

Aus der Abteilung für Virologie,
Fachrichtung Mikrobiologie und Hygiene,
Bereich der Klinischen Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. Müller-Lantzsch

**EXPRESSION
DES DIGEORGE CRITICAL REGION 6 PROTEINS**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2005

vorgelegt von Björn Jürgen Schwalbert
geboren am 19.06.1974
in Calw

A Inhaltsverzeichnis

A Inhaltsverzeichnis	I
-----------------------------	----------

B Abbildungsverzeichnis	V
--------------------------------	----------

C Abkürzungsverzeichnis	VI
--------------------------------	-----------

1a Zusammenfassung	1
---------------------------	----------

1b Summary	2
-------------------	----------

2 Einleitung	3
---------------------	----------

2.1 Viren	3
2.2 Epstein-Barr Virus	3
2.2.1 EBV assoziierte Erkrankungen	4
2.2.2 Das EBV-Genom	4
2.2.3 Die Kernproteine	5
2.2.4 Velokardiofaziales Syndrom	7
2.2.5 DiGeorge Syndrom (DGS)	7
2.2.6 DiGeorge Critical Region 6	10
2.3 Ziele der Arbeit	14

3 Material **15**

3.1	Chemikalien, Membranen, Filter	15
3.2	Puffer und Lösungen	16
3.3	Enzyme	18
3.4	Größen und Molekulargewichtsmarker	18
3.4.1	DNA-Größenmarker	18
3.4.2	Protein und Molekulargewichtsmarker	19
3.5	Antikörper	19
3.6	Zelllinien	20
3.7	Bakterienstämme	20
3.8	Nähr- und Kulturmedien	20
3.8.1	Nährmedien für Bakterien	20
3.8.2	Kulturmedien für Säugerzellen	21
3.9	Vektoren	21
3.9.1	pGEM TM -T Vektor	21
3.9.2	pSG5 Vektor	22
3.9.3	Effektorplasmide	23
3.10	Oligonukleotide (Primer)	23
3.11	Computersoftware	24
3.12	Verwendete Laborgeräte	24

4 Methoden **4**

4.1	Bakterien-Techniken	25
4.1.1	Aufzucht und Lagerung von Bakterien	25
4.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien	25
4.1.3	Transformation kompetenter Bakterien	27
4.1.4	Blue/White Screening	27
4.2	Kulturen eukaryotischer Zellen	28
4.2.1	Kultur von Monolayerzellen	28

4.2.2 Kultur von primären Zelllinien	28
4.3 Calciumphosphat-Transfektion von DNA in Zellen	29
4.4 Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGene™	30
4.5 DNA-Techniken	30
4.5.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
4.5.2 Verwendete Reagenzien	31
4.6 Isolierung von Plasmid-DNA	32
4.6.1 Analytische Isolierungen von Plasmid-DNA aus Bakterien (Minipräparation)	32
4.6.2 Präperative Plasmidisolierung (Nukleobond™)	33
4.6.3 Photometrische Konzentrations-u. Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	34
4.6.4 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisieren	35
4.6.5 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	36
4.7 Enzymatische Modifikationen von DNA	36
4.7.1 Spaltung v. DNA durch Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau)	36
4.7.2 Dephosphorilierung von Vektor-DNA	37
4.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten	38
4.7.4 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA	39
4.7.5 Herstellung eines Agarosegels	40
4.7.6 Agarosegelelektrophorese	41
4.7.7 Gene-Clean™-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
4.7.8 Nukleo-Spin™-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	42
4.8 Proteintechniken	42
4.8.1 Herstellung v. 2x Sample-Buffer-Proteinextrakten a. eukaryotischen Zellen	42
4.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
4.8.2.1 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	44
4.8.3 Western-Blot (Immunoblot)	46
4.8.3.1 Proteintransfer	46
4.8.3.2 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	47
4.8.3.3 Entfernung gebundener Antikörper nach ECL™-Färbung (Stripping)	47
4.8.4 Hemmung der Proteinbiosynthese	48
4.8.4.1 Stabilitäts-Bestimmung des DGCR6-Proteins	48
4.8.5 Immunfluoreszenzen	49

5 Ergebnisse **50**

5.1 Grundlagen	50
5.2 Herstellung eines DGCR6/L-Proteins mit HA-“Tag“	50
5.2.1 PCR-Amplifikation und Klonierung von pSG5-HA-DGCR6	50
5.2.2 Expression des HA-DGCR6/L in eukaryotischen Zellen	52
5.2.3 Nachweis des HA-DGCR6/L-Proteins mit Hilfe der DGCR6 spezifischen Antikörper	53
5.2.4 Nachweis des endogenen DGCR6/L-Proteins	53
5.2.5 Differenzierung der Homolge DGCR6 und DGCR6L	54
5.2.6 Bestimmung der Halbwertszeit des DGCR6/L-Protein	58
5.2.7 Analyse der subzellulären Lokalisation des DGCR6/L	61

6 Diskussion **63**

6.1 Klonierung des HA-DGCR6 Effektorplasmids	64
6.2 Eukaryotische Expression des HA-DGCR6/L	64
6.3 Nachweis des endogenen DGCR6/DGCR6L-Proteins	65
6.4 Untersuchungen zur Halbwertszeit des DGCR6/L-Proteins	67
6.5 Subzelluläre Lokalisation des DGCR6/L-Proteins	68
6.6 Ausblick	69

7 Literaturverzeichnis **71**

8 Publikationen **85**

9 Dank **86**

10 Lebenslauf **87**

B Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Organisation des EBV- Episoms	5
Abbildung 2.2	Entwicklung der Kiemenbögen	8
Abbildung 2.3	Schema über die Entwicklung der Schlundtaschen und Kiemenbögen.	8
Abbildung 2.4	Schematische Darstellung der sc11.1 Duplikation auf Chr.22q11.	12
Abbildung 3.1	Schematische Darstellung des Vektors pGEM™-T	22
Abbildung 3.2	Schematische Darstellung des Vektors pSG5	23
Abbildung 5.1	Elektrophorese d. <i>EcoRI</i> Verdau eines pSG5-HA-DGCR6 Konstrukts	51
Abbildung 5.2	Schematische Darstellung des pSG5-HA-DGCR6-Konstruktes	52
Abbildung 5.3	Western-Blot; HeLa-Zellextrakte pSG5-HA-DGCR6, Nachweis mit anti-HA-Antikörper	52
Abbildung 5.4	„Gestrippter“ Western-Blot; HeLa-Zellextrakt pSG5-HA-DGCR6, Nachweis mit anti-DGCR6-Antikörper; 7C8-2	53
Abbildung 5.5	Endogen nachgewiesenes DGCR6-Protein in primären Präputium-Fibroblasten	54
Abbildung 5.6	Western-Blot von Extrakten aus COS1-Zellen, die mit Konstrukten der Klone #1 und #6 pSG5-HA-DGCR6/L transfiziert wurden	57
Abbildung 5.7	Western-Blot: pSG5-HA-DGCR6 u. pSG5-HA-DGCR6L Konstrukte in COS1-Zellen mit der Gegenüberstellung des endogenen DGCR6 der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-435	58
Abbildung 5.8	Halbwertszeit Bestimmung: Western-Blot von Extrakten aus HeLa-Zellen, welche mit pSG5-HA-DGCR6-Konstrukten transfiziert wurden	59
Abbildung 5.9	Halbwertszeitbestimmung Western-Blot von DGCR6/L COS1-Zellextrakten, welche mit pSG5-HA-DGCR6-Konstrukten transfiziert wurden	60
Abbildung 5.10	Halbwertszeitbestimmung von DGCR6/L (p53) in Zellextrakten primärer Fibroblasten; Western-Blot	61
Abbildung 5.11	Immunfluoreszenz zur subzellulären Lokalisation des DGCR6/L	62

C Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
α	anti
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphat-Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
b	Base
bp	Basenpaar
BL	Burkitt Lymphom
BSA	bovine serum albumine
C-	Carboxy-
CIP	calf intestinal phosphatase
CMV	Cytomegalievirus
CR	critical region
Δ	Delta, Deletion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DiGe	DiGeorge (-Syndrom)
EBNA	Epstein-Barr virus nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr virus
ECL	enhanced chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

FKS	fötale Kälberserum
Gly	Glycin
gp	Glycoprotein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin Triphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HD	Hodkin Disease
His	Histidin
Ig	Immunglobulin
IM	Infektiöse Mononukleose
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalaktopyranosid
kbp	Kilobasenpaar
kDA	Kilodalton
λ	Wellenlänge
LB	Luria Broth
MCS	multi cloning site (Polylinkerregion)
M	Molar
m	Milli
μ	Mikro
mA	Milliampere
min	Minute
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mRNA	messenger RNA
N-	Amino-
n	Nano
NPC	Nasopharynxcarcinom
ori	origin of replication (Replikationsursprung)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffred saline

PCR	polymerase chain reaction
Pox	Peroxidase
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SB	sample buffer
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ss	Single strang
SV40	Simian Virus 40
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N,-Tetramethylethyendiamin
Taq	Thermus aquaticus
TAE	Tris/Natriumacetat/EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	Ultra Violett
V	Volt
mV	Millivolt
wt	Wildtyp
X-gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid

1a Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus (EBV) verursacht die infektiöse Mononukleose und ist an der Genese verschiedener humaner Tumorerkrankungen ursächlich beteiligt. Die EBV-kodierten Kernantigene 2 und 3C (EBNA2, EBNA3C) stellen Schlüsselgene der EBV-vermittelten Tumorgenese dar. EBNA3C wird mit der Metastasierung EBV-positiver Tumore in Verbindung gebracht.

Bei der Suche nach zellulären Partnerproteinen von EBNA2 und EBNA3C wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment mit *Saccharomyces cerevisiae*, das DGCR6-Protein als potentieller Bindungspartner identifiziert (Grässer, 2003, unveröffentlicht).

Für DGCR6/DGCR6L wurde ebenfalls eine Rolle bei der Metastasierung postuliert: von EUER et al., 2002 wurde gezeigt, dass die mRNA des DGCR6/DGCR6L-Gens in einem Subklon (4A4) der metastasierenden Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-435 im Vergleich zum nicht metastasierenden Subklon (2C5) verstärkt exprimiert wurde.

Das DGCR6-Gen liegt in zwei hoch konservierten Kopien (DGCR6/DGCR6L) auf dem Chromosom 22q11 vor. Bislang waren weder das DGCR6-Protein noch das Homologe DGCR6L-Protein beschrieben worden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Expression des DGCR6- bzw. des DGCR6L-Proteins in eukaryotischen Zellen. Anschließend wurden die Proteine zum Testen DGCR6-spezifischer monoklonaler Antikörper eingesetzt, welche in einer parallel durchgeführten Diplomarbeit von Dipl. Biol. T. Pfuhl hergestellt wurden (PFUHL et al., 2005) Es wurden zunächst Fusionsproteine mit einem N-terminalen HA-Epitop generiert, die mit dem kommerziell erhältlichen anti-HA-Antikörper 3F10 (Roche) anfärbbar waren, da zu diesem Zeitpunkt noch keine DGCR6 spezifischen Antikörper verfügbar waren.

Mit diesem Antikörper konnte nun auch das endogene DGCR6/DGCR6L nachgewiesen werden. Die Analyse der subzellulären Lokalisation zeigte, dass es sich bei DGCR6/DCGR6L vorwiegend, aber nicht ausschließlich, um phosphorylierte Kernproteine, mit unterschiedlichen Laufstrecken in der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, handelt. Es konnte gezeigt werden, dass das unterschiedliche Laufverhalten nicht von der Phosphorylierung abhängt. Unterschiede der Halbwertszeit in verschiedenen Zelllinien können aufgezeigt werden, bedürfen aber noch weiterer Untersuchungen.

1b Summary

The Epstein-Barr Virus (EBV) causes infectious mononucleosis and plays a role in the pathogenesis of various human malignancies. The EBV nuclear antigens 2 and 3c (EBNA2 and EBNA3c) are essential to tumor development. EBNA3c is associated with metastatic disease in EBV-positive malignancies.

The DGCR6-protein has been identified as a potential cellular binding partner for EBNA2 and EBNA3c by two-hybrid analysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Grässer, 2003, unpublished).

Recently, a role for DGCR6 in metastatic disease has also been proposed. Euer et al. (2002) demonstrated increased expression of DGCR6 mRNA in a subclone (4A4) of the metastasizing breast cancer cell line MDA-MB-435, as compared to a non metastasizing subclone (2C5).

Two highly conserved copies of the DGCR gene – DGCR6 and DGCR6L – are found on chromosome 22q11. Neither DGCR6-protein nor its homologue DGCR6L-protein have previously been characterized. The aim of this study was therefore the expression of the DGCR6/DGCR6L-proteins in eukaryotic cells. As there were no commercially available DGCR6 specific antibodies, fusion proteins with a N-terminal HA epitope were first generated which could be detected with anti-HA antibody 3F10 (Roche). The proteins were then used to test newly developed DCGR6-specific monoclonal antibodies (PFUHL et al., 2005). These antibodies were then used to mark endogenous DGCR6/DGCR6L.

Subsequent analysis of their sub-cellular localization revealed DGCR6/DGCR6L to be predominantly, although not exclusively, nuclear phosphoproteins which migrate with slightly different mobility in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The different mobility was found not to be due to phosphorylation. The two proteins appear to display different half-lives in various cell lines, but the relevance of this finding is still unclear and requires further study.

2 Einleitung

2.1 Viren

Viren besitzen folgende gemeinsame Merkmale: sie enthalten als genetische Information RNA oder DNA und sie verfügen nicht über die zur Replikation notwendigen Enzyme und Organellen. In Abhängigkeit vom Virustyp liegen die Nukleinsäuren als Einzel- oder Doppelstrang vor. Ein aus viralem Protein bestehendes Kapsid schützt das Genom; komplexe Virionen sind von einer lipidhaltigen Hülle (Envelope) umgeben. Diese Hülle stammt zum Teil von der Wirtszelle. Häufig sind virale Glykoproteine in die Virushülle eingelagert, welche aus dieser herausragen (Spikes) und so wiederum für die Infektiosität eine Rolle spielen.

2.2 Das Epstein-Barr Virus

Im Jahre 1964 gelang den Forschern Tony Epstein, Budd Achong und Yvonne Barr der elektronenmikroskopische Nachweis eines Virus in Burkitt-Lymphomzellen, welches heute als Epstein-Barr Virus (EPSTEIN et al., 1964) bekannt ist.

Das Virus zählt zur Gattung der *Lymphocryptoviridae* innerhalb der Familie der γ -*Herpesviridae*. Die Vertreter dieser Gruppe weisen eine starke Ähnlichkeit in ihrer Genstruktur und ihrem Wirtsspektrum auf.

Das Epstein-Barr Virus verfügt über den typischen Aufbau der Herpesviren. Es besitzt ein aus 162 Kapsomeren bestehendes, ikosaedrisches Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 100-110 nm, welches das 172 kbp lange doppelsträngige, lineare DNA Genom umschließt. Das Nukleokapsid ist von einer Envelope mit Spikes umgeben (ROIZMAN, 1990). Zwischen Kapsid und Hüllmembran befindet sich eine oft asymmetrisch verteilte, amorphe Proteinschicht, das Tegument (RICKINSON et al., 1996).

Man unterscheidet zwei EBV- Typen (Typ 1 und Typ2), welche sich durch Variationen in den primären Aminosäuresequenzen der EBV- Kernantigene EBNA 2, -3A, -3B und -3C auszeichnen (SAMPLE et al., 1990). In den Industrienationen ist Typ 1 dominierend, während in den übrigen Ländern ein eher ausgeglichenes Verhältnis der beiden Typen vorherrscht (SIXBEY, 1989; ZIMBER et al., 1986; ROWE et al., 1989).

2.2.1 EBV assoziierte Erkrankungen

Das große Interesse an der Erforschung der γ -Herpesviren ist auf deren Assoziation mit Zellproliferation und Tumorentstehung zurückzuführen. Das EBV steht in direktem Zusammenhang mit polyklonalen B-Lymphproliferativen Erkrankungen, wie der Infektiösen Mononukleose (IM, Pfeiffersches Drüsenfieber), die eine selbstlimitierende lymphoproliferative Erkrankung darstellt. Eine Assoziation des Epstein-Barr Virus mit der Entstehung des Burkitt-Lymphoms (BL) (BURKITT, D. 1958), des Hodgkin-Lymphoms (HD, Hodgkin Disease), des Nasopharynxkarzinoms (NPC) und bestimmter T-Zell-Lymphome gilt als gesichert.

2.2.2 Das EBV- Genom

Das EBV- Genom wurde als erstes Herpesvirusgenom vollständig kloniert und sequenziert (SKARE & STROMINGER et al., 1980, ARRAND et al., 1981, POLACK et al., 1984). Es liegt im Nukleokapsid des Virions als lineare, doppelsträngige DNA mit einer Größe von 172kbp vor (BAER et al., 1984) und hat einen GC-Gehalt von 60% (PRITCHETT et al., 1975, HAYWARD et al., 1977). Die 500bp langen, terminalen Sequenzwiederholungen (terminal repeats, TR) (KINTNER et al., 1979) an den Enden des Genoms sind für dessen Zirkularisierung essentiell.

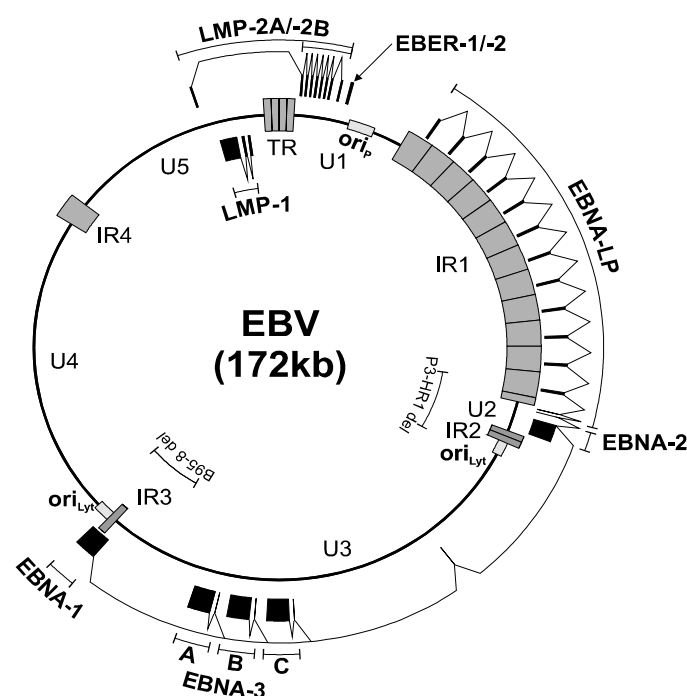


Abb.: 2.1: Organisation des EBV- Episoms, wie es zirkularisiert an den TR nach Infektion der Wirtszelle vorliegt. **Innen** dargestellt die relative Position der repetitiven und singulären Sequenzen und Replikationsursprünge. **Außen** dargestellt, die relative Position der latenten Transkripte und Exons (modifiziert nach KIEFF, 1996 & GRUNDHOFF, 1999)

2.2.3 Die Kernproteine

Die Transkripte der sechs EBV- Kernantigene (Epstein-Barr virus encoded nuclear antigens, EBNA) entstehen durch differentielle Splicevorgänge aus einem gemeinsamen, über 100 kb großen Primärscrip.

EBNA1 ist ein 76 kDa großes Phosphoprotein, das in dimerisierter Form im Nukleoplasma vorliegt. Eine hydrophile Domäne vermittelt die Bindung von EBNA1 an episomale EBV-DNA und Chromatin (ARMBINDER et al., 1991; FRAPPIER et al., 1997). Das Protein ist essentiell sowohl für die Replikationsinitiation des viralen Genoms (REISMAN et al., 1986; LUPTON et al., 1985; RAWLINS et al., 1985), als auch für die Persistenz des Episoms und somit für den Erhalt der viralen Latenz. EBNA1 zeigt in Nacktmäusen onkogenes Potential (WILSON et al., 1996/1992). In Burkitt-Lymphomen kann oftmals nur EBNA1 nachgewiesen werden, daher ist eine Tumorinduktion *in vivo* vorstellbar. Durch Glycin-Alanin-Sequenzwiederholungen entgeht EBNA1 als einziges EBV-Protein einer MHC-I-Präsentation und ruft keine cytotoxische T-Zellantwort hervor (LEVITSKAYA et al., 1995).

