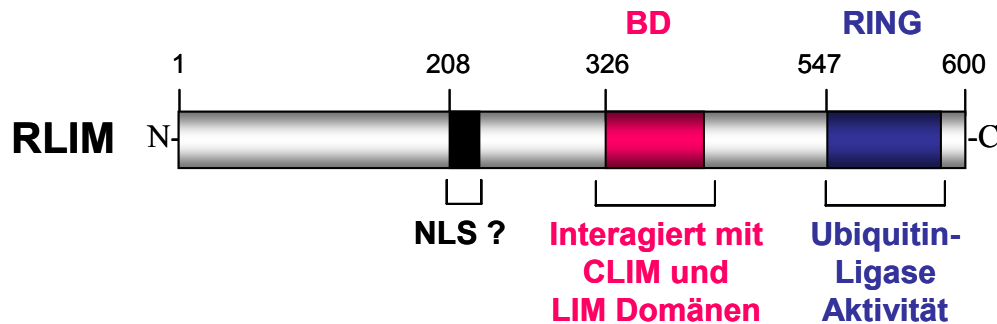
essentiell für eine korrekte Flügelbildung sind. Es wurde auch demonstriert, dass LMO-Proteine *in vivo* mit Apterous-Proteinen um den Kofaktor CLIM/Chip kompetieren und so die biologische Aktivität von LIM-HD-Proteine hemmen können (Milan and Cohen, 1999; van Meyel et al., 1999). Für Vertebraten wird angenommen, dass auch hier LMO-Proteine generell in der Lage sind, CLIM-Kofaktoren von ihren LIM-HD-Partnern zu verdrängen und so die Aktivität von LIM-HD-Proteinen zu inhibieren (Milan et al., 1998; Milan and Cohen, 1999; van Meyel et al., 1999; Zeng et al., 1998). CLIM2-Knockout-Mäuse zeigen Defekte bei der Bildung des Herzens, der Körperachse, des zentralen Nervensystems und bei der Entwicklung von Keimzellen (Mukhopadhyay et al., 2003).

#### **2.2.4.2 RLIM**

RLIM (RING finger LIM domain-binding protein) wurde aufgrund seiner Fähigkeit zur Interaktion mit nukleären LIM-Domänen identifiziert (Bach et al., 1999). Die RLIM-kodierende mRNA wird ubiquitär exprimiert und ist während der Entwicklung in der Maus schon vor dem Embryonaltag 7.5 (E7.5) nachweisbar. Der Kofaktor RLIM interagiert nicht nur mit nukleären LIM-Domänen-Proteinen, sondern auch mit CLIM-Kofaktoren und mit dem Sin3A-HDAC-Korepressor-Komplex (Bach et al., 1999). So inhibiert RLIM bei transienter Kotransfektion die transkriptionelle Aktivität von Lhx3/Plim und Lhx2 sowie alle bisher untersuchten synergistischen Aktivierungen von Lhx3 mit anderen Transkriptionsfaktoren. Eine Rekrutierung des Sin3A-HDAC-Korepressor-Komplexes scheint verantwortlich für die Hemmung der Lhx3-vermittelten Transkription zu sein (Bach et al., 1999). Mit *in vivo*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die retroviral-vermittelte Überexpression von RLIM im sich entwickelnden Hühnerflügel zu einem ähnlichen Phänotyp führt wie die spezifische Inhibierung von LIM-HD Faktoren. Hierbei kommt es zu Störungen bei der Entwicklung und Ausbildung distaler Flügelstrukturen (Bach et al., 1999). Über die molekularen Inhibierungsmechanismen und über die biologische Funktion von RLIM ist bisher wenig bekannt. Unklar ist, welche Rolle RLIM/CLIM-Interaktionen dabei spielen und ob die Inhibierungen von LIM-HD-Proteinen durch RLIM direkt, über CLIM-Kofaktoren, oder aber über beide Mechanismen geschieht.



RLIM konnte in Patienten mit Nierenkarzinomen nachgewiesen werden und es wird vermutet, dass eine veränderte Expression für die Entstehung von Tumoren relevant sein könnte (Scanlan et al., 1999).



**Abb. 2-5 Aufbau des RLIM Proteins**

RLIM enthält eine argininreiche Domäne, das potentielle NLS, eine basische Domäne, die für die Interaktion mit CLIM und mit LIM-Proteinen verantwortlich ist, sowie ein RINGfinger.

RLIM enthält ein RING-H2-Zinkfingermotiv, das an dem C-Terminus des Proteins lokalisiert ist. Grundsätzlich werden RINGfinger nahe des N- oder C-Terminus gefunden (Freemont, 2000). Dieses RINGfingermotiv besteht aus acht streng konservierten Cystein- und Histidinresten und ist definiert als: Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>9-39</sub>-Cys-X<sub>1-3</sub>-His-X<sub>2-3</sub>-Cys/His-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>4-48</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Die Cystein- und Histidinreste vermitteln die Zink-Bindung, wodurch es zur Ausbildung der charakteristischen RING-Zinkfingerstruktur kommt (Freemont, 2000; Joazeiro and Weissman, 2000). Diese Formation unterscheidet den RING-Zinkfinger von den Zinkfingern der LIM-Proteine, die als Tandem angeordnet sind.

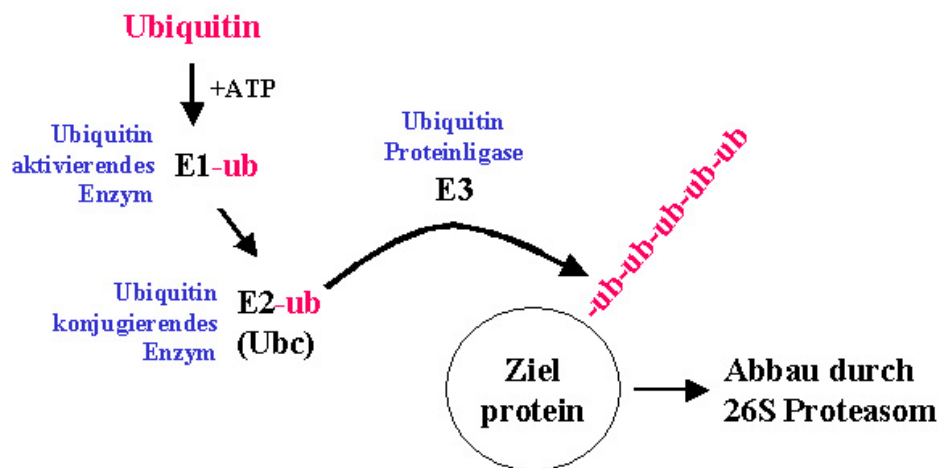
#### 2.2.4.3 RNF6

Zu Beginn meiner Arbeit war über das Protein Rnf6 lediglich bekannt, dass es ebenfalls einen RING-H2-Zinkfinger besitzt (Macdonald et al., 1999). Im Laufe meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rnf6 in Sertoli Zellen (spezielle Zellen des Hodens) im Cytoplasma lokalisiert ist, und dass im Kern eine punktartige Expression zu beobachten war (Lopez et al., 2002).

### 2.3 Ubiquitinierung und proteasomaler Abbau

Eine bedeutende Rolle innerhalb der posttranslationalen Modifikationssysteme in eukaryontischen Zellen nimmt das Ubiquitin-System ein. Die klassische Funktion des Ubiquitin-Systems ist der gezielte Proteinabbau durch das Proteasom. Die Degradation von Proteinen ist aber nur eine von vielen Aufgaben des Ubiquitin-Systems. Neben dem Abbau von Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-System deuten sich eine Reihe weiterer Funktionen für die Modifikation mit Ubiquitin an. So sind Ubiquitinierungen beispielsweise involviert in die Rezeptor-vermittelte Endocytose, die Regulation des Zellzyklus, der zellulären Differenzierung und der Apoptose (Pickart, 2001; Weissman, 2001). Über kovalente Isopeptidbindung werden Zielproteine (Substrate) mit Ubiquitin verknüpft. Ubiquitinierung führt häufig zur Bildung so genannter Ubiquitinketten, in denen einzelne Ubiquitinmoleküle miteinander verknüpft werden. Die über K<sup>48</sup>-verbundenen Polyubiquitin-Ketten werden von einer multikatalytischen Protease, dem Proteasom, erkannt und abgebaut (Jackson et al., 2000; Pickart, 2001).

Ubiquitin, ein Protein von 76 Aminosäuren, ist zwischen eukaryontischen Spezies hoch konserviert. Die Substrat-Verknüpfung erfolgt über eine Isopeptidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Ubiquitin-Glycins und der primären  $\epsilon$ -Aminogruppe eines internen Lysins des Zielproteins. Drei Enzymtypen sind an der Ubiquitinierung beteiligt. Dies sind der Typ E1, das Ubiquitin aktivierende Enzym (Uba1), der E2-Typ, Ubiquitin konjugierende Enzyme (Ubc's), und der E3-Typ, die Ubiquitinligasen. Zunächst wird der C-Terminus von Ubiquitin durch Ausbildung einer Thioesterbindung mit dem E1 Enzym aktiviert. Dieser Schritt benötigt ATP. Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin auf einen Cystein-Rest des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) transferiert. Der letzte Schritt, die Ausbildung einer Isopeptidbindung mit dem Zielprotein, erfolgt unter Zuhilfenahme einer E3 Ubiquitin-Ligase. Diese E3 Proteine sorgen für die spezifische Erkennung eines Zielproteins.

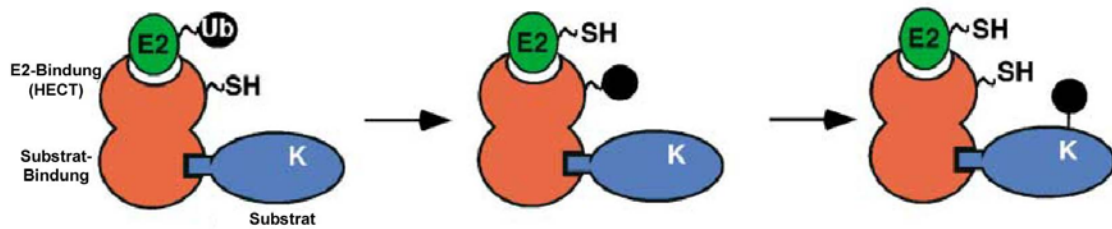


**Abb. 2-6 Ubiquitin-Kaskade**

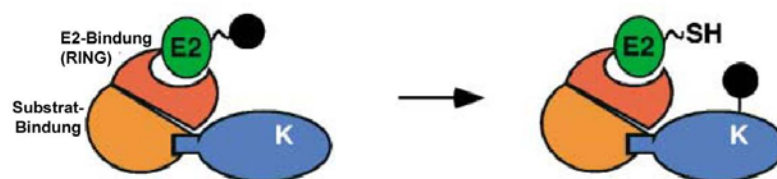
Ubiquitin (ub) wird zuerst in einem ATP-abhängigen Schritt durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert. Das aktivierte Ubiquitin wird anschließend auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen. Die Ubiquitin-Ligasen (E3s) binden an die E2s und vermitteln die spezifische Bindung des Ubiquitins an ein bestimmtes Substrat.

E3 Ubiquitin-Ligasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die HECT-E3-Ligasen (Homologous to E6-APC Terminus) und die RING (Really Interesting New Gene)fingere3-Ligasen, die den Ubiquitin-Transfer entweder mit der HECT-Domäne oder dem RINGfinger als katalytische Domäne bewerkstelligen. Die HECT-Domänen-Familie von E3-Enzymen besitzt eine ungefähr 350 Aminosäuren enthaltende HECT-Domäne, die zuerst in E6-AP gefunden wurde (Scheffner et al., 1993). Diese HECT-Domäne enthält ein katalytisches Cystein, welches ein Thioester-Zwischenprodukt mit Ubiquitin bildet. Anschließend kann das Ubiquitin dann auf das Substrat übertragen werden (Jackson et al., 2000; Pickart, 2001). HECT-E3-Ligasen sind direkt am Ubiquitin Transfer beteiligt, dagegen scheinen RINGfinger nicht unmittelbar am Transfer beteiligt zu sein. RINGfinger-E3-Ligasen enthalten einen etwa 70 Aminosäuren langen RINGfinger (Pickart, 2001). Sie vermitteln durch eine gleichzeitige enge Bindung sowohl an den E2-Ubiquitin-Komplex als auch an das Substrat-Protein den Transfer des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Substrat-Protein.

### A. HECT-Domänen E3s



### B. RINGfinger E3s



#### Abb. 2-7 Überblick der E3-Klassen

(A) HECT-Domänen E3s binden Ubiquitin direkt an einem konservierten Cysteinrest und übertragen es dann auf das Substrat (blau). (B) RINGfinger E3s vermitteln eine Bindung sowohl an den E2-Ubiquitin-Komplex als auch an das Substrat-Proteins (Modifiziert nach Pickart, 2004).

Ein Protein kann an einem oder mehreren Lysinresten durch ein Ubiquitin-Molekül (Monoubiquitinierung), durch eine Kette von Ubiquitinmolekülen (Polyubiquitinierung) oder durch eine Kombination von beiden Ubiquitinierungsarten modifiziert werden (Pickart, 2001; Weissman, 2001). Das Ubiquitin-Molekül selbst verfügt über sieben konservierte Lysinreste, die als potentielle Bindungsstellen für andere Ubiquitin-Moleküle in Frage kommen. So wurde für die Lysinreste K11, K29, K48 und K63 eine *in vivo*-Ubiquitin-Interaktion nachgewiesen (Hicke and Dunn, 2003; Weissman, 2001). Nachdem das erste Ubiquitin auf das Substrat-Protein übertragen wurde, spielt während einer Polyubiquitinierung die Position der Lysinreste im Ubiquitin eine herausragende Rolle bei der weiteren Prozessierung. Sehr häufig wird das nachfolgende Ubiquitin an den Lys48 (K48)-Rest des vorherigen Ubiquitins angehängt (Hershko and Ciechanover, 1998; Pickart, 2001). Solch multiubiquitinierte Substrate können über das 26S Proteasom erkannt und abgebaut werden. Dabei genügen Polyubiquitinketten von vier oder mehr Ubiquitin-Molekülen zur Erkennung und zum Abbau (Hicke and Dunn, 2003; Weissman,

2001). Substrate werden über eine ATP verbrauchenden Reaktion zu kurzen Peptiden abgebaut. Der ubiquitinvermittelte Abbau von Proteinen durch das Proteasom ist die bisher am besten analysierte Funktion des Ubiquitin-Moleküls. Die Stabilität von Transkriptionsfaktoren und deren Kofaktoren kann durch Ubiquitinierungen und anschließenden proteasomalen Abbau reguliert werden. So werden beispielsweise die BOB.1/OBF.1-Kofaktoren in B-Zell-Linien über diesen Weg abgebaut (Boehm et al., 2001).

K63-verknüpfte Ubiquitinketten auf Substraten führen nicht zum Abbau sondern dienen als Signalgeber z.B. in der NF $\kappa$ B Aktivierung oder der DNA-Reparatur (Pickart, 2001). Monoubiquitinierungen sind für verschiedene zelluläre Funktionen wichtig, und zwar bei der Histon-Regulation, der Rezeptor-vermittelten Endozytose und DNA-Reparatur (Weissman, 2001; Hicke, 2001). Monoubiquitinierungen werden dementsprechend auch in Zusammenhang mit Veränderungen der Lokalisierung von Proteinen gebracht.

## 2.4 Kerntransportsignale

Der Zellkern einer eukaryontischen Zelle wird durch eine Doppelmembran umschlossen, die das Nucleoplasma vom Cytoplasma trennt. Im Zellkern finden viele Prozesse statt (z.B. Transkription) und die daran beteiligten Faktoren müssen vom Ort ihrer Synthese, dem Cytoplasma, in den Kern gelangen. Umgekehrt gibt es auch Komponenten, die den Zellkern verlassen müssen, da sie im Cytoplasma gebraucht werden. Der nucleocytoplasmatische Austausch von Molekülen erfolgt durch Kernporenkomplexe. Das kann einerseits durch passive Diffusion und andererseits durch einen Rezeptor-vermittelten Prozess geschehen. Proteine, die kleiner als 40 kDa sind, können durch Diffusion in den Zellkern gelangen. Für größere Proteine ( $> 40$  kDa) ist dieser Weg jedoch sehr ineffizient und sie werden daher aktiv und signalabhängig in den Kern transportiert (Kaffman and O'Shea, 1999).

Der Transport von Proteinen zwischen Kompartimenten innerhalb einer Zelle wird durch Signalsequenzen vermittelt, die gleichzeitig essentiell und hinreichend für den Kerntransport aus und in den Zellkern sind. Von den Kernexportsignalen (NES), die für den Export von Proteinen aus dem Kern verantwortlich sind und sich oft durch einen

hohen Leucingehalt auszeichnen, lassen sich die Kernlokalisierungssignale (NLS) unterscheiden.

Von den Kernexportsignalen ist das leucinreiche NES des HIV-1-Rev-Proteins (Wen et al., 1995) am besten verstanden. Das Protein Rev aus dem HI-Virus enthält eine leucinreiche Sequenz, die als Exportsignal fungiert und von einem Exportrezeptor erkannt wird. Dieser NES-Exportrezeptor ist CRM1 (Fornerod et al., 1997). CRM1 exportiert verschiedene Substrate, die alle eine leucinreiche nukleäre Exportsequenz besitzen. Die anderen bekannten Exportrezeptoren sind hingegen substratspezifisch.

Kernlokalisierungssignale (NLS) sind häufig kurze Peptidsequenzen, die nötig und ausreichend für die nukleäre Lokalisation des betreffenden Proteins sind. Klassischerweise sind sie durch einen oder zwei Abschnitte mit basischen Aminosäuren charakterisiert. Zum Beispiel wurde im Tumor-Antigen vom Simian Virus (SV40) ein NLS beschrieben, bestehend aus einem Aminosäure-Heptamer, das fünf basische Reste einschließt. Ein zweiter NLS-Typ wurde erstmals im Nucleoplasmin beschrieben. Dieser zweite NLS-Typ besteht aus zwei basischen Regionen (bipartit) die unterbrochen werden von 10 Aminosäuren mit beliebiger Sequenz (Kaffman and O'Shea, 1999). Neuere Daten sprechen dafür, dass es andere Kernlokalisierungssignale gibt, die sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenz nicht als NLS identifizieren lassen. Ebenfalls werden nicht alle NLS Sequenzen mit basischen Aminosäuren in die Zelle transportiert. Das gleiche gilt für NES Sequenzen, wo ein Fehlen eines leucinreichen Abschnitts nicht die Möglichkeit ausschließt, dass ein Protein aktiv exportiert wird.

## 2.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, die Regulation von LIM-Proteinen durch ihre assoziierten Kofaktoren aufzuklären. Dies beinhaltete eine Charakterisierung der spezifischen Protein-Domänen des RLIM-Proteins. Da bekannt war, dass RLIM als transkriptioneller Korepressor wirken kann, sollte seine Repressorrolle näher untersucht und die dafür verantwortlichen Domänen charakterisiert werden.

Im LIM-Proteinsystem wurden in der Maus bisher immer zwei nahe verwandte Proteine identifiziert (z.B. CLIM1 und 2, oder LIMK1 und 2), die stark ähnliche Eigenschaften

besitzen. Bisher konnte für RLIM kein verwandtes Molekül charakterisiert werden und es sollte nach einem homologen Protein zu RLIM gesucht werden. Anschließend sollte dieses Protein auf seine Funktionen im LIM-Proteinsystem analysiert und mit RLIM verglichen werden.

RLIM besitzt einen RING-Zinkfingers und da dieses Motiv in Ubiquitin-Proteinligasen weit verbreitet zu finden ist (Lorick, 1999), sollte einerseits untersucht werden, ob RLIM Ubiquitinligaseaktivität besitzt und ob diese Funktion eine Rolle im LIM-Proteinsystem spielt. Falls vorhanden, sollten Substratproteine entdeckt werden und es sollte in Zellkultur überprüft werden, ob es vermittelt durch RLIM zu einem Abbau dieser Proteine kommt. Anschließend sollten diese Funktionen auch für das homologe Protein analysiert werden. Weiterhin sollten Unterschiede zwischen RLIM und seinem Homolog aufgedeckt und analysiert werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Eine RINGfinger Proteinfamilie bestehend aus RLIM und Rnf6

Innerhalb des LIM-HD Proteinsystems wurden in der Regel bei Säugetieren häufig zwei zueinander sehr homologe Vertreter gefunden (siehe Einleitung 2.2.1), die sich im Fall von Lhx3 und Lhx4 sogar teilweise funktionell ersetzen können (Hobert and Westphal, 2000). Eine ähnliche Paarbildung konnte auch bei den LMO Proteinen sowie den CLIM Kofaktoren gefunden werden. Ein solches Partnerprotein war für den Kofaktor RLIM bisher nicht bekannt.

Deshalb wurde zunächst die Datenbank (NCBI) nach Proteinen mit möglichst großen Aminosäuresequenzhomologien im Vergleich mit RLIM untersucht. Mit Hilfe dieser Datenbankrecherche wurde von mir das RINGfinger Protein Rnf6 als aussichtsreichster Kandidat identifiziert. Wie aus dem Aminosäuresequenzvergleich der Proteine RLIM (das für RLIM kodierende Gen heißt Rnf12) und Rnf6 ersichtlich wird (siehe Abb. 3-1), zeigen RLIM und Rnf6 aus der Maus eine Identität der Aminosäuresequenz von 45 %. Weiterhin weisen diese Proteine die größte Ähnlichkeit auf der Aminosäuresequenzebene in den funktionellen Domänen des N-terminalen Leucin-Zippers, im C-terminalen RING-H2-Zinkfingermotiv, in der basischen Domäne (Bindestelle für CLIM und LIM-Domänen) und in einem potentiellen nukleären Exportsignal (NES) auf (in Abb. 3-1 Rot überschrieben). Ferner enthalten beide Proteine ein putatives nukleäres Kernlokalisierungssignal (NLS), das sich jedoch für RLIM und Rnf6 jeweils in der Sequenz und hinsichtlich der Lage im Protein unterscheidet (in Abb. 3-1 Blau überschrieben).



		-----Leucin-Zipper-----	
mRNF6	<b>MDPSRSRSGGS</b> GEES <b>SFQENERRWQ</b> QERL <b>HREEAY</b> YQ <b>FINELSD</b> EDYRLMRD <b>HNLLGTPG</b> 60		
mRNF12	<b>MENS</b> DSNDK <b>GS</b> -DQ <b>SAAQ</b> --- <b>RRSQMDRLD</b> REEAFYQ <b>FVNNLSE</b> EDYRLMRD <b>NLLGTPG</b> 56		
		-----	
mRNF6	<b>EITSEEL</b> Q <b>QRLERAKE</b> QLAS <b>QPGSDSA</b> SDGDS <b>ESLRAHSDE</b> DS <b>LLRWLN</b> TF <b>RF</b> T <b>GNVTR</b> 120		
mRNF12	<b>ESTE</b> EEL <b>LRRLQ</b> Q <b>IK</b> E <b>GPPPQ</b> SPDENR <b>AG</b> ---- <b>ES</b> SDDVTNS <b>DSI</b> ID <b>WLN</b> SV <b>RQ</b> T <b>GN</b> TR 112		
mRNF6	<b>SGQ</b> NGNQ <b>SWRAV</b> SRTNP <b>NSG</b> E <b>FF</b> C <b>SLEI</b> H <b>IN</b> PD <b>NR</b> CS <b>EMHG</b> EDSTDI <b>PLSG</b> VNREHR <b>QQR</b> 180		
mRNF12	<b>SRQ</b> RGNQ <b>SWRAV</b> SRTNP <b>NSG</b> D <b>FR</b> F <b>SLEI</b> IN <b>VNR</b> NN <b>GS</b> Q <b>TSE</b> NE----- 154		
		-----NLS Rnf6?-----	
mRNF6	<b>PSS</b> PVARR <b>TRS</b> Q <b>TSM</b> SS <b>S</b> G <b>PRGR</b> RG <b>ARR</b> Q <b>SS</b> V <b>QGS</b> FATL <b>GRLRN</b> G <b>IG</b> VAL <b>G</b> V <b>RV</b> SA <b>PR</b> T 240		
mRNF12	- <b>SEP</b> STR <b>RLS</b> VEN <b>ME</b> SS <b>S</b> Q <b>RQ</b> MEN <b>SA</b> SES <b>AS</b> AR <b>PS</b> RA <b>E</b> ---- <b>RN</b> STEAV <b>TE</b> V <b>PT</b> TR <b>AQR</b> 209		
		-----	
mRNF6	NVINSHTNQSDGSTLRQGG <b>RQRF</b> GAAHIWENG <b>ARS</b> N <b>VTV</b> R <b>NTN</b> Q <b>R</b> LE <b>P</b> I <b>R</b> LR <b>PA</b> S <b>S</b> -SRS 299		
mRNF12	----- <b>ARS</b> ----- <b>R</b> S <b>PE</b> HR <b>R</b> TR <b>AR</b> A <b>ER</b> SM <b>S</b> PL <b>Q</b> P 233		
		--- NLS RLIM? ---	
mRNF6	<b>RS</b> PI <b>QR</b> QNG <b>TV</b> H <b>NS</b> Q <b>RQ</b> GR <b>PV</b> Q <b>QT</b> C <b>RNR</b> SV <b>RHR</b> GV <b>TR</b> V <b>F</b> LE <b>Q</b> C <b>R</b> E <b>HR</b> C <b>TD</b> Y <b>T</b> PL <b>S</b> NS <b>RL</b> 359		
mRNF12	<b>T</b> SE <b>I</b> PR <b>R</b> AP <b>T</b> LE <b>Q</b> SS <b>ENE</b> ----- <b>PE</b> GS <b>SR</b> TR <b>HH</b> -- <b>V</b> TL <b>R</b> Q <b>Q</b> IS <b>CP</b> EL <b>L</b> C <b>R</b> GL <b>FA</b> AS <b>CS</b> RN 286		
		----- basische Domäne -----	
mRNF6	<b>V</b> SR--IT <b>VEE</b> GES <b>SR</b> SS <b>AAT</b> Q <b>R</b> HP <b>AT</b> IL <b>D</b> LQ <b>VRR</b> IR <b>P</b> GE <b>TR</b> DR <b>DS</b> IAN <b>R</b> TR <b>SR</b> AG <b>LA</b> EST 417		
mRNF12	<b>P</b> S <b>Q</b> GTSS <b>SD</b> T <b>G</b> SN <b>SE</b> SS <b>G</b> SG <b>Q</b> R <b>P</b> PI <b>I</b> V <b>L</b> D <b>LQ</b> VRR <b>VR</b> P <b>GE</b> Y <b>R</b> Q <b>DS</b> IAS <b>R</b> TR <b>SR</b> S <b>Q</b> AP <b>NN</b> T 346		
		---- basische Domäne -----	
mRNF6	<b>V</b> --EST <b>S</b> GG <b>F</b> H <b>R</b> TI <b>S</b> H <b>L</b> ERS <b>G</b> V <b>R</b> TY <b>V</b> ST <b>I</b> TV <b>P</b> LR <b>R</b> I <b>S</b> END <b>V</b> VE <b>P</b> S <b>S</b> VAL <b>R</b> SI <b>L</b> R <b>Q</b> IM <b>T</b> GF 475		
mRNF12	<b>V</b> TY <b>E</b> S <b>E</b> R <b>G</b> GG <b>F</b> R <b>R</b> TI <b>S</b> RS <b>E</b> R <b>A</b> G <b>V</b> R <b>TY</b> V <b>ST</b> IR <b>I</b> PI <b>R</b> RI <b>L</b> NT <b>GL</b> SE <b>IT</b> S <b>V</b> A <b>I</b> Q <b>T</b> M <b>L</b> R <b>Q</b> IM <b>T</b> GF 406		
mRNF6	<b>G</b> EL <b>S</b> SL <b>M</b> E <b>V</b> E <b>P</b> ASE <b>N</b> Q <b>S</b> NG <b>Q</b> RL <b>P</b> E <b>V</b> YL <b>E</b> LS <b>NG</b> --- <b>DA</b> ADD <b>SG</b> QH <b>GR</b> AS <b>S</b> Q <b>A</b> S <b>Q</b> A <b>Q</b> D <b>G</b> A <b>E</b> 531		
mRNF12	<b>G</b> EL <b>S</b> Y <b>F</b> M <b>Y</b> SD <b>S</b> D <b>S</b> E <b>P</b> S <b>A</b> SV <b>S</b> SR <b>N</b> VER <b>V</b> E <b>S</b> R <b>NG</b> R <b>G</b> SS <b>G</b> GN <b>S</b> SG <b>S</b> SS <b>S</b> SS <b>P</b> SP <b>S</b> SS <b>G</b> ES <b>S</b> E 466		
		-----NES?-----	
mRNF6	MLAVREPAPPQARP <b>SG</b> - <b>S</b> R <b>S</b> RR <b>Q</b> L <b>G</b> R <b>A</b> D <b>S</b> V <b>V</b> E <b>A</b> C <b>T</b> LP <b>I</b> L <b>R</b> L <b>A</b> H <b>F</b> LL <b>N</b> E <b>G</b> DD <b>D</b> P <b>I</b> R <b>G</b> L <b>T</b> K 590		
mRNF12	SSSK <b>M</b> F <b>E</b> GS <b>S</b> E <b>G</b> GS <b>SG</b> P <b>S</b> R <b>K</b> D <b>G</b> R <b>H</b> R <b>A</b> P <b>V</b> T <b>F</b> D <b>E</b> SG <b>S</b> LP <b>F</b> F <b>S</b> L <b>A</b> Q <b>F</b> LL <b>N</b> E <b>D</b> D <b>D</b> Q <b>P</b> R <b>G</b> L <b>T</b> K 526		
		-----RINGfinger-----	
mRNF6	<b>E</b> QID <b>N</b> L <b>S</b> TR <b>S</b> Y <b>E</b> Q <b>D</b> GV <b>D</b> SEL <b>G</b> K <b>V</b> C <b>S</b> V <b>C</b> I <b>S</b> D <b>Y</b> V <b>A</b> C <b>N</b> K <b>L</b> R <b>Q</b> L <b>P</b> C <b>L</b> H <b>E</b> F <b>H</b> I <b>H</b> C <b>I</b> D <b>R</b> W <b>L</b> SE <b>N</b> C <b>T</b> 650		
mRNF12	<b>E</b> QID <b>N</b> L <b>A</b> M <b>R</b> S <b>F</b> GEN----- <b>D</b> AL <b>K</b> I <b>C</b> S <b>V</b> C <b>I</b> T <b>E</b> Y <b>T</b> E <b>G</b> D <b>K</b> L <b>R</b> K <b>L</b> P <b>C</b> S <b>H</b> E <b>F</b> H <b>V</b> H <b>C</b> I <b>D</b> R <b>W</b> L <b>S</b> E <b>N</b> S <b>T</b> 582		
		-----	
mRNF6	<b>CP</b> V <b>C</b> RR <b>P</b> V <b>L</b> E <b>F</b> C <b>A</b> T <b>S</b> S <b>G</b> 667		
mRNF12	<b>CP</b> I <b>C</b> RR <b>A</b> V <b>L</b> S <b>S</b> G <b>N</b> R <b>E</b> S <b>V</b> V 600		

**Abb. 3-1 Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von mRnf6 und mRLIM (Rnf12)**

Vergleich der Aminosäuresequenzen von murinem Rnf6 und murinem Rnf12 (Rnf12 ist das für RLIM kodierende Gen). Rote Markierung zeigt konservierte funktionelle Domänen, blaue Markierung zeigt stärker unterschiedliche funktionelle Domänen.

Aufgrund dieser Übereinstimmungen sollten beide Proteine hinsichtlich ihrer regulativen Funktion im LIM-HD-Proteinnetzwerk untersucht und potentiell funktionelle Domänen analysiert und verglichen werden.

## 3.2 Funktionelle Untersuchung von RLIM und Rnf6 als transkriptionelle Korepressoren

Da gezeigt werden konnte, dass RLIM als transkriptioneller Korepressor wirkt, wurden die Proteindomänen von RLIM näher analysiert, die für diesen Effekt verantwortlich sein könnten. Parallel dazu wurde untersucht, ob das Homolog Rnf6 ebenfalls als transkriptioneller Korepressor wirken kann. Die Effekte von RLIM und Rnf6 auf die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren wurden mittels transienter Transfektion studiert.

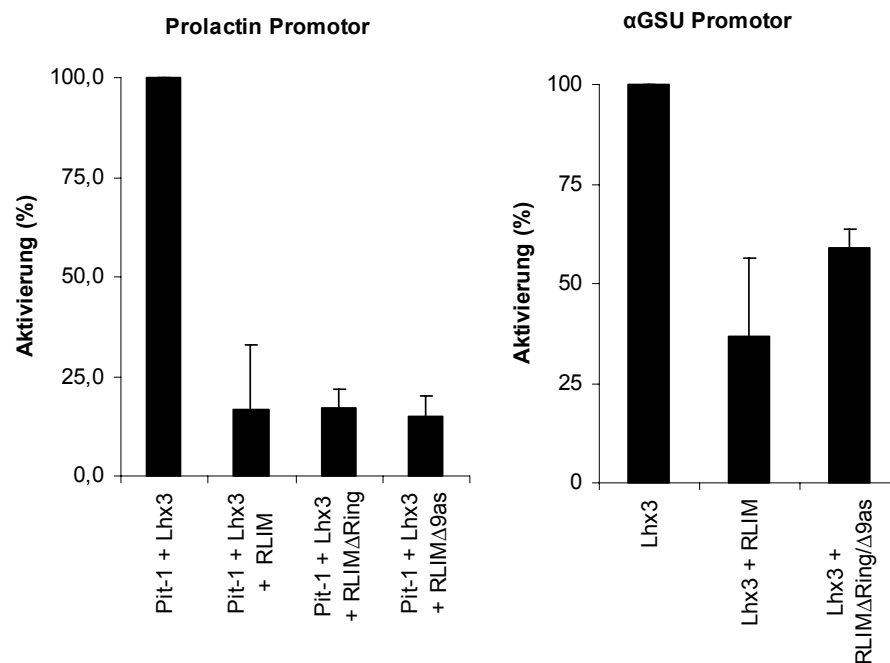
### 3.2.1 Einfluss von RLIM auf die Aktivität von LIM-HD Transkriptionsfaktoren

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Gene  $\alpha$ GSU ( $\alpha$ -glycoprotein subunit) und Prolactin im Hypophysenvorderlappen durch den LIM-HD Transkriptionsfaktor Lhx3 aktiviert werden (Bach et al., 1995). In diesem System konnte RLIM als transkriptioneller Korepressor identifiziert werden. Dies geschieht durch Rekrutierung des Faktors Sin3A (Bach et al., 1999), einer Komponente des HDAC Korepressor Komplexes. RLIM allein zeigte kein Transaktivierungspotential auf die Promotoren (Bach et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde der Wirkmechanismus von RLIM eingehender analysiert, um aufzuklären, welche Domänen für die Repressorrolle von RLIM verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden verschiedene RLIM-Deletionsmutanten generiert und auf ihre Repressorfunktion hin untersucht. Hierzu wurden CHO-Zellen mit den jeweiligen Konstrukten wie unter 5.2.3.7 beschrieben transfiziert. Als Reporterplasmid diente ein Luziferasevektor, welcher das Gen für das Enzym Luziferase unter der Kontrolle des jeweiligen Promotors exprimiert. Dieses wird in transienten Transfektionen von den transaktivierend wirkenden Proteinen Lhx3, Lhx3/Pit1 sowie Lhx3/CLIM stimuliert (Bach et al., 1999).