EBNA2 ist ein ca. 85 kDa großes Protein (PETTI et al., 1990; GRASSER et al., 1991), das zusammen mit EBNA-LP als erstes virales Protein im Ablauf einer EBV-Infektion exprimiert wird (ROONEY et al., 1989). Es ist essentiell für die Etablierung der Latenz und die Immortalisierung von B-Zellen (COHEN et al., 1989; HAMMERSCHMIDT et al., 1989). EBNA2 wirkt als Transkriptionsaktivator sowohl für zelluläre als auch virale Gene, z.B. durch Induktion des C-Promotors (WOISETSCHLAEGER et al., 1991; SUNG et al., 1991), welcher die Expression der EBNA Produkte reguliert. EBNA2 ist selbst nicht in der Lage an die DNA zu binden, sondern vermittelt diesen Effekt indirekt über eine Kooperation mit zellulären Faktoren, wie RBPJ κ (Recombinationsignal Binding Protein κ , CBF1) (WALTZER et al., 1994; ZIMBER-STROBEL et al., 1994; GROSSMANN et al., 1994; HENKEL et al., 1994). Die Interaktion von RBPJ κ und EBNA2 ist notwendig, aber nicht ausreichend für die Genexpression (MEITINGER et al., 1994). Bei der Suche nach

Partnerproteinen von EBNA2 und EBNA3C (s.u.) wurde das DGCR6-Protein als Bindungspartner sowohl von EBNA2 als auch EBNA3C identifiziert (F. A. Grässer unveröffentlichte Daten). Das DGCR6 ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

EBNA3A, 3B, 3C sind zu einander stark homologe Kernproteine von 944, 937 und 992 Aminosäuren, deren Transskripte vom C-Promotor initiiert werden. Sie bestehen aus je einem kleinen 5'- und einem großen 3'-Exon (RICKSTEN et al., 1988; SHIMIZU et al., 1988). Alle EBNA3 Proteine sind phosphoryliert und im Kern latent infizierter Zellen lokalisiert. Die Proteine EBNA3A und 3C sind essentiell für die B-Zell-Transformation, 3B ist für die Immortalisierung nicht nötig (TOMKINSON et al., 1993). EBNA3B ist hoch immunogen und stellt eines der Hauptziele der cytotoxischer T-Zellen dar (RICKINSON et al., 1997a/b). EBNA3 -Varianten interagieren mit RBPJ κ und sind so in der Lage, limitierend auf die EBNA2-vermittelten Promotoren zu wirken (MARSHALL et al., 1995; RADKOV et al., 1997; ROBERTSON et al., 1995/1996; WALTZER et al., 1996). EBNA3C ist ein 155 kDa großes Protein, das als Transaktivator zellulärer und viraler Gene fungiert. Es induziert den LMP I- und LMP II- Promotor (LE ROUX et al., 1994; MARSHALL et al., 1995; ROBERTSON et al., 1996; ZHAO et al., 2000) und reprimiert den C-Promotor (RADKOV et al., 1997). Zahlreiche Proteine wurden als Interaktionspartner identifiziert, wie zum Beispiel TBP, die Histon -Deacetylase 1 (HDAC1), das humane DEAD-Box -Protein DP103, Prothymosin- α , der Koaktivator p300 und Nm23-H1. Die biologische Relevanz dieser Interaktionen steht größtenteils noch aus (BAIN et al., 1996; RADKOV et al., 1999; GRUNDHOFF et al., 1999; COTTER et al., 2000; SUBRAMANIAN et al., 2001). EBNA3C ist in der Lage den Cyclin/cdk-Rb-E2F-Signalweg, welcher den Übergang von der G1- Phase des Zellzyklus reguliert, zu unterbrechen. In Zellmigrationsversuchen wurde der Effekt von EBNA3C auf die antimetastatische Funktion des Nm23-H1 untersucht. Da die Suprimierung von Nm23-H1 die Metastasierung von Mamma-Ca und Burkitt-Lymphom-Zellen zu begünstigen scheint (SUBRAMANIAN et al., 2002a/b), führt dies zu der Annahme, dass EBNA3C in die Einleitung metastatischer Prozesse involviert ist.

2.2.4 Velokardiofaziales Syndrom (VCFS)

Für das Velocardiofaciale Syndrom (VCFS), beschreibt die Velo – Cardio – Facial Syndrome Educational Foundation (www.vcfsef.org) über 180 Einzelfehlbildungen, die zum Teil auch in Kombination vorkommen können. Zu den Charakteristika gehören Lippen- Kiefer- Gaumen-Spalten, Herz/Aorten- Fehlbildungen, kognitive Defizite und typische Gesichts-Dysmorphien. Ein ähnlicher Ursprung der Erkrankungen wie beim DGS wurde aufgrund der überlappenden phänotypischen Ausprägungen vermutet und von Driscoll und Mitarbeitern 1992 bestätigt. Die Erkrankungen gehen auf eine Mikrodeletion auf dem langen Arm (q11.2) des Chromosom 22 zurück (DRISCOLL et al., 1992). Eine exakte Differenzierung zum DiGeorge-Syndrom ist jedoch nicht immer möglich, sodass VCFS/DGS oft zusammen genannt werden, oder aber mit ihrem Akronym „CATCH 22“, das von der *Newcastel Upon Tyne Group* vorgeschlagen wurde, bezeichnet werden.

2.2.5 DiGeorge –Syndrom (DGS)

Das nach Dr. Angelo DiGeorge, (Pädiater, Philadelphia geb.1912) 1968 erstmals benannte Syndrom (DI GEORGE, 1968). Das DiGeorge–Syndrom (DGS) wird ebenfalls synonym auch als Syndrom der 3. und 4. Schlundtasche oder „22q11.2 Deletions Syndrom“ (22qDS) bezeichnet. Es wird zu der Gruppe von Krankheiten gerechnet, die unter dem Akronym „CATCH22“ (Cardiac Abnormal facies, Thymic hypoplasia, Cleft palate, Hypocalcemia, Chromosome 22) zusammengefasst sind. Dazu zählt auch das Velocardiofaciale Syndrom (VCFS). Diese embryopathogenetische Hemmungsfehlbildung der dritten und vierten Schlundtasche manifestiert sich etwa in der 12. Schwangerschaftswoche und repräsentiert einen der häufigsten, mit 1:3000 bis 1:5000 Fällen pro Lebendgeborenen, humanen genetischen Defekte, der unter anderem mit einer Entwicklungsstörung der Thymusanlage auftritt, was zu einem Ausfall der zellulären Immunität führt. Zudem treten noch weitere Fehlbildungen und Entwicklungsdefizite in unterschiedlicher Vielfalt und Prägnanz auf, wie zum Beispiel Hypo- oder Aplasie der Nebenschilddrüse, die meist mit einer hypokalzämischen Tetanie einhergeht. Kardiale Fehlbildungen weisen ca. 74% der Patienten auf (MC DONALD - MC GINN et al., 1999) und sind somit nach der Trisomie 21 der häufigste Grund für eine Fallot-Tetralogie (1. Pulmonalstenose, 2. Ventrikelseptumdefekt, 3. reitende Aorta, 4. Rechtsherzhypertrophie).

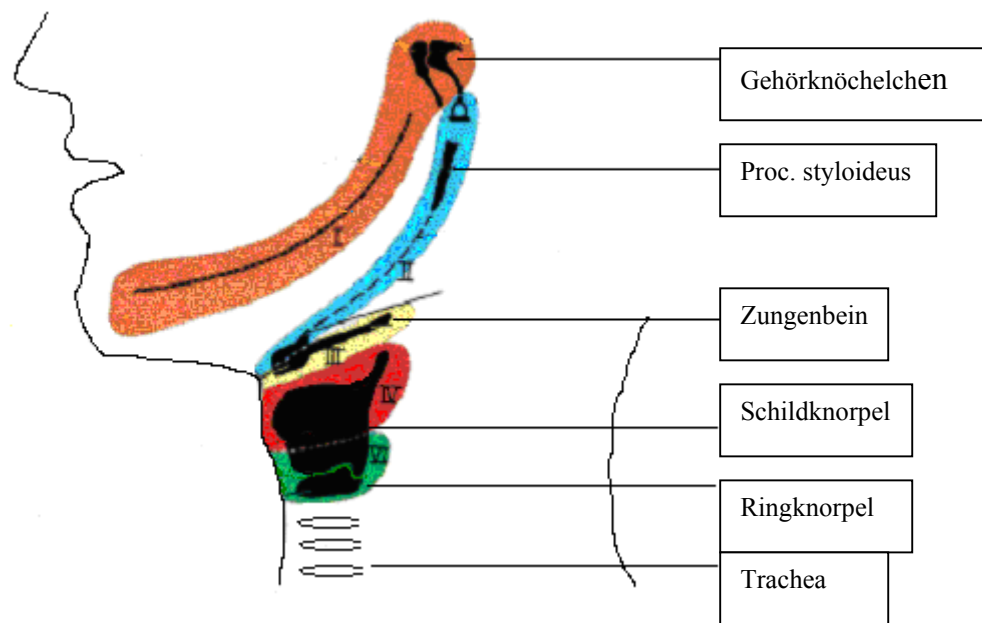


Abb.2.2: Entwicklung der Kiemenbögen: ●1. Kiemenbogen, ●2. Kiemenbogen, ●3. Kiemenbogen, ●4. Kiemenbogen, ●6. Kiemenbogen, mit den korrespondierenden Knorpelanteilen.

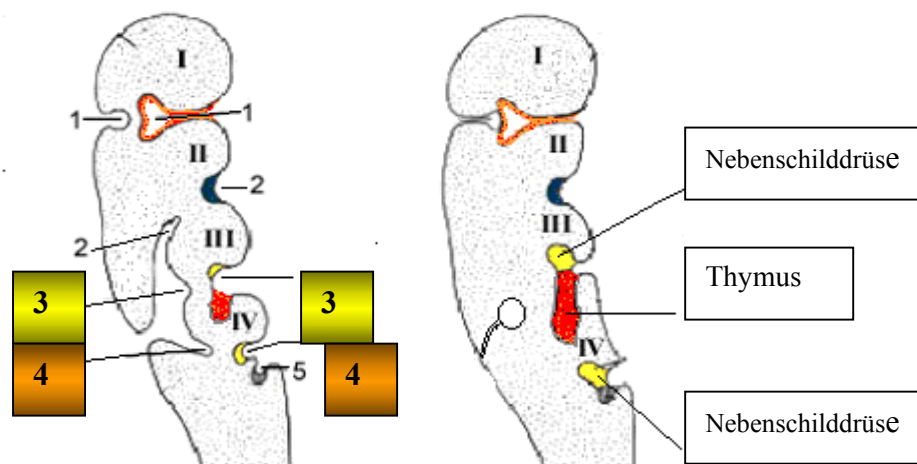


Abb. 2.3: Schema über die Entwicklung der Schlundtaschen und Kiemenfurchen. Im Gebiet der Kiemenbögen (römische Ziffern) entstehen zwischen den Bögen 5 Rinnen, die zu Schlundtaschen werden (arabische Ziffern). Aus der 3. Schlundtasche bildet sich der Thymus, aus der 4. Schlundtasche die Nebenschilddrüse und Teile des Thymus.

Pathogenese: Die fehlerhafte Morphogenese, bevorzugt der 3. und 4. entodermalen Schlundtaschen (=Gebiet des Schlunddarms, innen), sowie der korrespondierenden ektodermalen Kiemenbögen, aus denen sich Thymus und Nebenschilddrüse entwickeln (**Abbildung 2.2 und 2.3**). Daneben können aber die 1., 2. und 5. Schlundtasche sowie alle Kiemenbögen betroffen sein (THOMAS et al., 1997). Lippen, Tonsillen und Ohren bilden sich aus der 1. und 2. Schlundtasche, der ultimobronchiale Körper und die Pulmonalarterie aus der 5. Schlundtasche. So wird die Variabilität der phänotypischen Ausprägung erklärt. Das DGS zählt zu den Neurocristopathien, da eine Störung der Migration und Interaktion von Zellpopulationen der zephalen Neuralleiste vorliegt. Aufgrund einer unzureichenden Interaktionen von Zellen der Schlundtaschen mit denen der Kiemenbögen, ist die in der 4. bis 5. Embryonalwoche beginnende Entwicklung und anschließende Kaudalwanderung des Thymus und der Nebenschilddrüsen gehemmt. Die fehlerhafte Differenzierung von Philtrum (Rinne in der Mitte der Oberlippe), Ohrhöckerchen, Herzscheidewänden und embryonalen Aortenbögen stehen sowohl zeitlich als auch topographisch in engem Zusammenhang (**Abbildung 2.2**). Die molekulargenetische Analyse eines großen Patientenkollektivs ergab, dass bei über 90% der betroffenen Kinder eine Mikrodeletion in der Region 22q11.2 vorliegt (LEVY-MOZZICONACCI et al., 1994). Die meisten Patienten mit DGS haben eine große Deletion von 1-2 Mb innerhalb 22q11. Die gewöhnlich deletierte Region ist die DiGeorge Critical Region (DGCR). Die Position der „minimal critical region“ auf Chromosom 22, die eine Krankheit auszulösen vermag, konnte mittels DNA-Markern verfeinert werden (LINDSAY et al., 1993; HALFORD et al., 1993a). Die Größe der Deletion steht aber in keinerlei Verhältnis zu der phänotypischen Ausprägung der Krankheit (VANTRAPPEN et al., 1999). Auch wenn viele Überschneidungen der Merkmale bei den Krankheitsbildern vorliegen, sind die charakteristischen Hauptmerkmale stark unterschiedlich. Während bei Neugeborenen mit komplexen, kongenitalen, kardialen Fehlbildungen in Verbindung mit einer Hypokalzämie und Immundefizit gewöhnlich eher ein DGS diagnostiziert wird, wird bei Schulkindern mit Gaumenanomalie, Sprach- und Lernschwierigkeiten eher die Diagnose VCFS gestellt. Global gesehen trennt man den „pharyngealen“ Typ, mit pharyngealen Fehlbildungen vom „neurologisch psychischen“ Typ der vor allem sprachlich-kognitive Defizite aufweist (LINDSAY et al., 2001). Es müssen jedoch auch andere Ursachen in Betracht gezogen werden (VANTRAPPEN et al., 1999). Die Ätiologie des DGS ist nicht eindeutig geklärt. Eine Vielzahl von Faktoren kann offensichtlich zur Auslösung des polytopen Entwicklungsdefekts beitragen. Es wurde beschrieben, dass Alkohol als ein Faktor in Betracht gezogen werden kann. Aber auch Derivate des Vitamin A, z.B. Isoretinoin (bei

Acne conglobata) und Acitretin (bei Psoriasis, oder Lichen ruber planus) können eine „Retinoidembryopathie“ auslösen, die mit Gaumenspalte, kognitiven Defiziten, Herzfehlern und Thymusaplasien einhergehen kann. Für den mütterlichen Diabetes kann das Erscheinungsbild des DiGeorge Syndroms ebenfalls als begünstigend beschrieben werden. Heute gilt als gesichert, dass die Pathogenese des DiGeorge Syndroms heterogener Natur ist (LAMMER et al., 1986).

Diagnose: Ergibt die klinisch anamnestische Diagnostik einen Verdacht auf ein VCFS/DGS, können Deletionen am Chromosom 22q11.2 mittels „Fluoreszenz – in – situ – Hybridisierung“ (FISH – Technik) schnell und zuverlässig nachgewiesen werden (DRISCOLL et al., 1993; DESMAZE et al., 1993). Patienten mit einer 22q11.2 Deletion vererben mit 50% Wahrscheinlichkeit das deletierte Gen. Da aber, wie bereits erwähnt, das phänotypische Ausmaß nicht mit der Art und Größe der Deletion korreliert, gestaltet sich eine pränatale Vorhersage schwierig (LINDSAY et al., 1995).

2.2.6 DiGeorge Critical Region 6 (DGCR6)

Die Mikrodeletion auf Chromosom 22q11.2 wurde als DiGeorge Critical Region (DGCR) bezeichnet. Sie beginnt am Ort D22S75 (N25) und endet bei D22S259 (pR32) (DRISCOLL et al., 1993). Bei mehr als 90% der Patienten mit VCFS/DGS liegt eine Deletion in dieser Region (Typisch Deletierte Region, TDR) von ca. 3Mb vor, die eine geschätzte Zahl von 30 Genen umfasst (**Tabelle 1**). Zudem wurden zwei potentielle offene Leserahmen (ORFs) beschrieben (*DGCR3* und *DGCR4*) (BUDARF et al., 1995).

	Genbank Nr.	Referenz
CLTCL/CLTD/CLH-22	L77568/U41763/X95486-88	GONG et al., 1996
		KEDRA et al., 1996
		SIROTKIN et al., 1996
DGCR2(LAN,IDD)	L77560/X83545	DEMCZUK et al., 1995
		BUDARF et al., 1995a
		WADEY et al., 1995
CTP (DGCR5)	L77567	GOLDMUNTZ et al., 1996

DGS-G	L77564	GONG et al., 1996
DGS-I	L77566	GONG et al., 1996
TBX1	ACoooo91/AF012130	CHEIFFO et al., 1997
DGCR6	X96484	DEMCZUK et al., 1996
ZNF74	X71623	AUBRY et al., 1993
T10	X74505	HALFORD et al., 1993a
HIRA/TULPE1(DGCR1)	X75296/X75295	HALFORD et al., 1993b
LZTR-1	D38946	KURAHASHI et al., 1995
GP1BB	U07983	BUDARF et al., 1995b
GSC-2/GSCL	U96402	FUNKE et al., 1997
		GOTTLIEB et al., 1997

Tab.1: Gene in der DGCR (Auswahl)

Der lange Arm von Chromosom 22 verfügt über relativ viele Gene (SACCONI et al., 1996; DELOUKAS et al., 1998). Im Speziellen ist die Region q11 reich an „low copy repeat clusters“ (LCRs) (HALFORD et al., 1993; COLLINS et al., 1997; EDELMANN et al., 1999; DUNHAM et al., 1999). Auf dem Chromosom 22q11 hat man 8 LCRs gefunden (SHAIK et al., 2001). Durch die Ähnlichkeit von LCR-Sequenzen, kann es zu einer verschobenen Paarung der homologen Chromosomen und zu ungleichem Crossing Over kommen. Weil die Bruchstellen dann meistens im Bereich der LCR22 sind, gibt es eine geringe Variabilität im Ausmaß der Deletionen.

Das DiGeorge Critical Region 6 (DGCR6) Gen wurde 1996 erstmals beschrieben und besitzt eine Homologie zum *Drosophila* Protein gonadal (*gdl*) und zur humanen Laminin γ -1 (*LAMC1*) Kette. Die ursprünglich von DEMCZUK et al., 1996 beschriebene DGCR6 m-RNA ist 1070 Nukleotide lang mit einem offenen Leseraster ORF (open reading frame) von 252 nt und einem abgeleiteten Protein mit 84 AS, bei einem postulierten Molekulargewicht von 9.1 kDa (DEMCZUK et al., 1996). In Folge konnte gezeigt werden, dass die DGCR6 m-RNA 1148 nt lang ist, für 220 AS codiert und in zwei funktionellen Kopien auf dem Chromosom 22q11 vorliegt (EDELMANN et al., 2001). Das davon abgeleitete Protein hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 25 kDa. Die DiGeorge Critical Region 6 ist in der proximalen DGCR sc11.1a, während das DGCR6-like (DGCR6L) im distalen Teil, der sc11.1b Duplikation zu finden ist (**Abbildung 2.4**). Beide Loci liegen in einem Abstand von

1-2 Mb voneinander entfernt und beide sind bei betroffenen DGS/VCFS Patienten deletiert (LINDSAY et al., 1993, 1995). Das Gen befindet sich unmittelbar distal zum low copy repeat 22 (LCR22). Das LCR22 ist die Bruchstelle, die sowohl bei der 3 Mb als auch bei der 1,5 Mb Deletion vorhanden ist. Deshalb ist in den meisten Fällen auch das DGCR6 Gen deletiert. Distal des Gens liegt das Gen PRODH, das für die Prolindehydrogenase codiert. Als Unterscheidungsmerkmal zwischen den „Duplikaten“ dient die Anwesenheit eines Volllänge HERV-K Provirus im proximalen (sc11.1a) Teil. Dieses Virus wurde erst nach dem Divergieren von Menschen und Schimpansen integriert (BARBULESCU et al., 1999). Der sc11.1a Bereich liegt in einer invertierten Kopie proximal eines zweiten LCR22, der bei DGS/VCFS Patienten mit einer 1,5 Mb Deletion als Bruchstelle fungiert. Die Kopie des Gens wird als DGCR6L bezeichnet und teilt mit dem DGCR6 97% Sequenzhomologie. Beide Gene bestehen aus fünf Exons gleicher Länge mit konservierter Intron/Extron Struktur. Die aus der DNA-Sequenz folgende Aminosäuresequenz ist zu 97% identisch. Es wurden sieben Aminosäureunterschiede gefunden, aber kein alternatives Stop Codon. In einer PCR Analyse zeigte sich die Expression des DGCR6 bzw. DGCR6L in praktisch allen Geweben des menschlichen Körpers.

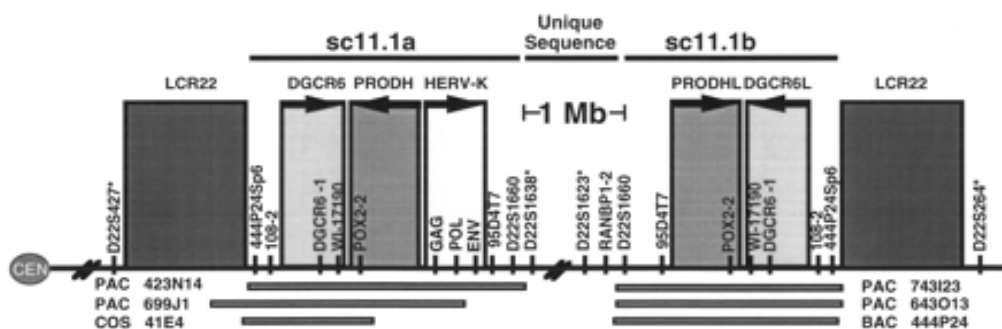


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der sc11.1 Duplikation auf Chr. 22q11

Unmittelbar an die Low Copy Repeat Region (LCR22) grenzen die sc11.1 Duplikationen.

Die Duplikationen sc11.1a und sc11.1b können unterschieden werden, durch die

Anwesenheit eines HERV-K Provirus in der proximalen Kopie (sc11.1a) (EDELMAAN et al., 2001).

Die Vermutung, dass dem DGS/VCFS ein Entwicklungsfelddefekt zugrunde liegt, wird durch tierexperimentelle Untersuchungen, die auf der Ausschaltung („Gene-knock-out-“ oder „Gene-targeting-“ Experimente) von Homeobox-Genen beruhen, gestützt. Homeobox- oder

Hox-Gene sind für die Steuerung komplexer Entwicklungsvorgänge während der Embryogenese verantwortlich. Durch Ausschaltung des Hox-1.5-Gens konnten im Mausmodell schwere Entwicklungsstörungen der 3. und 4. Schlundtasche, sowie der korrespondierenden Kiemenbögen induziert werden. Das Homolog zum murinen Hox-1.5-Gen liegt beim Mensch auf Chromosom 7. Patienten mit VCFS/DGS weisen in der Regel hier keine Anomalie auf. Die charakteristischen phänotypischen Veränderungen bei der Maus deuten jedoch darauf hin, dass Veränderungen entwicklungsfeldkontrollierender Gene für VCFS/DGS verantwortlich sind (CHISAKA & CAPECCHI et al., 1991).

92% der Aminosäuresequenz des humanen DGCR6 stimmen mit dem in der Maus überein, d.h. die Sequenz ist sehr hoch konserviert. Das DGCR6 homologe Gen (mDGCR6) (LINDSAY et al., 1997) liegt bei der Maus auf Chromosom 16. Mit neuen Chromosomen Techniken konnten Deletionen des Bereichs, der auch für die Del22q11-Syndrome beim Menschen verantwortlich ist, durchgeführt werden und die Auswirkungen auf die Mäuse beobachtet werden. Es wurde eine Deletion Df1 generiert, die 18 homologe Mausgene von den 24, die bei Patienten mit der 1,5 Mb Deletion fehlen, umfasst. Bei diesen Mäusen wurden kardiovaskuläre Defekte gefunden, die eine Ähnlichkeit mit denen von VCFS/DGS Patienten aufwiesen (LINDSAY et al., 1999). Eine Deletion des PRODH2/DGCR6 Locus wird in Zusammenhang mit der Entstehung der Schizophrenie gebracht (LIU et al., 2002a,b). Es wird vermutet, dass der Mangel an Prolinhydrogenase Störungen im Prolinstoffwechsel zur Folge hat, durch die es zur Hyperprolinämie kommt. Die hohen Prolinkonzentrationen haben toxische Effekte auf neuronale Zellen von Tieren. Da das PRODH2 Gen in der Nähe des DGCR6 Gens liegt, ist es bei Patienten mit DGS häufig deletiert. Dies könnte ein möglicher Kofaktor für die Entstehung der Schizophrenie sein. Zwei voneinander unabhängigen Studien bei DGS Patienten zeigten, dass bei 25-31% schizophrentypische Verhaltensweisen nachgewiesen werden konnten (PULVER et al., 1994; MURPHY et al., 1999). Deletionen in der 22q11 Region treten bei 0,025% der normalen Bevölkerung auf; erwachsene Schizophrenieerkrankte wiesen in 2% der untersuchten Fälle (KARAYIORGOU et al., 1995) und erkrankte Kinder in 6% der Fälle Deletionen auf (USISKIN et al., 1999). 2002 wurde bei Schizophreniepatienten, die Deletionen im Bereich des PRODH-Gens besaßen, ein erhöhter Prolinspiegel im Blut festgestellt (JACQUET et al., 2002). Im gleichen Jahr fiel das DGCR6 im Rahmen einer Mikrochip-Array-Testreihe auf, bei der verschiedene Gene untersucht wurden, die im Zusammenhang mit der Metastasierung von Brustkrebs stehen (EUER et al., 2002). Das DGCR6 war in einem Subklon der humanen Mammakarzinom Zelllinie MDA-MB435 im Vergleich zum nicht metastasierenden Subklon drastisch hochreguliert.

2.3 Ziele der Arbeit

Im Hefe-Two-Hybrid System konnte gezeigt werden, dass das DGCR6 Protein als potentieller Interaktionspartner sowohl von EBNA2 als auch von EBNA3C fungiert (Unveröffentlichte Daten, Arbeitsgruppe Grässer). Darüber hinaus gab die Hochregulation der DGCR6-mRNA in Mammakarzinomen (EUER et al., 2002) Anlass zu der vorliegenden Arbeit.

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung des DGCR6-Protein als potentieller Bindungspartner der EBV-kodierten EBNA2 und EBNA3C Proteine. Für EBNA3C war eine Funktion bei der Metastasierung von EBV-positiven Tumorzellen beschrieben worden, auch konnte für DGCR6 eine Beteiligung bei der Metastasierung von Mammakarzinom Zellen postuliert werden. Da das DGCR6-Protein bislang nicht identifiziert war, sollten in einer Arbeit von Dipl. Biol. T. Pfuhl monoklonale Antikörper gegen DGCR6 hergestellt werden. Zur Charakterisierung dieser Antikörper wurde in der vorliegenden Arbeit das DGCR6 durch PCR-Amplifikation komplett hergestellt und rekombinant in Säugerzellen exprimiert. Auch die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle sollte mittels Immunfluoreszenzen dargestellt werden. Weiterhin sollte die Stabilität der Proteine in unterschiedlichen Zelllinien untersucht werden.

3 Material

3.1 Chemikalien, Membranen, Filter

Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agarose	Seakem (Rockland, USA)
Amidoschwarz	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin (Binotal™)	Bayer (Leverkusen)
Bactoagar	DIFCO
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Cycloheximid	Sigma
Coomassie Brilliant Blue™ R-250	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Enhanced Chemoluminescence Western Blotting Detection System (ECL™)	Amersham (Freiburg)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethidiumbromid	Sigma
Fötale Kälberserum (FKS)	Seromed (Berlin)
Fugene™-Transfection Reagent	Roche
Glycerin	Serva
Hyperfilm ECL™	Amersham
IPTG	Novagen
Magermilchpulver	Glücksklee (Hamburg)
3-Mercapto-1,2-Propandiol	Sigma
Natriumjodid	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Non-essential Aminoacids	Seromed Biochrom KG
NucleoSpin Extract™	Macherey-Nagel
Nukleotide (dNTPs)	Boehringer (Mannheim)

Penicillin Streptomycin (100X)	PAA Laboratories GmbH
Ponceau S	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva
Triton X-100	Serva
X-Gal (5-Brom-4Chlor-3-Indolyl-bD-Galaktopyranosid)	Sigma
Zellulosefilter Whatman™ #1	Herolab (Maidstone, USA)

Alle weiteren Chemikalien, die verwendet wurden und hier nicht aufgeführt sind, wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in analysereiner Form bezogen.

3.2 Puffer und Lösungen

Amidoschwarz-Entfärbelösung	:	Isopropanol	10% (v/v)
		Essigsäure	10% (v/v)
Amidoschwarz-Färbelösung	:	Isopropanol	25,0% (v/v)
		Essigsäure	10,0% (v/v)
		Amidoschwarz	0,1% (w/v)
Blaumarker	:	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
		Glycerol	50% (v/v)
		EDTA	50mM
Blockingpuffer	:	Magermilchpulver in PBS-Puffer	5% (w/v)
Bottomgelstock für SDS-Gele	:	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
		SDS	0,4% (w/v)
Entfärbelösung	:	Isopropanol	10,0% (v/v)
		Essigsäure	10,0% (v/v)
Ethidiumbromidlösung	:	Ethidiumbromid	10 mg/ml H ₂ O

Laufpuffer:	:	Tris/HCl	0,025 M
		SDS	0,1% (w/v)
		Glycin	0,2 M
PBS	:	NaCl	140 mM
		KCl	25 mM
		MgCl ₂	0,5 mM
		CaCl ₂	1 mM
		Na-K-Phosphat	10 mM
2x SDS-Probenpuffer	:	Tris HCL (pH6,8)	130 mM
SDS	6% (w/v)		
3-Mercapto-1,2-propandiol	10% (v/v)		
Glycerol	10% (w/v)		
Bromphenolblau	0,05% (w/v)		
STET-Puffer	:	Tris (pH 8,0)	10 mM
		EDTA (pH 8,0)	50 mM
		Triton X-100	0,5% (v/v)
		Saccharose	8% (w/v)
		Lysozym	0,5 mg/ml
(Zugabe vor Gebrauch)			
TAE-Puffer 50x	:	Tris	2 M
		Natriumacetat	25 mM
		EDTA	0,5 M
		ad pH 7,8 mit Essigsäure	
TE-Puffer	:	Tris	10 mM
		EDTA	1 mM
		ad pH 7,6 mit Essigsäure	

Transferpuffer	:	Tris/HCl	25 mM
		Glycin	192 mM
		Methanol	20% (v/v)
		SDS	0,05% (w/v)
Uppergelstock für SDS-Gele	:	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
		SDS	0,4% (w/v)

Zusätzliche Puffer werden bei der jeweiligen Methode genannt.

3.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP)	Boehringer (Mannheim)
Lysozym aus Hühnereiweiß	Boehringer (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs Inc. (NEB)
RNAse A	Boehringer (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	Promega
Taq-Polymerase	Pharmacia Biotech oder Sigma
Viralex Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH

3.4 Größen- und Molekulargewichtsmarker

3.4.1 DNA-Größenmarker

1 kb plus DNA ladder™ (Life technologies)

Bei der Agarosegelelektrophorese wurde zur Bestimmung der Größe doppelsträngiger, linearer DNA-Moleküle (0,1-12 kb) eine 1 kb plus DNA Leiter verwendet, die folgende Fragmentgrößen enthält:

12000 , 11000 , 10000 , 9000 , 8000 , 7000 , 6000 , 5000 , 4000 , 3000 , 2000, 1650 , 1000 , 850 , 650 , 500 , 400 , 300 , 200 , 100 bp.

3.4.2 Protein-Molekulargewichtsmarker

Zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen bei der SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde der LMW-Marker („Low molecular weight – Marker“) der Firma Pharmacia eingesetzt.

Er enthält folgende Proteine:

Phosphorylase b	94	kDa
Kälberserumalbumin	67	kDa
Ovalbumin	43	kDa
Carboanhydrase	30	kDa
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	20,1	kDa
Lactalbumin	14,4	kDa

3.5 Antikörper

Die gegen DGCR6 gerichteten monoklonalen Antikörper 7C8-2 (Ratte, IgG). Zusätzlich wurde der Antikörper 3F10 der Firma Roche Biochemicals verwendet, der gegen einen Hämagglutinin (HA) Proteinanteil gerichtet ist und der anti P53 (Ab-6) von der Firma Oncogene™. Alle Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (anti-Ratte- und anti-Maus-Pox) wurden von der Firma Sigma bezogen.

Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

7C8:	1:10
anti HA 3F10:	1:100
anti P53 (Ab-6):	1: 2000

Die Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus- und anti-Ratte-Pox) wurden in der Regel in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt.

3.6 Zelllinien

Immortalisierte Zellen

COS1 : Für diese epitheliale Zelllinie wurde eine CV-1-Zelllinie, eine etablierte Nierenzelllinie von Grünen Meerkatzen, die für die Vermehrung von SV40-Virus permissiv ist, mit einer SV40-Mutante transfiziert, die eine Deletion von 6 bp im Replikationsursprung aufweist und somit nicht mehr replikationsfähig ist (Gluzman, 1981).

HeLa : Humane zervikale Karzinom-Zelllinie (Yee et al., 1985).

Primäre Zellen

Fibroblasten : Primäre Human Fibroblasten Zelllinie aus Präputium Präparaten aus Zirkumzisions Material.

Amnion : Primäre Humane Zelllinie aus Amnion Gewebe.

3.7 Bakterienstämme

E.colipMosBlue: Diese Bakterien stammen aus dem „pMOSBlueT-Vektor“ Kit der Firma Amersham. Sie werden sowohl zur Vermehrung rekombinanter DNA, als auch im Blue-White Screening bei der Klonierung rekombinanter DNA eingesetzt.

E.coliBL21/DE3: Dieser E.coli-Stamm verfügt über eine sehr hohe Expressionsrate und wird deshalb für die Expression rekombinanter Proteine eingesetzt (STUDIER & MOFFAT, 1986).

3.8 Nähr- und Kulturmedien

3.8.1 Nährmedien für Bakterien

Zur Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur wurde 2,5% (w/v) LB-Medium (Luria Broth Base (GIBCO)) angesetzt und autoklaviert.

Zum Ausstrich der Bakterien auf Platten wurden Petrischalen mit 3,75% (w/v) Luria's Agar (GIBCO) hergestellt und autoklaviert.

Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde Ampicillin (0,1% [w/v]) zu den Nährmedien gegeben, da die verwendeten Plasmide ein Ampicillinresistenzgen besitzen.

3.8.2 Kulturmedien für Säugerzellen

DMEM: Zur Kultivierung adhärenter Monolayer-Zellkulturen wurde "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (Bio-Whittaker) (1X) High Glucose verwendet. Dieses Medium wurde jeweils mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom) und einem "4er Antibiotikum" aus 40 U/ml Penicillin-G40, 10 U/ml Moronal, 10 µg/ml Neomycinsulfat und 50 µg/ml Streptomycinsulfat ergänzt.

MEM: Zur Kultivierung Primärer Monolayer-Zellkulturen wurde das Medium MEM EARLE (1X) (Biochrom). Das Medium wurde mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom) Penicillin Streptomycin 100X (PAA Laboratories) und nicht essentiellen AS 100X (Biochrom) versetzt.

3.9 Vektoren

3.9.1 pGEMTM-T Vektor

Der pGEMTM-T Vektor der Firma Promega wird zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Alle PCR-Amplifikate enthalten am 3' Ende ein Desoxyadenosin und können somit ohne einen vorherigen Restriktionsverdau in den mit überstehenden Desoxythymidinenden offenen Vektor inseriert werden. Die Ligation von Produkten ohne überhängende Desoxyadenosinenden erfolgt über die Multiple-Cloning-Site (MCS). Diese enthält Erkennungssequenzen mehrerer Restriktionsenzyme. Der erfolgreiche Einbau des Inserts wird durch die Zerstörung des lacZ-Markergens in einem Blue-White Screening angezeigt. Der pGEMTM-T Vektor besitzt neben den T7- und SP6-spezifischen Promotoren auch zwei „ori's“ (Origin of Replication). Der Bakterien-„ori“ verleiht ihm die Fähigkeit zur autonomen Replikation im prokaryotischen System und der „ori“ aus dem filamentösen Phagen fl ermöglicht ihm die Erzeugung von Einzelstrang-DNA. Für die Selektion transformierter Bakterien besitzt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen.

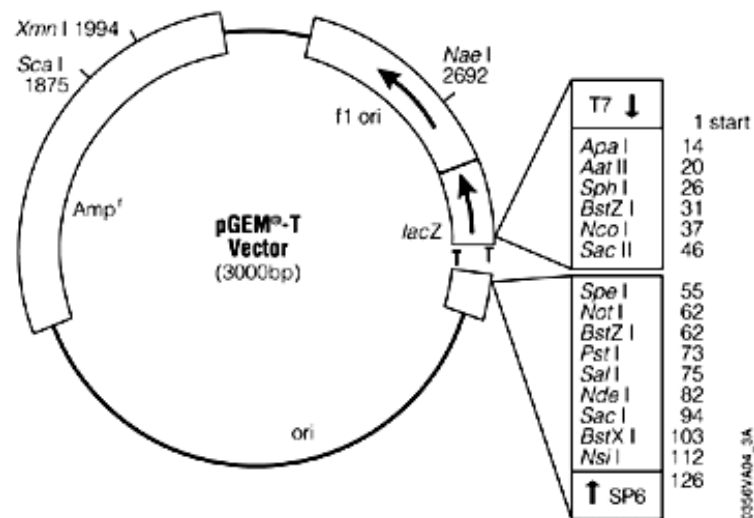


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Vektors pGEM™-T.

3.9.2 pSG5 Vektor

Der pSG5 Vektor der Firma Stratagene wird überwiegend für die Expression im eukaryotischen System eingesetzt. Der Vektor zeichnet sich durch eine hohe Expressionsrate aus, die große Mengen an doppelsträngiger DNA liefert. Zudem kann der Vektor sowohl für in vivo als auch für in vitro Expressionen verwendet werden. Der SV40 Promotor erleichtert die in vivo Expression, während der T7 Promotor die in vitro Transkription des klonierten Inserts vereinfacht. Die Ligation von Produkten erfolgt über die Multiple-Cloning-Site (MCS). Diese enthält die Erkennungssequenzen von EcoRI, BamHI und BglIII. Der pSG5 Vektor besitzt zwei „ori's“ (origin of replication). Der Bakterien „ori“ ermöglicht die autonome Replikation im prokaryotischen System und der „ori“ aus dem filamentösen Phagen f1 ermöglicht die Erzeugung von Einzelstrang-DNA. Für die Selektion in Bakterien und eukaryotischen Zellen enthält der 4,1 kb große Vektor ein Ampicillinresistenzgen.

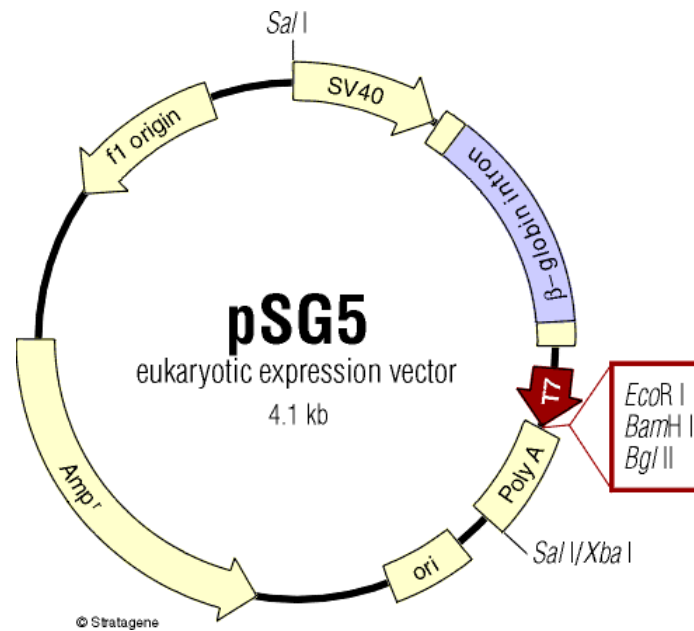


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Vektors pSG5.

3.9.3 Effektorplasmide

pSG5-HA-DGCR6:

Dieses Plasmid wurde hergestellt und diente im Verlauf dieser Arbeit der eukaryotischen Expression des humanen DiGeorge Critical Region 6 Proteins (DGCR6) mit HA-, „Tag“.

3.10 Oligonukleotide (Primer)

Die eingeführten Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung verwendet wurden, sind unterstrichen; das eingeführte Startcodon (ATG) hervorgehoben. Von links sind Bezeichnung, Orientierung und die Sequenz der Oligonukleotide angegeben. Sie wurden über die Firma MWG Biotech bezogen.

DG 5' Bam Eco HA:

5'- GGA TCC GAA TTC **ATG** TAC CCA TAC GAC GTC CCA GAC TAC GCT GAG
CGC TAC GCG GGC GCC TTG - 3'

DG 3' Bam Eco Stop:

5'- GGA TCC GAA TTC AGA TCT **ATG** GTG GGA CAG GGC TGC CTT TC - 3'

3.11 Computersoftware

Zur Textverarbeitung diente Microsoft Word 2002™ (Microsoft Corp.). Grafiken wurde mit dem Programm CorelDRAW 9.0™ (Corel Corp.) erstellt. Nukleotid- und Protein-Sequenzabgleiche wurden über die Internetseiten des NCBI (National Center Of Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/) und des Human Genome Center, Baylor College of Medicine (BCM Search Launcher: www.gc.bcm.tmc.edu:8088/search-launcher/launcher.htm/), sowie angeschlossener Dienste durchgeführt.

3.12 Verwendete Laborgeräte

Blotkammer

LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit

PCR-Maschine

Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research

Photometer

Pharmacia Biotech Ultraspec 3000

Ultraschallgerät

Bronson Sonifier 250

UV-Gerät

MWG Biotech Gelprint 2000 i

Zentrifugen

Heraeus Megafuge 1,0 R (mit Kühlung)

Heraeus Picofuge (Tischzentrifuge ohne Kühlung)

Sigma 202 MK (Tischzentrifuge mit Kühlung)

Mikroskope

Leica DM IRB/E Mikroskop mit Axio-Cam Color Kamera, Zeiss

4 Methoden

4.1 Bakterien-Techniken

4.1.1 Aufzucht und Lagerung von Bakterien

Zur Aufzucht und zum Zwecke der Amplifikation von Plasmiden wurden Bakterien mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. Eine entsprechende Menge LB-Medium wurde mit den Bakterien angeimpft. Zum Animpfen des Mediums können auch Bakterien aus der Stammhaltung (DMSO-Stocks) benutzt werden.

Zur Aufzucht für analytische Zwecke wurden zunächst Bakteriensuspensionen auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien dienten anschließend zum Animpfen von 2,5 ml LB-Suspensionskulturen.