Die jeweilige aktivierende Wirkung von Lhx3, Lhx3/Pit1 oder Lhx3/CLIM auf die Promotoren wurde für die folgenden Experimente gleich 100 % gesetzt und die Repression durch RLIM und durch die RLIM-Deletionsmutanten wurde verglichen. Eine

Kotransfektion mit RLIM führte zu einer Repression der synergistischen Aktivität von Lhx3 und Pit1 auf  $16,8 \pm 16,2$  % (siehe Abb. 3-2A).



**Abb. 3-2 Inhibierung des Prolactin und des  $\alpha$ GSU Promotors durch RLIM**

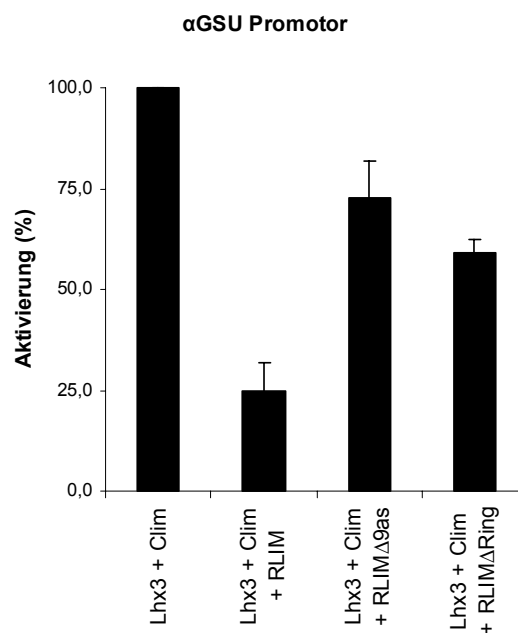
(A) Die synergistische Aktivität von Pit1 und Lhx3 auf den Prolactin Promotor wurde als 100 % definiert. Kotransfektion in CHO-Zellen zusammen mit RLIM und RLIM-Deletionsmutanten zeigten eine Repression der stimulierenden Aktivität von Pit1 und Lhx3 auf den Prolactin Promotor. (B) Die Aktivität von Lhx3 auf den  $\alpha$ GSU Promotor wurde als 100 % definiert. Kotransfektion in CHO-Zellen zusammen mit RLIM und RLIM-Deletionsmutanten zeigten eine Repression der stimulierenden Aktivität von Lhx3 auf den  $\alpha$ GSU Promotor. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 Bestimmungen.

RINGfinger Deletionsmutanten von RLIM wurden kotransfiziert, um zu untersuchen, ob die Repression RINGfinger abhängig ist. Diese Deletionsmutanten besitzen keine Ubiquitinligasefunktion mehr, entweder durch eine vollständige Deletion des RINGfingerbereichs (RLIM $\Delta$ RING) oder durch eine Deletion von mehreren, für die Ubiquitinligaseaktivität essentiellen Aminosäuren (RLIM $\Delta$ 9as). RLIM-Deletionsmutanten alleine, wie im Falle von RLIM in voller Länge, zeigten keinen Effekt auf die Transkription (Aktivität gleich 0 %, Daten nicht gezeigt). Kotransfektionen von Lhx3 und Pit1 sowie der RLIM-Deletionsmutanten führten zu einer Repression auf  $17,1 \pm 4,9$  % (für RLIM $\Delta$ RING) bzw.  $14,8 \pm 15,4$  % (für RLIM $\Delta$ 9as) (siehe ebenfalls Abb. 3-2A). Diese Repressionsraten unterschieden sich nicht signifikant von denen einer Kotransfektion mit RLIM.

Für den  $\alpha$ GSU Promotor war ebenfalls ein Transaktivierungspotential der LIM-HD Transkriptionsfaktoren bekannt (Bach et al., 1995). Ähnlich zum Prolactin-Promotor, kommt es bei einer Kotransfektion von Lhx3 und RLIM zu einer starken Repression auf die durch Lhx3 vermittelten Aktivierung der Transkription (Bach et al., 1999).

Kotransfektion mit RLIM führte zu einer Repression der durch Lhx3-vermittelten Transkriptionsaktivierung auf  $36,6 \pm 16,8$  %; RINGfinger deletierte RLIM-Konstrukte auf  $59,0 \pm 4,5$  % (Abb. 3-2B). Die RLIM-Deletionsmutanten allein zeigten ebenfalls keinen Effekt (Aktivität gleich 0 %). Ein signifikanter Unterschied der Repressionsraten der verschiedenen RLIM-Konstrukte auf diesen Promotor war, wie im vorhergehenden Fall, nicht messbar.

Anders stellte sich die Situation für Lhx3 in Kombination mit CLIM dar. Für beide konnte ebenfalls eine synergistische Aktivität auf den  $\alpha$ GSU Promoter gezeigt werden (Bach et al., 1997). Diese Aktivität wurde ebenso als 100 % definiert.



**Abb. 3-3 Inhibierung des  $\alpha$ GSU Promotors durch RLIM**

Die synergistische Aktivität von Lhx3 und CLIM auf den  $\alpha$ GSU Promotor wurde als 100 % definiert. Kotransfektion zusammen mit RLIM und RLIM-Mutanten zeigten eine Reprimierung dieser Aktivität. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 Bestimmungen.

Durch Kotransfektion mit RLIM konnte eine Reduktion der Promotoraktivierung auf  $24,6 \pm 6,8$  % beobachtet werden (siehe Abb. 3-3). Im Unterschied hierzu wurden bei

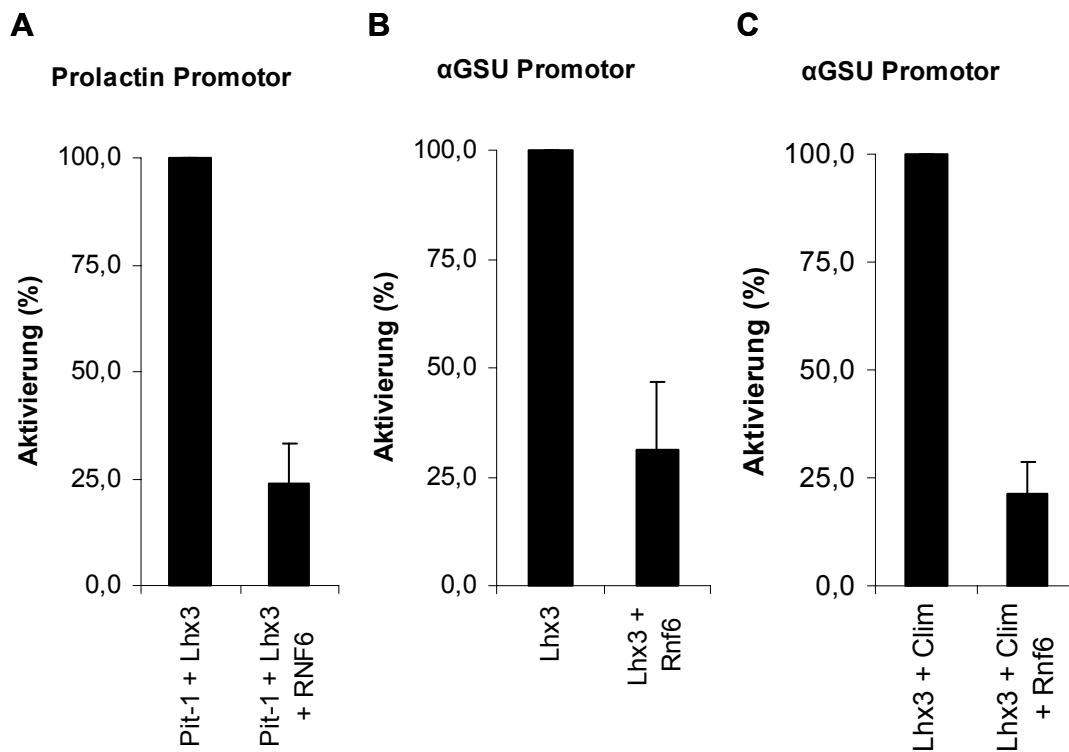
einer Kotransfektion mit RLIM $\Delta$ RING oder RLIM $\Delta$ 9as geringere Repressionsraten festgestellt; im Fall von RLIM $\Delta$ 9as auf  $72,7 \pm 9,3$  % bzw. auf  $58,9 \pm 3,6$  % für RLIM $\Delta$ RING. Die Repression zeigte somit signifikante Unterschiede bei einer Kotransfektion mit RLIM $\Delta$ RING oder RLIM $\Delta$ 9as im Gegensatz zu einer Kotransfektion mit RLIM. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten wurde diese CLIM-abhängige Aktivität auf den  $\alpha$ GSU Promotor nicht eindeutig von RLIM RINGfinger-Deletionsmutanten reprimiert.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass RLIM in der Lage ist, eine CLIM unabhängige Aktivierung ohne funktionellen RINGfinger zu inhibieren. Die effiziente Inhibierung der CLIM-abhängigen Aktivierung ist von der Anwesenheit eines funktionellen RINGfingers auf dem RLIM Protein abhängig.

### **3.2.2 Einfluss von Rnf6 auf die Aktivität von LIM-HD Transkriptionsfaktoren**

Da das identifizierte Rnf6 Protein hohe Sequenzhomologien mit RLIM aufweist, wurde es, wie RLIM, auf sein Verhalten als möglicher Repressor in transienten Transfektionen untersucht.

Es zeigte sich, dass das Verhalten von Rnf6 auf die Prolactin und  $\alpha$ GSU Promotoren ähnlich dem von RLIM war. Rnf6 war allein nicht in der Lage, diese Promotoren zu aktivieren. Auf das Lhx3-vermittelte Transaktivierungspotential wirkte Rnf6 jedoch als transkriptioneller Korepressor (Abb. 3-4). Es konnte eine starke Verminderung des Transaktivierungspotentials auf den Prolactin Promotor festgestellt werden. Die synergistische Aktivität von Lhx3 und Pit1 (gleich 100 % gesetzt) wurde auf  $23,8 \pm 9,2$  % reprimiert (siehe Abb. 3-4A).



**Abb. 3-4 Inhibition des Proactin Promotors und des αGSU Promotors durch Rnf6**

(A) Die synergistische Aktivität von Pit1 und Lhx3 auf den Proactin Promotor wurde als 100 % definiert. Kotransfektion zusammen mit Rnf6 zeigten eine Repression des transaktivierenden Potentials von Pit1 und Lhx3 auf den Proactin Promotor. (B) Die Aktivität von Lhx3 und die synergistische Aktivität von Lhx3 und CLIM (C) auf den αGSU Promotor wurde als 100 % definiert. Kotransfektion zusammen mit Rnf6 zeigten eine Reprimierung dieser Aktivitäten. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 Bestimmungen.

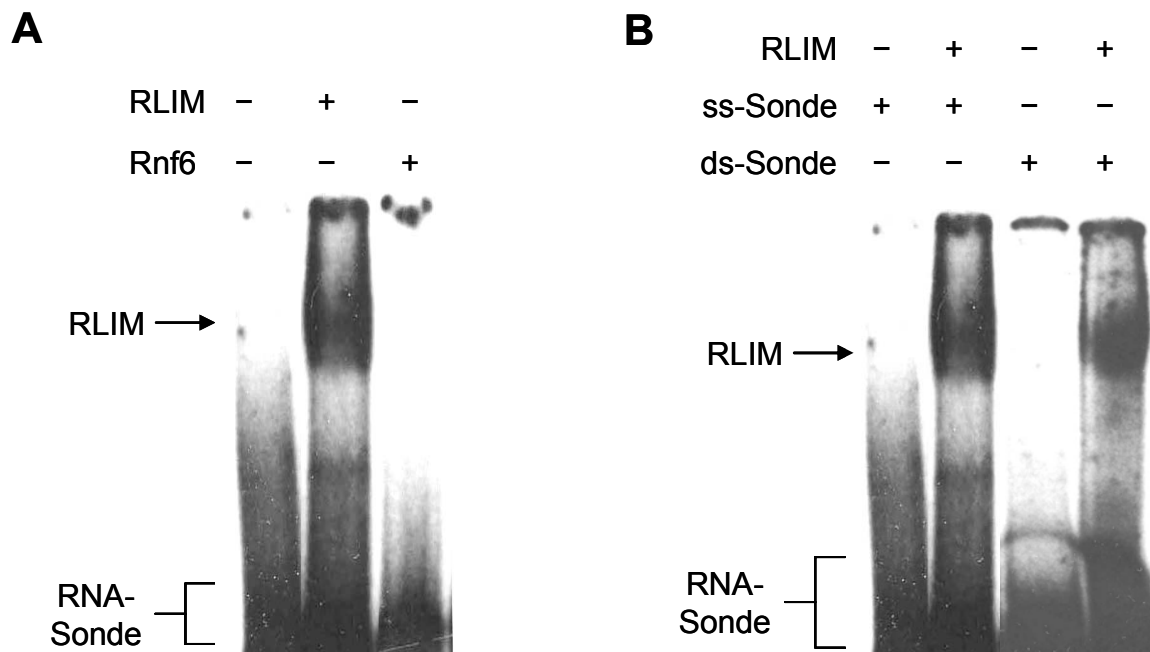
Rnf6 war ebenfalls in der Lage, eine durch Lhx3-vermittelte Transkriptionsaktivierung des αGSU Promotors zu reprimieren (Abb. 3-4B). Eine Kotransfektion zusammen mit Rnf6 führte zu einer Repression auf  $31,1 \pm 18,5$  %. Eine CLIM-abhängige synergistische Aktivität auf den αGSU Promotor vermittelt durch Lhx3 und CLIM, konnte durch Rnf6 auf  $21,1 \pm 7,3$  % reprimiert werden (Abb. 3-4C).

RLIM und Rnf6 verhalten sich in Bezug auf ihre Repressionsaktivität ähnlich. Es wurden keine signifikanten Unterschiede sichtbar. Dies belegt, dass Rnf6 genau wie RLIM, als transkriptioneller Repressor wirken kann.

### 3.3 RNA-Bindung von RLIM in EMSA-Experimenten

In den letzten Jahren wurden zahlreiche zelluläre Funktionen, die durch RNA reguliert wurden, gefunden. Neben der Inaktivierung von Genen durch RNAi (siehe auch 3.5.1.2) konnte die Notwendigkeit einer RNA-Bindung für die subzelluläre Lokalisation oder Assoziation mit Heterochromatin gefunden werden. Für den vorrangig mit Heterochromatin assoziierten Transkriptionsrepressor HP1 (Heterochromatin Protein 1) konnte eine RNA-Bindung gezeigt werden, die notwendig für seine perinukleäre Lokalisation ist (Eissenberg and Elgin, 2000; Muchardt et al., 2002). Ebenfalls konnte eine RNA-Bindung für das RINGfinger Protein HDM2 gezeigt werden (Elenbaas et al., 1996). Da RNA-Interaktionen oft durch eine basische Domäne vermittelt werden und RLIM bzw. Rnf6 mehrere basische Domänen enthalten, wurden beide Proteine auf ihre Fähigkeit zur RNA-Bindung untersucht. Hierfür wurden „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)-Experimente mit einer radioaktiv markierten RNA-Sonde durchgeführt. Drei verschieden 55nt lange RNA Stücke, mit zufällig ausgewählter Sequenz (siehe 7.2.1) wurde als Sonde für diese EMSA-Experimente benutzt und mit aufgereinigten GST-RLIM oder GST-Rnf6 Fusionsproteinen inkubiert. Die Auftrennung erfolgte auf einem 6 % igen Polyacrylamidgel.

Mit Hilfe dieser Methode gelang es nachzuweisen, dass RLIM-GST-Fusionsproteine im Unterschied zu Rnf6 an RNA binden und damit ihr Laufverhalten im EMSA-Experiment verändern (Abb. 3-5A). Da keine Unterschiede im Bindungsverhalten mit den drei benutzten unterschiedlichen RNA-Oligonukleotidsonden festzustellen war, scheint die Bindung von RLIM nicht sequenzspezifisch zu sein. Ebenfalls wurden keine Unterschiede im Bindungsverhalten mit einer doppelsträngigen (ds)-RNA-Sonde sichtbar (Abb. 3-5B).

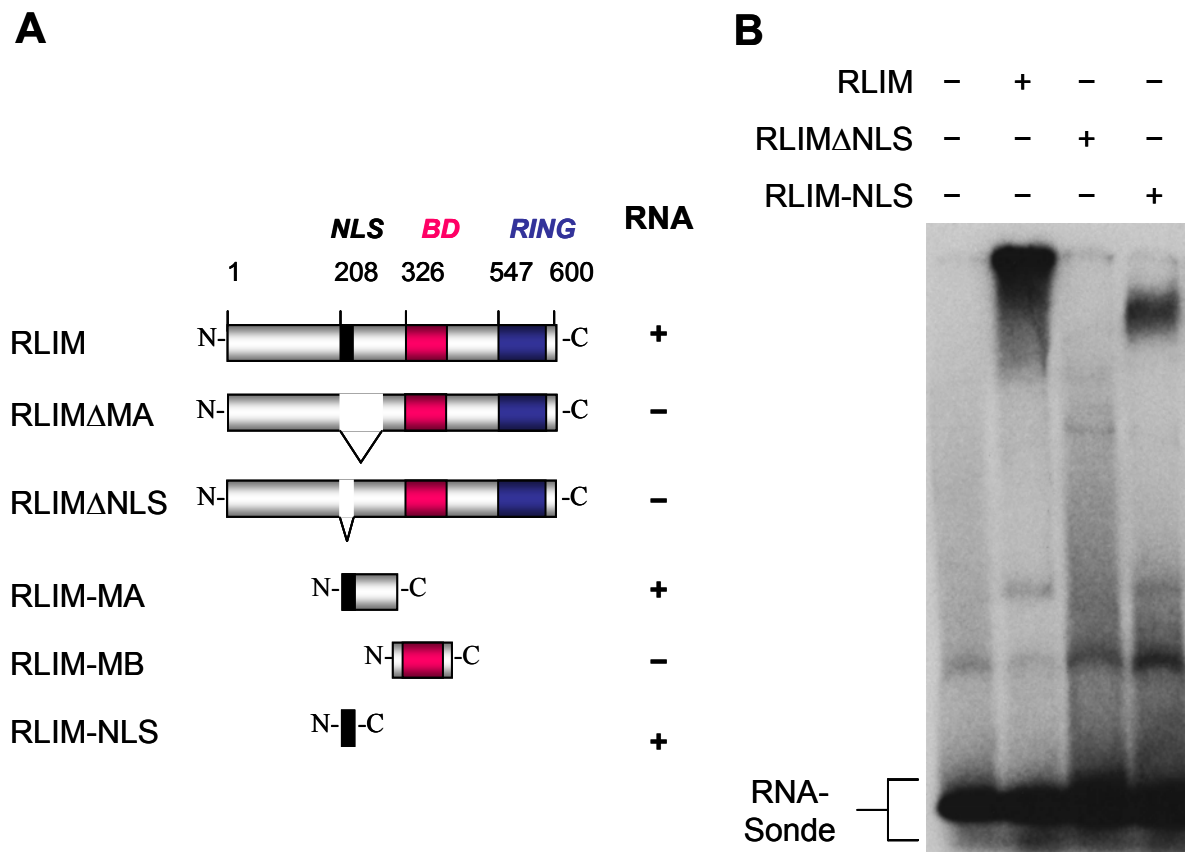


#### Abb. 3-5 Bindung von RLIM und Rnf6 im EMSA Experiment

Das EMSA Experiment wurde mit einem  $^{32}\text{P}$ -markierten RNA-Oligonukleotid und bakteriell exprimierten GST-RLIM oder GST-Rnf6-Fusionsproteinen durchgeführt. (A) RLIM und nicht Rnf6 bindet an RNA. (B) Vergleich der RNA-Bindung einer einzelsträngigen (ss) Sonde und einer doppelsträngigen (ds) Sonde. Unterschiede im Bindungsverhalten wurden nicht beobachtet.

Damit stellte sich die Frage, welche Domäne von RLIM für die RNA-Bindung verantwortlich ist. Zur Kartierung der RNA-Bindung wurden verschiedene RLIM-Mutanten (siehe auch Anhang 7.2.3) generiert. Abb. 3-6 zeigt diese unterschiedlichen RLIM-Mutanten und ihre Fähigkeit zur RNA-Bindung. Durch Eingrenzung der RNA-bindenden Domänen auf RLIM, konnte ich zeigen, dass ein NLS-deletiertes RLIM-GST-Fusionsprotein (RLIM $\Delta$ NLS) nicht in der Lage war, RNA zu binden (Abb. 3-6A+B). Ferner gelang mir der Nachweis, dass bereits diese potentielle NLS-Domäne alleine eine RNA-Bindung vermittelt (Abb. 3-6A+B). Somit konnte die RNA-Bindungsdomäne auf ein 22 Aminosäure langes Stück innerhalb des Proteins begrenzt werden.





**Abb. 3-6 Kartierung der RNA-Bindung auf RLIM**

(A) RNA-Bindungs-fähigkeit von unterschiedlichen RLIM-Mutanten. RLIM, RLIM-MA (as208-305) und RLIM-NLS (as205-226) binden an RNA. RLIM $\Delta$ MA, RLIM $\Delta$ NLS und RLIM-MB (as306-423) binden nicht an RNA. (B) Das EMSA Experiment wurde mit einem  $^{32}$ P-markierten einzelsträngigen RNA-Oligonukleotid und bakteriell exprimierten GST-RLIM-Mutanten durchgeführt. Das NLS von RLIM vermittelt die RNA-Bindung.

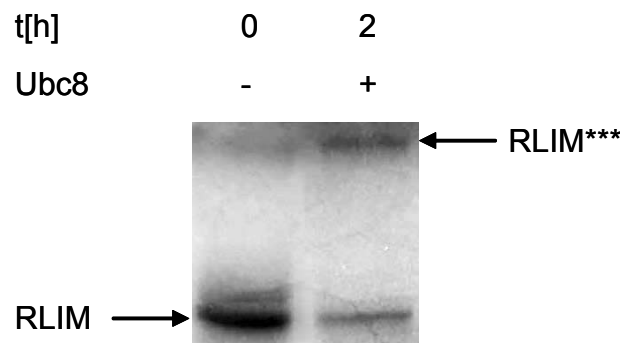
Diese Ergebnisse zeigen, dass RLIM im Unterschied zu Rnf6 RNA binden kann und diese Bindung von der stark basischen potentiellen NLS Domäne vermittelt wird. Die Funktion dieser RNA-Bindung ist allerdings noch nicht geklärt.

### 3.4 Funktion von RLIM und Rnf6 als Ubiquitinligase

#### 3.4.1 Autoubiquitinierungsaktivität von RLIM und RNF6

RLIM und Rnf6 besitzen an ihrem C-terminalen Ende ein RING-H2 Zinkfingermotiv. Da dieses Motiv häufig mit einer Ubiquitinligaseaktivität in Verbindung gebracht wird (siehe auch Einleitung 2.3), wurde in dieser vorliegenden Arbeit die Möglichkeit untersucht, ob RLIM eine Ubiquitinligase sein könnte. Ein generelles Charakteristikum der RINGfinger Ubiquitinligasen ist ihre Fähigkeit zu einer E2-abhängigen

Autoubiquitinierung. Daher wurde RLIM zuerst auf seine Autoubiquitinligasefunktion hin untersucht. Es wurden *in vitro* translatierte Proteine von RLIM hergestellt, mit denen überprüft werden sollte, ob das Protein RLIM in Anwesenheit eines E2 Enzyms (Ubc8) in der Lage ist, sich selbst zu ubiquitinieren (siehe Methoden 5.2.2.10).



**Abb. 3-7 Autoubiquitinierungsaktivität von RLIM**

<sup>35</sup>S-markiertes RLIM Protein wurde für 2h mit der Ubiquitin-Konjugase (E2) Ubc8 inkubiert. Polyubiquitinierte Proteine werden durch \*\*\* gekennzeichnet. Negativkontrolle ist ein Ansatz ohne E2-Inkubation. RLIM ist in der Lage zu einer Autoubiquitinierung.

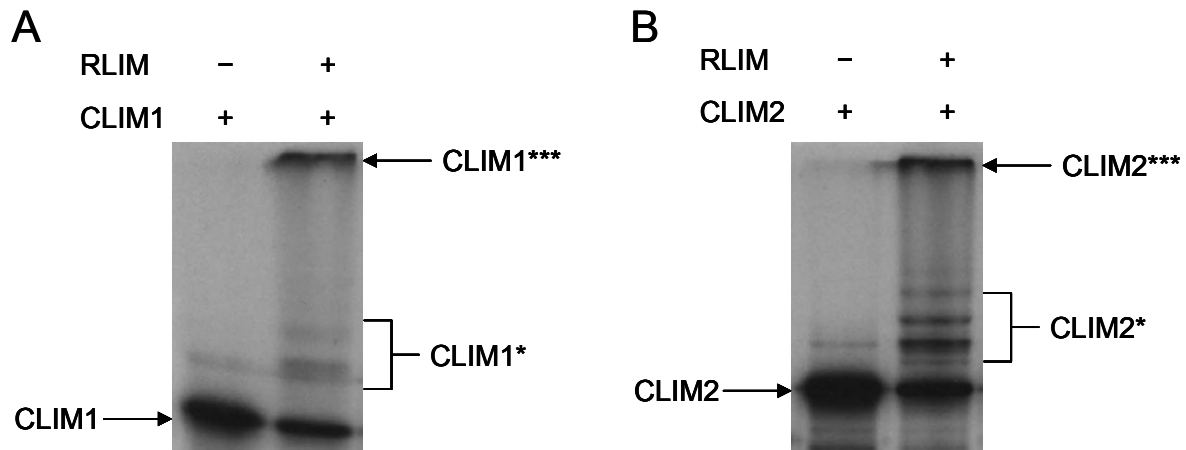
Wie in Abb. 3-7 gezeigt, ist RLIM zu einer E2-abhängigen Autoubiquitinierung fähig. Nach einer Ubiquitinierungsreaktion wurden signifikante Mengen von polyubiquitiniertem RLIM sichtbar, gleichzeitig nahm der Anteil von nicht ubiquitiniertem RLIM ab (Abb. 3-7). Weitere Analysen zeigten, dass diese Reaktion abhängig von einem intakten RINGfinger war (Ostendorff et al., 2002).

Parallel durchgeführte Arbeiten meiner Kollegin Anne Schlüter mit Rnf6 zeigten, dass Rnf6 vergleichbare Autoubiquitinierungseigenschaften besitzt.

### 3.4.2 Ubiquitinierung von Substratproteinen durch RLIM

Als nächstes stand die Frage nach Substratproteinen für die Ubiquitinligaseaktivität von RLIM im Vordergrund. In einer Ubiquitinierungskaskade ist die Substratspezifität stark abhängig von der jeweiligen Ubiquitinligase (siehe auch Einleitung 2.3), deshalb wurden Proteine untersucht, von denen eine Interaktion mit RLIM bekannt war. Exemplarisch wurden einige Proteine des LIM-Systems ausgewählt und auf eine durch RLIM vermittelte Ubiquitinierung hin untersucht.

Bakteriell exprimiertes GST-RLIM wurde verwendet, um CLIM1 und CLIM2, sowie LMO1 und LMO2 in Anwesenheit von Ubc8 zu ubiquitinieren. Die Negativkontrolle bestand aus einem gleichen Ansatz ohne E3 Enzym (RLIM).

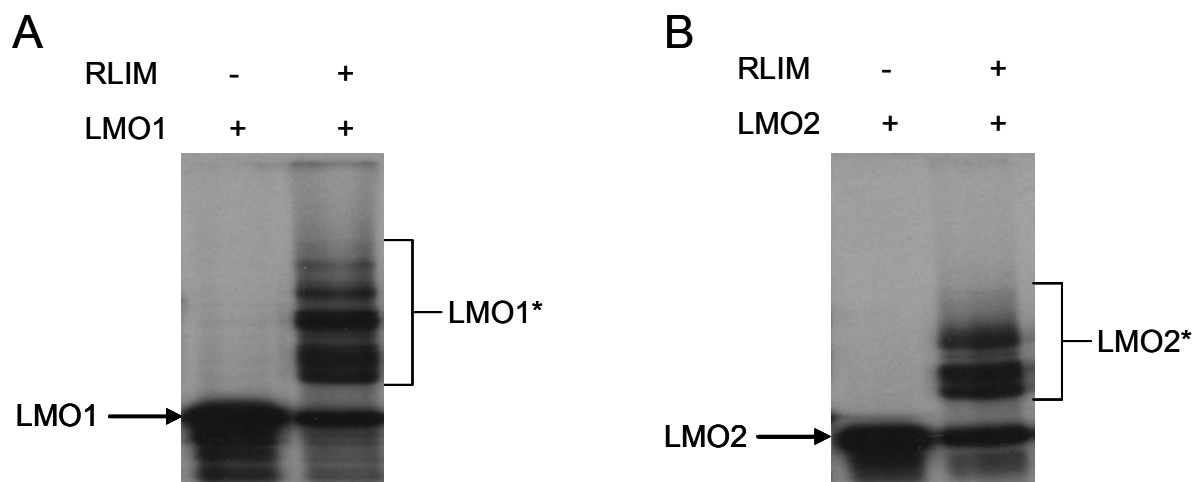


#### Abb. 3-8 RLIM ubiquitiniert CLIM Proteine

RLIM ubiquitiniert <sup>35</sup>S-markiertes CLIM1 (A) und CLIM2 (B) Proteine. Polyubiquitinierte Proteine werden durch \*\*\*, mono- bzw. oligoubiquitinierte Proteine durch \* gekennzeichnet. CLIM Proteine werden durch RLIM polyubiquitiniert.

RLIM ist in der Lage CLIM1 und CLIM2 zu polyubiquitinieren (Ostendorff et al., 2002). Gleiches konnte ich für signifikante Mengen von polyubiquitiniertem CLIM1 oder CLIM2 nachweisen. Diese Ubiquitinierung ist in Abb. 3-8 gezeigt. In beiden Fällen traten auch mono- bzw. oligoubiquitinierte CLIM Proteine auf (Abb. 3-8).

Als weitere Proteine des LIM-Systems wurden LMO-Proteinen auf eine Ubiquitinierung überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass LMO1 und LMO2 von RLIM mono- bzw. oligoubiquitiniert werden (Abb. 3-9). Im Gegensatz zu den Ubiquitinierungsmustern der CLIM Proteine konnte eine ähnlich effiziente Polyubiquitinierung der LMO Proteine von RLIM nicht vermittelt werden (fehlende Polyubiquitinierungsbanden auf Abb. 3-9 im Gegensatz zu Abb. 3-8).



### Abb. 3-9 RLIM ubiquitiniert LMO Proteine

RLIM ubiquitiniert <sup>35</sup>S-markiertes LMO1 (A) und LMO2 (B) Proteine. Mono- bzw. oligoubiquitinierte Proteine werden durch \* gekennzeichnet. LMO Proteine werden durch RLIM mono bzw. oligoubiquitiniert.

Diese Versuche zeigen, dass CLIM und LMO Proteine von RLIM ubiquitiniert werden. Das jeweilige Ubiquitinierungsmuster unterschied sich jedoch deutlich. CLIM Proteine wurden, im Gegensatz zu den mono- bzw. oligoubiquitinierten LMOs, vorwiegend polyubiquitiniert (Ostendorff et al., 2002).

In parallel durchgeführten Arbeiten von Anne Schlüter konnte gezeigt werden, dass Rnf6 ebenfalls CLIM und LMO Proteine ubiquitiniert. Die *in vitro*-Ubiquitinierungsmuster der beiden Ubiquitinligasen RLIM und Rnf6 unterschieden sich dabei kaum.

## 3.5 Proteinabbau durch RLIM und Rnf6

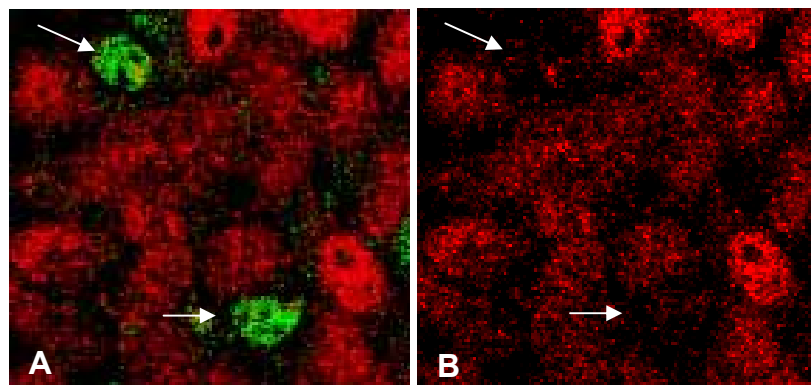
### 3.5.1 Abbau von endogenem CLIM durch RLIM

Aufgrund der Polyubiquitinierung von CLIM durch RLIM lag die Frage nahe, ob dies zu einem Abbau der endogenen ubiquitinierten CLIM Proteine führt, ob also RLIM oder RNF6 die Fähigkeit besitzen, CLIM Proteine für einen proteasomalen Abbau zu markieren. Dieser Frage wurde durch transiente Transfektionen in unterschiedlichen Zelllinien nachgegangen. Alle nachfolgenden Bilder wurden mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen.

### 3.5.1.1 Abbau von CLIM nach Transfektion mit RLIM und RLIM $\Delta$ 9as

Für dieses Experiment wurden Expressionsvektoren, die für ein HA (Hämagglutinin) markiertes RLIM kodierten, verwendet und in die Zelllinie  $\alpha$ T3 transfiziert (Windle et al., 1990); anschließend wurde die Expression von HA-RLIM mit einem HA-spezifischen Antikörper in immunocytochemischen Experimenten detektiert (siehe 5.2.3.6). Es wurden  $\alpha$ T3-Zellen benutzt, da dort alle Proteine des LIM-Systems endogen exprimiert werden und die CLIM Proteinmenge relativ hoch ist im Vergleich zu anderen untersuchten Zelllinien, wie z.B. CHO-Zellen. Vor dem Hintergrund einer hohen endogenen CLIM Konzentration sollte ein Abbau leichter sichtbar werden. CLIM Proteine wurden mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert (siehe 5.1.8.1). Das transfizierte HA-RLIM ist in den folgenden Bildern durch ein grünes Signal, das endogene CLIM Protein durch ein rotes Signal zu unterscheiden.

In den mit HA-RLIM transfizierten Zellen konnten signifikant geringere Mengen von endogenem CLIM detektiert werden (Abb. 3-10). Kontrolltransfektionen mit einem leeren Expressionsvektor zeigten keine veränderten CLIM Proteinmengen (Daten nicht gezeigt).



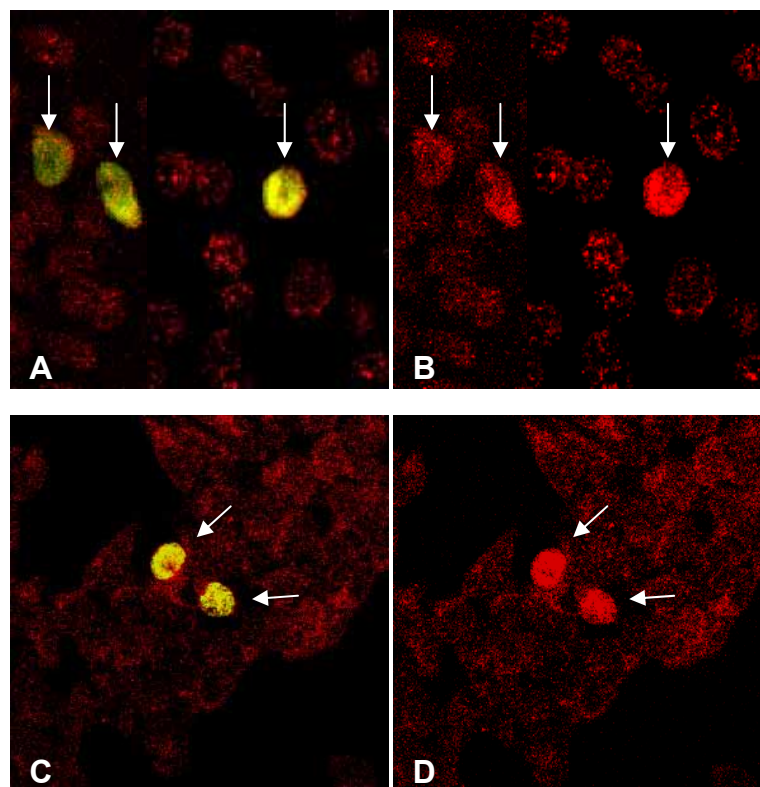
**Abb. 3-10 Degradation von CLIM in  $\alpha$ T3-Zellen**

(A) Überlagerung einer Färbung von HA-RLIM (grün) und endogenem CLIM (rot). (B) zeigt nur die endogene CLIM Proteinfärbung (rot). In den mit HA-RLIM transfizierten  $\alpha$ T3-Zellen (mit Pfeil markiert) sind signifikant niedrigere endogene CLIM Konzentrationen sichtbar.

Im Laufe dieser durchgeführten Arbeiten zeigte sich, dass bei den  $\alpha$ T3-Zellen große Schwankungen endogener CLIM Konzentrationen in den einzelnen Zellen sichtbar wurden. Wie schon in Abb. 3-10 zu beobachten, sind Zellen mit hohen und niedrigen CLIM Konzentrationen vorhanden. Daher wurden für die folgenden Experimente andere

Zelllinien benutzt und analysiert; für jedes Experiment wurden mindestens zwei unterschiedliche Zelllinien (CHO, HEK293 oder HeLA) verwendet.

Ein anderer Weg, um den Abbau von CLIM zu untersuchen, besteht in der Durchführung einer Transfektion der Expressionsvektoren, die für dominant negative RLIM-RINGfinger Mutanten kodieren. Es wird angenommen, dass RINGfinger mutierte Proteine die für eine Ubiquitinierung notwendigen E2-Enzyme wegkompetitieren und daher als dominant-negative Moleküle fungieren können (Pickart, 2001). Diese dominant negativen (DN) RLIM-Konstrukte (RLIM $\Delta$ 9as oder RLIM $\Delta$ RING) sollten aufgrund fehlender Ubiquitinierungsaktivität den Abbau der CLIM Proteine verhindern können. Das Resultat wäre eine starke Anreicherung der nun nicht mehr ubiquitinierten Proteine, welche gut detektierbar sein sollte.



**Abb. 3-11 Transfektion von HA-RLIM $\Delta$ 9as in CHO und HEK293-Zellen**

(A+B) zeigen CHO-Zellen, (C+D) zeigen HEK293-Zellen. (A+C) Überlagerung einer Färbung von HA-RLIM $\Delta$ 9as (grün, durch Überlagerung mit roter Färbung erscheint es als gelb) und endogenem CLIM (rot). (B+D) zeigt nur die endogene CLIM Proteinfärbung (rot). In den mit HA-RLIM $\Delta$ 9as transfizierten CHO- und HEK293-Zellen (mit Pfeil markiert) sind signifikant höhere endogene CLIM Konzentrationen sichtbar.

In der Tat führte die Transfektion von HA-RLIM $\Delta$ 9as in den Zelllinien CHO und HEK293 zu einem starken Anstieg endogener CLIM Konzentrationen. Wie zu sehen, sind in den transfizierten Zellen (grün in Abb. 3-11 A, C) größere endogene CLIM Proteinkonzentrationen (rot in Abb. 3-11 B, D) sichtbar. Auch nach einer HA-RLIM $\Delta$ RING Transfektion konnte das gleiche Resultat erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

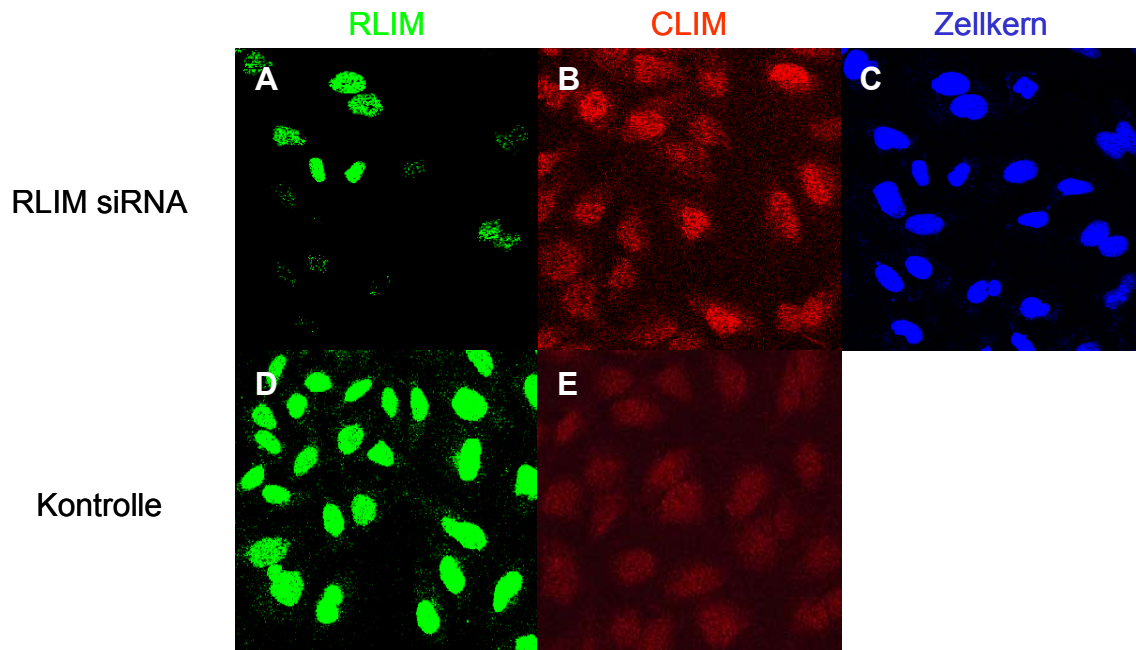
Die dominant negativen Eigenschaften der verwendeten Konstrukte resultierten also, wie vermutet, in einem verminderten Abbau von CLIM. RLIM ist somit ein Schlüsselenzym des Stoffumsatzes der CLIM Kofaktoren.

### **3.5.1.2 RNA Interferenz Experimente zur Untersuchung endogener RLIM Proteine**

Zur Bestätigung dieser Resultate wurden RNA Interferenz (RNAi) Experimente durchgeführt. Der Vorgang wird durch die Anwesenheit doppelsträngiger RNA, die identisch zur Sequenz der mRNA des untersuchten Genes sein muss, initiiert und als RNA Interferenz bezeichnet. Die dsRNA bewirkt den spezifischen Abbau der homologen mRNA und verhindert somit die Proteinproduktion (Fire, 1999; Hammond et al., 2001). In Säugetierzellen wurde eine Erniedrigung der Proteinkonzentration nach Transfektion von 21nt langen siRNA (small interfering RNA) beschrieben (Elbashir et al., 2001). Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt, um die endogene RLIM Expression in Zellkultur zu inhibieren. Zwei verschiedene RLIM siRNA Oligonukleotide spezifisch gegen humanes RLIM wurden benutzt; es lagen komplementäre Sequenzen ca. 100bp nach dem Start-ATG des RLIM Proteins vor (siehe Anhang 7.2.2), da beschrieben wurde, dass siRNA Oligonukleotide komplementär zu diesen Bereichen (ca. 100bp nach dem Start-ATG) häufig effizient waren eine Proteinexpression zu inhibieren (Elbashir et al., 2001).

Auch nach Transfektionen beider RLIM siRNAs in humane HeLa-Zellen konnte eine signifikant niedrigere Proteinkonzentration in bis zu 70 % der Zellen festgestellt werden. In vielen Zellen waren keine bzw. sehr niedrige RLIM Proteinkonzentrationen sichtbar (Abb. 3-12A). Kontrolltransfektionen, entweder mit den einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden oder einer siRNA mit zufällig ausgewählter Sequenz, zeigten keine Änderungen der RLIM Proteinmengen. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der

RLIM-Expression zu einer Zunahme endogener CLIM Konzentrationen führt. Deutlich wird dies im Vergleich der Bilder B und E der Abb. 3-12, wo eine höhere CLIM Proteinkonzentration bei den mit RLIM siRNA transfizierten Zellen zu beobachten war. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis, dass RLIM den Abbau und damit die in den Zellen vorhandenen CLIM Konzentrationen beeinflusst.

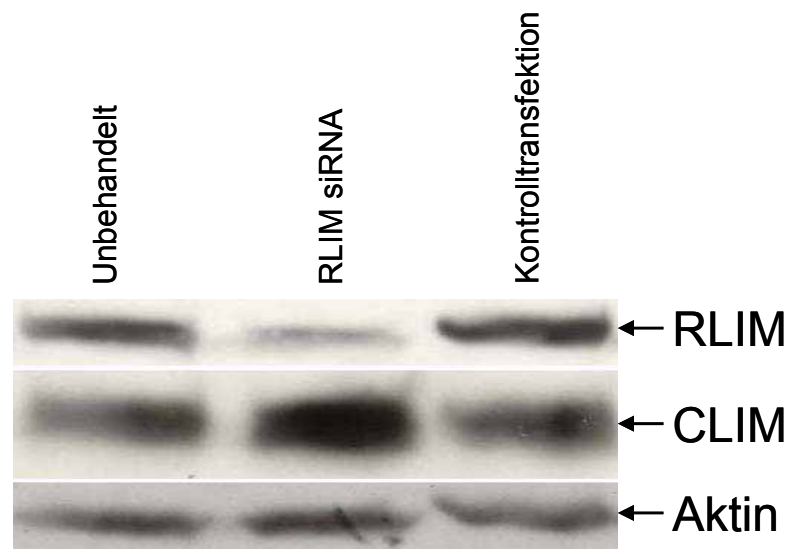


**Abb. 3-12 Inhibierung der RLIM Expression durch RNAi**

(A-C) HeLa-Zellen wurden mit RLIM siRNA transfiziert. (D+E) zeigen Kontrolltransfektionen mit einem einzelsträngigen RNA-Oligonukleotid. Die Zellen wurden durch eine RLIM-Färbung (grün), CLIM-Färbung (rot) und eine Zellkernfärbung (blau) sichtbar. Anteile der transfizierten Zellen wurden parallel entweder mit RLIM oder mit CLIM Antiseren detektiert. Ein Rückgang in der RLIM-Expression fand in schätzungsweise 60-70% der Zellen statt (siehe A). Zur Kontrolle der Zelldichte wurde eine Kernfärbung durchgeführt (siehe Bild C im Vergleich zu Bild A). Durch Inhibition der RLIM-Expression kam es zur Zunahme der CLIM Proteinkonzentrationen (Bild B im Vergleich zu Bild E).

Zur Bestätigung der RLIM und CLIM Proteinkonzentrationsänderungen nach RLIM siRNA Transfektion wurden Western-Blot Analysen mit HeLa-Zellextrakten durchgeführt. Hierzu wurden RLIM siRNA transfizierte HeLa-Zellextrakte verwendet. Als zwei unabhängige Kontrollen dienten untransfizierte Extrakte, sowie mit Kontroll-siRNA transfizierte Extrakte (siehe Anhang 7.2.2). Wie die Western-Blot Analyse in Abb. 3-13 zeigt, ist eine starke Abnahme der endogenen RLIM Proteinmenge nach Transfektion von RLIM siRNA sichtbar. In diesen Extrakten ist eine gleichzeitige Zunahme der endogenen CLIM Proteinmenge erkennbar.





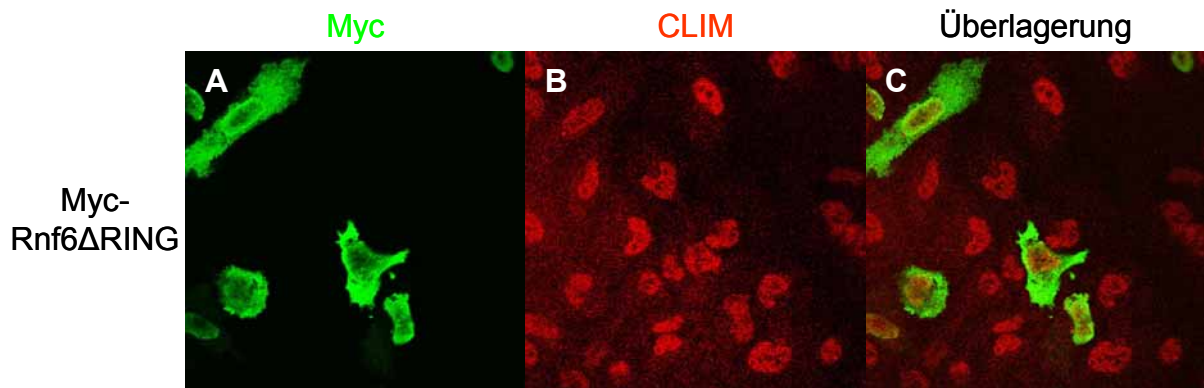
**Abb. 3-13 Western-Blot Analyse mit RNAi HeLa-Zellextrakten**

Vergleich der Expression von endogenen Proteinen in unbehandelten und transfizierten HeLa-Zellen durch Western-Blot Analyse. Sichtbar ist eine starke Abnahme der endogenen RLIM Proteinkonzentrationen, nach Transfektion von RLIM siRNA. In diesen Extrakten ist eine gleichzeitige Zunahme der endogenen CLIM Proteinmenge erkennbar. Als Kontrolle dienen untransfizierte und mit Kontroll-siRNA transfizierte HeLa-Zellextrakte.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass RLIM endogene CLIM Proteine zum Abbau markiert und dass RLIM daher eine wichtige Funktion bei der Regulation von zellulären CLIM Konzentrationen ausübt.

### 3.5.2 Abbau der LIM-Kinase durch Rnf6

Da auch Rnf6 CLIM polyubiquitiniert, lag die Vermutung nahe, dass Rnf6 ebenso CLIM Proteine zum Abbau markiert. Analog zu den Transfektionsexperimenten von RLIM wurden Transfektionen mit Expressionsvektoren, die für Rnf6 und dessen DN-Form Rnf6 $\Delta$ RING kodieren, durchgeführt und nach erhöhten CLIM Proteinkonzentrationen gesucht. Überraschenderweise konnte durch Transfektion von Rnf6 kein CLIM Abbau beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei den RLIM-Experimenten zeigte sich, dass es einfacher war, eine Zunahme der CLIM Konzentration als Folge der Transfektion eines DN-Konstrukts nachzuweisen, als die Abnahme von ohnehin niedrigen CLIM Proteinkonzentrationen.



**Abb. 3-14 Keine CLIM-Abbau durch Rnf6**

(A) Nach Transfektion von Myc-Rnf6 $\Delta$ RING (grün) in HeLa-Zellen werden keine Veränderungen der endogenen CLIM-Proteinkonzentrationen (B)(rot) sichtbar. Gezeigt werden beide Einfärbungen (grün, rot) und die Überlagerung (C) beider Färbungen.

Daher wurden zur Bestätigung der mit dem Rnf6 Konstrukt erhaltenden Ergebnisse Myc-markierte Rnf6 $\Delta$ RING Expressionsvektoren transfiziert und die Proteinexpression wurde mit Hilfe von  $\alpha$ Myc-Antikörper in immunocytochemischen Experimenten detektiert (siehe 5.1.8). Die Transfektion des Myc-markierten Rnf6 $\Delta$ RING Vektors führte zu keiner Änderung der CLIM Proteinkonzentrationen in den transfizierten Zellen (siehe Abb. 3-14). Im Gegensatz zu den Versuchen mit RLIM $\Delta$ RING konnten nach Transfektion des Rnf6 $\Delta$ RING Vektors keine höheren CLIM Konzentrationen beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es trotz ähnlicher *in vitro*-Ubiquitinierungsmuster von RLIM und Rnf6 nur durch RLIM zu einem Abbau endogener CLIM Proteine kommt, Rnf6 ist dazu nicht in der Lage. *In vivo* sind somit nur die CLIM Proteine Zielsubstrate eines von RLIM vermittelten Abbaus und nicht von Rnf6. Dies demonstriert eine unterschiedliche Spezifität von RLIM gegenüber Rnf6, im Bezug auf das Zielsubstratprotein CLIM.

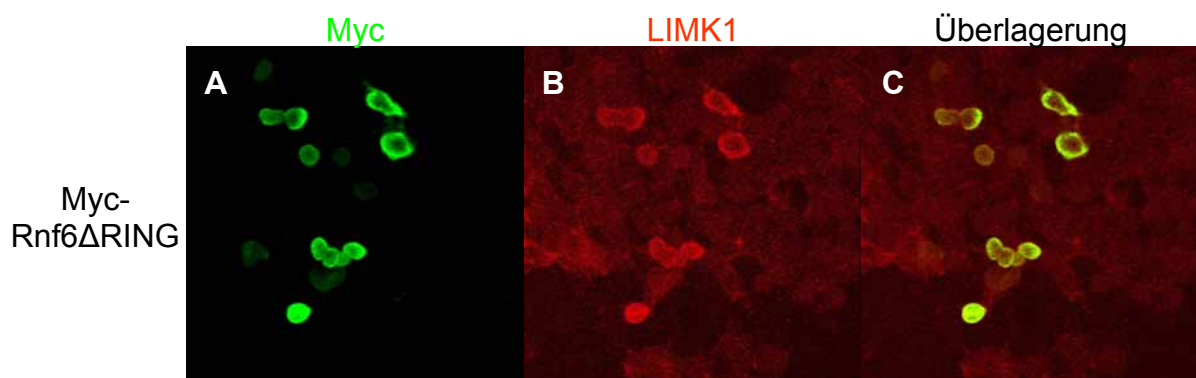
Da Rnf6 nicht am CLIM-Abbau beteiligt ist, wurde nach anderen Zielsubstraten von Rnf6 gesucht. Für RLIM konnte eine Interaktion mit LIM-Kinasen (LIMK) gezeigt werden (Bach et al., 1995) und in Ubiquitinierungsexperimenten meiner Kollegin Anne Schlüter zeigte sich, dass nicht nur RLIM sondern auch Rnf6, neben den unter 3.4 beschriebenen CLIM Interaktionen, LIM-Kinasen binden und polyubiquitinieren kann. Es war nun wichtig zu untersuchen, ob die durch RLIM und Rnf6 vermittelten Polyubiquitinierungen der LIMK deren Abbau induzieren könnten. Daher wurden in

dieser Arbeit, analog zu den CLIM-Abbauxperimenten, Transfektionen mit Myc-markierten Rnf6, Rnf6 $\Delta$ RING, RLIM und RLIM $\Delta$ RING Expressionsvektoren durchgeführt und die LIMK Expression überprüft.

### 3.5.2.1 Abbau von LIMK nach Transfektion mit Rnf6 $\Delta$ RING Expressionsvektoren

Endogene LIM-Kinase 1 (LIMK1) ist nur sehr schwach in den untersuchten Zelllinien exprimiert. Daher war es nicht möglich, einen weiteren Abbau endogener LIMK1, induziert durch Transfektionen mit Rnf6 oder RLIM in voller Länge, zu analysieren. Aus diesem Grund wurden Zellen mit Vektoren der DN-Konstrukte Rnf6 $\Delta$ RING oder RLIM $\Delta$ RING transfiziert und die Effekte der Überexpression dieser Proteine auf die Konzentrationsänderung endogener LIMK analysiert.

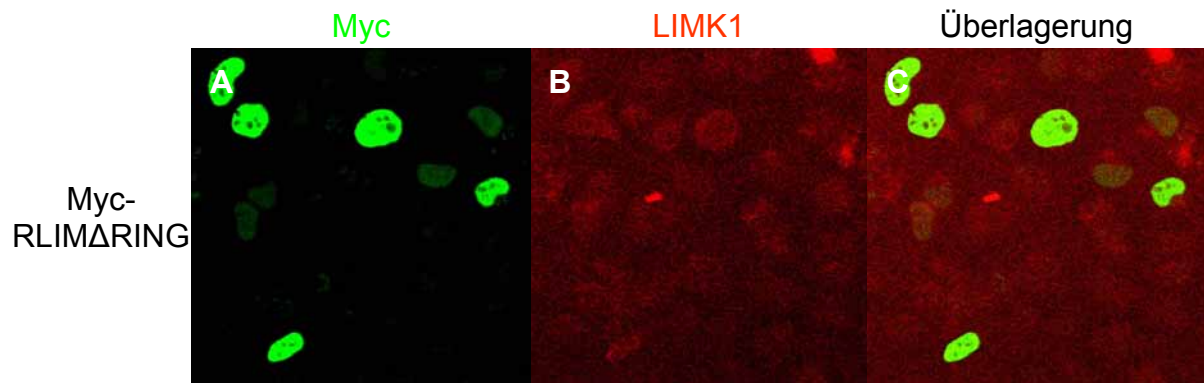
Wie in Abb. 3-15 zu sehen, kommt es in den mit Myc-markiertem Rnf6 $\Delta$ RING transfizierten Zellen zu einem Anstieg der endogenen LIMK1 Expression.



**Abb. 3-15 Anstieg der LIMK1 Expression durch Myc-Rnf6 $\Delta$ RING**

(A) Nach Transfektion von Rnf6 $\Delta$ RING (grün) in HEK293T-Zellen steigen endogene LIM-Kinase1 Proteinkonzentrationen (B)(rot). Gezeigt werden beide Einzelfärbungen (grün, rot) und die Überlagerung (C). Durch die Überlagerung beider Färbungen erscheinen die transfizierten Zellen mit höherer LIMK Konzentration (C) gelb.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit dem Myc-Rnf6 $\Delta$ RING Konstrukt konnten nach Vektortransfektion von Myc-RLIM $\Delta$ RING keine höheren LIMK1 Konzentrationen beobachtet werden (siehe Abb. 3-16).



**Abb. 3-16 Keine Degradation der LIMK1 durch RLIM**

(A) Nach Transfektion von RLIM6 $\Delta$ RING (grün) in HeLa-Zellen werden keine Veränderungen der endogenen LIMK1-Proteinmengen (B)(rot) sichtbar. Gezeigt werden beide Einfärbungen (A, B) und die Überlagerung (C) beider Färbungen.

Trotz ähnlicher *in vitro*-Ubiquitinierungsmuster von RLIM und Rnf6 kam es überraschenderweise nur durch eine Transfektion des Rnf6 $\Delta$ RING Expressionsvektors zu einem Anstieg endogener LIMK1. Dagegen wurden nur durch eine Transfektion des RLIM Expressionsvektors endogene CLIM Proteine zum Abbau markiert. Dies zeigt erneut die unterschiedliche Spezifität von Rnf6 und RLIM gegenüber dem Zielsubstratprotein LIMK.

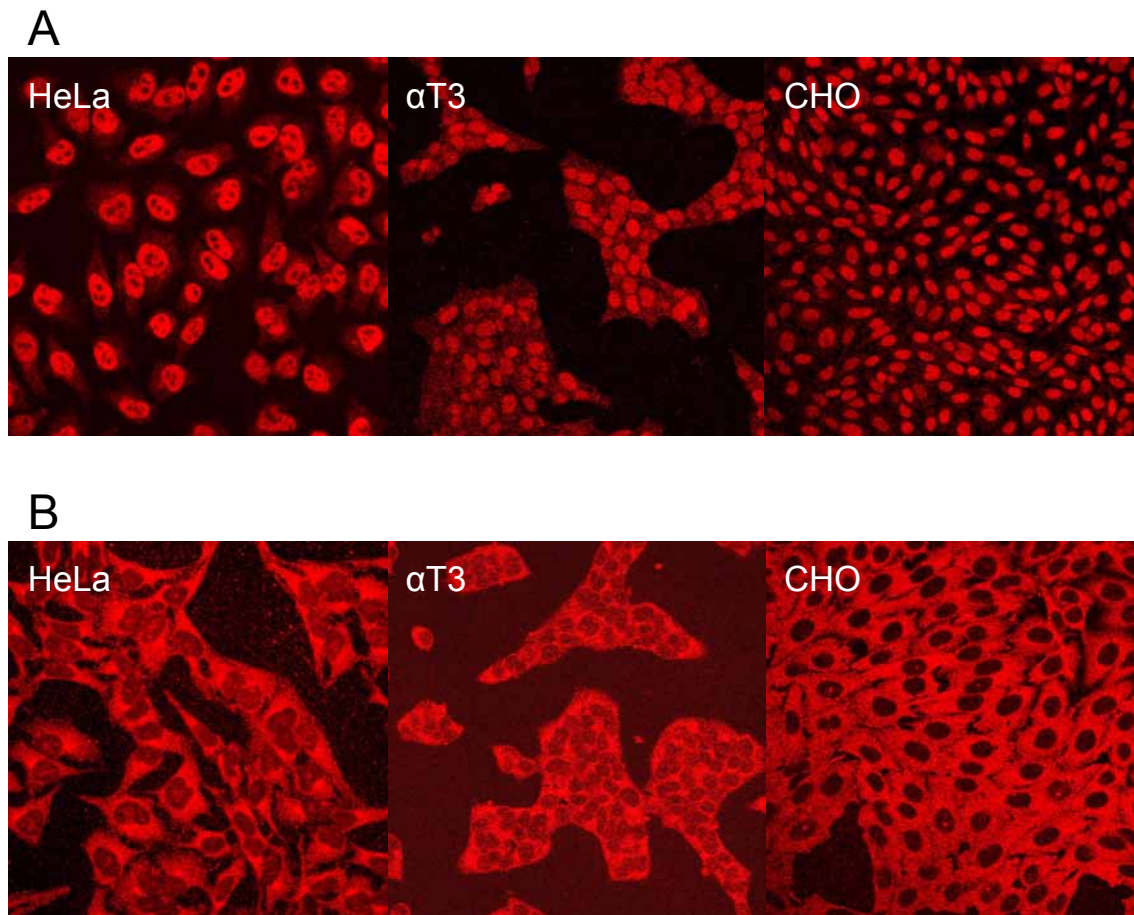
### 3.6 Subzelluläre Lokalisation von RLIM und Rnf6

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zu RLIM und Rnf6 zeigten deutliche Unterschiede beim Abbau endogener Proteine. Trotz ähnlicher *in vitro*-Ubiquitinierungsmuster wurden unterschiedliche endogene Zielproteine entdeckt. Endogener CLIM-Abbau wurde nur durch RLIM, endogene LIMK1-Degradation nur durch Rnf6 ausgelöst. Damit stellte sich die Frage nach der Ursache für diese Unterschiede. Eine mögliche Erklärung könnte in einer unterschiedlichen Lokalisation der beiden Proteine innerhalb der Zelle bestehen. Daher wurde die subzelluläre Lokalisation von RLIM und Rnf6 in Zelllinien mit Hilfe spezifischer Antiseren in immunocytochemischen Experimenten analysiert.

#### 3.6.1 Endogene RLIM und Rnf6 Lokalisation

Um eine Aussage über die jeweilige Lokalisation von RLIM und Rnf6 treffen und miteinander vergleichen zu können, wurden in unserem Labor spezifische Antiseren

gegen beide Proteine hergestellt (siehe 5.1.8.1). Mit Hilfe dieser Antiseren wurde das Lokalisationsmuster beider Proteine in unterschiedlichen Zelllinien analysiert. Endogene RLIM und Rnf6 Proteine wurden in HeLa-, CHO- und  $\alpha$ T3-Zellen untersucht (siehe 5.2.3.6).



**Abb. 3-17 Endogene Lokalisation von RLIM und Rnf6 in verschiedenen Zelllinien**

Immunocytochemische Analyse der Zelllinien HeLa,  $\alpha$ T3 und CHO mit spezifischen Antiseren gegen RLIM (A) und Rnf6 (B). (A) Überwiegend nukleäre RLIM Lokalisation in den Zelllinien HeLa,  $\alpha$ T3 und CHO. (B) Vorwiegend cytoplasmatische Rnf6 Lokalisation in den Zelllinien HeLa,  $\alpha$ T3 und CHO.

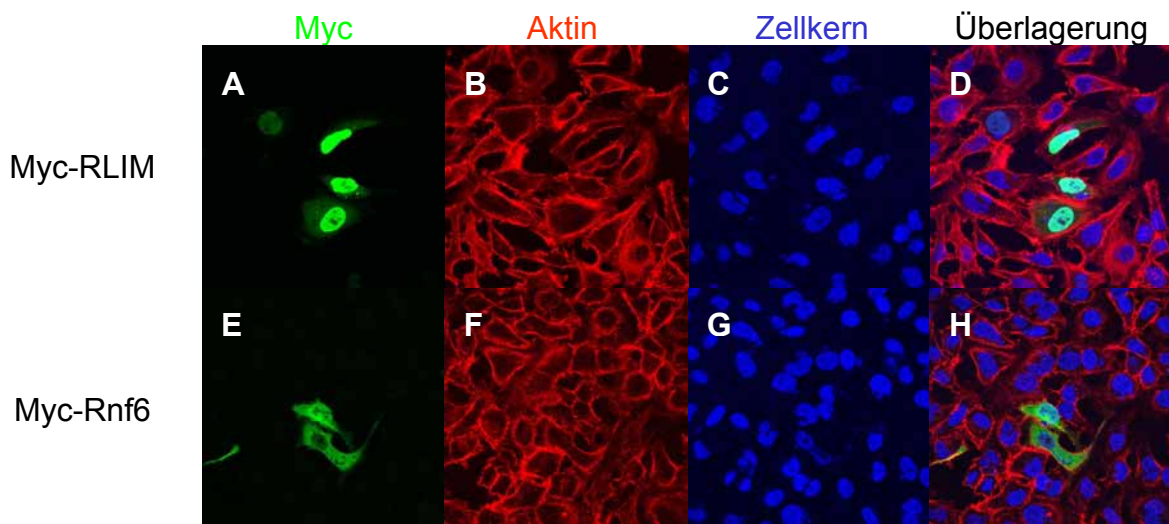
Für alle untersuchten Zelllinien, auch den nicht gezeigten HEK293, HEK293T und Feeder-Zellen, konnte ich zeigen, dass endogenes RLIM fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist (Abb. 3-17A), lediglich eine sehr schwache cytoplasmatische Lokalisation war detektierbar. Für Rnf6 zeigte sich ein anderes Lokalisationsmuster. Rnf6 wurde in den untersuchten Zelllinien vorrangig im Cytoplasma nachgewiesen und nur schwach im Zellkern (siehe Abb. 3-17B). Somit konnte eine überwiegend nukleäre endogene RLIM

Lokalisation und mehrheitlich endogene cytoplasmatische Rnf6 Lokalisation in den Zelllinien aufgezeigt werden.