Die LB-Suspensionskulturen wurden für 12-16 Stunden bei 37°C aerob auf dem Schüttler inkubiert. Zur selektiven Kultivierung wurde den LB-Agarplatten und LB-Suspensionskulturen Ampicillin zugegeben (0,1% [w/v]). Zur Stammhaltung wurden 800 µl der Übernachtskulturen mit 20% (v/v) DMSO versetzt. Diese wurden bei -70°C eingefroren und gelagert. Kurzfristig wurden Bakterien in Form von Zellkolonien auf Agarplatten, die mit Parafilm abgedichtet waren, gelagert.

4.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

(CaCl₂/RbCl-Methode; (KUSHNER, 1978 #12))

Bakterien nehmen normalerweise keine Fremd-DNA auf, sondern schützen sich sogar mit speziellen Abwehrmechanismen davor. Für gentechnisches Arbeiten soll nun aber die Fähigkeit der Bakterien sich schnell zu vermehren und somit auch ihre DNA zu replizieren ausgenutzt werden. Außerdem soll bestimmte Plasmid-DNA vermehrt werden. Die Bakterienzelle muss also die fremde Plasmid-DNA aufnehmen können. Um dies zu erreichen, wird eine Kompetenzinduktion der Bakterien durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die Bakterienzellwand durch chemische Einflüsse durchlässig gemacht und DNA kann in die Zelle eingeschleust werden.

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 30 ml SOB-Medium mit bereits kompetenten Bakterien angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200 ml SOB-Medium mit 8 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis die Bakterien sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und die Suspension eine optische Dichte bei 600 nm (OD600) von 0,3 erreicht hatte. Dann wurde die Bakterienkultur in 50 ml Aliquots 15 min auf Eis gehalten und anschließend 5 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Die Bakterienpellets wurden nun in jeweils 16 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2000 rpm für 5 min (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Die Bakterienpellets wurden nun in jeweils 4 ml Transformationspuffer 2 resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -70°C.

Transformationspuffer 1:	RbCl	0,10 M
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,05 M
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 M
	CH ₃ COOH (pH7)	0,03 M
	Glycerol	15,0% (v/v)
	ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	
	pH 5,8 mit 0,2 M CH ₃ COOH eingestellt	

Transformationspuffer 2:	MOPS (pH6,8)	0,500 M
	RbCl	0,010 M
	CaCl ₂ ·H ₂ O	0,075 M
	Glycerol	15% (v/v)
	ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} , sterilfiltriert	

SOB-Medium:	Trypton	20,0 g
	Hefe-Extrakt	5,0 g
	NaCl	0,6 g
	KCl	0,5 g
	ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} , autoklaviert	
	Zugabe von 20 mM MgCl ₂ direkt vor Gebrauch	

4.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

(LEDERBERG and COHEN, 1974)

Mit dem Begriff Transformation wird die Überführung freier, löslicher DNA in eine dafür kompetente Bakterienzelle bezeichnet. Die Methoden der Kompetenzerzeugung und der Transformation sind je nach Art der zu transformierenden Empfängerzelle unterschiedlich. Die eingesetzte, zirkuläre Plasmid-DNA trägt immer die Information für eine selbständige Replikation sowie Gene, die der Zelle eine Resistenz gegen bestimmte Antibiotika (in dieser Arbeit ausschließlich Ampicillin) verleihen. Dadurch wird eine erfolgreiche Selektion von transformierten Zellen gesichert. Für die Transformation wurde ein 200 µl Aliquot kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Etwa 60 µl des Aliquots wurden mit 20 ng Plasmid-DNA, bzw. mit 250 ng DNA (~10 µl) aus einem Ligationsansatz gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit hat die DNA die Gelegenheit sich an die Zelloberfläche der Bakterien anzulagern. Es erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec im Wasserbad, wodurch die Bakterienzellwand kurzfristig permeabel wird und die DNA in die Zelle eindringt. Nach 2 min Abkühlung auf Eis lässt die Permeabilität wieder nach. Dem Bakterienansatz wurde 1 ml LB-Medium zugegeben. Diese Vorkultur wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Um solche Bakterien mit Plasmid zu selektionieren wurde der Ansatz auf LB-Platten, die Ampicillin enthalten, ausplattiert bzw. entsprechendes LB-Medium damit angeimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Vorkultur soll den, durch den Hitzeschock gestressten, Bakterien das Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase erleichtern, bevor sie mit dem Antibiotikum in Kontakt kommen. Damit soll eine Erhöhung der Bakterienausbeute erreicht werden.

4.1.4 Blue/White Screening

Hierbei handelt es sich um eine beliebte Methode, mit deren Hilfe sich der Erfolg der Ligation eines Vektors mit dem entsprechenden Insert nachweisen lässt. Auf der Agarplatte kann optisch unterschieden werden zwischen Klonen, die den Vektor und das eingebaute Insert tragen und solchen, die nur den Vektor ohne ligiertes Insert tragen. Das Prinzip dieses Screenings fußt auf einer enzymatischen Reaktion. Das Enzym β -Galaktosidase wandelt das Substrat X-Gal bei Vorhandensein des Induktors IPTG zu einem blauen Farbstoff um. Die Methode ist nur anwendbar bei Bakterienstämmen, die das

Enzym β -Galaktosidase nicht enthalten (z.B. pMOS-Stamm). Außerdem muss der zu klonierende Vektor das lacZ-Gen enthalten, das für die β -Galaktosidase codiert. Wenn das lacZ-Gen durch den Einbau eines Inserts unterbrochen wird, kann die β -Galaktosidase nicht mehr gebildet werden und die betroffenen Kolonien bleiben weiß. Entsprechend sind Bakterien, die mit einem Vektor ohne entsprechendes Insert transformiert werden (das lacZ-Gen ist nicht unterbrochen) in der Lage β -Galaktosidase zu bilden und die enzymatische Reaktion findet statt. Dies führt zu einer Blaufärbung dieser Kolonien.

4.2 Kultur eukaryotischer Zellen

4.2.1 Kultur von Monolayerzellen

Monolayer Zellkulturen wachsen adhärent auf einer Unterlage. Sie wurden in 20 ml DMEM-Medium, dem 10% FKS und 4er-Antibiotikum zugesetzt war in 75 cm² Flaschen bei 37°C und 7% CO₂ im Brutschrank kultiviert und zweimal wöchentlich durch Andauen mit Trypsin subkultiviert. Dazu wurde das Medium unter sterilen Bedingungen abgenommen, der Zellrasen einmal mit 1,5 ml Trypsin/EDTA gespült und mit 1 ml Trypsin/EDTA, nach kurzer Inkubation bei 37°C und 7% CO₂ abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM-Medium verdünnt und 1 ml der Suspension in eine neue 75 cm² Flasche übertragen und auf 20 ml mit dem supplementierten DMEM-Medium aufgefüllt.

4.2.2 Kultur von primären Zelllinien

Die verwendeten primären Zelllinien wurden entsprechend ihres langsameren Wachstums und ihrer begrenzten Passagierfähigkeit, weniger häufig subkultiviert. Verwendet wurde hierzu MEM-Medium (siehe 3 Material). Verfahren wie bei monolayer Zellkulturen.

4.3 Calciumphosphat-Transfektion von DNA in Zellen

(modifiziert nach MANIATIS et al., 1989)

Calciumphosphat und DNA bilden unlösliche Copräzipitate, die bei Anlagerung an eukaryotische Zellen durch Phagozytose aufgenommen werden können. Adhärenente Monolayerkulturen wurden am Vortag in 10 ml (pro 10 cm Schale), bzw. 4 ml (pro Vertiefung einer 6-Lochplatte), DMEM-Medium (ergänzt mit 10% FKS und 4er-Antibiotikum) so verdünnt "ausgesät", dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine ca. 60%ige Konfluenz erreicht hatten. Die Transfektionsansätze wurden folgendermaßen vorbereitet: Die eingesetzte Plasmid-DNA in gewünschter Konzentration wurde in 420 µl sterilem H₂O aufgenommen. Dann wurde steril unter ständigem Schütteln 60 µl 2M CaCl₂-Lösung und anschließend ein HBS-Gemisch zugetropft. Dieses setzt sich aus zwei Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten zusammen. Das Mischungsverhältnis und somit der erhaltene pH-Wert ist von der verwendeten Zelllinie abhängig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde von dem 2×HBS-Puffer mit pH 6,5 100 µl eingesetzt und von dem mit pH 7,05 370 µl. Die Ansätze wurden 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei die Präzipitation stattfindet. Danach wurde das gebildete Präzipitat von DNA und Kalziumphosphat auf die zu transfizierenden Zellen getropft. Das Präzipitat und damit die zu transfizierende DNA, wurde von den Zellen durch Phagocytose aufgenommen. Nach 4-6 h Inkubationszeit bei 37°C und 7% CO₂ wurden die Zellen zweimal mit PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C und 7% CO₂ für 24-36 h konnten die Zellen geerntet werden, um Proteinextrakte herzustellen.

2× HBS-Puffer

NaCl 280 mM

HEPES 50 mM

Na₂HPO₄ 1,5 mM

pH 7,05 bzw. pH 6,5

(eingestellt mit 0,1 N NaOH)

4.4 Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGene™

FuGene™ ist ein Transfektionsreagenz, das von Roche Biochemicals angeboten wird. Es zeichnet sich durch eine hohe Transfektionseffizienz aus. Außerdem wird im Vergleich zur Calciumphosphatmethode recht wenig DNA benötigt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die entsprechenden Zellen ausgesät, sodass sie einen zu 50% konfluenten Zellrasen bildeten. Die Transfektion wurde nach Firmenvorschrift durchgeführt. Für 10 cm-Zellkultur-Schalen wurden 100 µl serumfreies Zellkulturmedium (DMEM) mit 5µl FuGene™ gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde dieses Gemisch tropfenweise zu 1-2 µg der entsprechenden Plasmid-DNA gegeben. Diese Suspension wurde 15 min bei 37°C inkubiert, damit sich die Micellen bilden können. Schließlich wurde die Suspension auf die ausgesäten Zellen getropft.

4.5 DNA-Techniken

4.5.1 Polymerase - Ketten – Reaktion (PCR)

(SAIKI et al., 1988)

Das enzymatische Verfahren der Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR) ermöglicht es DNA-Sequenzen innerhalb weniger Stunden in exponentieller Weise zu vervielfältigen. Für die PCR werden neben der Ausgang-DNA, spezifische Oligonukleotide (Primer), eine Polymerase und Nukleotide in ausreichender Menge benötigt. Der zu amplifizierende Bereich der Ausgangssequenz wird durch die Bindungsstellen der künstlich synthetisierten Primer bestimmt. Die Reaktion läuft in drei, sich mehrmals wiederholenden Schritten ab. Zunächst wird die Ausgangs-DNA durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Die entstehenden Einzelstränge werden als „Template“ bezeichnet. An diese Einzelstränge binden in einem weiteren Schritt die Primer. Da die Templates unterschiedlich orientiert sind, werden zwei verschiedene Primer benötigt. Die Temperatur, bei der diese als „Annealing“ bezeichnete Anlagerung stattfindet, ist von der Größe und Sequenz der Primer abhängig. Beim nächsten, als „Elongation“ bezeichneten Schritt der PCR verlängert die Polymerase die freien 3' Enden der Primer mit den jeweils zum Einzelstrang der Ausgangs-DNA komplementären Basen. Die Optimale Synthesetemperatur der aus thermophilen Organismen (*Thermus aquaticus*) isolierten Polymerase liegt zwischen 68°C und 72°C.

Nach Beendigung der Elongation beginnt der nächste PCR-Zyklus, wieder bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation.

Bei der Auswahl der Primerpaare wurde berücksichtigt, dass die Primer möglichst ähnliche Schmelztemperaturen besitzen, keine Selbstkomplementarität aufweisen und keine Sekundärstrukturen ausbilden können.

Zur Überprüfung auf eventuelle Kontaminationen wurde zusätzlich eine H₂O-Kontrolle, also ein kompletter Ansatz, aber ohne Matrizen-DNA, gemacht. Abschließend wurden 20 µl von jedem Ansatz in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Im Pipettierschema Tabelle 2 sind die eingesetzten Volumina und Konzentrationen am Beispiel eines 100µl Ansatzes aufgeführt. In Tabelle 3 ist ein das Schema eines verwendeten PCR Standardprogramms dargestellt.

4.5.2 Verwendete Reagenzien

Taq (<i>Thermus aquaticus</i>)-Polymerase (Sigma) :		5 U/µl
10× Polymerase-Reaktionspuffer (Sigma) :	KCl	500 mM
	Tris-HCl, pH 8,3	100 mM
	Gelatine	1 mg/ml
MgCl ₂ (Sigma) :		25 mM
dNTPs (Boehringer Mannheim) :	dATP, dCTP,	
	dGTP, dTTP, je	10 mM

Tabelle 2: Pipettierschema eines 100 µl Standard-PCR-Ansatzes.

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
MgCl ₂	2 µl	2 Mm
dNTP's	je 2 µl	je 200 µM
10×Reaktionspuffer	10 µl	1×
5'-Primer	1 µg	10 ng/µl
3'-Primer	1 µg	10 ng/µl
Matrizen DNA	0,1-1 µg	0,1-1 µg

Taq Polymerase	0,5 µl	2,5 U
H₂O_{bidest}	ad 100 µl	

Tabelle 3: Schema eines verwendeten PCR Standardprogramms

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	2 min.
Denaturierung	94°C	1 min.
Annealing	abhängig von Primern	1 min. x 30
Extension	72°C	2 min.
Letzte Extension	72°C	10 min.

Im Anschluss an die PCR wurde die entstandene DNA im Agarosegel aufgetrennt. Eine entsprechende Bande ließ auf den Erfolg der Amplifikation schließen.

4.6 Isolierung von Plasmid-DNA

4.6.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

(Minipräparation, „Boiling-Präp“)

(modifiziert nach BIRNBOIM and DOLY et al., 1979)

Mit dieser Methode lassen sich maximal etwa 5 µg DNA gewinnen. Einzelkolonien wurden in 2,5 ml LB-Medium mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin angeimpft und nach Inkubation über Nacht (37°C auf dem Schüttler) abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Das entstandene Zellsediment wurde in 200 µl STET-Puffer mit Lysozym (0,5 mg/ml) resuspendiert und anschließend 45 sec im Wasserbad bei 98,5°C gekocht. Der Ansatz wurde kurz auf Eis gekühlt und dann abzentrifugiert (25 min, 13000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Das somit entstandene Pellet aus unerwünschten Zellresten wurde mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und verworfen. Um die DNA zu fällen wurde 200 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK). Zum Schluss wurde

das DNA-Pellet noch mit 70%igem -18°C kalten Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (15 min, 13000 rpm, 4°C, Sigma Kryofuge 202MK), um eine reinere DNA zu erhalten. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 20-30 µl TE-Puffer mit RNase A (100 µg/ml) aufgenommen. Um noch vorhandene RNA zu verdauen wurde dieser Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert und kann dann schließlich bei 4°C gelagert werden.

4.6.2 Präparative Plasmidisolierung (NUCLEOBOND™)

Zur Herstellung von Plasmid-DNA in großen Mengen und mit einem hohen Reinheitsgrad wurde der NUCLEOBOND™-Kit von Marcherey Nagel verwendet. Bei dieser Methode wurden die Bakterien einer alkalischen Lyse und einer anschließenden Ionenaustauscherchromatographie über NUCLEOBOND™-Säulen nach Firmenvorschrift unterzogen. Durch Verwendung von NUCLEOBOND™-AX 100-Säulen (Midipräparation) können ca. 100 ml, mit NUCLEOBOND™-AX 500-Säulen (Maxipräparation) 200-500 ml Bakterienkultur aufgearbeitet werden. Eine Übernachtskultur wurde 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet bei Midipräparationen [Maxipräparationen] in 4ml [10 ml] Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml [10 ml] Puffer S2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Das im Puffer enthaltene SDS löst die bakterielle Zellmembran auf und führt so zur Lyse der Zellen und zur Freisetzung der Zellbestandteile. Das enthaltene NaOH denaturiert die chromosomale und die Plasmid-DNA. Anschließend wurden 4 ml [10 ml] Puffer S3 zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Dadurch wird das Lysat neutralisiert, wobei die kleinere, kovalent geschlossene Plasmid-DNA wieder renaturiert und in Lösung bleibt. Die chromosomale Wirts-DNA präzipitiert nach dieser Behandlung. Der Ansatz wurde 30 min bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 RF). Danach wurde der DNA-enthaltende Überstand auf die AX 100-NUCLEOBOND™-Säule [AX 500-NUCLEOBOND™-Säule] gegeben, die zuvor mit 4 ml [10 ml] Puffer N2 äquilibriert war. Aufgrund der Salz- und pH-Bedingungen im Lysat bindet nur Plasmid-DNA an die Säule und wird zurückgehalten. Nach Waschen der Säule zur Entfernung von Proteinen mit 2 × 5 ml [3 × 10 ml] Puffer N2 wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml [15 ml] Puffer N5 eluiert und mit 3,5 ml [10,5 ml] Isopropanol (100%) gefällt. Das durch 60 min Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C (Heraeus Megafuge 1.0 RF) erhaltene Pellet wurde mit eiskaltem Ethanol

(70%) gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Resuspension des DNA-Pellets in 100 [200] μ l TE-Puffer wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe unter 3.3.2.) und ein Kontroll-Restriktionsverdau durchgeführt.

Puffer S1 (pH 8,0):	Tris-HCl	50	mM
	EDTA	10	mM
	Rnase A	100	μ g/ml
Puffer S2:	NaOH	200	mM
	SDS	1%	(w/v)
Puffer S3 (pH5,1):	Kaliumacetat	2,8	M
Puffer N2 (pH6,3):	Tris-H ₃ PO ₄	100	mM
	Ethanol	15%	(v/v)
	KCl	900	mM
	Triton X-100	0,15%	(v/v)
Puffer N3 (pH6,3):	Tris-H ₃ PO ₄	100	mM
	Ethanol	15%	(v/v)
	KCl	1,15	M
Puffer N5 (pH8,5) :	Tris-H ₃ PO ₄	100	mM
	Ethanol	15%	(v/v)
	KCl	1	M

4.6.3 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren (MANIATIS et al., 1989)

Nukleinsäuren absorbieren Licht der Wellenlänge 260 nm, deshalb stellt die photometrisch gemessene Absorption bei 260 nm ein Maß für den DNA-Gehalt der Lösung dar.

Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei $\lambda = 260$ nm entspricht bei:

- doppelsträngiger DNA (dsDNA) einer Konzentration von 50 mg/ml

- einzelsträngiger DNA (ssDNA) und RNA einer Konzentration von 40 mg/ml
- Oligonukleotid DNA einer Konzentration von 33 mg/ml

Die Ursache für die höhere Absorption von einzelsträngiger DNA im Vergleich zu doppelsträngiger DNA ist im Hyperchromizitätseffekt begründet. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Nukleinsäurelösungen wurde der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) ermittelt (OD₂₆₀ nm/OD₂₈₀ nm). Bei reinen DNA Lösungen liegt dieser Wert zwischen 1,65 und 1,85. Tiefere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten, höhere Werte zeigen größere Mengen an RNA an.

Für die Messung wurden 3,5 µl DNA-Lösung 1:100 mit H₂O_{bidest} verdünnt, und die OD₂₆₀ und die OD₂₈₀ in einem Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia) gemessen. Als Referenz diente H₂O_{bidest}.

4.6.4 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolisieren

(KIRBY et al., 1957)

Durch Phenol-Extraktion lassen sich Proteine aus Nukleinsäurelösungen entfernen. Proteine werden in der Phenollösung denaturiert, wohingegen Nukleinsäuren wegen ihres polyanionischen Charakters in Phenollösungen unlöslich sind. Zur Phenol-Extraktion wurde der proteinhaltigen, wässrigen Nukleinsäurelösung das gleiche Volumen Phenol zugesetzt und beide Phasen durch Vortexen vermischt. Die anschließende Zentrifugation von 1 min bei 13000 rpm (Sigma Kryofuge 202MK) führt zur Phasentrennung in eine phenolhaltige Unterphase, eine Interphase mit denaturierten Proteinen und eine wässrige, DNA-haltige Oberphase. Diese Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Falcon überführt. Analog wurde eine CIA-Extraktion (Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion) durchgeführt, um eventuell noch vorhandene Phenolreste aus der DNA-Lösung zu entfernen.

Phenollösung:	Phenol dest.	50%	(v/v)
	CIA	50%	(v/v)
	8-OH-Chinolin	0,1%	(v/v) (Oxidationsschutz)
	Abgesättigt mit TE-Puffer (pH 8,0)		
CIA-Lösung:	Chloroform / Isoamylalkohol 24:1 (v/v)		

4.6.5 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Durch Ethanolpräzipitation lässt sich DNA aus einer wässrigen DNA-Lösung konzentrieren. Ausgenutzt wird dabei, dass Nukleinsäuren in Anwesenheit geeigneter Konzentrationen an monovalenten Kationen in Ethanol unlöslich sind. Der DNA-Lösung wurde daher 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumen Ethanol (100%) zugegeben und kurz gemischt. Zur DNA-Fällung wurde der Ansatz nun für 30 min auf -70°C gestellt. Anschließend konnte durch 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C (Sigma Kryofuge 202MK) die präzipitierte DNA pelletiert werden. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und nochmals für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 10 min unter Vakuum getrocknet (Speed-Vac Concentrator, Savant) und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer resuspendiert.