### 3.6.2 RLIM und Rnf6 Lokalisation in transfizierten Zellen

Um zu überprüfen, ob die RLIM bzw. Rnf6 Expression nach Vektortransfektion der endogenen Expression entspricht, wurden Lokalisationsexperimente mit Myc-markierten RLIM und Rnf6 Expressionsvektoren durchgeführt. In transfizierten Zellen wurden die jeweiligen Lokalisationen der Proteine mit denen der endogenen Proteine verglichen, da es durch die starke Überexpression nach Transfektion von Expressionsvektoren möglich wäre, dass die damit beobachtete Lokalisation des Proteins von der tatsächlichen Lokalisation abweicht.

Transfektion eines Myc-markierten RLIM führte überwiegend zu einer Lokalisation im Zellkern (Abb. 3-18A). Zur besseren Visualisierung der verschiedenen Zellkompartimente wurde das Cytoskelett rot (Aktinfärbung mittels Phalloidin, siehe Abb. 3-18B) und der Zellkern blau (Toto-3, siehe Abb. 3-18C) angefärbt (siehe auch 5.2.3.6). Wie im Fall der endogenen RLIM Expression konnte nur eine schwache cytoplasmatische RLIM Lokalisation nach Transfektion detektiert werden (Abb. 3-18A+D).



**Abb. 3-18 Lokalisation der transfizierten RLIM- und Rnf6-Proteine in HeLa-Zellen**

Immuncytochemische Analyse der HeLa-Zelllinie nach (A-D) Transfektion von Myc-markiertem RLIM (grün) und (E-H) Transfektion von Myc-markiertem Rnf6 (grün). Myc-RLIM war überwiegend nukleär lokalisiert (A+D), Rnf6 war mehrheitlich cytoplasmatisch lokalisiert (E+H). Zur besseren Visualisierung wurde das Aktinskelett rot (B+F) und der Zellkern blau (C+G) angefärbt. (D+H) zeigen jeweils die Überlagerung der Bilder A-C bzw. E-G.

Transfektion von Myc-markiertem Rnf6 (Abb. 3-18E-H) führte zu einer überwiegend cytoplasmatischen Expression in den Zellen. In einigen Fällen konnte nach Myc-Rnf6 Transfektion auch eine eher nukleäre Lokalisation von Rnf6 beobachtet werden. Dieses Resultat ist wahrscheinlich auf die starke Überexpression zurückzuführen (siehe Abb. 3-18E+H). Insgesamt entspricht dieses Ergebnis der transfizierten Myc-Rnf6 Zellen jedoch dem endogenen cytoplasmatischen Lokalisationsmuster des Rnf6 Proteins.

### 3.7 Charakterisierung des NLS

Wie unter 3.1 beschrieben, konnte durch einen Vergleich mit Datenbanken sowohl in RLIM als auch in Rnf6 ein potentielles NLS gefunden werden. Der Sequenzvergleich mit RLIM bzw. Rnf6 ergab eine basische, argininreiche Domäne als potentielles NLS für beide Proteine.

#### Kernlokalisierungssignal

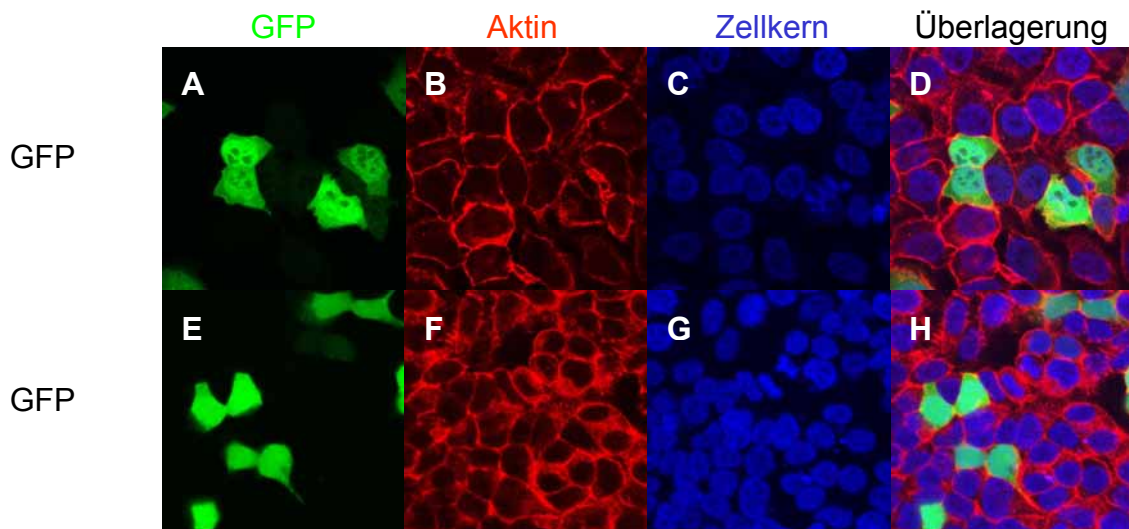
**RLIM:** RAQRRARSRSP~~EH~~RTRARAER

**Rnf6:** RRTRSQTSMSSSGPRGRRGARR

**Abb. 3-19 Ein Aminosäuresequenzvergleich der potentiellen NLS-Region von RLIM und Rnf6**

Gezeigt wird ein Aminosäuresequenzvergleich der potentiellen NLS-Region von RLIM und Rnf6, in dem rote Markierungen identische Aminosäuren der NLS von RLIM und von Rnf6 anzeigen.

Um die Funktionalität dieses NLS in RLIM und Rnf6 nachzuweisen, wurden GFP-Fusionsproteine (Green Fluorescent Protein) und Deletionskonstrukte generiert. Als Ausgangsplasmid für die nachfolgend beschriebenen GFP-Konstrukte wurde pEGFP-C3 (Clontech) benutzt. Die zu untersuchenden Domänen wurden jeweils C-terminal von GFP inkloniert und nach Transfektion wurde die Expression der GFP-Fusionsproteine im Zellkern und Cytoplasma analysiert. Die Transfektion des GFP-Vektors alleine führte in allen Zelllinien zu einer ubiquitären GFP-Expression, sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma (Abb. 3-20).



**Abb. 3-20 GFP Lokalisation in Zellen**

Transfektion des GFP-Vektors (grün) in HeLa-Zellen (A-D) und HEK293T-Zellen (E-H). (B+F) zeigen eine Färbung des Aktinskeletts (rot) und (C+G) eine Zellkernfärbung (blau). (D+H) sind jeweils die Überlagerungen der Bilder A-C bzw. E-G. Die Transfektion von pEGFP-C3 führte zu einer ubiquitären Lokalisation des GFP-Signals.

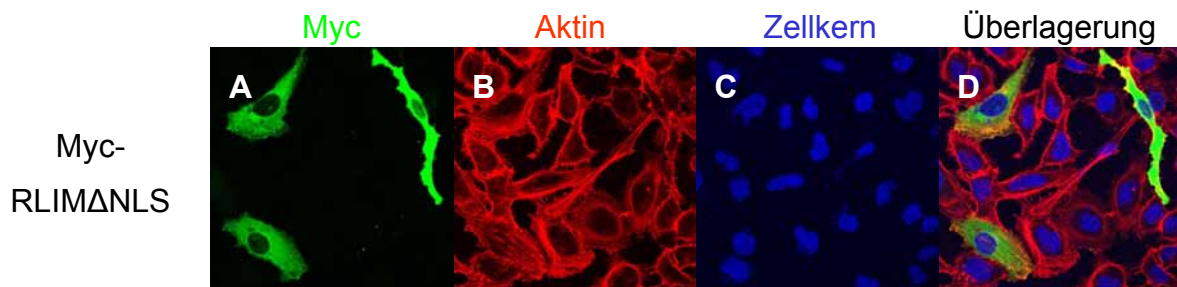
Bei allen folgenden Versuchen wurden HeLa und HEK293T-Zellen transfiziert. HeLa-Zellen besitzen den Vorteil, dass sie über einen großen Cytoplasmaanteil verfügen. Dadurch ließen sich die unterschiedlichen Zellkompartimente häufig leichter identifizieren. Transfektionen der Deletionskonstrukte und der GFP-Fusionsproteine in HeLa und HEK293T-Zellen führten zu denselben Ergebnissen.

### 3.7.1 RLIM besitzt ein funktionelles NLS

Aufgrund der starken Expression von RLIM im Zellkern lag es nahe, dass das Protein ein funktionelles NLS enthalten könnte. Zur Überprüfung der Notwendigkeit der potentiellen NLS-Domäne für die Kernlokalisierung wurden RLIM Deletionsproteine generiert. Den Myc-markierten RLIM Deletionsmutanten (RLIM $\Delta$ MA oder RLIM $\Delta$ NLS) wurden Domänen entfernt, die das potentielle NLS (ca. 22aa, siehe Abb. 3-19) besaßen. Nach Transfektion dieser Konstrukte in HeLa-Zellen wurde das Lokalisationsmuster anhand von immunchemischer Detektion analysiert. Die Analyse der Proteinexpression ergab, dass die Myc-RLIM $\Delta$ NLS Proteine strikt im Cytoplasma lokalisiert waren (Abb. 3-21), ebenso die Myc-RLIM $\Delta$ MA Proteine (siehe Schema in Abb. 3-22). In den transfizierten Zellen konnte keine Kernlokalisierung mehr beobachtet werden. Diese



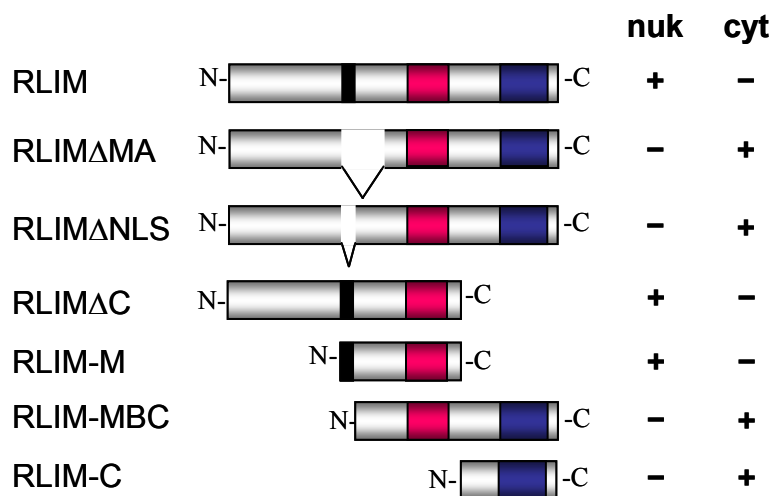
Sequenz war somit notwendig für die Kernlokalisierung von RLIM (zum Vergleich siehe das Kernsignal auf Abb. 3-18A).



**Abb. 3-21 RLIM $\Delta$ NLS Lokalisation in HeLa-Zellen**

(A) Cytoplasmatische Expression von Myc-markiertem RLIM $\Delta$ NLS (grün). Zur besseren Visualisierung wurde das Aktinskelett (rot, siehe B) und der Zellkern (blau, siehe C) angefärbt. (D) zeigt die Überlagerung der drei Färbungen. Transfektion von Myc-RLIM $\Delta$ NLS führte zu einer strikten cytoplasmatischen Lokalisation des Konstrukts.

Alle RLIM Konstrukte, die die oben beschriebene Sequenz enthielten, waren im Zellkern lokalisiert, alle übrigen Konstrukte hingegen im Cytoplasma (zusammengefasst in Abb. 3-22).

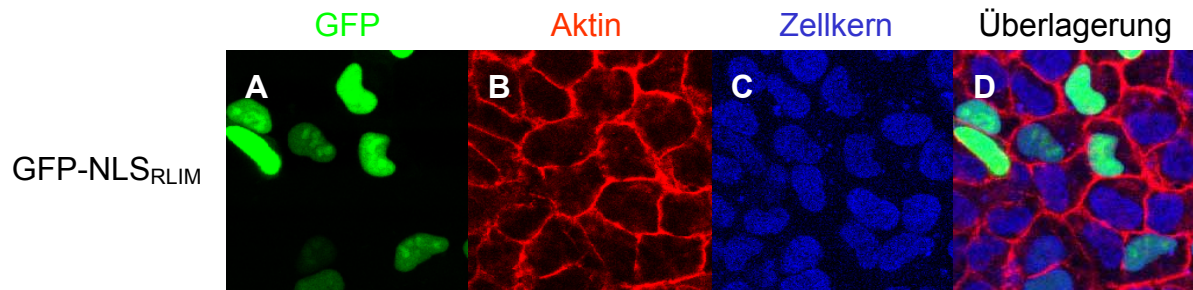


**Abb. 3-22 Lokalisationsschema unterschiedlicher RLIM Konstrukte**

Schema verschiedener RLIM Konstrukte und deren Lokalisation. Eine nukleäre Lokalisation wurde bei allen RLIM Konstrukten gefunden, die die NLS-Region (schwarze Markierung) enthielten. Cytoplasmatische Lokalisation wurden bei allen übrigen RLIM Konstrukten gefunden. Rote Markierung zeigt die CLIM und LIM Interaktionsdomäne und blaue den RINGfinger an (siehe hierzu auch Abb. 2-5).

Um festzustellen, ob diese Sequenz auch ausreichend für eine Kernlokalisierung ist, wurden GFP-Fusionsproteine, die eine NLS Sequenz aus RLIM beinhalteten generiert. Ein Vergleich der GFP-Expression nach Transfektion des leeren GFP-Vektors mit GFP-

NLS<sub>RLIM</sub> sollte dieses ermöglichen. In GFP-NLS<sub>RLIM</sub> transfizierten Zellen konnte nur ein striktes GFP-Signal im Zellkern beobachtet werden (Abb. 3-23A).



**Abb. 3-23 GFP-NLS<sub>RLIM</sub> Lokalisation in HeLa-Zellen**

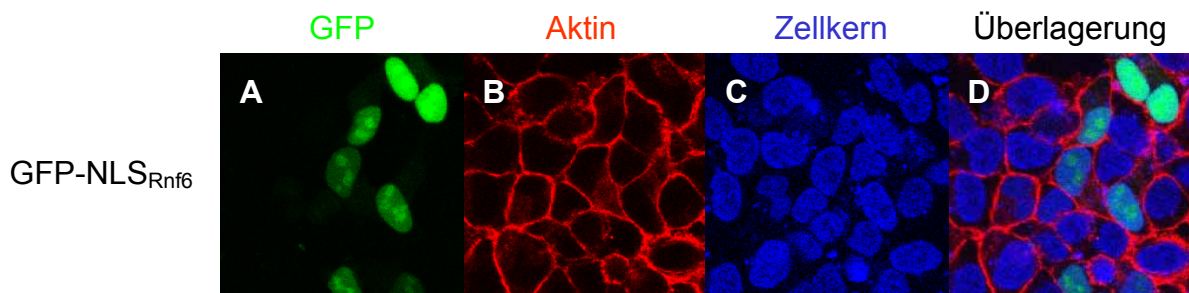
(A) Transfektion von GFP-NLS<sub>RLIM</sub> (grün) in HeLa-Zellen resultierte in einer nukleären Lokalisation des GFP-Signals. Zur besseren Visualisierung wurde das Aktinskelett (rot, siehe B) und der Zellkern (blau, siehe C) angefärbt. (D) zeigt die Überlagerung der drei Färbungen.

Folglich ist für eine Kernlokalisation diese Sequenz aus RLIM ausreichend, denn sie war in der Lage, eine vormals auch im Cytoplasma sichtbare GFP-Lokalisation in eine nukleäre GFP Lokalisation zu überführen. Auf RLIM konnte somit ein 22 Aminosäuren (as205-226) langes Stück als ein funktionelles Kernlokalisierungssignal charakterisiert werden.

### 3.7.2 Rnf6 besitzt ebenfalls ein funktionelles NLS

Aufgrund der Vorhersage aus den Sequenzinformationen war es möglich, dass auch Rnf6 ein NLS besitzen könnte. Obwohl Rnf6 vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist, war auch hier eine basische, argininreiche Domäne (as187-208), ähnlich zu der von RLIM, vorhanden (Sequenz siehe Abb. 3-19).

Zur Überprüfung und Charakterisierung dieses scheinbaren NLS, wurden ebenfalls GFP-Fusionsproteine generiert und die entsprechenden Vektoren transfiziert. Wie im oben beschriebenen Experiment des GFP-NLS<sub>RLIM</sub>, konnte auch hier durch Transfektion des Fusionsproteins GFP-NLS<sub>Rnf6</sub> ein GFP-Signal nur im Zellkern beobachtet werden (Abb. 3-24).



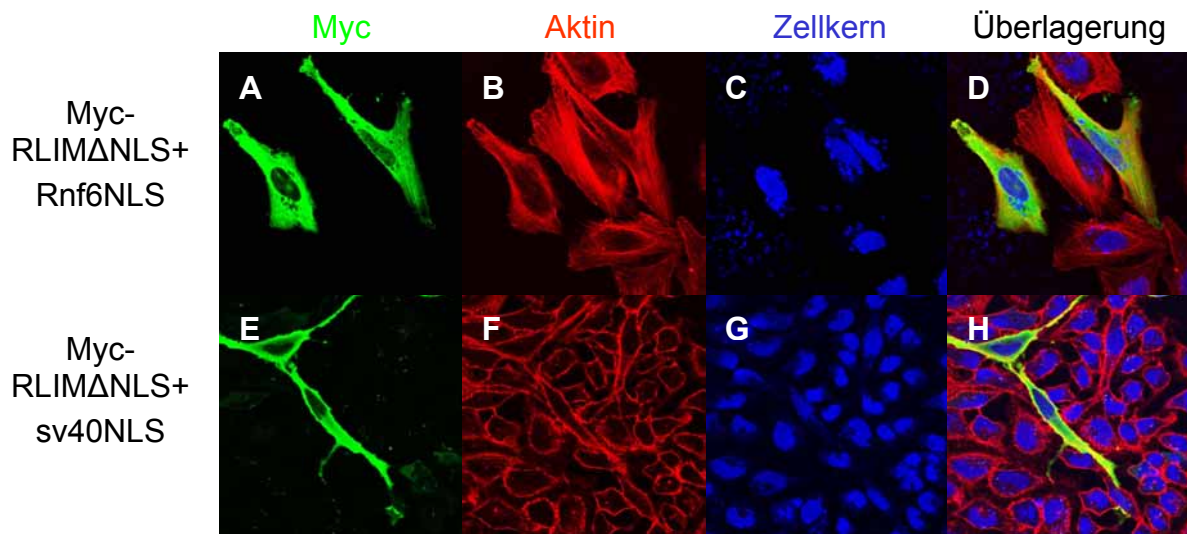
**Abb. 3-24 GFP-NLS<sub>Rnf6</sub> Lokalisation in HeLa-Zellen**

(A) Transfektion von GFP-NLS<sub>Rnf6</sub> (grün) in HeLa-Zellen resultierte in einer nukleären Lokalisation des GFP-Signals. Zur besseren Visualisierung wurde das Aktinskelett (rot, siehe B) und der Zellkern (blau, siehe C) angefärbt. (D) zeigt die Überlagerung der drei Färbungen.

Damit konnte gezeigt werden, dass auch Rnf6 ein funktionelles NLS besitzt, denn auch dieses NLS ist in der Lage, eine vormals auch im Cytoplasma sichtbare GFP-Lokalisation in eine nukleäre GFP Lokalisation zu überführen.

Bei einem Vergleich der GFP Kernlokalisierung von GFP-NLS<sub>RLIM</sub> und GFP-NLS<sub>Rnf6</sub> wurde deutlich, dass bei dem NLS von RLIM eine stärkere Kernlokalisierung beobachtbar war (sichtbar auf Abb. 3-23 A im Vergleich mit Abb. 3-24A). Dieser Vergleich zwischen dem NLS von RLIM und dem NLS von Rnf6 ist jedoch aufgrund der relativen Repräsentanz der GFP-Signale im Zellkern schwer zu beurteilen. Dennoch scheint es so, dass ein stärkeres GFP-Signal im Kern durch GFP-NLS<sub>RLIM</sub> hervorgerufen wird, da im Fall von GFP-NLS<sub>Rnf6</sub> häufig noch ein sehr schwaches Signal im Cytoplasma zu beobachten ist.

Zur weiteren Klärung wurde das NLS in RLIM ausgetauscht. Der Austausch des NLS in RLIM mit dem NLS von Rnf6 und anschließender Transfektion dieses Konstrukts Myc-RLIM $\Delta$ NLS+Rnf6NLS führte zu einer cytoplasmatischen Lokalisation (siehe Abb. 3-25A).



**Abb. 3-25 Lokalisation von RLIM $\Delta$ NLS+Rnf6NLS und RLIM $\Delta$ NLS+sv40NLS in HeLa-Zellen**

Immunocytochemische Analyse der HeLa-Zelllinie nach (A) Transfektion von Myc-markiertem RLIM $\Delta$ NLS+Rnf6NLS (grün) und (E) Transfektion von Myc-markiertem RLIM $\Delta$ NLS+sv40NLS (grün). Beide Myc-markierten Proteine waren überwiegend cytoplasmatisch lokalisiert (A+D) und (E+H). Zur besseren Visualisierung wurde das Aktinskelett rot (B+F) und der Zellkern blau (C+G) angefärbt. (D+H) zeigen jeweils die Überlagerung der Bilder A-C bzw. E-G.

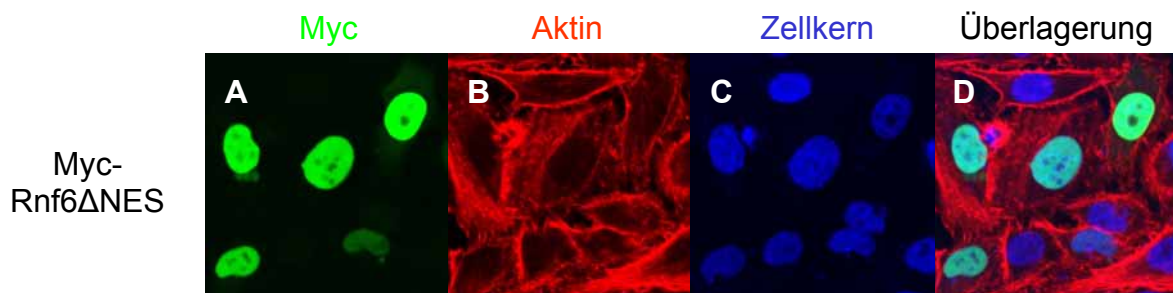
Das NLS von Rnf6 ist in der Sequenzumgebung von RLIM nicht in der Lage, eine nukleäre Lokalisation der Myc-markierten Fusionsproteine zu induzieren. Auch ein Austausch des NLS in RLIM mit einem heterologen NLS (sv40NLS, einem häufig in der Literatur als Kontrolle beschriebenen NLS) und anschließender Transfektion dieses Konstrukts Myc-RLIM $\Delta$ NLS+sv40NLS führte zu einer cytoplasmatischen Lokalisation (Abb. 3-25E). Trotz funktionsfähigem sv40NLS (Daten nicht gezeigt) blieb Myc-RLIM $\Delta$ NLS+sv40NLS ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass RLIM einerseits ein sehr starkes NLS besitzt und RLIM auch ein Kernexportsignal enthalten müsste.

### 3.8 Charakterisierung des NES in RLIM und Rnf6

Wie oben gezeigt, besitzt nicht nur RLIM, sondern auch Rnf6 ein funktionelles NLS. Trotzdem ist Rnf6 überwiegend cytoplasmatisch lokalisiert. RLIM auf der anderen Seite ist nukleär lokalisiert, wird aber beim Austausch des NLS mit anderen funktionellen NLS im Cytoplasma lokalisiert. Zusammengenommen ließen diese Befunde vermuten, dass RLIM und Rnf6 ein nukleäres Exportsignal (NES) besitzen.

In der Literatur wurden leucinreiche Aminosäuresequenzabschnitte beschrieben, die in der Lage sind, Proteine aus dem Kern zu exportieren (Fornerod et al., 1997; Ossareh-Nazari et al., 2001). Durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen konnte ich einen leucinreichen Bereich in Rnf6 und RLIM identifizieren, der starke Ähnlichkeit mit einer NES-Konsensussequenz aufweist (L-X<sub>2-3</sub>-L-X<sub>2-3</sub>-L-X-L; wobei x für eine beliebige Aminosäure steht) (Kudo et al., 1999).

Zur Beantwortung der Frage, ob RLIM und Rnf6 ein funktionelles NES besitzen, wurden ebenfalls Deletionskonstrukte und GFP-Fusionsproteine generiert. Die Aminosäuren as565-577 wurden aus dem Rnf6 Protein deletiert und der Expressionsvektor Myc-Rnf6 $\Delta$ NES wurde in Zellen transfiziert und anschließend detektiert.



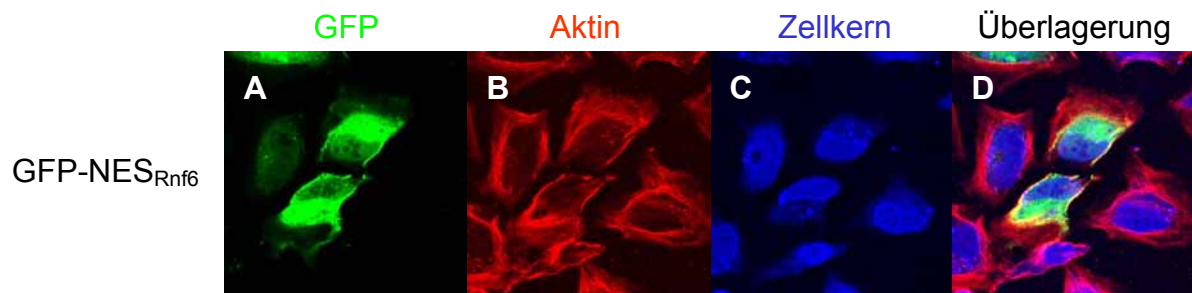
**Abb. 3-26 Rnf6 $\Delta$ NES Lokalisation in HeLa-Zellen**

(A) Nukleäre Expression von Myc-markiertem Rnf6 $\Delta$ NES (grün). Zur besseren Visualisierung wurde in (B) das Aktinskelett (rot) und in (C) der Zellkern (blau) angefärbt. (D) zeigt die Überlagerung der drei Färbungen.

Es zeigte sich, dass diese Sequenz (as565-577: LPILRLAHFFLL) notwendig für die cytoplasmatische Lokalisation von Rnf6 ist, da das Deletionsprotein im Zellkern nachweisbar war (Abb. 3-26A).

Zusätzlich wurden wiederum GFP-Fusionsproteine generiert, bei denen C-terminal von GFP das zu untersuchende NES fusioniert wurde, um zu überprüfen, ob das NES auch ausreichend für eine cytoplasmatische Lokalisation ist. Erneut erfolgte ein Vergleich der GFP Lokalisationen nach Transfektion der GFP- und GFP-Fusionsproteinvektoren.

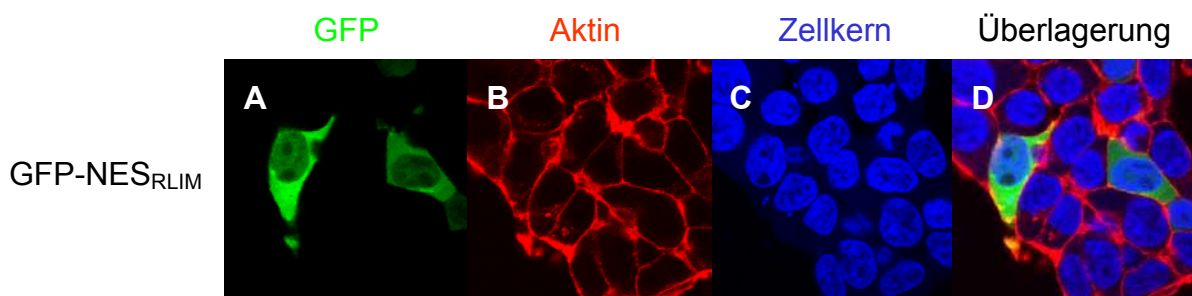
Eine Transfektion mit GFP-NES<sub>Rnf6</sub> führte zu einer cytoplasmatischen Lokalisation des GFP-Signals (Abb. 3-27A), hingegen war das GFP-Signal bei einer Kontrolltransfektion sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus zu finden (siehe Abb. 3-20).



**Abb. 3-27 GFP-NES<sub>Rnf6</sub> Lokalisation in HeLa-Zellen**

(A) Transfektion von GFP-NES<sub>Rnf6</sub> (grün) in HeLa-Zellen resultierte in einer cytoplasmatischen Lokalisation des GFP-Signals. Zur besseren Visualisierung wurde in (B) das Aktinskelett (rot) und in (C) der Zellkern (blau) angefärbt. (D) zeigt die Überlagerung der drei Färbungen.

In ähnlichen Experimenten wurde das potentielle NES von RLIM (as501-513: LPFFSLAQFFLL) untersucht und es zeigte sich, dass eine Transfektion mit GFP-NES<sub>RLIM</sub> ebenfalls zu einer cytoplasmatischen Lokalisation des GFP-Signals führte (Abb. 3-28A).



**Abb. 3-28 GFP-NES/RLIM Lokalisation in HeLa-Zellen**

(A) Transfektion von GFP-NES/RLIM (grün) in HeLa-Zellen resultierte in einer cytoplasmatischen Lokalisation des GFP-Signals. Zur besseren Visualisierung wurde in (B) das Aktinskelett (rot) und in (C) der Zellkern (blau) angefärbt. (D) zeigt die Überlagerung der drei Färbungen.

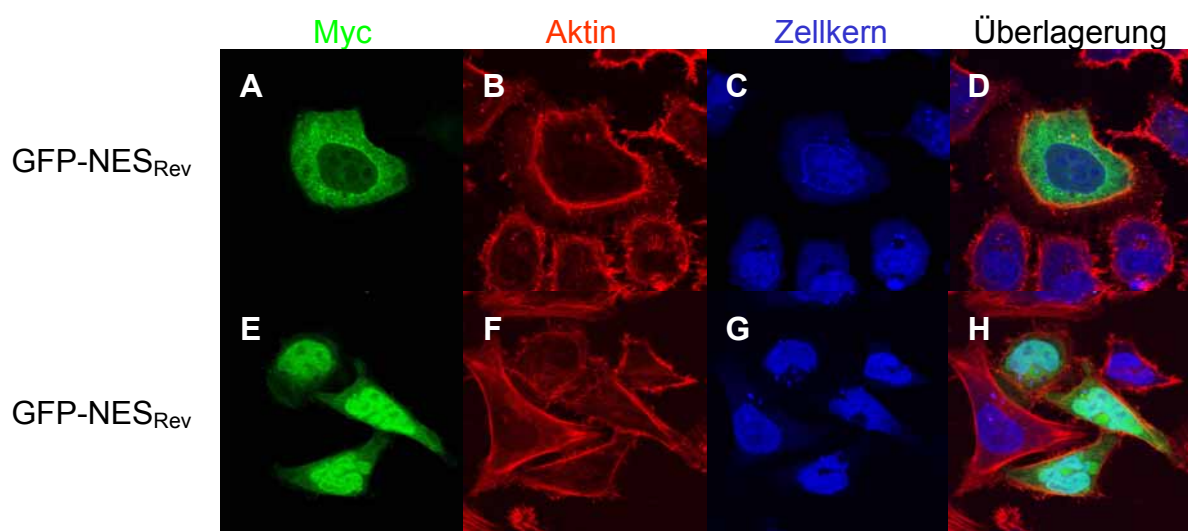
Diese Experimente zeigen, dass sowohl Rnf6 als auch RLIM ein funktionelles nukleäres Exportsignal besitzen, welches für eine cytoplasmatische Lokalisation ausreichend ist.

### 3.8.1 NES vermittelter Export durch den CRM1-Rezeptor

Die unter 3.8 beschriebenen Ergebnisse machten eine weitere Charakterisierung des NES notwendig. Die Sequenzen des NES von Rnf6 und RLIM zeigten Ähnlichkeiten zum NES des Rev-Proteins aus dem HI-Virus (LQLPPLERLTL). Von diesem ist bekannt, dass es den Export von Proteinen aus dem Nukleus über den CRM1-Rezeptor vermittelt (Pollard and Malim, 1998). Eine Möglichkeit, diesen Weg zu inhibieren, bietet die

Substanz Leptomycin B (LMB). Dabei handelt es sich um einen Stoff, der den CRM1-Rezeptor kovalent bindet, und so den Export von Proteinen verhindert (Kudo et al., 1999). Daher sollten GFP-NES-Fusionsproteine, die über den CRM1-Exportweg transportiert werden, durch eine Inkubation mit LMB im Zellkern angereichert werden.

In den folgenden Experimenten sollte gezeigt werden, ob die hier hergestellten GFP-NES-Fusionsproteine ebenfalls durch eine LMB-Inkubation im Zellkern angereichert werden. Als Kontrolle wurde das oben erwähnte CRM1-sensitive NES des HI-Virus als GFP-Fusionsprotein (GFP-NES<sub>Rev</sub>) benutzt.

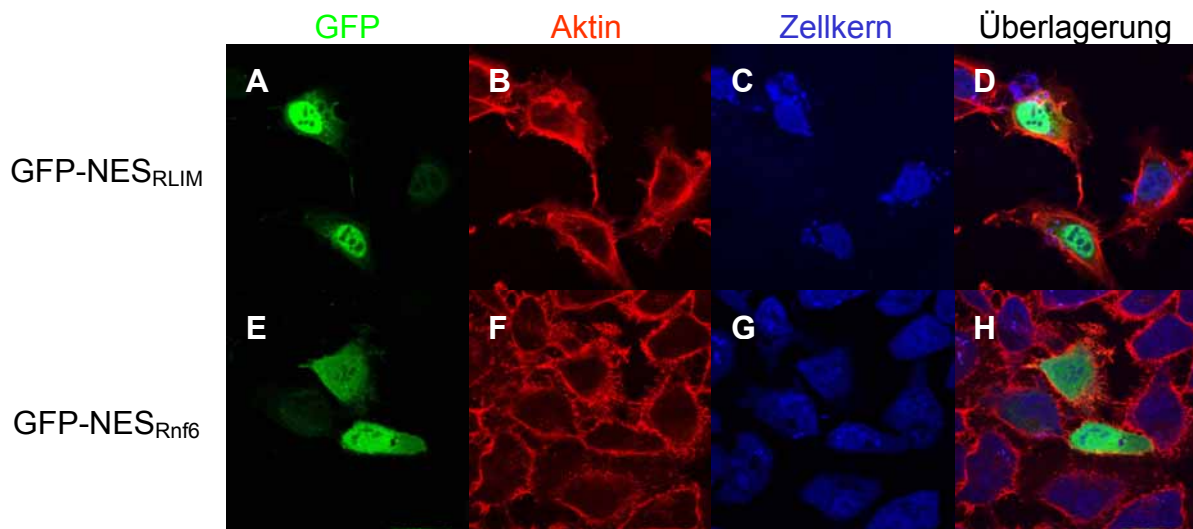


**Abb. 3-29 GFP-NES<sub>Rev</sub> Lokalisation in HeLa-Zellen.**

(A-D) Transfektion von GFP-NES<sub>Rev</sub> (grün) in HeLa-Zellen resultierte in einer cytoplasmatischen Lokalisation des GFP-Signals. (E-H) Durch Inkubation mit LMB kam es zu einer Anreicherung des GFP-Signals im Zellkern. (B+F) Zur besseren Visualisierung wurde das Aktinskelett (rot) und (C+G) der Zellkern (blau) angefärbt. (D+H) zeigen jeweils die Überlagerung der Bilder A-C bzw. E-G.

Die Transfektion von GFP-NES<sub>Rev</sub> führte zu einer vorwiegend cytoplasmatischen Lokalisation des GFP-Signals (Abb. 3-29 A-D). Durch Inkubation mit LMB wurde der Export aus dem Nukleus inhibiert und das GFP-Fusionsprotein wurde im Zellkern angereichert (Abb. 3-29 E-H). Die LMB Effekte wurden nicht durch eine Koinkubation mit Cycloheximid, das die Proteinsynthese inhibiert, verändert. Die Proteintranslokation hat folglich nicht eine *de novo* Proteinsynthese, sondern eine Proteinrelokation als Ursache. Somit konnte bestätigt werden, dass dieses NES sensitiv gegenüber einer LMB Inkubation ist.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob das NES von RLIM und Rnf6 ebenfalls sensitiv gegenüber LMB ist und ob sie über den CRM1-vermittelten Exportweg ins Cytoplasma transportiert werden? Hierzu wurden die GFP-NES<sub>Rnf6</sub> und GFP-NES<sub>RLIM</sub> Fusionsproteine transfiziert und anschließend analog zu den NES<sub>REV</sub>-Experimenten mit LMB inkubiert. Diese Inkubation führte zu einer Anreicherung der GFP-Proteine im Zellkern der transfizierten Zellen (Abb. 3-30A+E).



**Abb. 3-30 Effekt von LMB auf GFP-NES<sub>RLIM</sub> und GFP-NES<sub>Rnf6</sub> exprimierende HeLa-Zellen**

(A-D) Transfektion von GFP-NES<sub>RLIM</sub> (grün) und (E-H) von GFP-NES<sub>Rnf6</sub> (grün) in HeLa-Zellen nach Inkubation mit LMB. Die vormals cytoplasmatisch lokalisierten GFP-Signale wurden im Zellkern akkumuliert. Zur besseren Visualisierung wurde in B+F das Aktinskelett (rot) und in C+G der Zellkern (blau) angefärbt. Die Bilder D+H zeigen jeweils die Überlagerung der Bilder A-C bzw. E-G.

Ohne LMB Inkubation waren die GFP-Signale vorher überwiegend cytoplasmatisch (siehe Abb. 3-27 und Abb. 3-28). Es zeigt sich, dass wie auch im Fall des Kontroll-NES des REV Proteins nur ein Teil der transfizierten Zellen sensitiv gegenüber einer LMB Inkubation war. Lokalisationsunterschiede zwischen den GFP-Fusionsproteinen GFP-NES<sub>Rnf6</sub> und GFP-NES<sub>RLIM</sub> oder dem GFP-NES<sub>REV</sub> konnten nicht festgestellt werden.

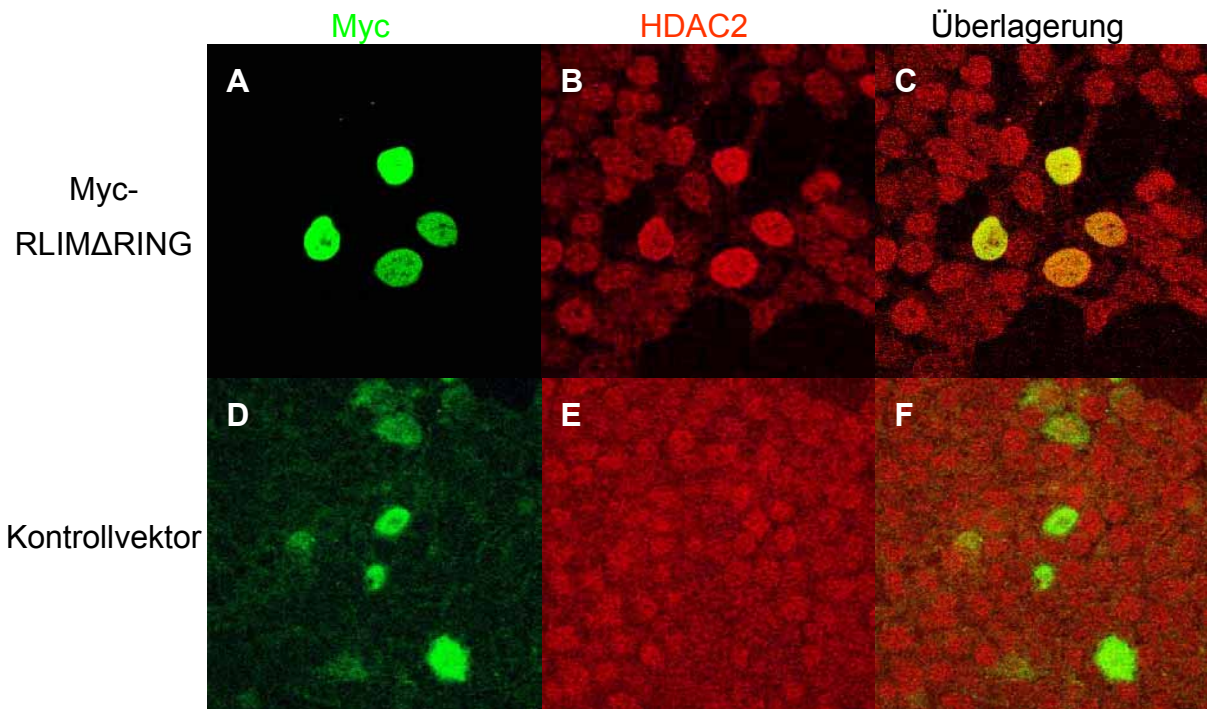
Insgesamt zeigen diese Versuche, dass sowohl RLIM als auch Rnf6 ein NES besitzen, das sich sensitiv gegenüber LMB zeigt, und dass die Proteine über den CRM1-vermittelten Exportweg aus dem Zellkern transportiert werden können.



### 3.9 Abbau von HDAC2 durch RLIM

RLIM reprimiert die LIM-HD abhängige Gentranskription durch die Rekrutierung eines Faktors des HDAC-Korepressorkomplexes. Diese Korepressorkomplexe enthalten unter anderem auch Histondeacethylasen (HDAC) (siehe auch Einleitung 2.1.4). In Kollaboration mit der Gruppe von Dr. T. Heinzel in Frankfurt wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob RLIM auch mit weiteren Komponenten des Korepressorkomplexes wie z.B. HDACs interagiert. Hinweise auf eine Interaktion dieser beiden Proteine ergaben sich aus Immunpräzipitationen mit einem HDAC2 spezifischen Antikörper. Es konnte eine Wechselwirkung von HDAC2 und RLIM festgestellt werden, die spezifisch erschien, weil keine Interaktion mit HDAC1 oder HDAC3 beobachtet werden konnte. Weiterhin konnten wir durch *in vitro*-Ubiquitinierung zeigen, dass HDAC2 ein *in vitro* Substrat von RLIM ist (Kramer et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde die *in vivo*-Interaktion von HDAC2 und RLIM in Zellen analysiert. Nach Transfektion eines Myc-markierten DN-RLIM Expressionsvektors (analog zu den CLIM-Abbau Experimenten in 3.5.1) konnte ich zeigen, dass es durch Transfektion dieses Myc-RLIM $\Delta$ RING Expressionsvektors zu einer Erhöhung der HDAC2 Proteinkonzentrationen kam (Abb. 3-31 A-C). Durch die DN-Eigenschaften dieses Konstrukts konnten erhöhte HDAC2 Proteinmengen in den transfizierten Zellen detektiert werden. RLIM ist also in der Lage, HDAC2 für den proteasomalen Abbau zu markieren.

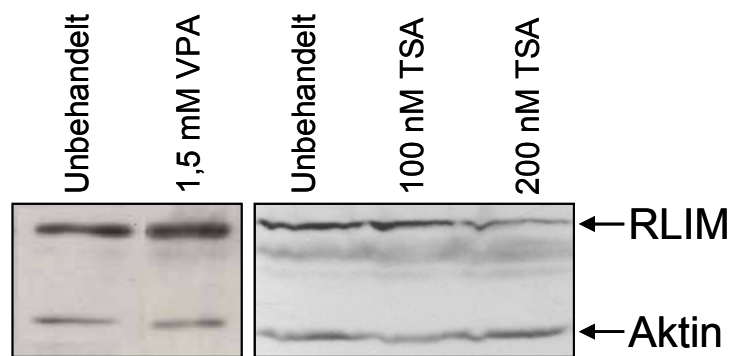


**Abb. 3-31 Erhöhte HDAC2 Proteinmengen nach Transfektion von RLIM $\Delta$ RING**

(A) Durch Transfektion von Myc-RLIM $\Delta$ RING (grün) waren erhöhte endogene HDAC2 Proteinkonzentrationen sichtbar (B)(rot). (D) Transfektion des Kontrollvektors (grün) änderte die endogenen HDAC2 Proteinmengen (E)(rot) nicht. Gezeigt werden beide Einzelfärbungen (grün, rot) und die Überlagerung (C+F) beider Färbungen.

Kontrolltransfektionen mit Vektoren ohne Insert, jedoch mit Myc-Markierung und mit NLS, wiesen keine erhöhten HDAC2 Werte auf (Abb. 3-31 D-F).

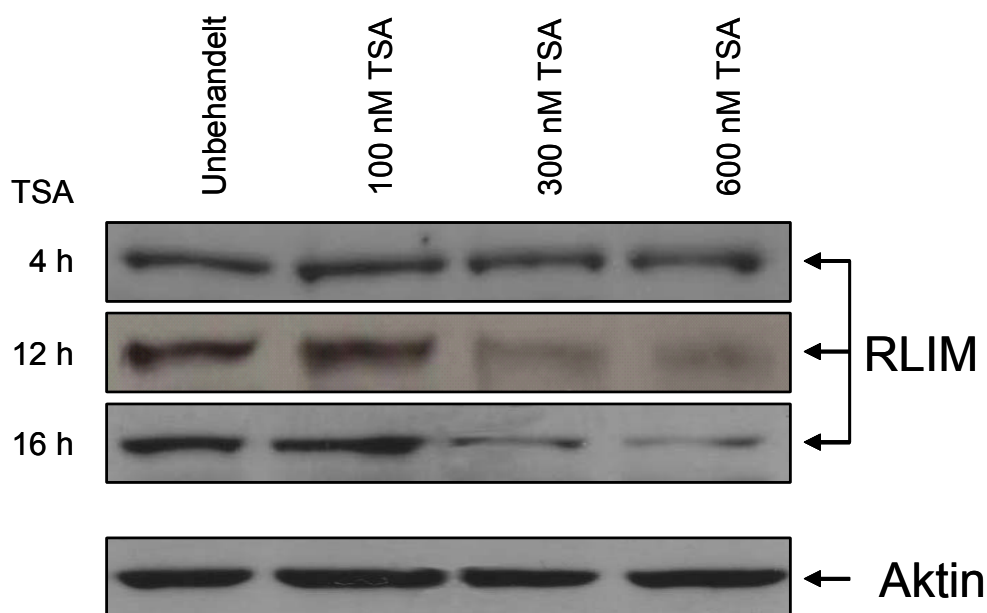
Bei weiterführenden Experimenten wurde deutlich, dass eine Inkubation mit HDAC-Inhibitoren auch auf RLIM einen Einfluss besitzt. Ich konnte zeigen, dass es mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) und nicht mit dem HDAC-Inhibitor VPA zu einem Rückgang der RLIM Proteinmenge kommt. Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen TSA (100 und 200 nM) und VPA (1,5mM) für 24h inkubiert. Es zeigte sich, dass bei einer 24h Inkubation mit 200 nM TSA ein Rückgang der RLIM Expression zu verzeichnen war (Abb. 3-32).



**Abb. 3-32 24h Inkubation von HEK293T-Zellen mit TSA führt zu einer Degradation von RLIM-Protein**

Vergleich der Expression von endogenem RLIM-Protein in unbehandelten und mit VPA (1,5mM) oder mit TSA (100 und 200 nM) inkubierten HEK293T-Zellen durch Western-Blot Analyse. Ein RLIM Rückgang zeigte sich bei 200 nM TSA.

Dieser durch TSA induzierte RLIM-Proteinabbau fand erst mit einiger Verzögerung statt. Aus einer TSA-Inkubationszeitreihe von 4 bis 16 h mit TSA-Konzentrationen von 100, 300 und 600 nM wurde deutlich, dass ein RLIM-Abbau erst nach einer 12h Inkubation (bei 300 nM TSA) sichtbar wurde (Abb. 3-33).



**Abb. 3-33 Kinetik der Degradation von RLIM-Protein**

Vergleich der Expression von endogenem RLIM-Protein nach 4 h, 12 h oder 16 h TSA-Inkubation. Gezeigt wird eine Western-Blot-Analyse von unbehandelten und mit TSA (100, 300, 600 nM) inkubierten Proteinextrakten aus HEK293T-Zellen. Ein Abbau von RLIM kann ab einer Konzentration von 300 nM TSA für eine 12h Inkubation beobachtet werden. Exemplarisch für alle Inkubationsreihen ist als Kontrolle eine Aktinfärbung (12 h) gezeigt.

Der Abbau von RLIM begann erst nach 12-stündiger TSA-Inkubation; ein Maximum trat nach 24 h bei 200 nM TSA auf. Die RLIM mRNA Mengen waren durch eine TSA-Inkubation nicht betroffen (Kramer et al., 2003), welches ebenfalls für einen Abbau der Proteine und nicht für eine Hemmung der Transkription spricht.

Aus diesen Daten geht hervor, dass für RLIM ein weiteres Substratprotein *in vivo* gefunden werden konnte. RLIM ist nicht nur an der Regulation von zellulären CLIM Konzentrationen beteiligt, sondern es wurde ein weiteres Substratprotein, HDAC2, von RLIM entdeckt. Wie bereits von anderen RINGfingerproteinen bekannt, besitzt RLIM eine Substratspezifität, dennoch können mehrere spezifische Substrate vorhanden sein.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass RLIM ein zentrales Protein im LIM-HD Proteinnetzwerk darstellt. Mit Rnf6 wurde ein zu RLIM homologes Protein identifiziert und auf seine Funktionen innerhalb des LIM-Systems und im Vergleich zu RLIM analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass RLIM und Rnf6 als transkriptionelle Repressoren und Ubiquitinligasen fungieren. Weitere Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, welche funktionellen Domänen auf RLIM bzw. Rnf6 an diesen Funktionen beteiligt sind und auf welche Faktoren sie möglicherweise wirken. Ein NLS und ein NES wurden auf RLIM und Rnf6 identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass RLIM und Rnf6 zwischen dem Kern und dem Cytoplasma hin und her transportiert werden können.

### 4.1 Evolution des LIM-Proteinnetzwerks

Ein struktureller und funktioneller Vergleich zwischen Genen und Proteinen verschiedener Spezies erlaubt eine Aussage darüber, ob ein bestimmter Entwicklungsmechanismus konserviert wurde. Das hier untersuchte LIM-Proteinnetzwerk besteht aus den LIM-Homeodomänen Transkriptionsfaktoren, den LMO-Proteine sowie den Kofaktorfamilien CLIM und RLIM.

Vor kurzem konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass Ssdp Proteine, früher als single-stranded-DNA-binding Proteine beschrieben, mit dem CLIM-*Drosophila*-Homolog Chip interagieren und für die Regulation der Flügelbildung wichtig sind (Chen et al., 2002). Diese Interaktion geschieht durch die stark konservierte LUFS-Domäne (LUG/LUH, Flo8, single-strand DNA-binding protein) am N-Terminus von Ssdp, einer Domäne mit noch unbekannter Funktion (Conner and Liu, 2000). Die Domäne, die die Interaktion zwischen Ssdp und Chip/CLIM Proteinen vermittelt ist hoch konserviert (90 % Aminosäureidentität zwischen Maus und *Drosophila*), und wurde sogar in Pflanzen gefunden. Damit ist diese Achse zwischen CLIM und den Ssdp Proteinen die wohl älteste evolutionär entstandene Verbindung zwischen Proteinen innerhalb des LIM-

Proteinnetzwerks. Die Interaktionsdomäne konnte bei dem *Arabidopsis* Protein LEUNIG zuerst beschrieben werden (Conner and Liu, 2000; Franks et al., 2002). LEUNIG interagiert durch die LUFs-Domäne mit dem Protein SEUSS, welches Ähnlichkeiten zu Chip/CLIM aufweist (van Meyel et al., 2003). Die erstaunliche Konservierung der Interaktion zwischen den LUFs-Domänen und Sequenzen innerhalb der Chip/CLIM und SEUSS Proteine von Pflanzen bis zu Vertebraten ist ein Beispiel für eine uralte transkriptionelle Regulationsfunktion, welche dann später in der Entwicklung noch durch Hinzufügen der LIM-Interaktionsdomäne bei den Chip/CLIM Proteinen und den damit verbundenen LIM-HD Protein Wechselwirkungen erweitert wurde (van Meyel et al., 2003).

Sequenzvergleiche weisen daraufhin, dass die LIM-HD und LMO Proteine später in der Evolution in das CLIM/Sspd System integriert wurden; LIM-HD Proteine wurden in so unterschiedlichen Organismen wie Ascidien, *Drosophila*, Zebrafisch, Hühnern und Säugetieren, nicht in Hefen und Pflanzen, gefunden und zeichnen sich durch eine hohe Konservierung aus. Zum Beispiel haben die humanen Kernproteine LMO1 und LMO2 auf der Ebene der Proteinsequenz eine 70 %ige Homologie zu dem *Drosophila* LMO (dLMO) (Zhu et al., 1995). Die Ähnlichkeiten der Defekte, hervorgerufen durch loss-of-function Mutationen der LIM-HD Proteine, zwischen diversen Organismen deuten an, dass das Vorhandensein eines LIM-HD „Ur-Gens“ für die neurale Identität, axonale Projektion oder Zellposition eine entscheidende Rolle spielte (Hobert and Westphal, 2000). Hervorzuheben ist ihre Fähigkeit zur Bildung von homodimeren, heterodimeren oder multimeren transkriptionellen Regulatorkomplexen. Dieses ermöglicht den LIM-HD Proteinen in einer zellspezifischen Art und Weise auf eine Reihe von entwicklungsbiologischen Ereignissen zu wirken.

Nach Auswertung von phylogenetischen Beziehungen innerhalb der LIM-HD Proteinfamilien wird angenommen, dass LIM-HD Proteine generell in Untergruppen von zwei zueinander sehr homologen Proteinen auftreten (Bach, 2000; Hobert and Westphal, 2000). Für dieses paarweise Auftreten sprechen z.B. Experimente, bei denen der Austausch der funktionellen Homeo- und LIM-Domänen zwischen den Faktoren *apterous* und *lim3* zumindest teilweise keine Effekte für die Funktion der beiden

Transkriptionsfaktoren hatte (O'Keefe et al., 1998). Gleichfalls findet man zwei zueinander stark homologe Proteine bei den nukleären LMOs, und bei den CLIM Kofaktoren sind ebenfalls zwei verwandte Proteine, CLIM1 und CLIM2, bekannt. Innerhalb der verschiedenen Säugetierspezies ist dieses paarweise Auftreten konserviert.

Nicht nur die LMO und LIM-HD Proteine, sondern auch den Kofaktor RLIM zeichnet eine hohe Konservierung zwischen verschiedenen Spezies aus. Die humane RLIM-Proteinsequenz ist zu 89 % identisch mit dem murinen RLIM und zu 85 % bzw. 81 % identisch mit den RLIM-Sequenzen vom Huhn bzw. vom Frosch. Ein weiteres Indiz der hohen Konservierung innerhalb verschiedener Spezies ist, dass das für RLIM-kodierende Gen beim Mensch und bei der Maus auf derselben Region des X-Chromosoms lokalisiert vorliegt (Ostendorff et al., 2000). Daher ist es erstaunlich, dass *C. elegans* scheinbar nicht über ein Gen verfügt, das für ein RLIM-ähnliches Produkt kodiert. Dies spricht für einen RLIM vermittelten Regulationsmechanismus, der eine weitere Ebene der Verflochtenheit der transkriptionellen Regulation darstellt und der erst später in der Evolution gebildet wurde. Durch RLIM wurde eine weitere Vielfalt und engere Regulation der LIM-HD Proteine erlaubt (Hobert and Westphal, 2000). Allerdings ist nicht ausgeschlossen, dass es in *C. elegans* ein anderes Protein gibt, zwar strukturell unterschiedlich, aber mit gleicher Funktion.

Das in dieser Arbeit identifizierte Rnf6 wurde durch einen Sequenzvergleich auf Grundlage der Nukleotidsequenzen von RLIM mit der „Human Genome“ Datenbank gefunden (siehe Ergebnisse 3.1). Ein Vergleich von RLIM mit Rnf6 ergab, dass diese Proteine einen RINGfinger, eine Leucin-Zipper-Domäne und ein potentielles NLS enthalten. Zusätzlich zum NLS konnte ein NES in beiden Proteinen identifiziert werden, die zusammen einen Transport in und aus dem Zellkern ermöglichen könnten (siehe Ergebnisse 3.1). Im Gegensatz zu den LIM-HD und CLIM Proteinen, die sich funktionell ersetzen können, weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass dies durch ihre unterschiedliche Eigenschaft, für RLIM und Rnf6 nicht möglich ist.

## 4.2 Mechanismus der transkriptionellen Repression vermittelt durch RLIM und Rnf6

In der Arbeit von Bach et al. 1999 wurde RLIM als Korepressor beschrieben, der in der Lage ist, eine von Lhx3 vermittelte transkriptionelle Aktivierung des  $\alpha$ GSU- und des Prolactin-Promotors zu inhibieren. Dies geschieht durch Rekrutierung HDAC-Korepressorkomplexes. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass RLIM mit allen getesteten nukleären LIM-Domänen interagieren kann, was eine generelle Repressorrolle für LIM-HD Proteine nahe legt. CLIM Kofaktoren sind ebenfalls von essentieller Bedeutung für die transkriptionelle Aktivität von LIM-HD Proteinen (siehe Einleitung 2.2.4.1).

Meine Analysen sollten nun die Frage klären, ob RLIM direkt oder indirekt über Kofaktoren die LIM-HD Transkription inhibiert. Dazu wurden RLIM-Deletionsmutanten generiert, und in transienten Transfektionen wurde ihr Repressorverhalten analysiert (siehe 3.2.1). Diese Versuche zeigten, dass die Deletionsmutanten RLIM $\Delta$ 9as oder RLIM $\Delta$ RING als Repressor einer durch Lhx3 vermittelten Transkriptionsaktivierung wirken, hingegen sind sie nicht im Stande, eine CLIM-abhängige Transkriptionsaktivierung zu inhibieren. Der RINGfinger von RLIM ist für eine Interaktion mit dem HDAC-Korepressorkomplex nicht notwendig (Ostendorff et al., 2002). Somit wirkt RLIM durch zwei unterschiedliche Inhibierungsmechanismen: Einerseits durch eine Rekrutierung des HDAC-Korepressorkomplexes und andererseits auch direkt über eine CLIM-Markierung zum Abbau, da den Deletionsmutanten RLIM $\Delta$ 9as und RLIM $\Delta$ RING eine Ubiquitinligaseaktivität fehlt und sie nicht mehr CLIM zum Abbau markieren können. Dieses Ergebnis wird von anderen Daten in der vorliegenden Arbeit unterstrichen. RLIM ubiquitiniert die CLIM Kofaktoren (siehe 3.4.2) und ist in der Lage, endogenes CLIM dem Abbau zuzuführen (siehe 3.5.1).

Rnf6 weist in der basischen Region eine hohe Sequenzhomologie zu RLIM auf (siehe 3.1). Da diese Region für eine Interaktion mit LIM-HD Proteinen verantwortlich ist, lag die Vermutung nahe, dass ebenso wie RLIM, auch Rnf6 ein negativer Kofaktor der transkriptionellen Aktivierung des  $\alpha$ GSU- und des Prolactin-Promotors sein könnte. Daher wurde in dieser Arbeit, analog zu den oben genannten Experimenten, Rnf6 auf sein Repressorpotential mittels transienter Transfektionen analysiert. Die erhaltenden



Ergebnisse zeigten, dass Rnf6 als Repressor wirken kann (siehe 3.2.2). Aufgrund der hohen Homologie zu RLIM ist es wahrscheinlich, dass der Inhibierungsmechanismus auch auf der Rekrutierung eines Faktors des Korepressorkomplexes basiert. Erstaunlicherweise wurden keine Unterschiede in der Repressionsfunktion zwischen Rnf6 und RLIM sichtbar. Dieses war für die CLIM abhängigen Experimenten unerwartet, da Rnf6 in Zellkultur nicht endogene CLIM Proteine zum Abbau markieren konnte (siehe 3.5.2). Die Diskrepanz, dass Rnf6 einerseits CLIM nicht dem Abbau zuführen kann, andererseits trotzdem die CLIM-abhängige Transkriptionsaktivierung hemmt, lässt sich nicht eindeutig klären. Endogen ist Rnf6 viel stärker im Cytoplasma lokalisiert; allerdings konnten auch geringe nukleäre Rnf6 Proteinkonzentrationen in der Zelle beobachtet werden, die die CLIM-abhängige Transkriptionsaktivierung hemmen könnten. Die Ergebnisse könnten aber auch eher einen Überexpressionseffekt widerspiegeln, als dass es der *in vivo* Situation in der Zelle entspricht, da es nach Rnf6 Überexpression in einigen Zellen zu verstärkten nukleären Proteinkonzentrationen kam (siehe 3.6.2). Eine Erklärung für die beobachteten Effekte könnte sein, dass der Luziferase-Versuchsaufbau sensitiver sein könnte, als die CLIM-Abbau Experimente. Die Messergebnisse des Luziferaseassays könnten leichter quantifizierbar sein, so dass zwar kein CLIM-Abbau in der Zelle zu beobachten wäre, jedoch Effekte auf die Transkription nachzuweisen. Aufgrund der starken endogenen cytoplasmatischen Rnf6 Lokalisation bleibt jedoch fraglich, ob die Repressionseffekte eine biologische Relevanz besitzen. Allerdings ist Rnf6 in der Lage, zwischen Cytoplasma und Kern zu wechseln (näher besprochen unter 4.4) und daher ist eine Repressorrolle *per se* nicht unwahrscheinlich. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Rnf6, nach noch nicht entdeckten Stimuli, in den Zellkern gelangt und die Transkription beeinflusst. Es bleibt abzuwarten und es bedarf weiterer Experimente, ob spezifische nukleäre Interaktionspartner für Rnf6 gefunden werden oder Rnf6 ‚nur‘ aufgrund hoher Homologie zu RLIM in identischer Art und Weise auf die Transkription wirkt. In weiteren Versuchen wäre es auch interessant zu testen, ob die Diskrepanz der CLIM-abhängigen Transkriptionsaktivierung in transienten Transfektionsexperimenten mit der Mutante Rnf6 $\Delta$ RING zu klären wären.

### 4.3 Funktionen der RNA-Bindung

In den letzten Jahren wurden immer mehr zelluläre Funktionen, die durch RNA reguliert werden, gefunden. Neben den klassischen Rollen der tRNA, mRNA und rRNA, gelangten microRNA und siRNA wegen ihrer Fähigkeit Gene zu inaktivieren zu großer Bedeutung (Pickford and Cogoni, 2003). Ferner wurden bei vielen mit Chromatin interagierenden Proteinen unterschiedliche Domänen entdeckt, die in der Lage waren, RNA binden zu können (Akhtar et al., 2000). Es zeigte sich, dass z.B. die Chromodomänen wichtig für die Funktionsweise vieler Chromatin-Regulationsproteine sind (Pirrotta, 1998; Jones et al., 2000). Wir konnten zeigen, dass RLIM in Zellen ebenfalls mit Chromatin assoziiert vorliegen kann (Ostendorff et al., 2002).

Meine Untersuchungen zeigten, dass RLIM im Gegensatz zu Rnf6 fähig war, RNA zu binden. Eine anschließende Kartierung konnte das NLS als RNA-bindende Domäne identifizieren. Die NLS-Regionen von RLIM und Rnf6 sind nicht nur hinsichtlich ihrer Lage innerhalb der Proteine unterschiedlich, sondern weichen auch in der Aminosäuresequenz voneinander ab. Diese unterschiedliche Aminosäuresequenz wird wahrscheinlich ausschlaggebend für die RNA-Bindung von RLIM sein. Obwohl wir bisher noch keine Konsequenzen dieser RNA-Bindung für RLIM zeigen konnten, weisen zahlreiche Beispiele aus der Literatur auf mögliche Funktionen hin.

Für das Protein HP1, einen Transkriptionsrepressor, der vorrangig im Heterochromatin vorliegt, ist eine RNA-Bindung für seine perinukleäre Lokalisation notwendig (Muchardt et al., 2002). Ob auch für RLIM eine RNA-Bindung wichtig für seine Lokalisation sein könnte, müsste durch RLIM-Lokalisationsexperimente in Anwesenheit von RNasen zu klären sein (Maison et al., 2002). Wir konnten bereits zeigen, dass das NLS auch phosphoryliert werden kann (persönliche Mitteilung von Steven Johnsen). Diese Phosphorylierung könnte die RNA-bindenden Eigenschaften der NLS-Region modifizieren. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass eine RNA-Bindung nur ein Nebeneffekt der Aminosäuresequenzfolge der NLS-Region ist, da gefunden wurde, dass einige argininreiche Sequenzen in der Lage sind, RNA zu binden (Weiss and Narayana, 1998).

In jüngster Zeit wurde gefunden, dass viele RNA-bindende Proteine wahrscheinlich bei der Zelladhäsion und der Ausbreitung der Zelle eine Rolle spielen (de Hoog et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass Paxillin, ein cytoplasmatisches LIM-Protein, in Strukturen mit einer großen Anzahl RNA-bindender Proteinen kolokalisiert, die für das Ausbreiten der Zelle wichtig sind. Spekuliert wurde, dass es sich bei diesen neuartigen Strukturen um Vorläufer der sog. „focal adhesions“ handelt (siehe auch 2.2.4), einer charakteristischen Oberflächenstruktur der Zelladhäsion. Vielleicht ist die RNA-Bindung von cytoplasmatischem RLIM ebenfalls für eine Funktion bei der Zelladhäsion und der Zellausbreitung wichtig. Hierfür spricht auch, dass auf RLIM ein PDZ-Domänen interagierendes Motiv gefunden wurde, ein bei Zellmatrixproteinen häufig gefundenes Motiv (Hiratani et al., 2003). Die RNA-Bindung könnte somit auch eine Funktion für cytoplasmatisches RLIM haben.

#### **4.4 Analyse der zellulären Lokalisation von RLIM und Rnf6**

RLIM und Rnf6 waren hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle nicht untersucht worden. Mit den in unserem Labor hergestellten spezifischen Antikörpern (siehe 5.1.8.1) war es möglich, die endogenen Proteine zu analysieren. Wie in Abb. 3-17 gezeigt, ist RLIM überwiegend im Zellkern lokalisiert und nur in geringen Konzentrationen im Cytoplasma. Hingegen wurde Rnf6 vorwiegend im Cytoplasma detektiert und nur in geringen Konzentrationen im Zellkern. Diese überwiegend nukleäre RLIM und cytoplasmatische Rnf6 Lokalisation wurde in allen untersuchten Zelllinien gefunden. Dieser Befund war zunächst überraschend, da beide Proteine über eine hohe Sequenzhomologie verfügten. Deswegen wurden beide Proteine auf Sequenzebene eingehend untersucht, mit dem Ziel, Domänen zu finden, die für diese Lokalisation verantwortlich sind. Wie unter 3.1 erwähnt, wurden potentielle NLS und NES Domänen auf RLIM und Rnf6 entdeckt.

In der ersten Beschreibung von RLIM als transkriptioneller Repressor (Bach et al., 1999) wurde über eine argininreiche Sequenz als potentielles NLS spekuliert. Der in Abb. 3-1 gezeigte Sequenzvergleich erlaubte eine Identifikation einer ähnlichen argininreichen Sequenz auf Rnf6, die sich jedoch signifikant in der Sequenz und in der Lage im Protein

von der entsprechenden Region in RLIM unterscheidet. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, dass das NLS von RLIM ausreichend für eine nukleäre Lokalisation war, denn ein vormalig ubiquitär lokalisiertes GFP wurde durch Fusion mit dieser NLS Domäne ausschließlich im Zellkern beobachtet (siehe Abb. 3-23). Auf Rnf6 wurde ebenfalls ein funktionelles NLS identifiziert. Ein Vergleich der NLS-Domänen zeigte, dass das NLS von RLIM effektiver in Bezug auf seine Lokalisationsstärke als das von Rnf6 zu sein schien. Erstens war eine stärkere Kernlokalisierung der RLIM<sub>NLS</sub>-GFP-Proteine zu beobachten und zweitens konnte das NLS von Rnf6 durch einen NLS-Austausch (RLIM $\Delta$ NLS+Rnf6NLS auf Abb. 3-25) dieses RLIM-Protein nicht zu einer nukleären Lokalisation führen. Fortlaufende Untersuchungen sollten zu einer weiteren Klärung bezüglich der NLS Lokalisationsstärken beitragen. Eine Analyse des Rnf6 $\Delta$ NLS+RLIMNLS Konstrukts würde dabei helfen. Im Fall von Rnf6 könnte das NLS auch maskiert sein und die Kernimporteigenschaften somit nicht zum tragen kommen. Das NLS auf Rnf6 unterscheidet sich, wie erwähnt, signifikant bezüglich seiner Lage im Protein im Vergleich zu RLIM, welches ebenfalls für eine Maskierung der NLS<sub>Rnf6</sub> sprechen könnte. Durch eine Konformationsänderung von Rnf6, ausgelöst durch geeignete Stimuli, könnte das NLS demaskiert werden und es so Rnf6 ermöglichen, in den Kern zu gelangen.