4.7 Enzymatische Modifikation von DNA

4.7.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau) (MANIATIS et al., 1989)

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die hochspezifisch Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und sie durch Spaltung der Phosphodiesterbindung im DNA-Rückgrat vollständig trennen. Die spezifischen Erkennungssequenzen umfassen 4-8 Basenpaare, die normalerweise auch die Schnittstelle selbst beinhalten. Häufig handelt es sich bei diesen Sequenzen um Palindrome. Es gibt grundsätzlich zwei Varianten, wie die DNA durch die Enzyme geschnitten wird. Bei der ersten Variante werden die Phosphodiesterbindungen zwischen direkt gegenüberliegenden Basenpaaren geschnitten, so dass glatte Enden („blunt ends“) entstehen. Die zweite Möglichkeit ist ein versetztes Aufschneiden der DNA, wobei entweder ein 3'- oder ein 5'-Überhang entsteht („sticky ends“). In dieser Arbeit wurden nur Restriktionsenzyme verwendet, die „sticky ends“ mit 5'-Überhang erzeugen. Mittlerweile sind eine Vielzahl von Restriktionsendonukleasen bekannt und auch käuflich zu erwerben. Diese Enzyme stammen ursprünglich aus Mikroorganismen, die sich mit ihrer Hilfe vor eingedrungener, schädigender Fremd-DNA

schützen. Die Wirksamkeit der Enzyme wird in Units angegeben. Ein Unit (u) ist definiert als die Menge Enzym, die in der Lage ist, 1 μg DNA in optimalem Milieu und bei optimaler Temperatur (meistens 37°C) innerhalb von 60 min vollständig zu schneiden. Der Vorgang des Schneidens wird auch als „Restriktionsverdau“ bezeichnet. In den Verdauansätzen wurden für analytische Zwecke 0,5-1 μg DNA und für präparative Zwecke bis zu 4 μg DNA verwendet. Die Anzahl der eingesetzten Units betragen je nach Enzym zwischen 2-10 U/ μg DNA, wobei das Volumen an zugesetztem Enzym wegen des in der Enzymlösung vorhandenen Glycerols 1/10 des Reaktionsansatzes nicht überschreiten durfte. Eine Glycerolkonzentration von über 5% (v/v) des Gesamtvolumens hat eine unspezifische Fragmentierung der DNA durch das Enzym zur Folge. Der Verdau wurde jeweils unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (Temperatur und Inkubationsdauer), mit den mitgelieferten 10fach Puffern und bei Bedarf, 10fach BSA durchgeführt. Es ist auch möglich DNA mit mehreren Enzymen in einem Ansatz zu fragmentieren. Oft benutzt wird der sog. „Doppelverdau“, mit zwei unterschiedlichen Enzymen. Voraussetzung ist dabei immer, dass die Enzyme im gleichen Puffermilieu angemessen schneiden. Bei nicht kompatiblen Puffern erfolgte ein sequenzieller Verdau mit den entsprechenden Enzymen nacheinander.

4.7.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

(BOIVAR et al., 1977; CHACONAS et al., 1980)

Um eine Rezirkularisierung bzw. eine Konkatemisierung von linearisierter Vektor-DNA zu verhindern, werden die linearisierten Vektoren vor der Ligation mit dem Insert mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIP, calf intestinal phosphatase) dephosphoryliert. Dieses Enzym spaltet vom freien 5'-Ende der DNA die reaktive Phosphatgruppe ab.

Ein Standardreaktionsansatz enthielt 20 μl der verdauten Vektor-DNA, 1 μl alkalische Phosphatase, 3 μl mitgelieferter 10fach Reaktionspuffer und wurde mit 6 μl H_2O bidest auf 30 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und durch Gene-CleanTM oder NUCLEOSPINTM-Säulen reisoliert. Bei Vektoren, die mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden und deren „sticky ends“ demzufolge auch nicht komplementär zueinander sind, ist eine Rezirkularisierung unwahrscheinlich, eine

Verbindung mehrerer Vektoren miteinander jedoch möglich. Aus diesem Grund wurde auch in solchen Fällen eine Dephosphorylierung durchgeführt.

4.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

(DUGAICZYK et al., 1975; SGARAMELLA, VAN DE SANDE & KHORANA, 1970)

Die T4-DNA-Ligase lässt sich aus E.coli-Bakterien isolieren, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert sind und gehört zu den DNA-Reparaturenzymen. Mit Hilfe dieses Enzyms können *in vitro* zwei Nukleinsäuremoleküle miteinander verknüpft werden, indem die Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden geknüpft und somit die Bildung einer intakten, rekombinanten ds-DNA ermöglicht wird. Die Enden der beiden Nukleinsäuremoleküle müssen dabei kompatibel sein, d.h. eine komplementäre Sequenz aufweisen. Die T4-DNA-Ligase benötigt für die Katalyse ATP als Cofaktor und Energiequelle. Die Effektivität der Ligation ist abhängig von den eingesetzten Konzentrationen an Vektor- und Insert-DNA. Diese wurden daher so gewählt, dass sie im Reaktionsansatz äquimolar vorliegen (je 0,5-1 µg). Nach Zugabe von 2 µl 10fach Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase [1 U/µl] wurde der Ligationsansatz auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit H₂O bidest aufgefüllt und 4 h oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten ohne vorhergehende Modifikation wurde der TA-Klonierungsvektor pGEM-T™ (Promega) eingesetzt und der Ansatz für 1 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Hälfte der Ligationsansätze (10 µl) wurde nach Inkubation direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt, die andere Hälfte für eventuell notwendige Wiederholungsschritte bei 4°C gelagert. Zu jeder Ligation wurde als Überprüfung einer erfolgreichen Dephosphorylierung des Vektors eine „CIP-Kontrolle“ (dephosphorylierter Vektor ohne Insert) mitgeführt. Das Wachstum von Transformanten wäre dann ein Beweis mangelnder Dephosphorylierung. Außerdem wurde noch eine Transformationskontrolle durchgeführt mit einem zirkulären Vektor, der den Bakterien nach erfolgreicher Transformation eine Antibiotika-Resistenz verleiht. Es gibt also Bakterienwachstum, welches als Nachweis für eine erfolgreiche Transformation gilt.

Ligasepuffer (10×):	ATP	10 mM
	MgCl ₂	50 mM
	DTT	10 mM
	Tris/HCl (pH 7,5)	660 mM

4.7.4 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA

(MANIATIS et al., 1989)

Die Agarosegelelektrophorese ist die am häufigsten verwendete Technik um Nukleinsäuren aufzutrennen und DNA Fragmente unterschiedlicher Größe sichtbar zu machen. DNA ist wegen des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandert im elektrischen Feld auf die Anode zu. Agarosegele wirken dabei wie Molekularsiebe. Sie bewirken, dass kleinere Moleküle schneller durch die Poren des Gels wandern, als große. Das konstante Masse-Ladungs-Verhältnis führt zu einer Auftrennung der DNA Fragmente entsprechend ihres Molekulargewichts. Daraus folgt, dass durch die Wahl einer geeigneten Agarosekonzentration eine optimale Auftrennung der DNA Moleküle erreicht werden kann. Je geringer die Agarosekonzentration ist, desto größer sind auch die Poren der Gelmatrix. Einfluss auf das Laufverhalten der DNA haben neben der Voltzahl, der Stromstärke, der Temperatur usw. auch die Konformation der DNA Moleküle. Die Konformation kann kovalent geschlossen und ringförmig (coiled und supercoiled Form) sein oder offen und linear. Die supercoiled Form wandert am schnellsten, während die offene lineare Form etwas langsamer ist. Als Puffer wurde Tris-Acetat-Puffer (TAE) verwendet. Die Anfärbung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Dieser interkaliert in doppelsträngige DNA, so dass die DNA-Fragmente unter UV-Licht als orange gefärbte Banden erkennbar und dokumentierbar sind.

4.7.5 Herstellung eines Agarosegels

Da der Auftrennungsbereich der Gelelektrophorese von der Porengröße, folglich von der Dichte der Gelmatrix, abhängt, wird der Auftrennungsbereich über die Agarosekonzentration, also die Menge der eingesetzten Agarose bestimmt. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto kleiner ist die Porengröße. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele mit der jeweils geeigneten Konzentration eingesetzt (zwischen 0,6% und 2,0% w/v).

Die entsprechende Agarosemenge wurde in 450 ml 1fach TAE-Puffer durch Aufkochen im Mikrowellenherd (ca. 5 min bei 750 W) gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 25 µl Ethidiumbromid [Stammlösung: 10 mg/ml in H₂O] versetzt. Anschließend wurde die Agaroselösung auf Glasplatten mit Kunststoffeinfassung (24,5 × 24,5 × 1 cm), die zuvor mit 1%iger Agarose abgedichtet wurde, gegossen. Durch an dem Kunststoffrahmen befestigte PVC-Kämme, wurden im Gel Probetaschen ausgespart, die nach der Polymerisation ca. 35 µl Fassungsvermögen hatten. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurden die Kämme entfernt, das Gel in Klarsichtfolie eingepackt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 1: Ideale Agarosekonzentrationen für bestimmte DNA-Trennbereiche

Agarosemenge (%)	DNA-Trennbereich (kbp)
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2	3-0,1

4.7.6 Agarosegelelektrophorese

Um die Dichte der DNA Lösung zu erhöhen und das Absinken in die Geltaschen zu gewährleisten, wurde den Proben 1/5 ihres Gesamtvolumens mit glycerolhaltigem Blaumarker zugesetzt. Der enthaltene Farbstoff Bromphenolblau hat zusätzlich den Effekt, dass die Lauffront der DNA im Gel zu erkennen ist. Zusätzlich sorgt das enthaltene EDTA als Chelatkomplexbildner dafür, dass den Enzymen die für ihre Funktion essentiellen bivalenten Kationen entzogen werden und inaktiviert sie somit. Aufgrund dieser beiden Funktionen wird der Blaumarker auch als „Stopp-Lade-Mix“ bezeichnet. Das Gelstück in benötigter Größe wurde in eine Elektrophoresekammer gefüllt mit 1fach TAE-Puffer, gelegt und die Proben submers in die Taschen pipettiert. Parallel dazu wurde eine Markerspur (10 μ l 1 kb plus DNA ladder™ (Life technologies), vgl.2.4.1.) zum Größenvergleich der Fragmente aufgetragen. Die DNA wurde durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt (1-2 h; 80-130 V). Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gel mit Puffer bedeckt war. Sollten die Größen der Fragmente analysiert und das Gel fotografiert werden, so wurde die DNA mit kurzwelligem UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) sichtbar gemacht (Geldokumentationssystem MWG Biotech Gel Print 2000i). Das kurzwellige UV-Licht schädigt die DNA sehr stark, was sie unbrauchbar macht für gentechnisches Arbeiten. Deshalb wurden zu präparativen Zwecken die entsprechenden Fragmente unter langwelligem UV-Licht ($\lambda=366$ nm) ausgeschnitten.

4.7.7 Gene-Clean™-Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des Gene-Clean™-Kits (Dianova) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Diese Methode erlaubt eine Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die größer als 130 bp sind. Das entsprechende DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht ($\lambda=366$ nm; siehe 3.5.2) mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es wurde das 2,5- bis 3-fache Volumen an 6 M NaI-Lösung zugegeben, welches die Denaturierung der DNA verhindert. Das Gelstück wurde zum Auflösen für 10 min bei 55°C inkubiert. Abhängig von der DNA-Menge wurde dem aufgelösten Gelstück 4-8 μ l

Glasmilch (Gene-Clean™-Kit) zugegeben. Zur Bindung der DNA an die Glasmilch wurde das Gemisch für eine Stunde oder über Nacht auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Sedimentation der Glasmilch wurde der Ansatz anschließend 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge), der Überstand verworfen, das Glasmilchpellet dreimal mit je 400 µl NEW-WASH™-Lösung (Gene-Clean™-Kit) gewaschen und erneut 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Um die DNA aus dem Glasmilchpellet zu eluieren, wurde das gewaschene Pellet in 20 µl TE-Puffer resuspendiert, der Ansatz für 5 min bei 55°C inkubiert und anschließend nochmals 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge). Der DNA-enthaltende Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. 3 µl dieses Überstandes wurden zur Überprüfung der Reisolierung auf ein Agarosegel aufgetragen.

4.7.8 Nucleo-Spin™- Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA Fragmente mit einer Größe unter 5 kb können mit Hilfe des NUCLEOSPIN™-Kits nach Angaben der Herstellerfirma Macherey & Nagel aus den Agarosegelen isoliert werden. Diese Methode basiert auf einer Ionenaustauschchromatographie, bei der die DNA an vorgefertigte, gepackte Säulen, die Silicagel enthalten, gebunden wird. Nach mehreren Waschschrritten wurde die gereinigte DNA durch geänderte Pufferbedingungen von der Säule eluiert.

4.8 Proteintechniken

4.8.1 Herstellung von 2x Sample-Buffer-Proteinextrakten aueukaryotischen Zellen (MANIATIS et al., 1989)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gesamtzellextrakte aus Monolayerkulturen und Suspensionskulturen hergestellt. Von einer dicht gewachsenen 75 cm² Kulturflasche wurden die Monolayerzellen geerntet, indem sie mittels eines Zellschabers abgeschabt und

mit PBS abgespült wurden. Bei den Zellen, die in Suspension wachsen entfällt dieser Schritt. Die Zellen wurden 10 min bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert (Megafuge 1.0 RF, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit sterilem, kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in einer definierten Menge 2× SDS-Probenpuffer (siehe unter 2.2) resuspendiert. Der SDS-Probenpuffer enthält 3-Mercapto-1,2-Propandiol, das Disulfidbrücken spaltet und somit die Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Durch die fehlende Tertiärstruktur ist die Wanderungstrecke der Proteine im Gel proportional zu ihrer Größe und die saubere Auftrennung der Proteine wird verbessert. Außerdem werden Protein-Protein-Interaktionen wegen der fehlenden nativen Struktur nicht mehr eingegangen. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine Ultraschall-Behandlung von 20 sec. Nun wurden die Proben für 10 min bei 95°C gekocht und anschließend 10 min bei 13000 rpm (Sigma Kryofuge 202MK) abzentrifugiert, um nicht gelöste Zellbestandteile zu sedimentieren. Der proteinhaltige Überstand wurde bei -20°C gelagert. Bei Verwendung von 2× SDS-Proben-Puffer ohne Bromphenolblau konnte der Proteingehalt der Extrakte photometrisch bestimmt werden. Dazu wurde eine 1:50 Verdünnung in 0,1 M NaOH-Lösung hergestellt. Die gemessene Extinktion dieser Lösung bei 280 nm wurde in folgende Formel eingesetzt zum Errechnen der Proteinmenge, die in der Gelelektrophorese eingesetzt werden soll.

$$\frac{6,4}{E_{280}} = 15 \mu\text{g Protein}$$

E_{280} = Extinktion des Proteinextraktes bei 280 nm

Das Ergebnis der angegebenen Formel entspricht der Menge 2x Sample-Buffer-Extrakt (in μl), die man benötigt, um 15 μg Protein zu erhalten.

4.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(LAEMMLI et al., 1970; MANIATIS et al., 1989)

In einer SDS-PAGE werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung kann nach Molekulargewicht, der Gesamtladung oder der dreidimensionalen Struktur der Proteine erfolgen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich unter denaturierten Bedingungen

gearbeitet und die Auftrennung der Proteine nur nach deren Molekulargewicht durchgeführt. Das negativ geladene SDS, das sich im Puffer und in der Gelmatrix im Überschuss befindet, lagert sich an die hydrophoben Regionen der Proteine an. An der Aminosäurenkette lagert sich pro zwei Aminosäurenreste je ein SDS-Molekül an. Dadurch werden die positiven Ladungen der Proteine kompensiert und sie erhalten eine stark negative Ladung. Diese überlagert die Eigenladung des Proteins und ist zu dessen Masse ungefähr proportional. Mit dieser Vorgehensweise wird eine Wanderung der Proteine ausschließlich zur Anode und eine vollständige Denaturierung erreicht. Das SDS löst fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen und die Tertiärstruktur geht verloren. Die Matrix des Gels besteht aus Ketten polymerisierten Acrylamids, die durch N,N'-Methyl-Bisacrylamid quervernetzt sind. Gestartet wird die Polymerisation durch Ammoniumpersulfat (APS) und katalysiert durch N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED). Die Porengröße und somit die Auftrennungseigenschaften der chemisch inerten Polyacrylamid-Gelmatrix hängen direkt von den Mengenverhältnissen der eingesetzten Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentration ab. Die Proteine wandern also in einem Gel geeigneter Porengröße entsprechend ihrer Molmasse, wobei die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichts darstellt. Um eine hohe Auflösung bei der Trennung zu erreichen, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wird das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt, das aus zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichen pH-Werten besteht. Die Proteine laufen zuerst durch ein grobporiges Sammelgel (Uppergel), in dem sie konzentriert werden und eine einheitliche Lauffront erreicht wird. Dann wandern sie in ein feinporiges Trenngel (Bottomgel), in dem die Auftrennung erfolgt. Parallel zu den zu untersuchenden Proteinen wurden Markerproteine, deren Molekulargewicht bekannt ist, aufgetrennt, um das relative Molekulargewicht der Proteine zu ermitteln.

4.8.2.1 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Es wurden zwei Glasplatten (14,5 x 16,5 cm) verwendet, von denen eine an einer Seite eine Aussparung aufweist. Die Platten wurden vor der Verwendung mit Ethanol (70% [v/v]) gereinigt. An den drei Seiten ohne Aussparung wurde je einen Teflon-Abstandhalter eingelegt und die Platten dann mit Klammern aufeinander befestigt. Um zu verhindern,

dass das SDS-Gel aus der Gießkammer ausläuft, wurden die Ränder mit Agarose (1%) abgedichtet. Dann wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen (bis 3 cm unter den Rand) und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Um später die Proteinproben aufzutragen, wurden Geltaschen mit einem Teflonkamm ausgespart. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden der Kamm, sowie der Abstandhalter an der Unterseite des Trenngels entfernt. Danach wurde das Gel senkrecht in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Diese besteht eigentlich aus zwei Kammern, die beide mit Laufpuffer gefüllt wurden. Das Gel bildet eine „Brücke“ für den Strom, der fließt, wenn Spannung an die Kammern angelegt wird. Die Proteinproben wurden mit Hilfe einer Hamilton-Mikropipette in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei 24 mA und später im Trenngel bei 28 mA für 2,5 bis 3 h.

Tabelle 4: Komponenten für 10%iges und 12,5%iges Polyacrylamidgel

Komponente	Trenngel		Sammelgel
	10%	12,5%	
Sammelgelstock	-	-	1,25 ml
Trenngelstock	4,0 ml	4,0 ml	-
Acrylamid (30%)	5,3 ml	6,7 ml	750 μl
Bisacrylamid (2%)	2,12 ml	2,68ml	300 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	4,58 ml	2,62 ml	2,7 ml
APS (10%)	140 μl	140 μl	50 μl
TEMED	14 μl	14 μl	10 μl

4.8.3 Western Blot (Immunoblot)

(TOWBIN et al., 1979; BURNETTE, 1981)

Beim Western Blot werden die zuvor in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, wobei das nach der Auftrennung entstandene Proteilmuster immobilisiert auf der Membran erhalten bleibt. Die Proteine binden bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Da sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine weitgehend erhalten bleibt, können diese durch den Einsatz spezifischer Antikörper immunologisch nachgewiesen werden (Immunoblot).

4.8.3.1 Proteintransfer

Vor dem Aufbau des Blots wurde die verwendete Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) in PBS äquilibriert. Anschließend wurde der Blot in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne aufgebaut. Dazu wurde eine Vorrichtung verwendet, die aus zwei PVC-Gittern besteht, die zusammengesteckt werden können. Auf das erste Gitter wurde ein Wattetuch gelegt und darauf zwei Whatman-Papiere. Danach folgte das Polyacrylamidgel, das mit der Nitrocellulose-Membran bedeckt wurde. Zum Schluss folgten wieder zwei Whatman-Papiere und ein Wattetuch. Durch das zweite Gitter wurde der Blot luftblasenfrei abgeschlossen. Schließlich wurde er, in richtiger Orientierung zur Anode hin, in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer (LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit) eingespannt. Der Transfer wurde 1,5 h bei 330 mA durchgeführt oder alternativ über Nacht bei 35 mA. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran zur unspezifischen Färbung aller Proteine ca. 10 min mit PonceauSTM (Sigma-Aldrich) gefärbt. Dieses verursacht eine reversible Färbung der Proteine auf der Membran, die mit Wasser wieder abgewaschen werden kann. Die Markerspur wurde mit einem Skalpell abgetrennt, 15 min in Amidoschwarz-Lösung angefärbt und anschließend entfärbt. Die restliche Membran wurde für 30 min bei Raumtemperatur in 5%iger PBS-Milch geblockt, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen.

4.8.3.2 Immunologischer Proteinnachweis auf Membranen

Der immunologische Nachweis wird mit Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine durchgeführt. Die Detektion der gebundenen Antikörper kann radioaktiv erfolgen oder durch Chemilumineszenz. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die chemilumineszente Detektion benutzt. Nach dem Blocken wurde die Nitrocellulosemembran mit dem entsprechenden Antikörper in 2-5 ml PBS-Milch (5%) luftblasenfrei in Klarsichthüllen eingeschweißt und auf einem Taumler über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 × 15 min in PBS-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran mit einem entsprechenden Sekundärantikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, in 2-5 ml PBS-Milch (5%) luftblasenfrei in Klarsichthüllen eingeschweißt und auf einem Schüttler 1 h bei 4°C inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten von 15 min in PBS-Puffer erfolgte die Detektion gebundener Sekundärantikörper mit Hilfe des ECL™-Kits (Enhanced Chemoluminescence, Amersham). Bei der Detektion erfolgt eine durch Peroxidase-katalysierte Reduktion von H₂O₂ und gleichzeitig eine Oxidation von Luminol, was eine Licht-Emission der Wellenlänge $\lambda=428$ nm zur Folge hat, die durch einen blaulichtempfindlichen ECL™-Film (Hyperfilm ECL™, Amersham) dokumentiert werden kann. Dazu wurde die Membran in einer Kunststoffschale mit den kurz vorher 1:1 gemischten ECL™-Lösungen 1 und 2 (je 3 ml) für eine Minute inkubiert, mit Whatman-Papier getrocknet und der ECL™-Film für die entsprechende Expositionszeit aufgelegt. Der Film wurde anschließend entwickelt, fixiert und zum Trocknen aufgehängt.

4.8.3.3 Entfernung gebundener Antikörper nach ECL™-Färbung („Stripping“)

Nach manchen Versuchen erschien es sinnvoll dieselbe Membran mit einem anderen Antikörper noch mal zu färben, sei es aus Vergleichszwecken oder auch nur, weil der Antikörper nicht gut genug gebunden oder zu unspezifisch war. Dazu wurde die Membran nach erfolgter ECL™-Färbung 30 min in ca. 100 ml Stripping-Puffer bei 55°C im Wasserbad geschüttelt („gestrippt“). Durch das enthaltene SDS und 3-Mercapto-1,2-propandiol werden die kovalenten Protein-Antikörper-Bindungen gelöst. Anschließend

wurde die Membran 2×15 und 4×5 min in PBS auf dem Schüttler gewaschen, in 5%iger PBS-Milch geblockt und wie unter 4.6.3.2 beschrieben weiterbehandelt.

Stripping-Puffer (nach ECL™-Färbung):	Tris (pH 6,7)	62,5 mM
	SDS	2 %
	3-Mercapto-1,2-Propandiol	100 mM

4.8.4 Hemmung der Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese kann durch verschiedene Stoffe an unterschiedlichen Punkten gehemmt, beziehungsweise unterbrochen werden. Eine Möglichkeit ist die Hemmung an den Ribosomen, wie sie auch bei einigen Antibiotika Anwendung findet. Die pharmazeutischen Antibiotika hemmen jedoch vorwiegend die prokaryotischen Ribosomen oder deren Untereinheiten. Cycloheximid hemmt jedoch sowohl die eukaryotischen als auch die prokaryotischen Zellsysteme (wahrscheinlich die Translokaseaktivität der 80S-Ribosomen), so dass es ausschließlich experimentelle Anwendung findet, wie auch in dieser Arbeit.

4.8.4.1 Stabilitäts-Bestimmung des DGCR6-Proteins

Der dicht gewachsenen Zellkultur wurde das Nährmedium abgenommen und durch Cycloheximid angereichertes ersetzt. Die Konzentration des Cycloheximid im Nährmedium lag zwischen 20 µg/ml und 80 µg/ml je nach verwendeter Zelllinie, wobei generell gesagt werden kann, dass primäre Zelllinien wesentlich höhere Konzentrationen an Cycloheximid benötigten als immortalisierte Zelllinien, um die Proteinbiosynthese zu hemmen. Nach dem Aufbringen des Cycloheximid-Medium wurden Zellextrakte nach einem Zeitschema hergestellt und über ein 10%iges SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Der Western-Blot wurde mit dem monoklonalen Primärantikörper 7C8-2 und anti-Ratte-pox Sekundärantikörper und als Kontrolle der Primärantikörper anti-p53 (Ab-6) und der Sekundärantikörper anti-Maus-pox inkubiert.

4.8.5 Immunfluoreszenzen

Zur Untersuchung in der Immunfluoreszenz wurden auf Deckgläsern gewachsene COS1-Zellen in 6-Loch-Platten mit 5µg der jeweiligen Plasmide nach der Kalziumphosphat-Methode (siehe 4.2.5) transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 15min mit 4% Paraformaldehyd/PBS bei RT fixiert. Nach anschließender Permeabilisierung in 2% Triton-X-100/PBS (2min, 4°C) und dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 2% BSA/PBS für 15min bei 37°C in einer feuchter Kammer wurden die Zellen 45min bei 37°C in einer feuchten Kammer mit den in 3µg/ml BSA/PBS verdünnten Primäantikörpern inkubiert (siehe 3.5), nach vier Waschschritten (je 10min bei RT auf dem Schüttler: 3xPBS; 1x in 0,03% Triton-X-100/PBS verdünnten anti-Ratte-Sekundäantikörpern (FITC-konjugiert [1:50]) (Sigma) inkubiert und nochmals wie oben gewaschen. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Zellen 5min in 2µg/ml DAPI/Methanol inkubiert, anschließend einmal in Methanol gewaschen und in Elvanol-Lösung (3%[w/v] Elvanol-Polyvinylalkohol, 30%[v/v]Glycerin in PBS) auf Objektträger gebracht, versiegelt und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Die Immunfluoreszenzen wurden mit einem Leica DM IRB/E Mikroskop (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie, Universitätsklinik Homburg) und mit einer Zeiss Axio-Cam Color Kamera dokumentiert. Bearbeitung und Auswertung erfolgte mit Corel Photo Paint/Draw 9.0™ Software.

5 Ergebnisse

5.1 Grundlagen

Das DGCR6-Protein wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid Experiment, bei dem EBNA2 bzw. EBNA3C als Fänger eingesetzt wurde, als potentieller Bindungspartner gefunden (Arbeitsgruppe Grässer, 2003, unveröffentlicht). Hierdurch wurde das DGCR6-Protein interessant für die EBV Forschung. Dazu sollte das DGCR6- Protein in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Hierfür wurde mittels PCR aus einer Testis- cDNA- Bank die entsprechende cDNA amplifiziert. Die DGCR6-cDNA wurde von EDELMANN et al. (2001) mit einer Größe von 1148 bp beschrieben. Die RNA enthält am 5'-Ende das offene Leseraster von DGCR6 bzw. DGCR6L mit 660 bp, d.h. die abgeleiteten Proteine sollten eine Größe von 220 AS aufweisen.

5.2 Herstellung eines DGCR6/L-Proteins mit HA-“Tag“

5.2.1 PCR-Amplifikation und Klonierung von pSG5-HA-DGCR6/ DGCR6L

Die Klonierung eines Gens in einen Expressionsvektor setzt voraus, dass die Sequenz in der richtigen Orientierung und im korrekten Leseraster in den Vektor integriert werden. Die Primer zur Amplifikation des HA-DGCR6/L erhielten am 5'- und am 3'-Ende eine EcoRI Schnittstelle. Als Template für die PCR wurde eine humane Testis cDNA-Bank (Firma Stratagene) verwendet. Das Amplifikat wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt. Das Fragment war in der erwarteten Größe vorhanden und die negative Kontrolle ergab kein Amplifikat. Nach dem Aufreinigen wurde die DNA in den pGEM-T-Vektor subkloniert. Aus einem der positiven Klone der pGEM-Klonierung wurde das Insert durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI ausgeschnitten. Die Ligation erfolgte dann mit dem EcoRI verdauten und dephosphorylierten pSG5 Vektor (Abbildung 5.1).

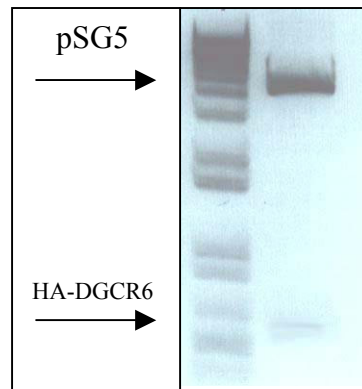


Abb. 5.1: Elektrophorese des EcoRI Verdau eines pSG5-HA-DGCR6/L Konstrukts. Die Analyse erfolgte in einem 1%igem Agarosegel Kontrollverdau mit EcoRI zum Nachweis des HA-DGCR6 Inserts, sowie der Integrität der Schnittstellen. Die Position des linearen Vectors (pSG5) und des DGCR6-Inserts wird durch Pfeile Markiert.

EcoRI schneidet nicht im DGCR6/L-Gen, was eine Klonierung mit diesem Restriktionsenzym ermöglicht. Das Konstrukt wurde in pMOS Bakterien transformiert und auf Agarplatten kultiviert. Eine in den 5' Primer zusätzlich eingefügte BamH-Schnittstelle diente dazu die Orientierung der EcoRI Ligation zu überprüfen. Plasmide wurden aus den Ampicillin resistenten Bakterienkollonien isoliert und mittels eines Kontrollverdaus die richtig orientierten Klone ausgewählt (Abbildung 5.2).

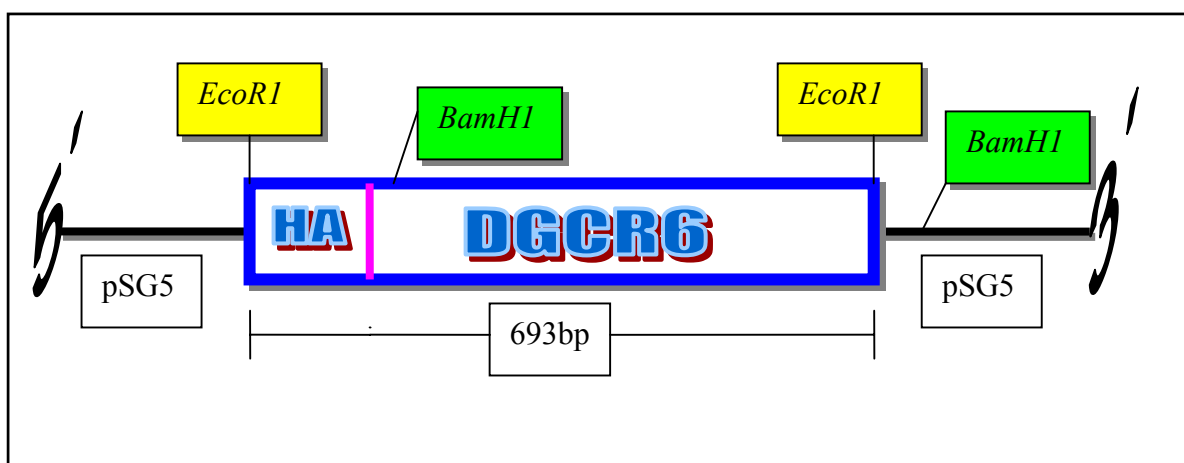


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung des pSG5-HA-DGCR6-Konstruktes.

Dargestellt ist das DGCR6, das dem Offenen Leserahmen des DGCR6-Gens entspricht (660 bp) mit dem über PCR eingefügten HA-„Tag“ (33 bp) und den Restriktionsschnittstellen von *EcoRI*, die für die Klonierung in den pSG5 verwendet wurden. Außerdem sind die Schnittstellen von *BamHI*, die für den Orientierungsverdau nötig waren, eingezeichnet. Das HA-„Tag“ diente zum Nachweis des von mit dem HA-spezifischen Antikörper 3F10 (Roche)

5.2.2 Expression des HA-DGCR6/L in eukaryotischen Zellen

Um das DGCR6 in eukaryotischen Zellen zu exprimieren, wurde das pSG5-HA-DGCR6/L-Konstrukt hergestellt. Bestehend aus dem eukaryotischen Expressionsvektor pSG5, dem Hämagglutinin-Epitop (33 bp = 11 AS) und dem offenen Leserahmen des DGCR6/L-Gens (660 bp = 220 AS), ergibt die Aminosäuresequenz von 231 AS und einem zu erwartenden Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Das HA-„Tag“ wurde eingefügt, da ein monoklonaler Antikörper gegen HA existiert (3F10, Roche). Dadurch lässt sich im Western Blot das HA-DGCR6/L-Protein nachweisen. HeLa-Zellen wurden mit pSG5-HA-DGCR6/L (Fugene™) transfiziert, nach 48h Zellextrakte hergestellt und über ein 12,5%iges SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Danach mit anti-HA-Primärantikörper und anti-Ratte-pox-Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit der ECL-Färbung wie in **Abbildung 5.3** dargestellt.

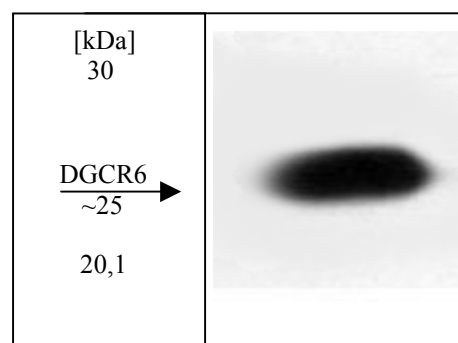


Abb. 5.3: Western-Blot; HeLa-Zellextrakt pSG5-HA-DGCR6/L, Nachweis mit anti-HA-AK 3F10. Das Zellextrakt wurde 48h nach Transfektion hergestellt und über ein 12,5%iges SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Danach mit dem monoklonalen anti-HA-Primärantikörper 3F10 (Roche) und anti-Ratte-Pox-Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit der ECL-Färbung. Wie erwartet ließ sich das HA-DGCR6 Protein in der Größe von 25kDa nachweisen.

5.2.3 Nachweis des HA-DGCR6/L-Proteins mit Hilfe der DGCR6 spezifischen Antikörper

Dazu wurde die Nitrocellulosemembran der Western Blot Analyse, die zum Nachweis des HA-Konstruktes hergestellt worden war (Abbildung 5.3) „gestrippt“ (4.6.3.3), das heißt, die anti-HA Antikörper wurden nach der ECL™-Färbung wieder vom Epitop entfernt, um eine zweite Antikörperfärbung am selben Fusionsprotein möglich zu machen. Für die zweite Antikörperfärbung am selben Fusionsprotein auf der Nitrocellulosemembran wurde diese mit dem DGCR6/L-Primärantikörper 7C8-2 inkubiert. Somit konnte gezeigt werden, dass der DGCR6/L spezifische Antikörper das selbe Fusionsprotein erkennt, wie der gegen das HA-Epitop gerichtete Antikörper (Abbildung 5.4).

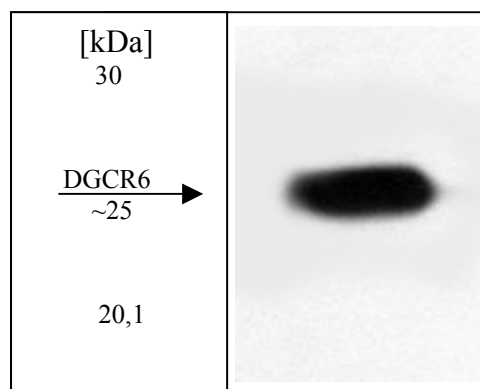


Abb. 5.4: Nachweis von HA-DGCR6, mit dem monoklonalen anti-DGCR6-Primärantikörper 7C8-2. Das Zellextrakt wurde über ein 12,5%iges SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Danach mit dem monoklonalen anti-DGCR6 (7C8-2) und anti-Ratte-Pox-Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit der ECL-Färbung. Wie erwartet ließ sich das HA-DGCR6 Protein in der Größe von 25kDa auch mit dem monoklonalen anti-DGCR6/L Antikörper spezifisch nachweisen.

5.2.4 Nachweis des endogenen DGCR6/L-Proteins

Nachdem der Nachweis von DGCR6/L in HeLa-Zellen, die mit dem Vektor pSG5-HA-DGCR6/L transfiziert wurden, mit dem HA spezifischen Antikörper erbracht werden konnte, sollte auch das endogene humane DGCR6/L-Protein nachgewiesen werden. Dazu ist ein DGCR6/L spezifischer Antikörper notwendig. Dieser wurde in der Diplomarbeit von Dipl.

Biol. T. Pfuhl in Zusammenarbeit mit E. Kremmer [Institut für molekulare Immunologie der GSF, München] hergestellt. Um nun das endogene DGCR6/L-Protein nachzuweisen wurden primäre Präputium-Fibroblasten kultiviert, Zellextrakte davon hergestellt, diese über ein 12,5%iges SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und danach mit dem monoklonalen anti-DGCR6/L-Primärantikörper (7C8-2) und anti-Ratte-pox-Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit der ECL-Färbung (**Abbildung 5.5**)

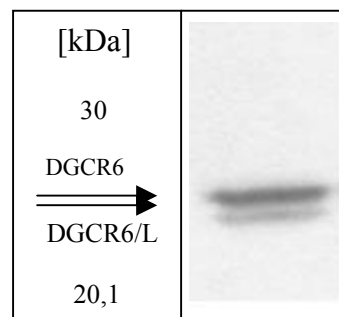


Abb. 5.5: Endogen nachgewiesenes DGCR6/L-Protein in primären Präputium-Fibroblasten

Zellextrakte primärer humaner Präputium-Fibroblasten wurden in einem 12,5% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, mit dem monoklonalen Primärantikörper 7C8-2 und anti-Ratte-pox-Sekundärantikörper inkubiert. In derselben Größe, wie bereits zuvor durch das HA-“Tag“ Konstrukt gezeigt, konnte das endogene DGCR6/L-Protein nachgewiesen werden.

Wie bereits zuvor durch das pSG5-HA-DGCR6/L Konstrukt dargestellt, konnte mit dem monoklonalen Primärantikörper das endogene DGCR6/L-Protein, in derselben Größe bestätigt werden. Es zeichnete sich hier eine Doppelbande für das Protein ab, von denen die obere Bande ein etwas stärkeres Signal zeigt.

5.2.5 Differenzierung der Homologe DGCR6 und DGCR6L

Es lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um die von EDELMANN et al., (2001) beschriebenen Homologe DGCR6 und DGCR6L handelt. Daher wurden verschiedene Klone durch Sequenzanalyse charakterisiert (GATC, Konstanz). Das Ergebnis der Analysen bestätigte die Vermutung. Klon #1 entspricht demnach DGCR6 und Klon #6 DGCR6L (vergl. Sequenzanalysen). In den Aminosäuresequenzen von DGCR6 und DGCR6L sind die sieben Aminosäuren, in denen sich die beiden Proteine unterscheiden, hervorgehoben.

Nukleotidsequenz von DGCR6

```

1 gggactgtcg taaaaggggc gggacgcgcc gcggtcggga tgacgtgagc tgggggcgct
61 cgtcgtcgca gccggcggct agcgggcgct cgcgccatg agcgcctacg gggcgccttg
121 gaggaggtgg cggacgggtgc ccggcagcag gagcgcacct accagctgct gtcggcgctta
181 cagagcctgg tgaaggagt tcccagctca ttccagcagc gcttgtccta caccacgctg
241 agcgacctgg ccctggcgct tctcgacggc accgtgttcg aaatcgtgca ggggctactg
301 gagatccagc acctcaccga aaagagcctg tacaaccagc gctgcgctt acagaacgag
361 catcgagtgc tcaggcaggc gctgcccagc aagcaccagg aagcccagca ggcctgcccg
421 ccccataacc tgcctgtgct tcaggcggct cagcagcgag aactagaggc ggtggagcac
481 cggatccgtg aggagcagcg ggcgatggac cagaagatcg tccctggagct ggaccggaag
541 gtggctgacc agcagagcac actggagaag gcgggggtgg ctggcttcta cgtgaccacc
601 aaccacaggy agctgatgct gcagatgaac ctgctggaac tcatccggaa gctgcagcag
661 aggggctgct gggcagggaa ggcagccctg gggctaggag gtccctggca gttgctgct
721 gccagtgctg accagaaagg cagccctgtc ccaccatagc cacaggcagc agaagtctgg
781 gcagagttca tcttcttgac ctttgccac tgcttcccg gctgcccga gggggttccc
841 cctgctgagg agagaccagg tggaccccag ccgctgtca ccttcatct gggacttgc
901 gtcaaaccct aggatagtct cataaagggg aggctgggcc agcctgctgc tgtctgctt
961 agggccaggc agagagtgag gctgggggtt ctacacctt actccaccgg gcacatcca
1021 acctgcaact gggcccactc gagtgcttgt tctggctca gccgctccct tggcagctgc
1081 agccccatg cagaagaggc tcccaggccc aagctctgtg tgaccagagc aaataaagat
1141 gcctcagt

```

Aminosäuresequenz von DGCR6

```

MERYAGALEEVADGARQQRHYQLLSALQSLVKELPSSFQQRLSY
TTLSDLALALLDGTVF EIVQGLLEIQHLTEKSLYNQRLRLQNEHR
VLRQALRQKHQEAQQACRPHNLPV LQAAQORELEAVEHR IREEQR
AMDQKIVLELDRKVADQOSTLEKAGVAGFYVTTNPQELMLQMNLL
ELIRKLQQRGCWAGKAALGLGGPWQLPAAQCDQKGSVPPP