Es wurde nach Exportsignalen innerhalb des Proteins gesucht und wie auf Abb. 3-1 gezeigt gefunden. Es konnten funktionelle NES auf Rnf6 und auch auf RLIM identifiziert werden (siehe Abb. 3-27 und Abb. 3-28), die einen Protein Transport durch den CRM1-Exportweg aus dem Zellkern vermitteln könnten (siehe 3.8.1). Um die Aktivität der beiden NES miteinander zu vergleichen, könnten NES-Vergleichsanalysen wie die von Henderson im Jahr 2000 beschriebenen durchgeführt werden (Henderson and Eleftheriou, 2000). Diese würden einen Aufschluss darüber geben, welches NES für eine cytoplasmatische Lokalisation stärker ist.

Neben einer Maskierung sind weitere Möglichkeiten denkbar, die die cytoplasmatische Lokalisation von Rnf6 im Vergleich zu der Kernlokalisierung von RLIM erklären könnten. Scheinbar ist das NES<sub>Rnf6</sub> stärker als das NES<sub>RLIM</sub>, denkbar wäre aber auch, dass die beiden NES gleich stark sind und die unterschiedliche Lokalisation von Rnf6 und RLIM

nur durch die verschiedenen NLS Stärken hervorgerufen würde. Ebenfalls denkbar wäre, dass nicht nur das NLS sondern auch das NES von RLIM stärker für ihre jeweilige hervorrufende Lokalisation sind als von Rnf6, dann müsste die Differenz der NLS- zu der NES-Stärke bei RLIM größer sein als bei Rnf6, damit die beobachteten nukleäre RLIM- und cytoplasmatische Rnf6-Lokalisation zu erklären wären.

Zusammenfassend sind RLIM und Rnf6 von den Sequenzsignalen her in der Lage, sich zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma zu bewegen. Für viele Tumorsupressorproteine wie z.B. p53, BRCA1 oder APC ist beschrieben worden, dass durch einen Kerntransport nicht nur ihre Lokalisation, sondern auch ihre Proteinfunktion verändert werden kann (Fabbro and Henderson, 2003; Hood and Silver, 2000). Denkbar wären nicht nur unterschiedliche Zielproteine der Ubiquitinligasen RLIM und Rnf6 im jeweiligen Zellkompartiment, sondern auch andere damit verbundene Auswirkungen bezüglich des Proteinabbaus. Ein Abbau der ubiquitinierten Proteine könnte nur in einem Zellkompartiment ausgeführt werden, z.B. würde nur die Polyubiquitinierung von nukleärem CLIM zu einem Abbau führen, nicht von cytoplasmatischem CLIM. Der Abbau bedarf vielleicht weiterer Modifikation, wie z.B. Phosphorylierung, die nur in dem einen Zellkompartiment ausgeführt werden können. Dies würde erklären, dass es zwar die gleichen *in vitro* Ubiquitinierungsmuster von CLIM und der LIMK gibt, es aber durch RLIM im Fall von CLIM und nur durch Rnf6 im Fall der LIMK zu einem Abbau dieser Proteine kommt. Ein ähnlicher Fall konnte kürzlich für p53 beschrieben werden, wonach es zwar zu einer MDM2-vermittelten Ubiquitinierung sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma kommt, aber nur das nukleäre p53 abgebaut wird (O'Keefe et al., 2003). Warum dies der Fall war, konnte nicht geklärt werden. Spekuliert wurden weitere für einen Abbau notwendige Proteinmodifikationen, die nur in einem Zellkompartiment stattfinden können.

#### **4.5 *in vivo* Zielmoleküle der Ubiquitinligasen RLIM und Rnf6**

Im Gegensatz zur zelltypspezifischen Expression der LIM-HD Gene (Bach, 2000; Hobert and Westphal, 2000; Maison et al., 2002) werden die Kofaktoren CLIM und RLIM ubiquitär exprimiert. Sehr früh während der Entwicklung von Vertebraten kann RLIM,

während der Mausentwicklung schon früher als E7.5, detektiert werden (Bach et al., 1999) und wir konnten sogar in ES-Zellen RLIM und CLIM nachweisen (persönliche Mitteilung M.Bossenz). Überdies wird die RLIM-kodierende mRNA, genauso wie die von CLIM1 und CLIM2, in vielen Körperregionen überlappend exprimiert und wir konnten zeigen, dass es erhebliche Diskrepanzen zwischen der Expression von mRNA und Proteinen gibt. Aufgrund dieser Hinweise, die für eine posttranslationale Modifikation der Proteine sprechen, und den Befund, dass RLIM und Rnf6 einen RINGfinger besitzen, der häufig mit einer Ubiquitinligaseaktivität in Verbindung gebracht wird, wurden in der vorliegenden Arbeit RLIM, ebenso wie Rnf6, auf die Möglichkeit hin untersucht, ob sie an einem Proteinabbau beteiligt sind.

#### 4.5.1 Ist CLIM ein *in vivo* Zielmolekül von RLIM?

Die zellulären Konzentrationen vieler Schlüsselenzyme werden durch den proteasomalen Abbau reguliert (Fang et al., 2000; Freiman and Tjian, 2003; Meek and Knippschild, 2003). Dies geschieht durch den Mechanismus der Ubiquitinierung und den anschließenden proteolytischen Abbau im 26S Proteasom. Dieser Vorgang ist beispielsweise beteiligt an der Regulation der entwicklungsbiologischen Faktoren wie NF  $\kappa$ B, c-Jun, Tramtrack (Hershko und Ciechanover, 1998) oder BOB.1/OBF (Boehm et al., 2001; Tiedt et al., 2001). In dieser Arbeit (siehe 3.4 und 4.6) konnte gezeigt werden, dass RLIM und Rnf6 in der Lage sind CLIM1 und 2 *in vitro* zu ubiquitinieren. Der Abbau durch das 26S Proteasom ist aber nur eine von mehreren Folgen der Ubiquitinierung (siehe auch Einleitung 2.3). Demnach stellte sich die Frage, ob RLIM oder Rnf6 *in vivo* an einem Abbau endogener CLIM Proteine beteiligt sind.

Folgende Beobachtungen weisen daraufhin, dass RLIM auf Zellebene CLIM Proteine zum Abbau markiert. Erste Hinweise auf einen RLIM induzierten CLIM-Abbau erhielten wir durch eine Analyse von endogenen RLIM und CLIM Proteinkonzentrationen die zeigten, dass es eine reziproke Korrelation dieser Proteine bei einem Vergleich mittels Westernblotanalyse in verschiedenen Zelllinien  $\alpha$ T3, CHO und HEK293 gab (Ostendorff et al., 2002). Zellen mit hohen endogenen CLIM Konzentrationen (z.B. bei den  $\alpha$ T3-Zellen) enthielten niedrige endogene RLIM Proteinmengen und Zellen mit niedrigen

CLIM Konzentrationen (z.B. CHO-Zellen) wiesen hohe RLIM Proteinmengen auf. Meine Analysen in transfizierten Zellen zeigten, dass es durch RLIM Transfektion zu einem signifikanten Rückgang der CLIM Proteinkonzentrationen im Zellkern kam. Bestätigt werden konnte dieser Abbau auch mittels Transfektionen der dominant-negativen RLIM Konstrukte (RLIM $\Delta$ 9as, RLIM $\Delta$ 9RING). Dadurch, dass die Ubiquitinaktivität fehlte, wurde der Abbau der CLIM Proteine verhindert, und als Konsequenz stieg die endogene CLIM Proteinkonzentration. Erklärt wird der molekulare Mechanismus dieser dominant negativen Konstrukte mit der Überexpression des RINGfinger deletierten Proteins die für eine Ubiquitinierung notwendigen E2-Enzyme weg kompetieren kann (Pickart, 2001). Als Resultat sollte es zu einer starken Anreicherung der nun nicht mehr ubiquitinierten Proteine kommen. Mit dieser Vermutung stimmten die unter 3.5.1.1 und 3.5.2.1 beschriebenen Versuche überein. Weitere Hinweise auf einen CLIM-Abbau vermittelt durch RLIM ergaben sich durch die Benutzung der RNAi Technik. Nach einer Inhibierung der endogenen RLIM Proteinsynthese durch die Transfektion einer RLIM spezifischen siRNA konnten auf zellulärer Ebene und in einer Westernblotanalyse erhöhte endogene CLIM Proteinkonzentrationen gefunden werden (siehe 3.5.1.2).

Diese Ergebnisse lassen keinen Zweifel daran, dass RLIM eine zentrale Rolle beim Abbau der CLIM Kofaktoren spielt.

Kürzlich konnten meine Experimente zum CLIM-Abbau, der durch RLIM induziert wird, in einem anderen unabhängigen System bestätigt werden. Die Arbeitsgruppe um Masanori Taira konnte die Verbindung von XLim-1 und seinem positiven Regulator CLIM2 (auch bekannt als Ldb1, NLI) zu dem RING Finger Protein XRnf12 (*Xenopus* Ortholog von *Rnf12*/RLIM) während der frühen *Xenopus*-Entwicklung aufzeigen (Hiratani et al., 2003). Dabei wurde aufgedeckt, dass während der frühen *Xenopus*-Entwicklung das korrekte stöchiometrische Verhältnis von XLim-1 zu dessen Koaktivator CLIM2 wichtig für die Funktionen des Spemann-Organisationszentrums ist. Eine Störung dieses stöchiometrischen Gleichgewichts, z.B. durch ein Übergewicht von CLIM2, unterdrückt die stimulierende biologische Aktivität des XLim-1/CLIM2-Komplexes. XRnf12 besitzt ebenfalls eine Ubiquitinligaseaktivität und hält durch die

Markierung von CLIM2 zum proteasomabhängigen Abbau das XLim-1/CLIM2-Verhältnis im Gleichgewicht (Hiratani et al., 2003).

Zur weiteren Aufklärung der Rolle von RLIM und CLIM zueinander werden in unserer Arbeitsgruppe RLIM Knockout-Mäuse generiert. Ein konditionaler RLIM-Knockout bietet die Möglichkeit, das Fehlen von RLIM nur in bestimmten Zelltypen zu untersuchen. Hierbei könnte dann die Beziehung von CLIM und RLIM zueinander in Bezug auf spezielle Zelltypen und zu bestimmten Zeitpunkten in der embryonalen Entwicklung näher aufgeklärt werden.

Die Spezifität des Abbaus von CLIM gegenüber RLIM wird dadurch bestätigt, dass Rnf6 Transfektionen keine Auswirkungen auf die CLIM Proteinmengen hatten (siehe 3.5.2). Rnf6 ist zwar *in vitro* in der Lage, mit CLIM zu interagieren und es zu ubiquitinieren, aber auf Zellebene scheinen die CLIM Kofaktoren keine Zielmoleküle von Rnf6 zu sein. Dafür sprechen ebenfalls die Lokalisationsstudien unter 3.6.1, da Rnf6 vorrangig im Cytoplasma und die CLIM Kofaktoren im Nukleus lokalisiert sind. Dennoch waren durch die Überexpressionseffekte nach einer Rnf6 Transfektion einige Zellen sichtbar, die große Rnf6 Mengen im Zellkern zeigten (siehe 3.6.2). Doch auch diese Zellen wiesen keine Änderung der CLIM Proteinmengen auf. Die hier vorliegenden Daten sprechen somit für eine unterschiedliche Spezifität der Ubiquitinligasen, bei denen es zwar zur Ubiquitinierung durch Rnf6 kommt, aber nicht zum Abbau (siehe auch weiter unten 4.6).

#### **4.5.2 Ist LIMK ein *in vivo* Zielmolekül von Rnf6?**

Meine Untersuchungen haben gezeigt, dass CLIM Proteine zwar durch Rnf6 ubiquitiniert, nicht aber dem Abbau zugeführt werden (Abb. 3-14). Ferner konnte beobachtet werden, dass Rnf6 überwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist (siehe 3.6.1). Demnach blieb die Frage, welche Zielproteine Rnf6 *in vivo* besitzen könnte. Ein geeigneter cytoplasmatischer Kandidat unter den LIM-Proteinen schien die LIM-Kinase 1 zu sein, von der eine Interaktion mit RLIM bekannt war (Bach et al., 1995). In parallel laufenden Versuchen (siehe 3.4) meiner Kollegin Anne Schlüter konnte gezeigt werden, dass Rnf6, neben RLIM, in der Lage war, LIMK1 *in vitro* zu ubiquitinieren. Diese Ergebnisse hatten mich veranlasst, nach einem Abbau der LIMK1 durch Rnf6 zu sehen. In der Tat konnte gezeigt



werden, dass Rnf6 bei einem endogenen LIMK1 Abbau eine Rolle spielt (siehe 3.5.2.1). Für diesen Befund spricht, dass nach einer Überexpression der DN-Form (Rnf6 $\Delta$ RING) erhöhte LIMK1 Proteinmengen detektiert werden konnten (Abb. 3-15). Es kommt demnach durch die Rnf6 vermittelte Polyubiquitinierung zu einem Abbau endogener LIMK1 auf zellulärer Ebene. Weitere Daten aus unserer Arbeitsgruppe sprechen ebenfalls für eine Regulation der LIMK1 durch Rnf6. Mein Kollege Baris Tursun war in der Lage, eine Kolokalisation von Rnf6 und LIMK1 während der Mausembryogenese zu zeigen. Am Embryonaltag 12,5 der Maus zeigten Rnf6 und LIMK1 ein klar überlappendes Expressionsmuster im Neuralrohr der Maus sowie in axonalen Projektionen. Ebenso konnte eine Koexpression im Cytoplasma von primären hippocampalen Neuronen der Maus und in deren neuronalen Projektionen gefunden werden (Daten von Michaela Schweizer). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die LIMK1 ein *in vivo* Zielsubstrat von Rnf6 darstellt.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der erhöhten LIMK1 Proteinkonzentration, induziert durch Rnf6, und dem Aktincytoskelett konnten bisher nicht gefunden werden. Wie in der Einleitung beschrieben, bilden sich als Konsequenz einer Inaktivierung von Cofilin durch LIMK1 Phosphorylierung vermehrt Aktinstressfasern. Meine Daten zeigten allerdings keine Akkumulation von Aktin in den Rnf6-transfizierten Zellen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass zur Detektion einer vermehrten Aktinproduktion eine aktivierte LIMK vorhanden sein müsste. In weiteren Versuchen wäre es interessant zu testen, ob ein Effekt auf die Aktinproduktion in Experimenten mit einer aktivierten LIMK1 zu beobachten wäre. Diese könnten durch Stimulation über den ROCK (Ohashi et al., 2000) und/oder PAK1 (Edwards et al., 1999) Weg (siehe auch Abb. 2-4) erreicht werden oder durch Kotransfektion mit einer konstitutiv aktivierten LIMK1 (Roovers et al., 2003).

Neben den Funktionen der LIMK1 im Cytoplasma konnte in jüngerer Zeit auch eine nukleäre Lokalisation der LIMK1 gefunden werden. Im Zellkern sorgt LIMK1 für eine Aktivierung von Cyclin D (Roovers et al., 2003). Wir konnten zwar eine Interaktion mit nukleärem RLIM *in vitro* zeigen, aber eine Regulation durch RLIM im Zellkern konnte nicht beobachtet werden. Weder im Cytoplasma, noch im Zellkern wurden Änderungen

der LIMK1 Konzentrationen durch RLIM beobachtet (3.5.2.1). Dies bestätigt ebenfalls, dass LIMK1 kein *in vivo* Zielsubstrat von RLIM zu sein scheint.

### 4.5.3 HDAC2 – ein weiteres *in vivo* Substrat von RLIM ?

Wie oben erwähnt war bekannt, dass RLIM mit dem HDAC-Korepressorkomplex interagiert. In parallel laufenden Versuchen der Arbeitsgruppe T.Heinzel in Frankfurt wurde nach einer Ubiquitinligase für das Protein HDAC2 gesucht. Es konnte einerseits gezeigt werden, dass RLIM spezifisch mit HDAC2 interagiert (Kramer et al., 2003) und nicht mit anderen Histondeacetylasen (HDAC1 oder 3); andererseits, dass RLIM HDAC2 ubiquitinieren kann. Nachfolgende Transfektionen konnten zeigen, dass es nur durch RLIM zu einem HDAC2-Abbau kam, nicht durch Rnf6 (siehe Abb. 3-31 und unveröffentlichte Daten). Somit wurde ein weiteres nukleäres Zielprotein von RLIM identifiziert, auf welches Rnf6 keinen Einfluss hat.

## 4.6 Substratspezifität der Ubiquitinligasen

Für die Ubiquitinligasen RLIM und Rnf6 konnten mehrere Substratproteine in *in vitro* Ubiquitinierungsexperimenten gefunden werden. Neben der Möglichkeit sich selbst zu ubiquitinieren und somit für den proteolytischen Abbau im 26S Proteasom zu markieren (Ostendorff et al., 2002), konnten CLIM und LMO (siehe 3.4.2), sowie die LIMK (persönliche Mitteilung A.Schlüter) als Substratproteine für eine Ubiquitinierung durch RLIM bzw. Rnf6 aufgezeigt werden.

Eine von RLIM und Rnf6 vermittelte Ubiquitinierung kann auf zwei unterschiedlichen Ebenen eine Spezifität erlangen. Erstens gibt es Spezifität innerhalb der Ubiquitinkaskade. Einer weitaus geringeren Anzahl von E2-Enzymen (50 E2-Enzyme bei dem Menschen) steht die große Anzahl der E3-Enzyme gegenüber (eine genaue Anzahl ist schwer abzuschätzen, spekuliert werden mehrere Hundert Ubiquitinligasen, (Pickart, 2004)). Diese Art von Spezifität ist bei den untersuchten Ubiquitinligasen RLIM bzw. Rnf6 nicht von Bedeutung, da beide das gleiche E2-konjugierende Enzym Ubc8 benutzen (Ostendorff et al., 2002). Zweitens gibt es eine Substratspezifität der E3-Enzyme, hier von RLIM und Rnf6. Nicht alle Proteine, mit denen E3-Enzyme wechselwirken, werden

als Substratproteine benutzt (Pickart, 2004). Dies ist ebenfalls für RLIM und Rnf6 der Fall, da andere Proteine des LIM-Systems, außer den oben genannten (CLIM, LMO und LIMK), nicht effektiv ubiquitiniert werden konnten (Ostendorff et al., 2002). Dieses verdeutlicht, dass RLIM und Rnf6 nicht alle Proteine ubiquitinieren, an die sie binden können. Es muss somit noch einen zusätzlichen, bisher nicht näher bekannten Mechanismus geben, der die Ligase Aktivität steuert. Übereinstimmend mit anderen gefundenen Daten verdeutlicht dies, dass jedes E3 Enzym nur mit einer bestimmten Anzahl von Substraten und mit nur wenigen E2 Enzymen wechselwirkt.

Meine Analysen zum *in vivo* Abbau zeigten eindeutig die unterschiedliche Spezifität der Ubiquitinligasen gegenüber dem Abbau der verschiedenen Substratmoleküle. Trotz ähnlicher *in vitro* Ubiquitinierungsmuster wurden nur durch RLIM die CLIM und HDAC2 Proteine, sowie nur durch Rnf6 die LIMK1 zum Abbau markiert. Diese Ergebnisse sprechen klar für die unterschiedliche Spezifität von RLIM und Rnf6. Wie lassen sich die unterschiedlichen Spezifitäten erklären? Einerseits könnten K63-verknüpfte Ubiquitinierung durch Rnf6 im Fall von CLIM sowie HDAC2, und RLIM im Fall der LIMK1, ausgelöst werden, welche nicht zum Abbau durch das Proteasom führen (siehe Einleitung 2.3). Andererseits wird wahrscheinlich die unterschiedliche Lokalisation der Ubiquitinligasen eine entscheidende Rolle spielen (siehe 4.4). Für das nukleäre RLIM konnten zwei nukleäre Substratmoleküle, für das cytoplasmatische Rnf6 ein Substratmolekül im Cytoplasma identifiziert werden. Dies spricht ebenfalls dafür, dass die regulatorischen Funktionen zumindest auf Proteinabbauebene durch Ubiquitinierungen von RLIM im Zellkern und die von Rnf6 im Cytoplasma ausgeübt werden.

Wie oben erwähnt konnte ein ähnlicher Fall kürzlich für p53 beschrieben werden, bei dem es nur in einem Zellkompartiment zum Abbau von p53 kommt (O'Keefe et al., 2003). Aber auch posttranslationale Modifikationen der Ubiquitinligasen RLIM und Rnf6 könnten die Eigenschaften bezüglich der Substratspezifität ändern. In der Literatur ist ein Beispiel für eine Substratspezifität durch posttranslationale Modifikationen bezüglich Mdm2 und deren Ubiquitinierungseigenschaften beschrieben worden. Die Spezifität, mit der Mdm2 p53 und sich selbst ubiquitiniert, ist zum Teil abhängig von der RINGfinger

Domäne. Durch Ersetzen dieser Domäne mit einem heterologen RINGfinger kommt es zwar weiterhin zu einer Autoubiquitinierung, aber nicht mehr zu einer Ubiquitinierung von p53 (Fang et al., 2000; Meek and Knippschild, 2003). Die Balance zwischen der Autoubiquitinierung und einer Substratubiquitinierung wird reguliert durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Sumoylierung und Phosphorylierung. Eine Mdm2 Sumoylierung führt zu einer Änderung des Gleichgewichts hin zu vermehrter p53 Ubiquitinierung und minimierter Autoubiquitinierung. Phosphorylierung am Serin 395 hingegen vermindert einen p53 Abbau. Diskutiert wird ebenfalls eine Acetylierung eines Lysinrests mit der Folge einer Erniedrigung der E3 Aktivität.

Es wäre interessant zu untersuchen, ob eine ähnliche Regulation bezüglich der Ubiquitinligaseeigenschaften bei RLIM oder Rnf6 vorkommt. Erste Hinweise ergaben sich, da RLIM an mehreren Stellen des Proteins phosphoryliert wird (persönliche Mitteilung von Steven Johnsen) und dies nicht nur an dem oben erwähnten NLS. Ein erster Versuch eine Acetylierung von RLIM nachzuweisen, ist leider nicht erfolgreich gewesen. Weiterführende Untersuchungen sollten einige Hinweise liefern, wie die Ubiquitinligaseaktivität und deren Spezifität von RLIM oder Rnf6 reguliert werden kann.

#### **4.7 Abbau von RLIM durch TSA**

HDAC Inhibitoren werden als potentielle Medikamente in der Krebstherapie angesehen (Kramer et al., 2001; Marks et al., 2001; Melnick and Licht, 2002), da sie in der Lage sind, den durch HDAC Komplexbildung ausgelösten Effekt der transkriptionellen Inhibierung wieder aufzuheben. Während der Analysen unterschiedlicher HDAC-Inhibitoren auf die HDAC2 Expression und deren Auswirkungen wurden auch Effekte auf eine RLIM Expression sichtbar.

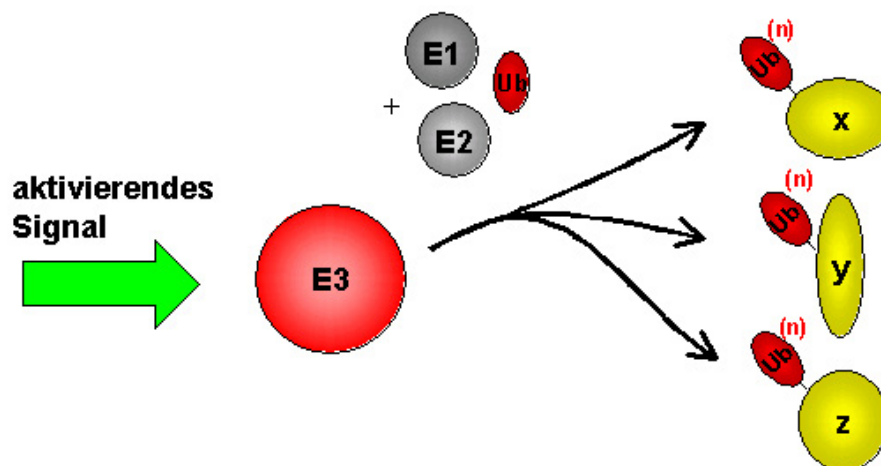
Eine Analyse der RLIM Expression in Zellkultur mit den HDAC Inhibitoren VPA und TSA zeigte unterschiedliche Auswirkungen auf die RLIM Expression. VPA konnte die RLIM Expression nicht beeinflussen, hingegen konnte TSA die RLIM Proteinmengen reduzieren (siehe 3.9). Dieser Effekt trat erst mit einiger Verzögerung nach Beginn der Inkubation mit TSA auf (siehe 3.9). Da die Mengen der RLIM Transkripte nicht verändert wurden, beeinflusst eine TSA Inkubation also entweder die RLIM Synthese

oder die RLIM Stabilität. In parallel durchgeführten Experimenten von O. Krämer konnte gezeigt werden, dass ein Proteasominhibitor diesen TSA-Effekt aufhebt. Somit ist TSA im Gegensatz zu VPA in der Lage, einen proteasomalen RLIM-Abbau zu induzieren. Für einen proteasomal abhängigen Abbau von RLIM spricht auch, dass RLIM polyubiquitiniert werden kann (siehe Ergebnisse 3.4.1). Unbekannt bleibt der Mechanismus, wie es zu einer RLIM Degradation durch TSA kommen kann, und ob dieser Effekt mit der HDAC Inhibitionsaktivität von TSA verknüpft ist. Da aber der RLIM Proteinrückgang mehrere Stunden nach einer TSA Behandlung der Zellen erfolgte (Abb. 3-33), ist eine Induktion intermediärer Genprodukte wahrscheinlich. Eine Erklärung wäre eine Induktion einer noch unbekanntem Ubiquitin-Konjugase oder Ligase, die für einen RLIM Abbau notwendig ist. Im Gegensatz zu vielen anderen HDAC Inhibitoren inhibiert VPA vorzugsweise die Klasse 1 der HDACs. Dies könnte eine Erklärung für das Fehlen eines Effekts von VPA auf RLIM geben, da es möglich wäre, dass eine Induktion dieses unbekanntem Ubiquitinenzyms abhängig von einer Inhibition der Klasse 2 der HDACs sein könnte. Eine andere Erklärung wäre, dass die Stabilität von RLIM ein HDAC Klasse 2 abhängiger Effekt ist. Dieses erscheint aber eher unwahrscheinlich, da gefunden wurde, dass eine Acetylierung z.B. p53 vor einem Abbau schützt. Ein umgekehrter Fall, dass als Folge einer HDAC Inhibition eine verstärkte Acetylierung zum Abbau eines Proteins führt, ist nicht bekannt. Eine weitere Möglichkeit wäre ein zugegebenermaßen komplexes Modell, welches den RLIM Abbau zusammen als Komplex mit seinem HDAC Substrat stellt. Ein HDAC Inhibitor, gebunden an HDAC2, könnte eine Konformationsänderung bewirken, die die Abbauanfälligkeit von RLIM ändert. Diese Experimente zeigen, dass die Stabilität von RLIM durch Medikamente beeinflusst werden kann. Da im Tiermodell eine Inhibition des Tumorwachstums durch TSA gezeigt worden ist (Marks et al., 2001), und TSA eine Wirkung auf RLIM besitzt, ist dies ein weiteres Indiz, dass RLIM eine Rolle bei Krebstumoren spielen könnte.

## 4.8 Ubiquitinligasen als Regulatorproteine im Zellkern

Im eukaryontischen Zellkern laufen viele unterschiedliche Prozesse parallel ab. Eine übergeordnete Regulation ist wegen der Vielzahl der nukleären Abläufe und Funktionen

erforderlich. Es wurde spekuliert, dass E3 Ubiquitinligasen Schlüsselpositionen bei der Koordinierung Zellkernfunktionen wahrnehmen (Bach and Ostendorff, 2003). In näherer Zukunft soll genauer untersucht werden, ob auch RLIM eine übergeordnete regulatorische Position innerhalb des nukleären Proteinnetzwerks einnimmt. Ein genereller regulatorischer Mechanismus könnte die Synchronisation oder Integration von nukleären Funktionen sein, hierbei ist für eine Kernantwort auf ein spezifisches Signal oft eine zeitgleiche Aktivierung bzw. Modifikation verschiedener Regulationswege notwendig. E3-Enzyme sind oft in der Lage, unterschiedliche Substrate zu ubiquitinieren, die ihrerseits verschiedene Stoffwechselwege regulieren. Dadurch dass die Ubiquitinligaseaktivität von E3 Enzymen oft induzierbar ist, z.B. durch Phosphorylierung, könnten diese Regulationswege somit synchronisiert werden.



**Abb. 4-1 Modell der Synchronisierung von zellulären Funktionen durch E3-Ubiquitin-Ligasen.**

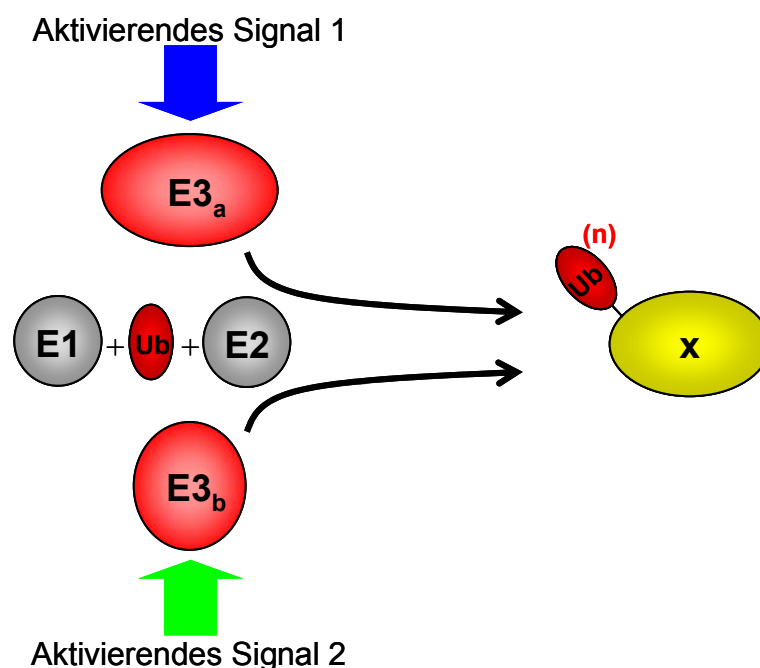
Eine einzige E3 Ubiquitinligase (rot) ist in der Lage nach einem aktivierenden Signal (grüner Pfeil) verschiedenartige Substratproteine (x, y und z in gelb) zu markieren, um auf diese Weise unterschiedliche Regulationsprozesse in der Gegenwart von Ubiquitin (Ub in rot) und den E1- und E2-Enzymen (grau) zu synchronisieren. Die schwarzen Pfeile stellen die Ubiquitinierungsaktivitäten des E3-Enzyms dar.

Ein Beispiel ist das E3-Enzym SIAH1 (Seven In Absentia Homologue), für das Substrate in verschiedenen Signalwegen gefunden wurden. Zu diesen Zielproteinen gehören Substrate mit unterschiedlichen Aufgaben bei der Regulation von Proteinnetzwerken, wie die beiden Transkriptionsfaktoren c-Myb (Tanikawa et al., 2000) und  $\beta$ -Catenin (Liu et al., 2001; Matsuzawa and Reed, 2001) sowie der transkriptionelle Koaktivator OBF-1/BOB1 (Boehm et al., 2001; Tiedt et al., 2001), der transkriptionelle Repressor TIEG1 (Johnsen et

al., 2002) und das Membranprotein Numb (Susini et al., 2001). Somit ist SIAH1 in der Lage, regulatorisch in unterschiedliche zelluläre Prozesse einzugreifen, und auf diese Weise die verschiedenen Wege weiter stromabwärts zu synchronisieren.

RLIM ist ebenfalls in der Lage, regulatorisch in verschiedene Systeme einzugreifen, und ist deshalb auch ein Kandidat für die Synchronisation von nukleären Funktionen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CLIM durch die von RLIM vermittelte Polyubiquitinierung dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (siehe 3.5.1), dass LMO-Proteine durch RLIM monoubiquitiniert werden (siehe 3.4.2) und dass der Histon-regulierende HDAC2-Komplex durch RLIM dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (siehe 3.9).

E3 Ubiquitinligasen können auch bei der Integration bzw. bei der Zusammenführung von unterschiedlichen Regulationsprozessen eine wichtige Rolle spielen. Ein spezifisches Proteinsubstrat kann dabei von zwei oder mehreren E3 Ligasen markiert werden und somit werden verschiedene E3 vermittelte Regulationsprozesse zusammengeführt.



**Abb. 4-2 Modell der Integration von verschiedenen zellulären Prozessen durch E3-Ubiquitin-Ligasen.**

Ein Substrat (x in gelb) kann von unterschiedlichen E3-Ubiquitin-Ligasen (rot) in der Gegenwart von Ubiquitin (Ub in rot) sowie E1- und E2-Enzymen (grau) markiert werden, um so verschiedene E3-vermittelte Regulationsprozesse zusammenzuführen. Die schwarzen Pfeile stellen die Ubiquitinierungsaktivitäten des E3-Enzyms dar. Die aktivierenden Signale der E3-Enzyme sind als grüner und blauer Pfeil dargestellt.