```

Nukleotidsequenz von DGCR6L

```

1 gggacaatcg taaaaggggc gggacgcgcc gcgctcggga tgtcgtgaag ctgggggagc
61 tcgtcgccgc cgcggcggc tagcggcgt cgcgccatg gagcgcctacg cggccgcctt
121 ggaggaggtg gcggacagtg cccggcagca ggagcgcacac taccagttgc tgtcggcgct
181 acagagcctg gtgaaggagt tgcccagctc ttccagcagc cgcctgtcct acaccacgct
241 cagcgacctg gccctggcgc ttctcgacgg caccgtgttc gaaatcgtgc aggggctact
301 ggagatccag cacctcaccg aaaagagcct gtacaaccag cgcctgccc tacagaacga
361 gcaccgagtg ctcaggcagg cgtgcccga gaagcaccag gaagcccagc aggcctgccc
421 gcccacaaac ctgctgtggt ttcaggcggc tcagcagcga gaactagagg cctggaaca
481 ccggatccgt gaggagcagc gggcgatgga ccagaagatc atcctggagc tggaccgaa
541 ggtggctgac cagcagagca cactggagaa ggcgggggtg gctggcttct acgtgaccac
601 caaccacag gagctgatgc tgcagatgaa cctgctgga ctcatccgaa agctgcagca
661 gaggggctgc cggcagggg atgcagccct gggactggga ggtccctggc agtcgctgc
721 tgcccagtgt gaccagaaag gcagccctgt cccaccatag ccacaggcag cagaagtctg
781 ggcagagttc atcttcttga cctttggcca ctgccttccc agctgcccgc agggggttcc
841 ccctgctgag gagagaccag gtggacccta gctgctgtc acccttcatc tgggacttgc
901 tgtcaaacc taggatagtc tcataaaggg gaggtgggc cagcctgctg ctgtctgctt
961 caggaccagg cagagagtga ggctgggggt tctcacacct tactccaccg ggcacatccc
1021 aacctgcaact ggggcccacc cgagcgttgc ttctggtctc agccgctccc ttggcagctg
1081 cagccccat gcagaagagg ctcccaggcc caagctctgt gtgaccaga gaaataaaga
1141 tgcctcagt

```

Aminosäuresequenz von DGCR6L

```

MERYAAALEEVAD SARQQRHYQLLSALQSLVKELPSSFQQRLSY
TTLSDLALALLDGTVF EIVQGLLEIQHLTEKSLYNQRLRLQNEHR
VLRQALRQKHQEAQQACRPHNLPV VQAAQORELEAVEHR IREEQR
AMDQKIILELDRKVADQOSTLEKAGVAGFYVTTNPQELMLQMNLL
ELIRKLQQRGC RAGNAALGLGGPWQSPAAQCDQKGSVPPP

```


Sequenzanalyse von HA-DGCR6 Klonen

Klon #1

Entspricht DGCR6

```
gagtccgactacgctgagcgctcgcgggcgccctggaggaggtggcggacggtgcccttcagcaggagcgacact
accagctgctgtcggcgcttacagagcctggtgaaggagttgccagctcattccagcagcgcttgtcctacacca
cgctgagcgacactggccctggcgcttctcgacggcaccgtggtcgaaatcgctgcaggggctactggagatccagc
acctcaccgaaaagagcctgtacaaccagcgccctgcgccctacagaacgagcatcgagtgtcaggcaggcgctgc
ggcagaagcaccaggaagcccagcaggcctgcccggccccataacctgcctgtgcttcaggcggctcagcagcgag
aactagaggcgggtggagcaccggatccgtgaggagcagcgggcgatggaccagaagatcgctcctggagctggacc
ggaaggtggctgaccagcagagcacactggagaaggcgggggtggctggcttctacgtgaccaccaaccacagc
agctgatgctgcagatgaacctgctggaactcatccggaagctgcagcagaggggctgctgggcagggaaaggcag
ccctggggctaggaggtccctggcagttgctgctgccagtgtagaccagaaaggcagccctgtcccacataga
tctgaattcgggatccagatcttattaaagcagaacttggtttattgcagcttataatggttaca
```

Klon #6

Entspricht DGCR6L

```
Gagtccgactacgctgagcgctcgcgggcgccctggaggaggtggcggacggtgcccgccagcaggagcgacact
accagttgctgtcggcgcttacagagcctggtgaaggagttgccagctctttccagcagcgcttgcctacacca
cgctcagcgacactggccctggcgcttctcgacggcaccgtggtcgaaatcgctgcaggggctactggagatccagc
acctcaccgaaaagagcctgtacaaccagcgccctgcgccctacagaacgagcaccgagtgctcaggcaggcgctgc
ggcagaagcaccaggaagcccagcaggcctgcccggccccacaacctgcctgtggttcaggcggctcagcagcgag
aactagaggcgggtggaacaccggatccgtgaggagcagcgggcgatggaccagaagatcatcctggagctggacc
ggaaggtggctgaccagcagagcacaccggagaaggcgggggtggctggcttctacgtgaccaccaaccacagc
agctgatgctgcagatgaacctgctggaactcatccgaaagctgcagcagaggggctgccgggcagggaaatgcag
ccctgggactgggaggtccctggcagtcgctgctgccagtgtagaccagaaaggcagccctgtcccacataga
tctgaattcgggatccagatcttattaaagcagaacttggtttattgcagcttataatggttaca
```

Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glycin	Gly	G
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K

Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Die Klone #1 (DGCR6) und #6 (DGCR6L) wurden in COS1-Zellen transfiziert (Fugene) und im Western-Blot mit dem Primärantikörper anti-HA und 7C8-2, Sekundärantikörper jeweils anti-Ratte-pox dargestellt (**Abbildung 5.6**)

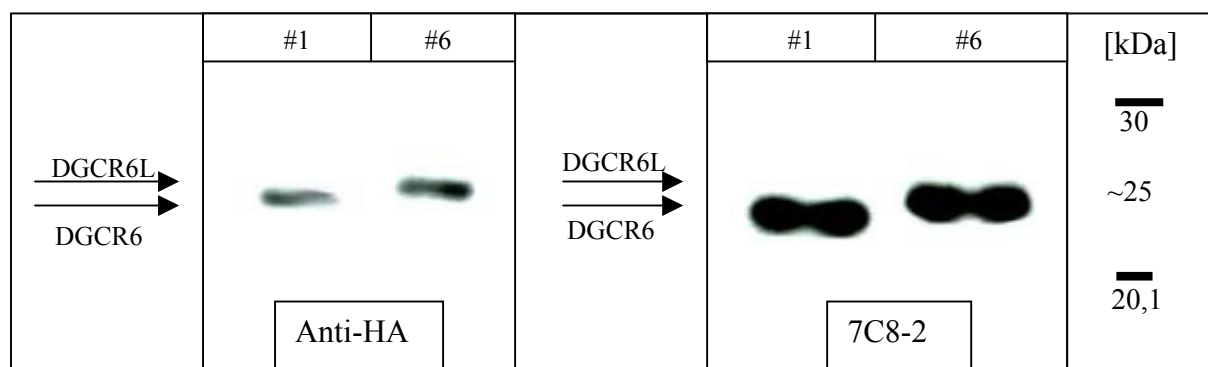


Abb. 5.6: Western-Blot von Extrakten aus COS1-Zellen, die mit Konstrukten der Klone #1 und #6 pSG5-HA-DGCR6/L transfiziert wurden. Klon #1 (DGCR6) und #6 (DGCR6L) wurden jeweils mit den Primärantikörpern anti-HA und 7C8-2 und den Sekundär-AK anti-Ratte-pox.

Wie in **Abbildung 5.6** dargestellt, weist DGCR6 (#1) gegenüber DGCR6L (#6) auch ein unterschiedliches Laufverhalten auf dem SDS-PAGE-Gel auf. Inwieweit sich dieser Unterschied auch auf die funktionellen Unterschiede auswirkt wird noch zu klären sein.

In der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-435 wird von EUER et al., (2002) eine Hochregulation der Expression, der mRNA des DGCR6, gegenüber der mRNA des DGCR6 in nicht metastasierenden Mammakarzinom-Zelllinien beschrieben. Beim Nachweis des endogenen DGCR6-Protein in humanen primären Fibroblasten, konnte im SDS-Gel eine Doppelbande auf der Höhe von ~25kDa gezeigt werden. Hierbei handelt es sich um die

homologe DGCR6 und DGCR6L, die beide in den primären Fibroblasten exprimiert wurden. Die Ausprägung der Expression des DGCR6/DGCR6L wie sie in humanen Fibroblasten gezeigt wurde, kann bei der von uns verwendeten humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 ebenso nachgewiesen werden. Es stellt sich ein etwas ausgeglicheneres Verhältnis zwischen den homologen DGCR6 und DGCR6L dar (**Abbildung 5.7**).

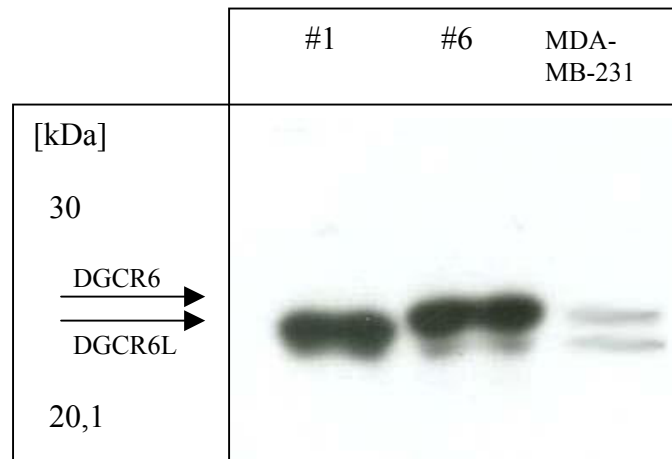


Abb. 5.7: Western-Blot der pSG5-HA-DGCR6 und pSG5-HA-DGCR6L Konstrukte in COS1-Zellen, mit der Gegenüberstellung des endogenen DGCR6 der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231.

In den COS1 Zellen ließen sich die pSG5-HA-DGCR6 und pSG5-HA-DGCR6L Konstrukte nachweisen. DGCR6 und DGCR6L waren in nahezu ausgeglichenem Verhältnis in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 nachzuweisen. Die Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper 7C8 dargestellt.

5.2.6 Bestimmung der Halbwertszeit des DGCR6/L-Protein

Durch die Hemmung des Proteinbiosyntheseapparates mittels Cycloheximid ist es möglich die Halbwertszeiten des DGCR6/L in verschiedenen Zelllinien zu zeigen. Cycloheximid hemmt wahrscheinlich die Translokaseaktivität der 80S-Ribosomen. Dadurch kann die Neusynthese von Protein soweit gehemmt werden, dass der Proteinabbau, bzw. die Stabilität des Proteins, dargestellt werden. Dies geschah durch zeitlich versetzt hergestellte Zellextrakte die mit einem SDS-Gel aufgetrennt wurden. Dazu wurden zunächst HeLa-Zellkulturen und

COS1-Zellkulturen mit pSG5-HA-DGCR6-Konstrukten transfiziert und wie in 4.8.1 behandelt. Die Proteinmengen wurden photometrisch gemessen und gleiche Proteinmengen auf das SDS-Gel aufgetragen, um die Auswertung repräsentativ zu machen. Die Analysen der Zellextrakte im Western-Blot sind in **Abbildung 5.8 und 5.9** aufgeführt. Als Marker für die Proteinbiosyntheseinhibition wurde p53 verwendet, das durch den monoklonalen Primärantikörper Ab-6 der Firma Oncogene™ im Western-Blot dargestellt werden kann.

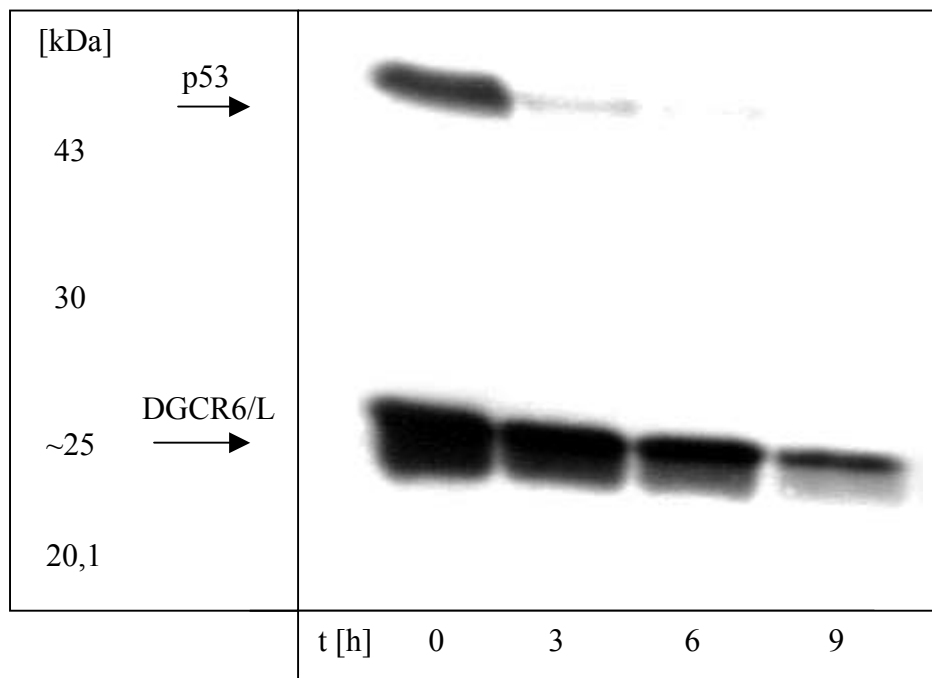


Abb. 5.8: Halbwertszeit Bestimmung: Western-Blot von Extrakten aus HeLa-Zellen, welche mit pSG5-HA-DGCR6/L-Konstrukten transfiziert wurden. Die Extrakte wurden in den Zeitabständen ausgehend von t(0)h, in 3h, 6h, 9h hergestellt, bei 4°C gelagert und gemeinsam aufgetrennt und mit dem Antikörper 7C8-2 dargestellt. Hierbei diente p53 als Kontrolle der Proteinbiosynthesehemmung hier wurde anti- p53 (Ab-6) eingesetzt.

In **Abbildung 5.8** wird gezeigt, dass p53 nach sechs Stunden Cycloheximidbehandlung in HeLa Zellen nicht mehr nachzuweisen ist. Die Proteinbiosynthese wurde erfolgreich gehemmt und es können Rückschlüsse auf die Stabilität des DGCR6/L gezogen werden. DGCR6/L ist auch nach neun Stunden noch in HeLa-Zellen nachzuweisen, wenn auch ein deutlicher Rückgang zu verzeichnen ist. In den COS1-Zellextrakten hingegen ist über den Zeitraum von acht Stunden keine Abnahme der Intensität des Proteinsignals im Western-Blot zu erkennen. Dies ist möglicherweise auf die Stabilisierung durch das T-Antigen des SV40 Virus zurückzuführen (**Abbildung 5.9**).

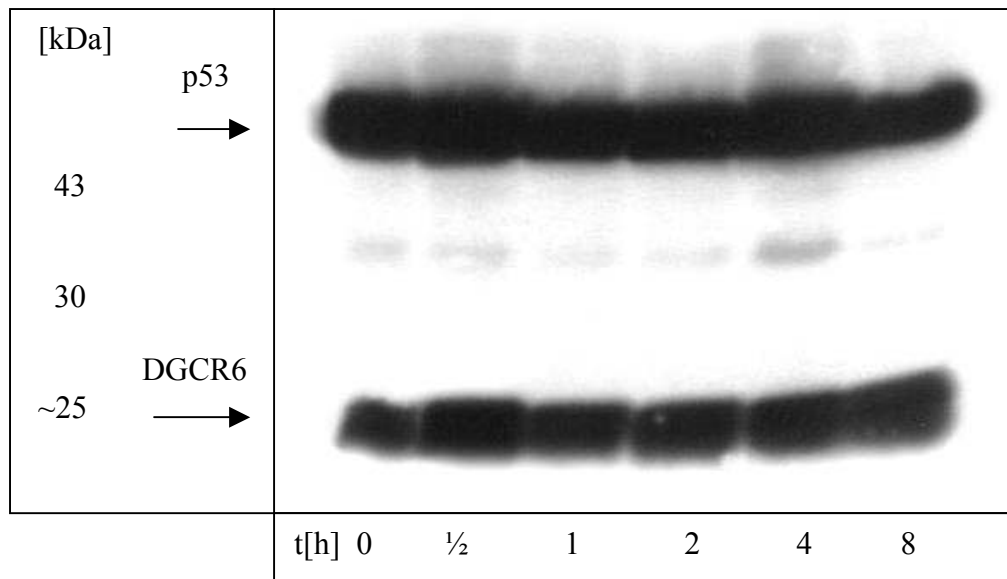


Abb.5.9: Halbwertszeit Bestimmung von DGCR6/L in COS1-Zellextrakten mittels Western-Blot, welche mit pSG5-HA DGCR6-Konstrukten transfiziert wurden. Die Extrakte wurden in den Zeitabständen ausgehend von t(0)h, in 1/2h, 1h, 2h, 4h, 8h hergestellt, bei 4°C gelagert und gemeinsam aufgetrennt. Hierbei diente p53 als Kontrolle der Proteinbiosynthesehemmung. Wie dargestellt ist in COS1-Zellen sowohl p53 als auch DGCR6/L stabilisiert, d.h. es lässt sich auch nach 8h kein Abbau der Proteine nachweisen. Dies ist möglicherweise auf die Stabilisierung durch das T-Antigen des SV40 Virus zurückzuführen, mit welchem COS1-Zellen immortalisiert sind. Angefärbt wurde mit dem Antikörper 7C8-2 und anti- p53 (Ab-6).

Nun sollte auch die Stabilität des endogenen DGCR6 bzw. des DGCR6L in primären Zelllinien gezeigt werden. Hierzu wurden humane Präputium-Fibroblasten Kulturen mit Cycloheximid behandelt. Um auch hier die gewünschte Proteinbiosynthesehemmung zu erreichen, mussten drei- bis vierfach höhere Cycloheximid Konzentrationen als bei den Tumorzelllinien eingesetzt werden. **Abbildung 5.10** zeigt Zellextrakte von Fibroblasten die nach unterschiedlich langer Inkubation von Cycloheximid hergestellt wurden (t = 0, t = 1/2, t = 1, t = 2, t = 4, t = 8h). Das endogene DGCR6/L lässt sich in den Fibroblasten- Zellextrakten bis t 2h nachweisen, daraus ergibt sich eine etwaige Halbwertszeit von 1 Stunde – 1 1/2 Stunden. DGCR6/L wurde mit dem Antikörper 7C8-2 dargestellt. Zur Kontrolle der Proteinbiosynthesehemmung ist auch hier anti- p53 (Ab-6) eingesetzt worden. p53 ist bei dem Zellextrakt, welches nach einer Stunde hergestellt wurde, nicht mehr nachweisbar, als Zeichen der erfolgreichen Proteinbiosynthesehemmung. Ob nun die Tatsache, dass DGCR6/L

in Tumorzelllinien stabiler ist als in Primären-Zelllinien, oder ob auch die Art des Herkunftsgewebes ebenfalls der Zellen einen Einfluss auf die Proteinstabilität hat ist Gegenstand derzeitiger Forschungen und kann hier noch nicht abschließend geklärt werden.

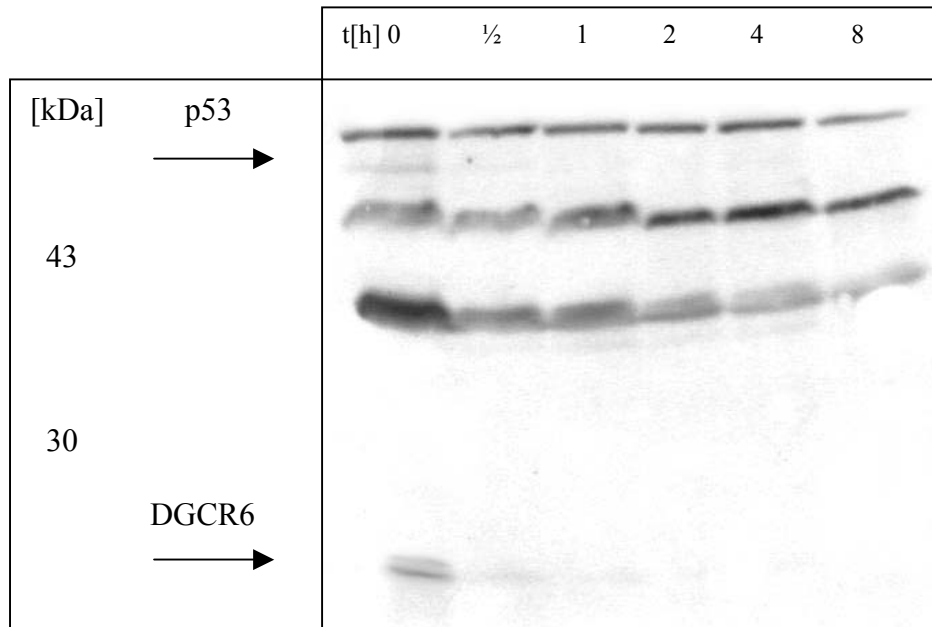


Abb. 5.10: Halbwertszeitbestimmung von DGCR6/L (p53) in Zellextrakten primärer Fibroblasten im Western-Blot mit dem Primär-AK 7C8-2. Als Kontrolle der Proteinbiosynthese- Inhibition diente p53, das mit dem Primär-AK Ab-6 dargestellt ist. Nach zwei Stunden kann DGCR6/L nicht mehr nachgewiesen werden. Die nicht bezeichneten Proteinbanden stellen einen Hintergrund dar, welcher in primären Zellextrakten bei 7C8-2 entsteht.

5.2.7 Analyse der subzellulären Lokalisation des DGCR6/L

Um die subzelluläre Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle zu zeigen wurden COS1-Zellen mit pSG5-HA-DGCR6/L-Konstrukten transfiziert (Fugene) und wie in 4.4 behandelt. Nach 24h wurden die COS1-Zellen fixiert, mit Antikörpern gefärbt und die Lokalisation der transient exprimierten Proteine fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Die pSG5-HA-DGCR6/L-Konstrukte wurden mit 7C8-2 (anti-DGCR6) Antikörper und anti-Ratte-FITC mAks, die Nuklei mit DAPI dargestellt (**Abbildung 5.11**).