Die mit RLIM eng verwandte und vorwiegend im Cytoplasma lokalisierte Ubiquitinligase Rnf6 könnte einen Integrationspartner von RLIM darstellen, zumal mit dem Kofaktor CLIM ein gemeinsames Substrat für die beiden E3-Ligasen identifiziert werden konnte. Ein weiterer wichtiger Aspekt des Zusammenwirkens dieser beiden Integrationspartner ist die Möglichkeit der kompartmentübergreifenden, zellulären Regulation. Da RLIM vorwiegend im Zellkern und Rnf6 überwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist, könnten durch die Modifikation des gemeinsamen Substratproteins die Antworten der unterschiedlichen zellulären Kompartimente zusammengeführt werden.

Zur Klärung der Frage nach einer möglichen Stellung von RLIM bei der Regulation von nukleären Prozessen müssen in der Zukunft noch weitere Experimente durchgeführt werden, wie z.B. die Suche nach aktivierenden Signalwegen und deren Auswirkungen auf RLIM. Derzeit liegen erste Hinweise auf eine RLIM Phosphorylierung vor, welche eine Aktivitätsänderung hervorrufen könnte.

#### **4.9 LIM-Proteinnetzwerk und menschliche Erkrankungen**

Innerhalb des LIM-Systems sind eine Reihe von Proteinen beschrieben worden, von denen etliche Auswirkungen auf unterschiedliche menschliche Krankheiten besitzen. In erster Linie sind die Onkoproteine LMO1 und LMO2 zu nennen. Sie wurden aufgrund ihres Vorkommens in Translokationsbruchstellen bei Patienten mit T-Zell-Leukämie entdeckt. Dies führte zu einer fehlerhaften Expression der LMO-Proteine durch die eine Leukämie hervorgerufen wurde (Rabbitts, 1998). LMO4 wurde auch in einem Zusammenhang mit Brustkrebs gebracht, da es in über 50 % der Brustkrebszelllinien zu einer LMO4-Überexpression kam (Visvader et al., 2001). Auch die LIMK wurde in Zusammenhang mit verschiedenen menschlichen Erkrankungen gebracht. Zu nennen ist hierbei in erster Linie das Williamssyndrom, ein Erbkrankheit, bei der das Krankheitsbild mit erniedrigtem Intelligenzquotienten und einer eingeschränkten räumlichen Kognition einhergeht (OMIM Datenbank unter [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).) Neuere Daten deuten auf eine Rolle der LIMK bei der Regulation der Tumorzellinvasion (Yoshioka et al., 2003). Auch RLIM ist wahrscheinlich bei der Tumorentstehung involviert. Bei Patienten mit Nierenzellkarzinom wurde eine abnormale RLIM Expression gefunden (Scanlan et al.,



1999). Ferner wurden in Oesophaguskarzinom-Zelllinien Mutationen im Rnf6-Gen gefunden (Lo et al., 2002). Neueste Daten unseres Labors zeigen, dass sowohl in Brustkrebszelllinien als auch in Patienten mit invasivem Brustkarzinom RLIM spezifisch in den Tumorzellen stark überexprimiert ist.

Die Aufdeckung der Regulationsmechanismen des LIM-Proteinnetzwerks durch RLIM und Rnf6 ist nicht nur aufschlussreich in Bezug zur Organentwicklung, Zelldifferenzierungen und den damit zusammenhängenden molekularen Ursachen, sondern steuert auch einen Beitrag für die Tumorentstehung bei und könnte möglicherweise bei der Entwicklung neuer Krebstherapien helfen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen

Laborchemikalien und molekularbiologischen Reagenzien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem, Darmstadt; Amersham Pharmacia, Freiburg; Clontech, Palo Alto (USA); Gibco-BRL Life Technologies, Eggenstein; Invitrogen, Karlsruhe; MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Merck, Darmstadt; Qiagen, Hilden; Roth, Karlsruhe; Schleicher & Schüll, Dassel; Sigma, München; Stratagene, La Jolla (USA) und Whatman, Maidstone (USA) bezogen.

#### 5.1.2 Spezielle Chemikalien und Hilfsmittel sind im Folgenden aufgeführt:

Biomax MR und X-Omat Blue XB-1	Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA
Hyperfilm <sup>TM</sup> ECL	Amersham-Pharmacia, GB
L- <sup>35</sup> S-Methionin	Amersham-Pharmacia, GB
$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dCTP	Amersham-Pharmacia, GB
$\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]-dATP	Amersham-Pharmacia, GB
Zellkulturschalen und Pipetten	Renner GmbH, Dannstadt
LMB	Geschenk von M.Yoshida

### 5.1.3 Liste der gebräuchlichen Medien und Lösungen

DNA-Probenpuffer (6x)	40 % Sucrose; 0.25 % O-Bromphenolblau; 0.25 % Xylen-Cyanolblau
Laemmli Probenpuffer (3x)	360 mM Tris-HCl (pH 6.8); 6 % SDS; 30 % Glycerol; 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol; 0.05 % O-Bromphenolblau
Laemmli Stop Puffer(2x)	62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8; 2 % SDS; 10 % Glycerol; 100 mM DTT; 0,001% Bromphenolblau
LB(Luria-Bertani)-Medium	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 0,5 % NaCl
PBS-Puffer	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 und 0,1 % Tween 20
SDS-PAGE-Lauf-Puffer	25 mM Tris-HCL; 190 mM Glycerol; 0.1 % SDS (pH 8.3)
TBE-Puffer	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2.5 mM EDTA; pH 8.3
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 0.1 mM EDTA (pH 8.0)
NETN-Puffer	0,5% NP 40; 20 mM Tris pH8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% Glycerol ; frisch dazugeben 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1x PIC
Western-Blot-Transfer-Puffer	50 mM Tris (pH8); 380 mM Glycin; 0.1 % SDS; 20 % Methanol

### 5.1.4 Bakterienstämme

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ IQ (Gibco-BRL)

Hanahan, 1983

BL21 (New England Biolabs)

Studier und Mofatt, 1986

### 5.1.5 Vektoren

pCR 2.1 TOPO-TA; (Klonierungsvektor, Invitrogen)

pCS2; (eukaryontischer Expressionsvektor, Roth et al., 1991)

pCS2 + MT; (Myc-Epitop beinhaltender eukaryontischer Expressionsvektor, Roth et al., 1991)

pCS2 + NLS + MT; (Myc-Epitop und NLS beinhaltender eukaryontischer Expressionsvektor, Roth et al., 1991)

pGEX-KGK, pGEX-KG, pGEX-AHK; (bakterieller Expressionsvektor, c-terminaler GST-Fusionsvektor, M.G. Rosenfeld)

pcDNA3; (eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen)

pEGFP-C3; (GFP-Fusionsvektor, Clontech)

pGL2-Basic Vector; (Luziferase Vektor, Promega)

### 5.1.6 Zelllinien

HEK293T-Zellen; Humane Embryonale Nierenzellen, SV Antigen fehlt (Pierce, Rockford, USA)

HEK293-Zellen; Humane Embryonale Nierenzellen

CHO-Zellen; „Chinese Hamster Ovary Zellen“

$\alpha$ T3-Zellen; gonadotrope Hypophyse Linie (P.Mellon)

HeLa-Zellen; Humane Cervix Karziomzellen

### 5.1.7 Oligonukleotide

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

## 5.1.8 Antikörper

### 5.1.8.1 Primäre Antikörper

Antikörper gegen	Herkunftspezies	Eingesetzte Verdünnung	Bezugsquelle
Aktin	polyklonal, Kaninchen	1:5000	Santa Cruz
anti-HA.11	monoklonaler, Maus	1:1000	BAbCO
CLIM	polyklonal, Kaninchen	1:3000	Ostendorff, 2002
c-myc	polyklonal, Kaninchen	1:1000	Santa Cruz (sc-789)
HDAC2	polyklonal, Kaninchen	1:200	Santa Cruz
RLIM	polyklonal, Meerschweinchen	1:5000	Ostendorff, 2002
RLIM	polyklonal, Kaninchen	1:3000	Ostendorff, 2002
Rnf6	polyklonal, Meerschweinchen	1:200	Schlüter, 2003
Tubulin	monoklonal, Maus	1:25000	Sigma

### 5.1.8.2 Sekundäre Antikörper und HRP-Portein A

Antikörper gegen	Herkunftspezies	Eingesetzte Verdünnung	Bezugsquelle
Alexa488-anti-Kaninchen	Ziege	1:1000	MoBiTec
Alexa488-anti-Meerschweinchen	Ziege	1:1000	Vector Alexis
Cy3-anti-Kaninchen	Ziege	1:1000	Jackson Laboratories
Cy3-anti-Maus	Ziege	1:1000	Dianova
Myc-FITC	Maus	1:1000	Santa Cruz
HRP-Protein A	Ziege	1:3000 - 1:5000	Bio-Rad

### 5.1.9 Zellkulturmedien

#### HeLa, HEK 293, HEK 293T, $\alpha$ T3-Zellen

- 500 ml Dulbecco's MEM (high glucose) mit Glutamax-I, 4500 mg/ Glukose,  
(Gibco-BRL)
- 55 ml Fötale Kälberserum (FCS, inaktiviert bei 65°C für 30 min; Gibco-BRL);  
5 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung
- 5,5 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin/ 10000  $\mu$ g/ml  
Streptomycin, Gibco-BRL)

#### CHO

- 500 ml HAM's F12 (Gibco-BRL)
- 55 ml Fötale Kälberserum (FCS, inaktiviert bei 65°C für 30 min; Gibco-BRL);  
5 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung
- 5,5 ml Penicillin-/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin/ 10000  $\mu$ g/ml  
Streptomycin, Gibco-BRL)

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Arbeiten mit DNA und RNA

#### 5.2.1.1 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 1 min bei 14.000 Upm (Eppendorf Tischzentrifuge, 5417) sedimentiert. Die Zellen wurden danach in 200 $\mu$ l Lösung 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100  $\mu$ g/ml RNaseA) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 200  $\mu$ l Lösung 2 (200 mM NaOH; 1% SDS) dazugegeben, vermischt und bis zu 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Lösung 3 (2,8 M Kaliumacetat, pH 5,1) wurde abermals gemischt. Zwecks Proteinfällung wurde 10 min bei 4°C inkubiert und 30 min 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Isopropanol versetzt.

Nach 30 minütiger Zentrifugation, anschließendem Waschen des Niederschlages mit 70 % Ethanol und 5 minütiger Trocknung wurde das Pellet in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Von diesem Ansatz wurden 5 µl für Restriktionsanalysen und 2,5 µl für Sequenzanalysen eingesetzt.

#### **5.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (Maxi-Präparation)**

Die Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde mit Plasmid „Maxi-Präparations-Systemen der Firmen Qiagen, Gibco-BRL oder Machery-Nagel durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen einer 200 ml- bzw. 150 ml-Übernachtskultur benötigt. Die Zellen wurden zuerst bei 6000 U<sub>pm</sub> für 15 min bei 4°C (Beckman J2-21 M/E Zentrifuge, JA 10-Rotor) abzentrifugiert. Die Plasmide wurden anschließend nach den Angaben der Hersteller isoliert.

#### **5.2.1.3 Phenol-/Chloroform-Extraktion**

Die Phenolisierung ist die Standard-Extraktionsmethode, um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen (Sambrook et al., 1989). Phenol dissoziiert Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten, während Chloroform Proteine denaturiert und die Phasentrennung erleichtert.

Hierfür wurden DNA-haltige Lösungen mit dem gleichen Volumen eines wassergesättigten Phenol-/Chloroform-Gemisches (1:1; w/v) versetzt, gut gemischt und zur Phasentrennung bei 14000 x g für 10 min zentrifugiert. Aus der oberen wässrigen Phase wurde durch Ausschütteln mit je einem Volumen Chloroform die restliche Phenollösung entfernt und bei 14000 x g für 5 min zentrifugiert. Die obere DNA-enthaltende Phase wurde abgenommen und die DNA anschließend durch eine Ethanolfällung ausgefällt.

#### **5.2.1.4 Ethanolfällung**

Nukleinsäuren können durch Zugabe von 2 Volumen 96 %igem Ethanol gefällt werden, da auf diese Weise den Nukleinsäuren die Hydrathülle entzogen wird (Sambrook et al., 1989). Die Zugabe von monovalenten Kationen, Na<sup>+</sup> auf 0.3 M Endkonzentration als Acetat, ändert selektiv die Löslichkeit der DNA und erhöht dadurch die Effizienz der Ethanolfällung.

Durch Zugabe von 0.1 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,4) und 2 Volumen Ethanol wurde die DNA 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefällt. Danach wurde das DNA-Präzipitat für 10 min bei  $14000\times g$  abzentrifugiert und anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem gewählten kleinen Volumen 1x TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **5.2.1.5 Dephosphorylierungen von 5'-Enden**

Eine Religation von Vektoren kann durch die Entfernung der Phosphatgruppen am 5'-Ende mit Hilfe von alkalischen Phosphatasen verhindert werden. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  alkalischer Phosphatase (1 U/ $\mu\text{l}$ ; MBI-Fermentas) und 10x AP-Puffer wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  die betreffende DNA für 1 h inkubiert. Es folgte eine Inaktivierung der Phosphatase bei  $85^{\circ}\text{C}$  für 15 min. Zur DNA-Reinigung wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion mit Ethanol-fällung verwendet. Das gewaschene und getrocknete Pellet wurde in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **5.2.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten mit Whatman DE81-Papier**

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das DNA enthaltende Fragment herausgeschnitten, in ein Agarosegel überführt und unter UV-Licht unterhalb des DNA-Fragmentes ein Stück DE81-Papier eingesetzt. Danach wurde die Elektrophorese fortgesetzt bis das DNA-Fragment vollständig an das Papier gebunden war. Das Papier wurde entnommen in ein PCR-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, welches durchstoichen worden war. Es folgte eine 1 min Zentrifugation  $14000 \text{ Upm}$ . Die DNA wurde durch dreimaliges Waschen mit je 100  $\mu\text{l}$  Hochsalzpuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 M LiCl; 20 % Ethanol) mit nachfolgender Inkubation für 5 min und Zentrifugation vom Papier eluiert. Das Eluat wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung aufgereinigt.

#### **5.2.1.7 Hybridisierung von Synthetischen Oligonukleotiden**

Je 2-5  $\mu\text{g}$  der beiden komplementären Oligonukleotid-Einzelstränge wurden in 50  $\mu\text{l}$  0,1 M KCl aufgenommen und vereinigt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung wurden die hybridisierten Oligonukleotide aufgereinigt.



### 5.2.1.8 Radioaktive End-Markierung von DNA

Der Transfer eines  $\gamma$ -Phosphates von ATP an das 5'-Ende der DNA wird durch die Polynukleotidkinase katalysiert. 50 ng DNA wurde mit 5  $\mu$ l  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP nach Angabe des Herstellers mit 2  $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase für 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Isolierung der radioaktiv markierten DNA.

### 5.2.1.9 Radioaktive Markierung von RNA

Zur radioaktiven Markierung von einzelsträngiger RNA wurde der Riboprobe Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 5.2.1.10 Isolierung radioaktiv markierter DNA

Für die Abtrennung der nach der radioaktiven Markierung nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide wurden die Mini Quick Spin Columns der Firma Boehringer, Mannheim verwendet. Die Sephadexgelfiltrationssäulen wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die gesamte Reaktion einer radioaktiven Markierung wurde jeweils auf eine Säule gegeben und mit 4000 x g für 4 min durch die Matrix gepresst. Die markierte und somit aufgereingte DNA konnte anschließend bei -20°C gelagert werden.

### 5.2.1.11 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

DNA und RNA-Konzentrationen wurden photometrisch durch Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Ultrospec 3000, Pharmacia). Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNA das Absorptionsmaximum. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht etwa 50  $\mu$ g/ml für doppelsträngige DNA, sowie 20  $\mu$ g/ml für einzelsträngige DNA und 40  $\mu$ g/ml für RNA.

### 5.2.1.12 Restriktionsverdau

Restriktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l durchgeführt. Jedem Ansatz wurde der vom Hersteller für das jeweilige Enzym empfohlene Puffer zugefügt. Die Reaktionen wurde in der Regel mit 1-2 U Enzym/ $\mu$ g DNA verdaut und inkubierten 1 h - über Nacht bei 37°C. Durch Zugabe von Probenpuffer (bei anschließender Gelelektrophorese) oder durch enzyspezifische Hitzeinaktivierung (im Fall nachfolgender Manipulation der DNA mit weiteren Enzymen) wurden die Reaktionen gestoppt.

### 5.2.1.13 Elektrophorese in Agarosegelen

DNA Moleküle wurden in Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TBE gelöst (aufkochen) und Ethidiumbromid hinzugefügt (0,05 µl/ml). Die Konzentration der Agarose wurde entsprechend der Größe der DNA-Moleküle eingestellt (0,8-2 %). Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und bei etwa 10 V/cm Gellänge elektrophoretisch aufgetrennt.

Die DNA ist aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandert daher im elektrischen Feld zur Anode. Dabei wird die Geschwindigkeit durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Spannung beeinflusst. Je höher die gewählte Agarosekonzentration, desto geringer ist die Porengröße und damit die Wanderungsgeschwindigkeit. Kleinere DNA-Fragmente wurden daher bei höheren Agarosekonzentrationen aufgetrennt.

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

### 5.2.1.14 Elektrophorese in nativen Polyacrylamidgelen

Native Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zur Größentrennung von DNA-Fragmenten und zur Analyse von Protein-DNA oder Protein-RNA-Komplexen benutzt. Für DNA-Fragmente wurden 20 %, für Protein-DNA-Komplexe oder Protein-RNA-Komplexe 6 % Acrylamidkonzentrationen verwendet. Zur Herstellung eines 6 %igen Gels wurde 6 ml 30 %ige Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (29:1) und 3 ml 5x TBE mit ddH<sub>2</sub>O auf 30 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 10 µl TEMED und 400 µl 20 % APS in eine Vertikal-Gelapparatur gegossen. Die Polymerisationszeit betrug mindestens 30 min. Nach einem Gelvorlauf von 15 min wurden die Protein-DNA oder Protein-RNA-Komplexe in 0,5x TBE Puffer bei 120 V aufgetrennt. Eine Fixierung (50 % Methanol; 10 % Essigsäure) von 5-10 min, Trocknung und Dokumentation mit einem Röntgenfilm (bei -80°C) folgten.

#### **5.2.1.15 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Nach Auftrennen der DNA wurden die DNA enthaltenden Agarosestücke unter UV-Licht bei 260 nm ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des DNA-Gel-Extraktions-Kits (Genomics) nach Angabe des Herstellers aus der Agarose isoliert.

#### **5.2.1.16 Präparation von Vektoren**

Zur Herstellung linearer Vektor-DNA wurde der jeweilige Vektor mit einem oder einer Kombination von Restriktionsenzymen geschnitten. Zur Überprüfung der Vollständigkeit einer Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes auf ein Agarosegel geladen. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung des DNA-Gel-Extraktions-Kits (Genomics) isoliert. Zur Verhinderung einer Religation der Vektor-DNA, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert worden war, wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert.

#### **5.2.1.17 Klonierung von PCR-Fragmenten**

Amplifizierte PCR-Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend, wie 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, über Gelelektrophorese getrennt und isoliert werden 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, wurde 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, um im Folgenden eine leichtere Restriktion zu erreichen. Die *Taq*-Polymerase hängt einzelne Desoxyadenosinreste an die 3'-Enden von PCR-Produkten. Der linearisierte vorliegende TOPO-Vektor besitzt überhängende 3'-Thymidinreste, welches zum einen eine effiziente Ligation von PCR-Produkten erlaubt und zum anderen die Selbstligation von Vektor-DNA reduziert. Nach der Transformation und Vermehrung des Vektors in optimierten *E.coli*-Bakterien, konnten aus diesem Vektor die DNA-Fragmente herausgeschnitten und in andere Vektoren inkloniert werden.

### 5.2.1.18 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (Roche) benutzt. Standardmäßig wurde ein molares Vektor / Insert Verhältnis von 1 zu 3 benutzt. Die Ligation erfolgte üblicherweise mit 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase (1.5 U/ $\mu\text{l}$ ) bei 16°C über Nacht, teilweise wurde die Reaktion auch in 3 - 5 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Ligation wurden in einem möglichst kleinen Volumen (höchstens 15  $\mu\text{l}$ ) vorgenommen. Teile des Ligationsansatzes (4 - 15  $\mu\text{l}$ ) wurden in kompetente Bakterien-Zellen des *E.coli*-Stammes DH5 $\alpha$  transformiert.

### 5.2.1.19 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis et al.1986). Hierzu wird eine doppelsträngige DNA (Template-DNA) denaturiert und an den entstehenden komplementären DNA-Einzelsträngen zwei Oligonukleotid-Primer, welche die zu amplifizierende Region (Ziel-DNA) flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase werden, ausgehend von den entsprechenden Oligonukleotid-Primern, die jeweiligen komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Durch das Wiederholen eines ca. dreißigfachen Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung von Primern und davon ausgehender Komplementärstrangsynthese erreicht man eine Vermehrung des DNA-Fragments zwischen den Primern. Standardmäßig wurde in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß ein 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz zusammenpipettiert. Im Allgemeinen enthielt ein 50  $\mu\text{l}$  Ansatz 1 - 20 ng Plasmid-DNA oder 0,2 - 2  $\mu\text{g}$  genomische DNA, 5  $\mu\text{l}$  10x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl; 0,8 % NP-40), 2  $\mu\text{l}$  50 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 pmol jedes Primers, 5  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Zur Durchführung der Reaktion wurde ein PTC-2000 Pelztier Thermal Cycler (MJ Research) benutzt. Der Ansatz wurde für 1 min bei 94°C inkubiert und durchlief dann 25-40-mal einen Zyklus aus Denaturierung (94°C, 1 min), Hybridisierung (bei geeigneter Temperatur und Dauer) und Polymerasereaktion (72°C und geeignete Dauer).

Die Hybridisierungstemperatur der Primer war abhängig vom GC-Gehalt der Oligonucleotide. Die Dauer der Polymerasereaktion richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Als Abschluss der PCR wurde der Ansatz für 5 min bei 72°C inkubiert und auf RT gekühlt.

#### **5.2.1.20 Zielgerichtete Mutagenese**

Um zielgerichtete Mutagenesen einer Protein-kodierenden DNA-Sequenz zu erreichen, wurde mit dem Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene gearbeitet. Hierbei werden 20 - 40 ng Template-DNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 125 ng der jeweiligen Primer, 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, 18 Zyklen bei Punktmutationen und 12 Zyklen bei Deletionen, folgendes Programm durchgeführt, 1 min 95°C, 1 min 55°C, 2 min pro 1 kB des Vektors 68°C, danach 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, mutierte DNA. Der Ansatz wurde danach transformiert, Mini-Präparationen wurden angefertigt und mittels Sequenzierung wurde überprüft, ob die Mutagenese erfolgreich war.

#### **5.2.1.21 Sequenzierung von DNA**

DNA-Sequenzierungen wurden mit einem ABI Prism 377 DNA-Sequencer (Perkin Elmer) unter Verwendung des ABI-Prism-Dye-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kits (Perkin Elmer) und Standard-Primern nach Angaben des Herstellers von der Sequenz Service-Einheit des ZMNH durchgeführt. Jeweils Ansätze, die ca. 0,6 - 0,75 µg DNA und 10 pmol Primer enthielten und mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Volumen von 8 µl gebracht worden waren, wurden benötigt.

#### **5.2.1.22 Herstellung kompetenter Bakterien**

Von einer Glycerinkultur des *E.coli*-Stammes DH5α wurden circa 10 µl auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurde eine einzelne Kolonie zum Animpfen einer 5 ml Vorkultur benutzt, die wiederum über Nacht bei 37°C geschüttelt wurde. Als Hauptkultur wurden 150 ml LB-Medium, das

10 mM CaCl<sub>2</sub> enthielt, mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und solange geschüttelt, bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dies ist der Fall, wenn die Bakteriensuspension eine OD<sub>600</sub> von 0,45-0,5 erreicht hat. 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 Überstands wurde das Sediment in 50 ml eiskaltem 100 mM CaCl<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub> mit 15 % Glycerin resuspendiert und über Nacht im 4°C-Raum auf Eis inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension auf Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

#### **5.2.1.23 Transformation von Bakterienzellen**

Die kompetenten Bakterienzellen wurden zuerst langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA (1-25 ng) wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte für 45-60 sec ein Hitzeschock bei 42°C. Der Ansatz wurde sofort wieder auf Eis abgekühlt und dort für 2 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl LB-Medium ohne Antibiotika wurden die Zellen 45 min bei 37°C geschüttelt, um ihnen die Gelegenheit zur Expression der Antibiotikaresistenzgene zu geben. Die Bakterien wurden dann auf antibiotikahaltige LB-Platten (0.1 mg/ml Ampicillin oder 0.1 mg/ml Kanamycin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### **5.2.2 Proteinbiochemische Arbeiten**

#### **5.2.2.1 Expression von Proteinen in Bakterien**

Proteine wurden in dem *Escherichia coli*-Stamm BL21 exprimiert. Für GST-Fusionsproteine (Glutathion-S-Transferase) wurden die Vektoren pGEX-KGK, pGEX-KG und pGEX-AHK 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 20 ml Vorkultur aus einem kultivierten Klon in antibiotikahaltigem LB-Medium inkubiert. 3-5 ml der Vorkultur wurden in 200 ml frisches antibiotikahaltiges LB-Medium

gegeben und die Bakterien wurden bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,3 (mittlere logarithmische Wachstumsphase) schüttelnd bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten Wachstumsphase wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Suspension wurde weitere 3-5 h bei kurzen Proteinen bei 37°C und alternativ über Nacht bei der Expression längerer Proteine (RLIM und Rnf6) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei RT und 6000 Upm zentrifugiert (Zentrifuge J2-21M/E, JA-10 Rotor, Beckmann).

### 5.2.2.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden mit Hilfe von Glutathion-Agarose (Sigma) aus dem Bakterienlysat gereinigt. Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensedimente der exprimierten GST-Proteine wurden in Lysispuffer (50 mM NaCl; 50 mM Tris pH 7,6; 10 % Glycerol; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin; 1 mM DTT) resuspendiert und in ein 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Die Proben wurden 3x 30 sec in 45 Sekundenintervallen mit 60 Watt beschallt und anschließend 30 min bei 9500 Upm in einer Beckmann Zentrifuge (Rotor JA-20) zentrifugiert. Zu dem Überstand wurden 500 µl Glutathion-Agarose (nach Angaben des Herstellers equilibriert) pipettiert. Überstand und Glutathion-Agarose wurden 3 - 4 h bei ständiger Rotation inkubiert. Das durch die anschließende Zentrifugation (3500 Upm, 5 min, Haereus-Zentrifuge) erhaltene Sediment wurde 3x 5 - 10 min mit ca. 5 ml Lysispuffer gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschsritten wurde wie beschrieben zentrifugiert, der Lysispuffer dekantiert und neuer Lysispuffer zugegeben. Anschließend wurden die GST-Proteine mit dem Elutionspuffer (Lysispuffer mit 10-25 mM Glutathion) unter ständiger Rotation 1 h bis über Nacht von der Glutathion-Agarose eluiert.

Unter Benutzung einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung des Gels wurden die Proben analysiert.

### 5.2.2.3 Aufreinigung von Proteinen aus eukaryontischen Zellen

24 h nach einer Transfektion wurden Zellextrakte zur Gewinnung der Proteine hergestellt. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, Zellkulturschalen mit einem

Durchmesser von 10 oder 6 cm verwendet. Alle Schritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen. Die Zellen wurden 2x mit 5ml PBS gewaschen. Nachdem das PBS vollständig abgesaugt worden war, wurden 200 µl bis 500 µl (je nach Zelldichte) NETN-Puffer dazugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte abgelöst. In Suspension wurden die Zellen 15 min inkubiert. Danach wurden die Zellextrakte 15 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert.

#### **5.2.2.4 Proteinbestimmung noch Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (1976) durchgeführt. Es wurde Bradford-Reagenz (Roti-Quant) der Firma Roth verwendet. Je 500 µl Reagenz wurden mit 2 µl Zellextrakt versetzt und gemischt. Zusätzlich wurde eine Eichreihe aus 200 µl Bradford-Reagenz mit 1 - 10 µg BSA pipettiert. Je 200 µl der Lösungen (Doppelbestimmung) wurden in eine Mikrotiter-Platte mit 96 Mulden pipettiert. Die Proteinkonzentration konnte nach einer Extinktionsmessung bei 595 nm mit Hilfe der erstellten Eichgerade berechnet werden.

#### **5.2.2.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. 8-15 %ige SDS-Polyacrylamidgele (Sambrook et al., 1989) wurden verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in 3x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 100°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 15-44 mA. Vorgefärbte Protein-Molekulargewichtsstandards (Benchmark Prestained Protein Ladder, Invitrogen) wurden zur Bestimmung der Proteingrößen verwendet. Zur Visualisierung wurden die Proteine im Gel mit Coomassie angefärbt, auf Nitrozellulose transferiert und im Western-Blot-Verfahren analysiert. Im Fall radioaktiver Proteine wurde das Gel getrocknet, danach wurde Röntgenfilm exponiert.

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

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele 60 min in Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250; 50 % Methanol; 7,5 % Essigsäure) gefärbt,



anschließend mit Entfärberlösung (50 % Methanol; 10 % Essigsäure) inkubiert und getrocknet (Model 583, Biorad).

#### **5.2.2.7 Elektrophoretischer Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Western-Blot)**

Der Transfer von Proteinen nach Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte nach Herstellerangaben entweder nach einer Semi-Dry-Transfer-Methode in einer Graphitblot-Apparatur (Phase, Lübeck) mit Transferpuffer (50 mM Tris-HCl, 380 mM Glycerin, 0.1 % SDS, 20 % Methanol) bei 1 mA/cm<sup>2</sup> für 60-120 min oder nach einer Tank-Blot Methode mittels einer Blot-Apparatur (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad,) im Transferpuffer (20 % SDS-PAGE-Laufpuffer, 20 % Ethanol) bei 90 mA über Nacht. Anschließend wurde die Membran kurz in Ponceaurot (Ponceau S, Applichem) geschwenkt, um zu überprüfen, ob der Transfer gleichmäßig erfolgt war. Die Ponceaurot-Färbung wurde durch mehrmaliges Schwenken in ddH<sub>2</sub>O und PBST entfernt. Danach folgte der immunologische Nachweis mit spezifischen Antikörpern.

#### **5.2.2.8 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen**

Der Western Blot wurde nach dem Proteintransfer in einer Blockierungslösung (PBS; 3 % fettfreies Milchpulver) 1 h inkubiert und die freie Proteinbindungskapazität der Membran dadurch abgesättigt. Nach dem Blockieren wurde der gegen das gesuchte Protein gerichtete Antikörper (primärer Antikörper) in Blockierungslösung mit entsprechender Verdünnung inkubiert, dies für mindestens 1 h bei RT bis über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran zweimal mit PBST für 1 und 10 min bei RT und zweimal mit PBS für 1 und 10 min bei RT gewaschen. Daraufhin wurde der Western-Blot mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Protein A für mindestens 20 min inkubiert. Die Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte nach erneutem Waschen (wie oben) mit dem ECL- (Enhanced Chemiluminescence) Reagenz nach den Angaben der Firma Amersham auf ECL-Filmen (Hyperfilm-ECL, Amersham).

#### **5.2.2.9 Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen *in vitro***

Es wurde 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 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. Vorgefärbte Protein-Molekulargewichtsstandards (Benchmark Prestained Protein Ladder, Invitrogen) wurden zur Bestimmung und Überprüfung der Proteingrößen verwendet.

#### **5.2.2.10 *In Vitro*-Ubiquitinierungen**

Für RLIM-abhängige *in vitro*-Ubiquitinierungen wurden als Substrat 2 - 5 µl <sup>35</sup>S- markiertes TNT-Protein in Gegenwart von 50 ng E1, 50 ng bakteriell exprimiertem E2 (UbcH5, Ubc8), 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-RLIM-Mutanten 2 h bei 30 °C inkubiert (Ostendorff et al., 2002). 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. Nach der Geltrocknung wurde über Nacht ein Kodak Biomax Film exponiert.

### **5.2.3 Methoden der Zellkultur**

#### **5.2.3.1 Kultur von Säugerezellen**

Die verwendeten HEK293-Zellen, HEK293T-Zellen, HeLa-Zellen und αT3-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> mit gesättigtem Wasserdampf kultiviert. CHO-Zellen wurden in HAM's F12 Medium mit denselben Zusätzen und unter denselben Bedingungen gehalten. Die unterschiedlichen Zelllinien wuchsen fast bis zur Konfluenz bevor sie subkultiviert wurden. Zum Ablösen der Zellen von der Schale wurde 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco-BRL) verwendet.

### 5.2.3.2 Lagerung von Säugerzellen

Die Zellen wurden von den Kulturschalen durch Zugabe von 1x Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco-BRL) abgelöst, in FCS/DMSO (9:1) aufgenommen und in Aliquots von 1 ml auf Kryo-Einfrierröhrchen (Renner) verteilt. Diese wurden langsam auf -80°C abgekühlt und danach in flüssigen Stickstoff überführt.

### 5.2.3.3 Transfektion der Säugerzellen mit Polyethanolimin (PEI)

HEK293T-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 15 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 24-48 h wurden die Zellen geerntet.

### 5.2.3.4 Transfektion der Säugerzellen mit Lipofektionsreagenzien

HEK293-Zellen, CHO-Zellen und  $\alpha$ T3-Zellen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem Superfect transfections kit (Qiagen) transfiziert. HeLa-Zellen wurden mit jetPEI (Polyplus Transfection) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Die Zellen wurden 1 Tag vorher ausgesät, transfiziert und nach 24-48h wurden die Zellen geerntet.

### 5.2.3.5 Transfektion der Säugerzellen in RNAi-Experimenten

HeLa-Zellen oder HEK293T wurden nach Angaben des Herstellers mit dem Oligofectamine Reagenz der Firma Invitrogen transfiziert. Das Aussäen und die Aufarbeitung der Zellen erfolgten nach Elbashir et al., 2001.

### 5.2.3.6 Immunocytochemische Detektion in Säugerzellen

Um transfizierte oder endogene Proteine in Säugerzellen nachzuweisen, wurden immunocytochemische Experimente durchgeführt. Die Zellen wurden auf einer Mikrotiterplatte mit 24 Mulden ausgesät, in die zuvor sterilisierte Deckgläschen gelegt

worden waren. Die Transfektion erfolgte wie oben beschrieben. Nach 24-48 h wurden die Zellen 20 min bei 4°C in 4 % PFA fixiert, 3x mit PBS gewaschen und anschließend 5 min in PBS + 0,5 % Triton X100 inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschritten in PBS. GFP transfizierte Zellen wurden für 15 min mit Phalloidin (1:500; Molecular Probes) und TOTO-3 (1:10000; Molecular Probes) inkubiert. Es folgten Waschschriffe mit PBS und ddH<sub>2</sub>O. Alle anderen Transfektionen wurden mit dem in PBST / 10 % FCS verdünnten primären Antikörper inkubiert. Die Inkubation erfolgte 1 h bis über Nacht bei RT. Nach weiteren 3 Waschschriffen mit PBST wurde ein Fluoreszenz-markierter sekundärer Antikörper (in PBST / 10 % FCS) dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei Dunkelheit wurden die Zellen 3 Mal mit PBS gewaschen. Wenn gewünscht, folgte eine 8 min Inkubation mit TOTO-3 (1:10000; Molecular Probes). Es folgte ein letzter Waschschriff 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.

#### **5.2.3.7 Luziferase-Test**

24 h nach der Transfektion mit einem Luziferase-Reporterplasmid wurden die Zellen geerntet. Das Medium wurde vollständig entfernt, 300 µl frisch zubereiteter Lysis-Puffer (88 mM Tris-HCl pH 7,8; 88 mM MES pH7,8; 12,5 mM MgOAc; 1 mM DTT; 0,1 % Triton X-100; 2,5 mM ATP) wurden hinzugefügt. 200 µl der Lösung wurden abgenommen und in einem Luminometer vermessen. Das Luminometer (TD-20/20 Luminometer, Turner Designs) wurde vorher messbereit befüllt mit Luziferinlösung (0,5 mM Luziferin; 5 mM Kaliumphosphat, pH7,8).

#### **5.2.3.8 Gelshift (Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

EMSA Versuche wurden mit bakteriell-exprimierten Proteinen und <sup>32</sup>P-markierten RNA-Fragmenten durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden 30 min in 1x Bindungspuffer (20 mM HEPES pH7,6; 100 mM KCl; 2 mM EDTA; 0,01 % NP40 auf Eis inkubiert und anschließend mit 6 µl DNA-Probenpuffer in einem nativen 6 %igen Polyacrylamidgel in 0,5x TBE aufgetrennt. Es folgten eine Fixierung für 5-10 min in 40 % Methanol mit 10 %

Essigsäure, eine Gelrocknung und eine Exposition mit einem Röntgenfilm. Als Sequenzen wurde der pcDNA3-Vektor mit *Eco*R1 linearisiert. Als Vergleich diente eine zum pcDNA3-Vektor komplementäre Sequenz. Für eine ds-Oligonukleotidsonde wurden diese beiden Sequenzen in einem Ansatz markiert.

## 6 Literaturverzeichnis

Agulnick,A.D., Taira,M., Breen,J.J., Tanaka,T., Dawid,I.B., and 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., and Edlund,H. (1997). Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385, 257-260.

Akhtar,A., Zink,D., and Becker,P.B. (2000). Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* 407, 405-409.

Alberts, B., Bray, D. Lewis J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd. 1994. New York, Garland Publishing, Inc.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Arber,S., Barbayannis,F.A., Hanser,H., Schneider,C., Stanyon,C.A., Bernard,O., and Caroni,P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809.

Arber,S. and Caroni,P. (1996). Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interactions in situ. *Genes Dev.* 10, 289-300.

Bach,I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mechanisms of Development* 91, 5-17.

Bach,I., Carriere,C., Ostendorff,H.P., Andersen,B., and Rosenfeld,M.G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes & Development* 11, 1370-1380.

Bach,I. and Ostendorff,H.P. (2003). Orchestrating nuclear functions: ubiquitin sets the rhythm. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 189-195.

Bach,I., Rhodes,S.J., Pearse,R.V., Heinzl,T., Gloss,B., Scully,K.M., Sawchenko,P.E., and Rosenfeld,M.G. (1995). P-Lim, A Lim Homeodomain Factor, Is Expressed During Pituitary Organ and Cell Commitment and Synergizes with Pit-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 2720-2724.

Bach,I., Rodriguez-Esteban,C., Carriere,C., Bhushan,A., Krones,A., Rose,D.W., Glass,C.K., Andersen,B., Belmonte,J.C.I., and Rosenfeld,M.G. (1999). RLIM inhibits

functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nature Genetics* 22, 394-399.

Bellugi,U., Lichtenberger,L., Mills,D., Galaburda,A., and Korenberg,J.R. (1999). Bridging cognition, the brain and molecular genetics: evidence from Williams syndrome. *Trends in Neurosciences* 22, 197-207.

Bernard,O., Ganiatsas,S., Kannourakis,C., and Dringen,R. (1994). Kiz-1, A Protein with Lim Zinc-Finger and Kinase Domains, Is Expressed Mainly in Neurons. *Cell Growth & Differentiation* 5, 1159-1171.

Birk,O.S., Casiano,D.E., Wassif,C.A., Cogliati,T., Zhao,L., Zhao,Y., Grinberg,A., Huang,S., Kreidberg,J.A., Parker,K.L., Porter,F.D., and Westphal,H. (2000). The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403, 909-913.

Boehm,J., He,Y.S., Greiner,A., Staudt,L., and Wirth,T. (2001). Regulation of BOB.1/OBF.1 stability by SIAH. *Embo Journal* 20, 4153-4162.

Breen,J.J., Agulnick,A.D., Westphal,H., and Dawid,I.B. (1998). Interactions between LIM domains and the LIM domain-binding protein Ldb1. *J. Biol. Chem.* 273, 4712-4717.

Brown,M.C., Perrotta,J.A., and Turner,C.E. (1998). Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Molecular Biology of the Cell* 9, 1803-1816.

Burdine,R.D. and Schier,A.F. (2000). Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation. *Genes & Development* 14, 763-776.

Chen,H., Lun,Y., Ovchinnikov,D., Kokubo,H., Oberg,K.C., Pepicelli,C.V., Gan,L., Lee,B., and Johnson,R.L. (1998). Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat. Genet.* 19, 51-55.

Chen,L., Segal,D., Hukriede,N.A., Podtelejnikov,A.V., Bayarsaihan,D., Kennison,J.A., Ogryzko,V.V., Dawid,I.B., and Westphal,H. (2002). Ssdp proteins interact with the LIM-domain-binding protein Ldb1 to regulate development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14320-14325.

Conner,J. and Liu,Z.C. (2000). LEUNIG, a putative transcriptional corepressor that regulates AGAMOUS expression during flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12902-12907.

Dawid,I.B., Breen,J.J., and Toyama,R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends in Genetics* 14, 156-162.

- de Hoog,C.L., Foster,L.J., and Mann,M. (2004). RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* 117, 649-662.
- Dreyer,S.D., Zhou,G., Baldini,A., Winterpacht,A., Zabel,B., Cole,W., Johnson,R.L., and Lee,B. (1998). Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat. Genet.* 19, 47-50.
- Edwards,D.C., Sanders,L.C., Bokoch,G.M., and Gill,G.N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature Cell Biology* 1, 253-259.
- Eissenberg,J.C. and Elgin,S.C.R. (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* 10, 204-210.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., and Tuschl,T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elenbaas,B., Dobbelstein,M., Roth,J., Shenk,T., and Levine,A.J. (1996). The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Molecular Medicine* 2, 439-451.
- Fabbro,M. and Henderson,B.R. (2003). Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Experimental Cell Research* 282, 59-69.
- Fang,S., Jensen,J.P., Ludwig,R.L., Vousden,K.H., and Weissman,A.M. (2000). Mdm2 Is a RING Finger-dependent Ubiquitin Protein Ligase for Itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 8945-8951.
- Feuerstein,R., Wang,X.K., Song,D.C., Cooke,N.E., and Liebhaber,S.A. (1994). The Lim/Double Zinc-Finger Motif Functions As A Protein Dimerization Domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10655-10659.
- Fire,A. (1999). RNA-triggered gene silencing. *Trends in Genetics* 15, 358-363.
- Foletta,V.C., Moussi,N., Sarmiere,P.D., Bamberg,J.R., and Bernard,O. (2004). LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Experimental Cell Research* 294, 392-405.
- Fornerod,M., Ohno,M., Yoshida,M., and Mattaj,I.W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.



Franks,R.G., Wang,C.X., Levin,J.Z., and Liu,Z.C. (2002). SEUSS, a member of a novel family of plant regulatory proteins, represses floral homeotic gene expression with LEUNIG. *Development* 129, 253-263.

Freemont,P.S. (2000). Ubiquitination: RING for destruction? *Current Biology* 10, R84-R87.

Freiman,R.N. and Tjian,R. (2003). Regulating the regulators: Lysine modifications make their mark. *Cell* 112, 11-17.

German,M.S., Wang,J.H., Chadwick,R.B., and Rutter,W.J. (1992). Synergistic Activation of the Insulin Gene by A Lim Homeo Domain Protein and A Basic Helix Loop Helix Protein - Building A Functional Insulin Minienhancer Complex. *Genes & Development* 6, 2165-2176.

Gilbert, S. F. *Developmental Biology*. 6th. 2000.

Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Hammond,S.M., Caudy,A.A., and Hannon,G.J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Reviews Genetics* 2, 110-119.

Henderson,B.R. and Eleftheriou,A. (2000). A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Experimental Cell Research* 256, 213-224.

Hermanson,O., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (2002). Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 13, 55-60.

Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* 67, 425-479.

Hicke,L. and Dunn,R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19, 141-172.

Hiratani,I., Yamamoto,N., Mochizuki,T., Ohmori,S.Y., and Taira,M. (2003). Selective degradation of excess Ldb1 by Rnf12/RLIM confers proper Ldb1 expression levels and Xlim-1/Ldb1 stoichiometry in *Xenopus* organizer functions. *Development* 130, 4161-4175.

Hobert,O. and Westphal,H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. *Trends in Genetics* 16, 75-83.

Hood, J.K. and Silver, P.A. (2000). Diverse nuclear transport pathways regulate cell proliferation and oncogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* 1471, M31-M41.

Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10, 429-439.

Joazeiro, C.A.P. and Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: Mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.

Johnsen, S.A., Subramaniam, M., Monroe, D.G., Janknecht, R., and Spelsberg, T.C. (2002). Modulation of transforming growth factor beta (TGF beta)/Smad transcriptional responses through targeted degradation of TGF beta-inducible early gene-1 by human seven in absentia homologue. *J. Biol. Chem.* 277, 30754-30759.

Jones, D.O., Cowell, I.G., and Singh, P.B. (2000). Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* 22, 124-137.

Jurata, L.W. and Gill, G.N. (1997). Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. *Molecular and Cellular Biology* 17, 5688-5698.

Jurata, L.W., Kenny, D.A., and Gill, G.N. (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11693-11698.

Jurata, L.W., Pfaff, S.L., and Gill, G.N. (1998). The nuclear LIM domain interactor NLI mediates homo- and heterodimerization of LIM domain transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 3152-3157.

Kaffman, A. and O'Shea, E.K. (1999). Regulation of nuclear localization: A key to a door. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15, 291-339.

Khoury, G. and Gruss, P. (1983). Enhancer elements. *Cell* 33, 313-314.

Kramer, O.H., Gottlicher, M., and Heinzl, T. (2001). Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12, 294-300.

Kramer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., and Gottlicher, M. (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *Embo Journal* 22, 3411-3420.

- Kudo,N., Taoka,H., Toda,T., Yoshida,M., and Horinouchi,S. (1999). A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *J. Biol. Chem.* *274*, 15151-15158.
- Larson,R.C., Lavenir,I., Larson,T.A., Baer,R., Warren,A.J., Wadman,I., Nottage,K., and Rabbitts,T.H. (1996). Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J.* *15*, 1021-1027.
- Larson,R.C., Osada,H., Larson,T.A., Lavenir,I., and Rabbitts,T.H. (1995). The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. *Oncogene* *11*, 853-862.
- Lee,S.K. and Pfaff,S.L. (2001). Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat. Neurosci.* *4 Suppl*, 1183-1191.
- Lee,T.I. and Young,R.A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual Review of Genetics* *34*, 77-137.
- Lewin, B. *Genes VI*. 1997. Oxford University Press.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Li,H., Witte,D.P., Branford,W.W., Aronow,B.J., Weinstein,M., Kaur,S., Wert,S., Singh,G., Schreiner,C.M., Whitsett,J.A., Scott,W.J., and Potter,S. (1994). Gsh-4 encodes a LIM-type homeodomain, is expressed in the developing central nervous system and is required for early postnatal survival. *EMBO J.* *13*, 2876-2885.
- Liu,J., Stevens,J., Rote,C.A., Yost,H.J., Hu,Y.X., Neufeld,K.L., White,R.L., and Matsunami,N. (2001). Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Molecular Cell* *7*, 927-936.
- Lo,H.S., Hu,N., Gere,S., Lu,N., Su,H., Goldstein,A.M., Taylor,P.R., and Lee,M.P. (2002). Identification of somatic mutations of the RNF6 gene in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Research* *62*, 4191-4193.
- Lopez,P., Vidal,F., Martin,L., Lopez-Fernandez,L.A., Rual,J.F., Rosen,B.S., Cuzin,F., and Rassoulzadegan,M. (2002). Gene control in germinal differentiation: Rnf6, a transcription regulatory protein in the mouse Sertoli cell. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 3488-3496.
- Louis,H.A., Pino,J.D., Schmeichel,K.L., Pomies,P., and Beckerle,M.C. (1997). Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression. *J. Biol. Chem.* *272*, 27484-27491.

- Macdonald,D.H.C., Lahiri,D., Sampath,A., Chase,A., Sohal,J., and Cross,N.C.P. (1999). Cloning and characterization of RNF6, a novel RING finger gene mapping to 13q12. *Genomics* 58, 94-97.
- Maekawa,M., Ishizaki,T., Boku,S., Watanabe,N., Fujita,A., Iwamatsu,A., Obinata,T., Ohashi,K., Mizuno,K., and Narumiya,S. (1999). Signaling from rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.
- Maison,C., Bailly,D., Peters,A.H., Quivy,J.P., Roche,D., Taddei,A., Lachner,M., Jenuwein,T., and Almouzni,G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat. Genet.* 30, 329-334.
- Marks,P.A., Richon,V.M., Breslow,R., and Rifkind,R.A. (2001). Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Current Opinion in Oncology* 13, 477-483.
- Matsuzawa,S. and Reed,J.C. (2001). Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Molecular Cell* 7, 915-926.
- Meek,D.W. and Knippschild,U. (2003). Posttranslational Modification of MDM2. *Mol Cancer Res* 1, 1017-1026.
- Meier,B.C., Price,J.R., Parker,G.E., Bridwell,J.L., and Rhodes,S.J. (1999). Characterization of the porcine Lhx3/LIM-3/P-Lim LIM homeodomain transcription factor. *Mol. Cell Endocrinol.* 147, 65-74.
- Melnick,A. and Licht,J.D. (2002). Histone deacetylases as therapeutic targets in hematologic malignancies. *Current Opinion in Hematology* 9, 322-332.
- Meng,Y.H., Zhang,Y., Tregoubov,V., Janus,C., Cruz,L., Jackson,M., Lu,W.Y., MacDonald,J.F., Wang,J.Y., Falls,D.L., and Jial,Z.P. (2002). Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35, 121-133.
- Milan,M. and 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. *Molecular Cell* 4, 267-273.
- Milan,M., Diaz-Benjumea,F.J., and Cohen,S.M. (1998). Beadex encodes an LMO protein that regulates Apterous LIM-homeodomain activity in *Drosophila* wing development: a model for LMO oncogene function. *Genes Dev.* 12, 2912-2920.
- Millonig,J.H., Millen,K.J., and Hatten,M.E. (2000). The mouse Dreher gene *Lmx1a* controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS. *Nature* 403, 764-769.

Mochizuki,T., Karavanov,A.A., Curtiss,P.E., Ault,K.T., Sugimoto,N., Watabe,T., Shiokawa,K., Jamrich,M., Cho,K.W.Y., Dawid,I.B., and Taira,M. (2000). Xlim-1 and LIM domain binding protein 1 cooperate with various transcription factors in the regulation of the gooseoid promoter. *Developmental Biology* 224, 470-485.

Morcillo,P., Rosen,C., Baylies,M.K., and Dorsett,D. (1997). Chip, a widely expressed chromosomal protein required for segmentation and activity of a remote wing margin enhancer in *Drosophila*. *Genes Dev.* 11, 2729-2740.

Muchardt,C., Guilleme,M., Seeler,J.S., Trouche,D., Dejean,A., and Yaniv,M. (2002). Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 alpha. *Embo Reports* 3, 975-981.

Mukhopadhyay,M., Teufel,A., Yamashita,T., Agulnick,A.D., Chen,L., Downs,K.M., Schindler,A., Grinberg,A., Huang,S.P., Dorward,D., and Westphal,H. (2003). Functional ablation of the mouse *Ldb1* gene results in severe patterning defects during gastrulation. *Development* 130, 495-505.

Näär,A.M., Lemon,B.D., and Tjian,R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 475-501.

Netchine,I., Sobrier,M.L., Krude,H., Schnabel,D., Maghnie,M., Marcos,E., Duriez,B., Cacheux,V., Moers,A., Goossens,M., Gruters,A., and Amselem,S. (2000). Mutations in *LHX3* result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat. Genet.* 25, 182-186.

O'Keefe,D.D., Thor,S., and Thomas,J.B. (1998). Function and specificity of LIM domains in *Drosophila* nervous system and wing development. *Development* 125, 3915-3923.

O'Keefe,K., Li,H.P., and Zhang,Y.P. (2003). Nucleocytoplasmic shuttling of p53 is essential for MDM2-mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology* 23, 6396-6405.

Ohashi,K., Nagata,K., Maekawa,M., Ishizaki,T., Narumiya,S., and 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.

Ossareh-Nazari,B., Gwizdek,C., and Dargemont,C. (2001). Protein export from the nucleus. *Traffic* 2, 684-689.

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

- Pickart,C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* *70*, 503-533.
- Pickart,C.M. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell* *116*, 181-190.
- Pickford,A.S. and Cogoni,C. (2003). RNA-mediated gene silencing. *Cellular and Molecular Life Sciences* *60*, 871-882.
- Pinto do,O.P., Kolterud,A., and Carlsson,L. (1998). Expression of the LIM-homeobox gene LH2 generates immortalized steel factor-dependent multipotent hematopoietic precursors. *EMBO J.* *17*, 5744-5756.
- Pirrotta,V. (1998). Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell* *93*, 333-336.
- Pollard,V.W. and Malim,M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annual Review of Microbiology* *52*, 491-532.
- Porter,F.D., Drago,J., Xu,Y., Cheema,S.S., Wassif,C., Huang,S.P., Lee,E., Grinberg,A., Massalas,J.S., Bodine,D., Alt,F., and Westphal,H. (1997). Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* *124*, 2935-2944.
- Rabbitts,T.H. (1998). LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes & Development* *12*, 2651-2657.
- Retaux,S. and Bachy,I. (2002). A short history of LIM domains (1993-2002) From protein interaction to degradation. *Molecular Neurobiology* *26*, 269-281.
- Rodriguez-Esteban,C., Schwabe,J.W., Pena,J.D., Rincon-Limas,D.E., Magallon,J., Botas,J., and Belmonte,J.C. (1998). Lhx2, a vertebrate homologue of apterous, regulates vertebrate limb outgrowth. *Development* *125*, 3925-3934.
- Roovers,K., Klein,E.A., Castagnino,P., and Assoian,R.K. (2003). Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of cyclin D1 expression. *Developmental Cell* *5*, 273-284.
- Ryan,A.K. and Rosenfeld,M.G. (1997). POU domain family values: Flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes & Development* *11*, 1207-1225.
- Sanchezgarcia,I. and Rabbitts,T.H. (1994). The Lim Domain - A New Structural Motif Found in Zinc-Finger-Like Proteins. *Trends in Genetics* *10*, 315-320.

- 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., and Old,L.J. (1999). Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 83, 456-464.
- Scheffner,M., Huibregtse,J.M., Vierstra,R.D., and Howley,P.M. (1993). The Hpv-16 E6 and E6-Ap Complex Functions As A Ubiquitin-Protein Ligase in the Ubiquitination of P53. *Cell* 75, 495-505.
- Schmeichel,K.L. and Beckerle,M.C. (1994). The Lim Domain Is A Modular Protein-Binding Interface. *Cell* 79, 211-219.
- Sharma,K., Sheng,H.Z., Lettieri,K., Li,H., Karavanov,A., Potter,S., Westphal,H., and Pfaff,S.L. (1998). LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell* 95, 817-828.
- Shawlot,W. and Behringer,R.R. (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* 374, 425-430.
- Sheng,H.Z., Moriyama,K., Yamashita,T., Li,H., Potter,S.S., Mahon,K.A., and Westphal,H. (1997). Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 278, 1809-1812.
- Sheng,H.Z., Zhadanov,A.B., Mosinger,B., Jr., Fujii,T., Bertuzzi,S., Grinberg,A., Lee,E.J., Huang,S.P., Mahon,K.A., and Westphal,H. (1996). Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene Lhx3. *Science* 272, 1004-1007.
- Susini,L., Passer,B.J., Amzallag-Elbaz,N., Juven-Gershon,T., Prieur,S., Privat,N., Tuynder,M., Gendron,M.C., Israel,A., Amson,R., Oren,M., and Telerman,A. (2001). Siah-1 binds and regulates the function of Numb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 15067-15072.
- Tanikawa,J., Ichikawa-Iwata,E., Kanei-Ishii,C., Nakai,A., Matsuzawa,S., Reed,J.C., and Ishii,S. (2000). p53 suppresses the c-myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J. Biol. Chem.* 275, 15578-15585.
- Thaler,J.P., Lee,S.K., Jurata,L.W., Gill,G.N., and Pfaff,S.L. (2002). LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions. *Cell* 110, 237-249.
- Thor,S., Andersson,S.G., Tomlinson,A., and Thomas,J.B. (1999). A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* 397, 76-80.
- Tiedt,R., Bartholdy,B.A., Matthias,G., Newell,J.W., and Matthias,P. (2001). The RING finger protein Siah-1 regulates the level of the transcriptional coactivator OBF-1. *Embo Journal* 20, 4143-4152.

Toyama,R., Kobayashi,M., Tomita,T., and Dawid,I.B. (1998). Expression of LIM-domain binding protein (ldb) genes during zebrafish embryogenesis. *Mech. Dev.* 71, 197-200.

Tse,E., Smith,A.J.H., Hunt,S., Lavenir,I., Forster,A., Warren,A.J., Grutz,G., Foroni,L., Carlton,M.B.L., Colledge,W.H., Boehm,T., and Rabbitts,T.H. (2004). Null mutation of the Lmo4 gene or a combined null mutation of the Lmo1/Lmo3 genes causes perinatal lethality, and Lmo4 controls neural tube development in mice. *Molecular and Cellular Biology* 24, 2063-2073.

van Meyel,D.J., O'Keefe,D.D., Jurata,L.W., Thor,S., Gill,G.N., and Thomas,J.B. (1999). Chip and apterous physically interact to form a functional complex during *Drosophila* development. *Molecular Cell* 4, 259-265.

van Meyel,D.J., Thomas,J.B., and Agulnick,A.D. (2003). Ssdp proteins bind to LIM-interacting co-factors and regulate the activity of LIM-homeodomain protein complexes in vivo. *Development* 130, 1915-1925.

Visvader,J.E., Mao,X., Fujiwara,Y., Hahm,K., and Orkin,S.H. (1997). The LIM-domain binding protein Ldb1 and its partner LMO2 act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 13707-13712.

Visvader,J.E., Venter,D., Hahm,K., Santamaria,M., Sum,E.Y.M., O'Reilly,L., White,D., Williams,R., Armes,J., and Lindeman,G.J. (2001). The LIM domain gene LMO4 inhibits differentiation of mammary epithelial cells in vitro and is overexpressed in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14452-14457.

Wadman,I.A., Osada,H., Grutz,G.G., Agulnick,A.D., Westphal,H., Forster,A., and Rabbitts,T.H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157.

Warren,A.J., Colledge,W.H., Carlton,M.B., Evans,M.J., Smith,A.J., and Rabbitts,T.H. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57.

Weiss,M.A. and Narayana,N. (1998). RNA recognition by arginine-rich peptide motifs. *Biopolymers* 48, 167-180.

Weissman,A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 169-178.

Wen,W., Meinkoth,J.L., Tsien,R.Y., and Taylor,S.S. (1995). Identification of A Signal for Rapid Export of Proteins from the Nucleus. *Cell* 82, 463-473.



- Windle, J.J., Weiner, R.I., and Mellon, P.L. (1990). Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* *4*, 597-603.
- Xu, Y., Baldassare, M., Fisher, P., Rathbun, G., Oltz, E.M., Yancopoulos, G.D., Jessell, T.M., and Alt, F.W. (1993). LH-2: a LIM/homeodomain gene expressed in developing lymphocytes and neural cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 227-231.
- Yamada, Y., Warren, A.J., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R., and Rabbitts, T.H. (1998). The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 3890-3895.
- Yang, N. and Mizuno, K. (1998). Cytoplasmic localization of LIM-kinase 1 is directed by two nuclear export signals within the PDZ domain. *Molecular Biology of the Cell* *9*, 186A.
- Yoshioka, K., Foletta, V., Bernard, O., and Itoh, K. (2003). A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 7247-7252.
- Zeng, C., Justice, N.J., Abdelilah, S., Chan, Y.M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1998). The *Drosophila* LIM-only gene, dLMO, is mutated in Beadex alleles and might represent an evolutionarily conserved function in appendage development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 10637-10642.
- Zhao, Y., Sheng, H.Z., Amini, R., Grinberg, A., Lee, E., Huang, S., Taira, M., and Westphal, H. (1999). Control of hippocampal morphogenesis and neuronal differentiation by the LIM homeobox gene *Lhx5*. *Science* *284*, 1155-1158.
- Zhu, T.H., Bodem, J., Keppel, E., Paro, R., and Royer-Pokora, B. (1995). A single ancestral gene of the human LIM domain oncogene family LMO in *Drosophila*: characterization of the *Drosophila* *Dlmo* gene. *Oncogene* *11*, 1283-1290.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

32P	Phosphor-Isotop 32
35S	Schwefel-Isotop 35
A, mA	Ampere, Milliampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Ci, mCi	Curie, Millicurie
CLIM/Ldb/NLI	Kofaktor von LIM-HD-Proteinen
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
cpm	Impulse pro Minute
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonuklein-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
E1	Ubiquitin aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin Proteinligase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GST	Glutathion-S -Transferase
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HECT Domäne	homolog zu E6-APC Terminus
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2'Ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase

IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -D-Galactosidase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l, ml, $\mu$ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LIM	konserviertes Zinkfinger-Protein-Interaktionsmotiv, 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
M, mM, $\mu$ M	molar, millimolar, mikromolar
MeOH	Methanol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure(messenger RNA)
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Säure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
POU	Abkürzung für <i>Pit1</i> , <i>Oct-1/2</i> und <i>unc86</i>
RING	really interesting new gene
RLIM	RINGfinger LIM domain-binding protein
RNA	Ribonukleinsäure
Rnf6	RINGfinger Protein 6
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (enzymatische Wirkungseinheit)
Ub	Ubiquitin
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosidase
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7.2 Liste der verwendeten Oligonukleotide

### 7.2.1 RNA-EMSA-Oligonukleotide

pcDNA3 Vektor mit *EcoR1* linearisiert:

5'-gacccaagcttggtaccgagctcggatccactagtaacggccgccagtgtgctgg-3'

T7 RNA emsa: 5'cagcacactggcggcgttactagtgatccgagctcggtagccaagcttgggtctc-3'

### 7.2.2 RNAi-Oligonukleotide

Die Auswahl der spezifischen Sequenz wurde mit Information des Labors von Dr. T.Tuschl durchgeführt ([Http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html](http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html)).

#### Humanes RLIM Oligonukleotid A

Sense: 5'gucagauggaccgauuggadTdT-3'

Antisense: 5'uccaaucggaccaucagacdTdT-3'

#### Humanes RLIM Oligonukleotid B

Sense: 5'gaagcuuucuaucauuugdTdT-3'

Antisense: 5'caauugauagaaagcuucdTdT-3'

#### Kontroll-Oligonukleotid

Sense: 5'gauggcagcaagagcucudTdT-3'

Antisense: 5'agacgcucuugcugccaucdTdT-3'

### 7.2.3 RLIM und Rnf6-Oligonukleotide für Klonierungen

NAME DES OLIGONUKLEOTIDS	5'-OLIGONUKLEOTIDSEQUENZ-3'
mRLIM 5' atg start	ATGGAGAACTCAGATTCTAAC
mRLIM 3'' stop	CACAACACTTTCTCTGTTTC
1mRLIM Muta 206 5'	GTGCCGACCACCAGACCGCGGGCTCAGAGGAGGGCA
2mRLIM Muta 206 3''	TGCCCTCCTCTGAGCCC GCGGTCTGGTGGTTCGGCAC
3mRLIM Muta 304 5'	GTGAATCCTCAGGACCGCGGTCTGGCCAAAGACC
4mRLIM Muta 304 3''	GGTCTTTGGCCAGCCC GCGGTCTGAGGATCAC
mRLIM Muta 226 5'	CCAGAGCAAGAGCTGAAAGCCCGCGGAGCATGTCCCCTTTGC
mRLIM Muta 226 3''	GCAAAGGGGACATGCTCCGCGGTCTTTTCAGCTCTTGCTCTGG
NLS 5' (RLIM)	ATGGCTCCAAAGAAGAAGCGTAAGGTA
NLS 3'' (RLIM)	TACCTTACGCTTCTTCTTTGGAGCCAT
mRLIM NLS 3'' stop	TCTTTTCAGCTCTTGCTCTGG
NES RLIM 5'	CTGCCATTCTTTAGTCTGGCTCAGTTTTTTCTTTA
NES RLIM 3''	TAAAAGAAAAAAGTGGCCAGACTAAAGAATGGCAGCCGC

13-5-1	TACCTCTTGAGTCTAAGATTGCT
13-M-1	GCTCAGAGGAGGGCAAGAAGCCG
13-M-2	AGGCACTAGGCTCTGAATCACTG
13-C-1	CAGGCTTTGGTGAGCTAAGCTAC
13-C-2	TCACACAACACTTTCTCTGTTCC
RLIM-M-3" (MB)	TCCTGAGGATTCACTATTGC
RLIM-M-5" (MB)	GGATCTGGCCAAGGACCTCC
RLIM- dRING 3"	TGT"TTCAAAGCATC
RNF6 NLS 5'	GCTAGGCGAACCAGAAGCC
RNF6 NLS 3"	CCTCCTCGCACC
RNF6 Mut NES 5' phosph	AATGAAGGCGATGATGATGATCCAATTC
RNF6 NES Mut 3" phos	GCTGTCTGCCCGTCCTAACTGC
NES Rnf6 5'	TTACCCATTCTGCGCCTTGCTCACTTCTTCTTACTG
NES Rnf6 3"	CAGTAAGAAGAAGTGAGCAAGGCGCAGAATGGGTAA
NES HIVREV 5'	CTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTT
NES HIVREV 3"	AAGAGTAAGTCTCTCAAGCGGTGGTAGCTGAAG

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ingolf Bach für die Ermöglichung dieser Arbeit, für die Anregungen und den Enthusiasmus, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn möchte ich mich für die Betreuung der Dissertation für den Fachbereich Chemie und der Übernahme des Koreferates bedanken.

Bei Frau PD Dr. Sabine Hoffmeister-Ullerich bedanke ich mich herzlich für ihr freundliches Interesse und die Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit

Allen meinen Mitarbeitern, auch den Ehemaligen, danke ich für die schöne Zeit und das sehr freundliche gute Klima im Labor, besonders danke ich Birte und Micky, die mir sehr viele eintönige Laborarbeiten abgenommen haben. Den Mitgliedern der benachbarten Nachwuchsgruppen danke ich für die stets freundliche Atmosphäre im ZMNH.

Bei meinen Freunden, meiner lieben Großmutter Hildegard Siewert und besonders bei Myriam Müller bedanke ich mich für ihr Verständnis, ihre Hilfe und den Beistand während dieser Zeit.

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, Marvin Alexander Peters, dass von mir vor dieser Promotion keine weiteren Promotionsversuche unternommen worden sind.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, Marvin Alexander Peters, in Kenntnis der Strafbarkeit einer falschen Eidesstattlichen Versicherung, folgendes an Eides Statt:

Meine vorliegende Dissertationsschrift wurde von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Marvin Alexander Peters  
Geburtsdatum/-ort: 07.02.1973 in Bremen  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

1980 - 1983 Grundsschule Oberneuland  
1983 - 1992 Ökumenisches Gymnasium, Bremen  
Juni 1992 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

## Hochschulausbildung

1992-2000 Studium der Chemie an der Universität Bremen  
2000 Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Beyersmann  
September 2000 Diplom in Chemie

## Auslandsaufenthalte während des Studiums

1996-1997 Auslandsaufenthalt an der University of Maryland at College Park, USA

## Promotion

Seit Oktober 2000 Dissertation am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg unter der Leitung von PD Dr. Ingolf Bach, Thema: Funktionen der Ubiquitinligasen RLIM und Rnf6 in der Regulation von LIM-Domänen Proteinnetzwerken



## Publikationsliste

Becker T., Bossenz M., Tursun B., Schlüter A., Peters M.A., Becker C.G., Ostendorff H.P., and Bach I. (2003). Comparing protein stabilities during zebrafish embryogenesis. *Methods Cell Sci.* 25, 85-9.

Kramer, O.H., Zhu, P., Ostendorff, H.P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M.A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., and Gottlicher, M. (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *Embo Journal* 22, 3411-3420.

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

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