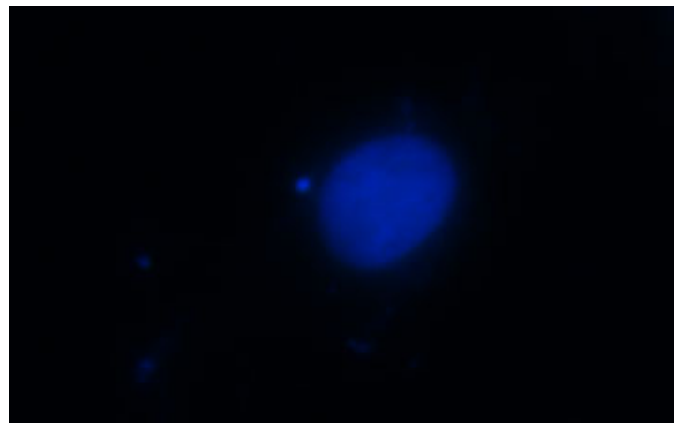
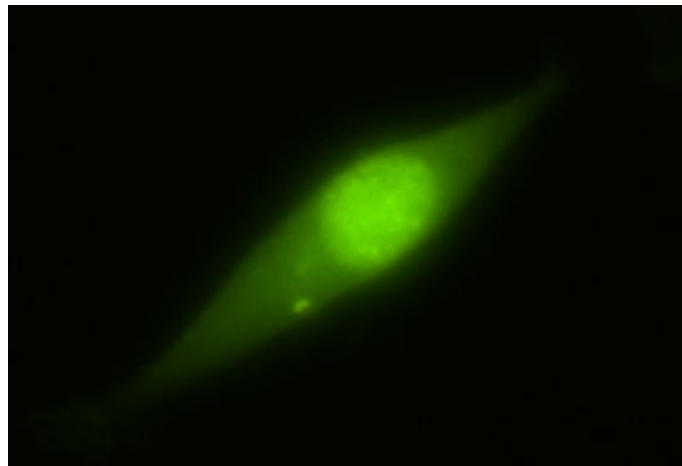


Abb. 5.11: Immunfluoreszenz zur subzellulären Lokalisation des DGCR6/L

Oberes Bild: Fluoreszenz von COS1-Zellen transfiziert mit pSG5-HA-DGCR6/L-Konstrukten

Unteres Bild: Kern Darstellung mit DAPI

→ DGCR6/L befindet sich vorwiegend im Zellkern

Das DGCR6/L-Protein wird demnach vorwiegend im Kern exprimiert, aber auch im Zytoplasma ist es deutlich, wenn auch nicht in der gleichen Intensität wie im Kern nachzuweisen. Die Färbung des Proteins in der Zelle weist eine diffuse Verteilung des Fluoreszenzsignals auf, somit ist weder eine spezifische Anreicherung an der Kernmembran, noch an der Zellmembran, zu erkennen.

6 Diskussion

Das Epstein-Barr Virus (EBV) verursacht die infektiöse Mononukleose und ist an der Genese verschiedener humaner Tumorerkrankungen ursächlich beteiligt. Die EBV-kodierten Kernantigene 2 und 3C (EBNA2, EBNA3C) stellen Schlüsselgene der EBV-vermittelten Tumorgenese dar. EBNA3C wird mit der Metastasierung EBV-positiver Tumore in Verbindung gebracht. Es konnte nachgewiesen werden, dass Zellen der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231, in denen Nm23-H1 exprimiert wird, eine 50-75%ige Reduktion der Zellmigration zeigen, die bei einer Co-Expression mit EBNA3C wieder aufgehoben wird. EBNA3C hemmt somit den antimetastatischen Effekt von Nm23-H1 (SUBRAMANIAN et al., 2001). Bei der Suche nach zellulären Partnerproteinen von EBNA2 und EBNA3C, wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment das DGCR6-Protein als potentieller Bindungspartner identifiziert (Grässer, 2003, unveröffentlicht). Daher erscheint es möglich, dass DGCR6 bei der Metastasierung EBV-positiver Tumoren (z.B. Nasopharynx-Karzinom, NPC) eine Rolle spielen könnte.

Um biochemische Untersuchungen an DGCR6/DGCR6L durchführen zu können, war es zunächst notwendig, DGCR6/DGCR6L in eukaryotischen Zellen zu exprimieren, da die DGCR6/DGCR6L-Proteine bislang nicht beschrieben waren. Dazu wurde zuerst aus einer Testis-cDNA-Bank mittels PCR der entsprechende Genabschnitt, welcher mit einem HA-Epitop ergänzt wurde, in den pGEM-Vektor subkloniert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 umkloniert. Anschließend wurden die DGCR6-Konstrukte in unterschiedliche Zelllinien transfiziert und im Western-Blot nachgewiesen. In einer parallel durchgeführten Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen DGCR6 hergestellt. Mit Hilfe dieser monoklonalen Antikörper war es nun möglich auch das endogene DGCR6 sowie DGCR6L nachzuweisen. Daher sollte auch die Expression in unterschiedlichen Zelllinien sowie die subzelluläre Lokalisation analysiert werden. Weiterhin sollte die Stabilität des DGCR6-Proteins in HeLa-Zellen und COS1-Zellen sowie in primären humanen Fibroblasten und die subzelluläre Lokalisation des DGCR6/L im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

6.1 Klonierung des HA-DGCR6/L Effektorplasmids

Die Klonierung eines DGCR6/L-Konstruktes mit einem HA-„Tag“ war notwendig, um das exprimierte Protein in einem ersten Schritt mit Hilfe von HA-Antikörpern (Fa. Roche) nachzuweisen. Das DGCR6/L-Gen wurde mittels entsprechender Oligonukleotide in einer PCR amplifiziert und gleichzeitig am 5'-Ende die Sequenz für ein HA-„Tag“ eingefügt, was zu einem Fragment mit einer Größe von ca. 700 bp führte. Darin war der komplette offene Leserahmen des DGCR6/L, der in der Literatur angegeben ist, enthalten. Das N-terminale Ende des davon abgeleiteten HA-DGCR6/-DGCR6L Proteins enthält ein „HA-Tag“, welches mit spezifischen Antikörpern nachweisbar ist. Das Amplifikat wurde in den eukaryotischen Expressionsvektor pSG5 über EcoRI einkloniert. Nach Transformation der ligierten DNA in pMOS-Bakterien konnten durch einen Kontrollverdau Klone, die das Insert in richtiger Orientierung enthielten, identifiziert werden. Diese Klone wurden sequenziert (Fa. GATC, Konstanz), wobei sich herausstellte, dass der Klon #1 dem DGCR6 entspricht, während Klon #6 mit dem DGCR6L übereinstimmt, das zu 97% homolog zum DGCR6 ist (EDELHANN et al., 2001).

6.2 Eukaryotische Expression des HA-DGCR6/L

Das HA-DGCR6/L weist 660 bp auf (Abbildung 5.2), das entspricht 220 AS und somit einem Molekulargewicht des Proteins von ca. 25 kDa. Die aus der Klonierung erhaltenen Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert und die Expression des Proteins mittels HA-Antikörper im Western Blot (siehe Abbildung 5.3) dargestellt. Die in der parallel durchgeführten Arbeit von Dipl. Biol. T. Pfuhl hergestellten monoklonalen Antikörper detektieren sowohl das pSG5-HA-DGCR6/L-Konstrukt als auch das endogene DGCR6/L-Protein (Abbildung 5.6). Es konnte so gezeigt werden, dass die Subklonierung erfolgreich war und die DGCR6/L-Proteine zuverlässig erkannt wurde (Vergleich mit HA-Kontrolle). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die hergestellten DGCR6 Antikörper in der Lage sind sowohl das DGCR6 als auch das DGCR6L zu erkennen (Abbildung 5.7).

6.3 Nachweis des endogenen DGCR6/DGCR6L-Proteins

Mit dem monoklonalen Antikörper 7C8 (anti-DGCR6/L) konnte auch das endogene DGCR6/L-Protein in primären humanen Fibroblasten nachgewiesen werden. In unterschiedlichen Tumorzelllinien wurde das endogene DGCR6/L im Rahmen der Stabilitätsuntersuchung nachgewiesen. Schon in frühen Experimenten fiel auf, dass sich häufig eine Doppelbande in den Western-Blots abzeichnete. Dass es sich hierbei um die von EDELMANN et al., 2001 beschriebenen Homologe DGCR6 und DGCR6L handelte, konnte im Western-Blot (Abbildung 5.6) gezeigt werden, in dem eine Gegenüberstellung von Klon #1 (DGCR6) und Klon #6 (DGCR6L) zu sehen ist. Dabei handelt es sich um Zellextrakte des Subklons der metastasierenden humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231, in dem beide Homologe exprimiert wurden. Sowohl DGCR6 als auch DGCR6L ließen sich in nahezu ausgeglichenem Maße exprimieren. Eine Hochregulation der mRNA des DGCR6 in subklonen der humanen Zelllinie MDA-MB-435 im Zelllinien wurde bereits von EUER et al., 2002 beschrieben. In den von uns getesteten Zelllinien konnte das DGCR6/L-Protein in unterschiedlicher Ausprägung nachgewiesen werden (Abbildung 6.1). Wovon diese Unterschiede in der Expression abhängen wird noch zu klären sein.

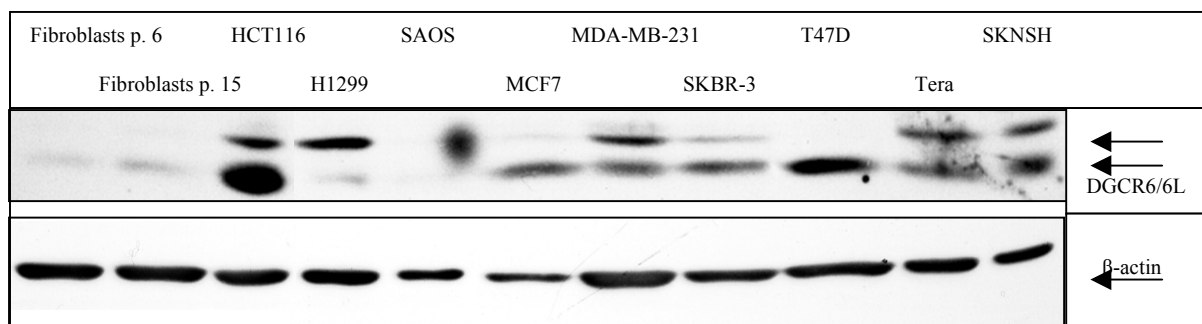


Abbildung 6.1: Expression des DGCR6/L ist in Tumorzellen stark erhöht.

Oben: Zellextrakte aus primären humanen Fibroblasten im Vergleich mit verschiedenen Tumorzelllinien. Unten: Der Blot demonstriert am β -Actin - Nachweis, dass die Spuren vergleichbare Mengen an Protein enthielten. In Western- Blot Analysen wurden bereits unterschiedliche DGCR6/DGCR6L Expressionsmuster beschrieben. Der Western-Blot zeigt unterschiedlich erhöhte DGCR6/DGCR6L-Protein Expressionsmuster in verschiedenen Tumorzelllinien im Vergleich mit primären humanen Fibroblasten. Die β -Actin Banden dienen der relativen Vergleichbarkeit der Proteinmengen. (Abbildung wurde von Dipl. Biol. T. Pfuhl zur Verfügung gestellt.)

In den Extrakten verschiedener Zelllinien zeigte sich eine Doppelbande deren Herkunft geklärt werden sollte. Das unterschiedliche Laufverhalten auf dem SDS-Gel von DGCR6, dabei stand zum einen eine Phosphorylierung und zum anderen das unterschiedliche Laufverhalten von DGCR6 und DGCR6L zur Diskussion. In unveröffentlichten Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe Grässer konnte bislang gezeigt werden, dass die Proteine DGCR6 und DGCR6L phosphoryliert sind. Dieser Befund führte zunächst zu der Annahme, die Phosphorylierung könnte etwas mit dem unterschiedlichen Laufverhalten zu tun haben. Um dieser Hypothese nach zu gehen wurden COS1-Zellen mit HA-DGCR6 und HA-DGCR6L transfiziert und nach 48h mit $H_3^{32}PO_4$ metabolisch markiert. Danach wurden mit dem anti-DGCR6-Antikörper die Zellextrakte immunpräzipitiert. Die Markerbande zeigte ^{14}C -markiertes Protein. Bei eindeutig identifiziertem HA-DGCR6 und HA-DGCR6L ließ sich nach Transfektion im Western-Blot je eine Bande nachweisen. Diese Phosphorylierung hatte keinen Einfluss auf das unterschiedliche Laufverhalten im SDS-Gel (Abbildung 6.2). Vielmehr ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die Doppelbande vom DGCR6- und DGCR6L-Protein stammt und nicht etwa vom DGCR6-Protein und DGCR6-phosphorylierten Protein oder vom DGCR6L-Protein und DGCR6L-phosphorylierten Protein.

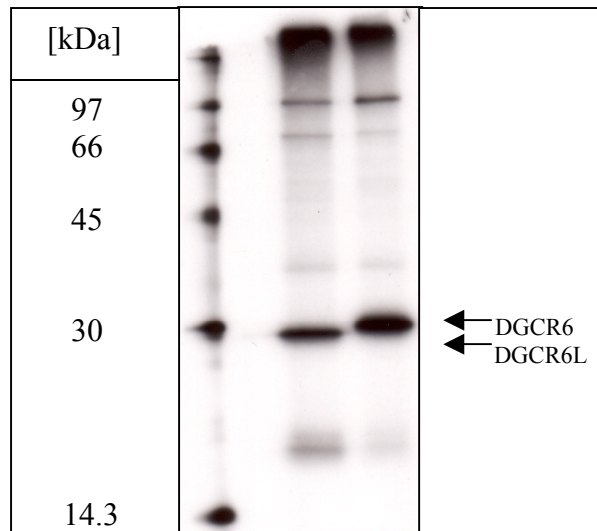


Abbildung 6.2: In vivo Phosphorylierung von DGCR6 und DGCR6L

COS1-Zellen wurden mit HA-DGCR6 und HA-DGCR6L transfiziert und nach 48h mit $H_3^{32}PO_4$ metabolisch markiert. Zellextrakte wurden mit dem anti-DGCR6-Antikörper immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde auf ein 10%iges SDS-Gel aufgebracht, welches getrocknet und mittels ECL-Färbung exprimiert wurde. Die Markerbande zeigt ^{14}C -markiertes Protein. (Abbildung zur Verfügung gestellt von Dipl. Biol. T.Pfuhl)

Die sieben Aminosäuren, um die sich die zueinander homologen Proteine unterscheiden, können Einfluss auf die Struktur der beiden Proteine haben und möglicherweise das unterschiedliche Laufverhalten bedingen. Die strukturellen Unterschiede könnten natürlich auch funktionelle Unterschiede beinhalten. Die beiden Gene sind schon seit mindestens 12 Mio. Jahren konserviert und somit scheint es evolutionär wichtig zu sein, dass beide Gene funktionell vorhanden sind (EDELHANN et al., 2001).

6.4 Untersuchungen zur Halbwertszeit des DGCR6/L-Proteins

Durch die Hemmung des Proteinbiosyntheseapparates mittels Cycloheximid ist es möglich, die metabolische Stabilität des DGCR6/DGCR6L-Proteins in verschiedenen Zelllinien durch zeitlich versetzte Herstellung von Zellextrakten zu untersuchen. In der nicht humanen COS1-Zelllinie zeigt sich die Stabilisierung des DGCR6-Proteins in ähnlicher Form wie die Stabilisierung des p53. Dies lässt vermuten, dass DGCR6 in den COS1-Zellen durch das T-

Antigen des SV40-Virus stabilisiert wird. So war in COS1 Zellen nach 8 Stunden weder ein Abbau des DGCR6-Proteins noch des p53 zu verzeichnen. In HeLa-Zellen zeigte sich ein deutlicher Rückgang des DGCR6 innerhalb der ersten 9 Stunden, wohingegen in primären humanen Fibroblasten das DGCR6-Protein bereits nach zwei Stunden nicht mehr nachweisbar ist. In den hier aufgeführten Untersuchungen lässt sich die von EUER et al., (2002) beschriebene Hochregulation der DGCR6 mRNA in einem Subklon der metastasierenden humanen Mammakarzinom Zelllinie in Einklang bringen. Die Stabilität des DGCR6-Proteins ist in Tumorgewebe deutlich erhöht. Im Fall der COS1-Zellen, wird das Protein stabilisiert, dadurch ist kein Abbau nachzuweisen.

Es wäre vorstellbar, dass das DGCR6-Protein in Tumorzellen, besonders in metastasierenden Tumorzellen, stabilisiert wird. Dies kann daran liegen, dass diese Zellen, durch die mangelnde Kontaktinhibition, ein unbegrenztes Wachstum aufweisen und die Kontaktinhibition einen Einfluss auf die Stabilisierung hat. In der Literatur sind die mRNA-Level in verschiedenen humanen Geweben beschrieben (DEMČUK, THOMAS and AURIAS et al., 1996). In Skelettmuskel- und Herzgewebe fand man die größten Mengen, was eigentlich nicht darauf hinweist, dass die Mengen an DGCR6-Protein im Zusammenhang mit dem Wachstum der Zelle stehen könnte. Auch denkbar wäre, dass DGCR6 in der Verarbeitung wachstumshemmender Signale eine Rolle spielt. Weiteren Aufschluss darüber könnte auch hier eine Bestimmung der Halbwertszeiten des DGCR6-Proteins in den unterschiedlichen Geweben bringen.

6.5 Subzelluläre Lokalisation des DGCR6/L-Proteins

Das DGCR6/L-Protein sollte in seiner subzellulären Lokalisation mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden. Hierzu wurden COS1-Zellen transfiziert und im Fluoreszenzmikroskop mit dem Antikörperklon 7C8 (anti-DGCR6) nachgewiesen (s.a. 4.6.5). Dass das DGCR6/L-Protein vorwiegend im Kern aber auch im Zytoplasma zu finden ist, konnte auf eine mögliche Funktion als Shuttleprotein hinweisen. Eine Transmembranfunktion wurde unter anderem von HIERK et. al., (2004) postuliert. Diese konnten wir bislang jedoch nicht bestätigen, da weder der spezifische Antikörper 7C8 noch der anti-HA Antikörper in B-Zellen (BJAB), die HA-DGCR6 bzw. HA-DGCR6L exprimierten, ein Membransignal zeigten. Das außenständige HA-Epitop, das N-Terminal in das Fusionsprotein eingefügt war, hätte ein abzugrenzendes Plasmamembransignal zeigen müssen. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Eine

Reaktion mit den DGCR6/L-spezifischen Antikörpern 7C8 und 2H5, welche ein Anfärben des außen liegenden C-Terminus des DGCR6 postuliert hätten, blieb ebenso aus. Somit können wir eine Lokalisation in der Plasmamembran weitestgehend ausschließen.

6.6 Ausblick

Das DGCR6-Protein konnte erfolgreich in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Dies sollte nun die Grundlage sein, um eine Reihe weiterer Untersuchungen an diesem Protein durchzuführen. Es muss noch untersucht werden, in welcher Phase des Zellzyklus das DGCR6/L vorwiegend exprimiert wird. Dabei wäre es interessant zu zeigen, welchen Einfluss die Art der Zelle hat und welches der Homologe DGCR6 und DGCR6L in der jeweiligen Zellart bevorzugt exprimiert wird. Die mRNA-Menge wurde für verschiedene humane Gewebe beschrieben. Es zeigte sich, dass die mRNA vor allem in ruhenden Zellen wie Skelettmuskel- und Herzmuskelgewebe zu finden ist (DEMCZUK, THOMAS and AURIAS et al., 1996), was jedoch den Umkehrschluss, dass das Proteinniveau mit der Proliferation der Zelllinie korreliert nicht zulässt. Zusätzlich könnten mit der Überprüfung der Proteinstabilität bzw. der Halbwertszeit in einzelnen Geweben die Untersuchungen ergänzt werden. Hierzu ist es notwendig, noch andere Tumorzelllinien im Vergleich zu primären Zelllinien auf die DGCR6/L-Proteinniveaus zu testen. Insbesondere metastasierende versus nicht metastasierende EBV-positive Tumorzelllinien kämen hier in Frage. Dabei sei hier noch einmal im Speziellen auf die von EUER et al., 2002 beschriebene Hochregulation der DGCR6-mRNA, in der metastasierenden, humanen Mammakarzinom-Zelllinie im Vergleich zur nicht metastasierenden Mammakarzinom-Zelllinie hingewiesen. In dem uns zugeschickten Probenmaterial von David Tarin (Co-Autor der Veröffentlichung EUER et al.; 2002) konnte im Rahmen der Untersuchungen von Dipl. Biol. T. Pfuhl jedoch die bereits erwähnte Hochregulation des DGCR6-Proteins nicht bestätigt werden. Es zeigten sich dieselben Mengen von DGCR6/DGCR6L im Vergleich zu humanen Fibroblasten.

HIERK et. al., (2004) beschreibt am „Hühner Model“, am Ortholog für DGCR6, die unterschiedlichen Expressionsmuster der Gene TBX-1, UFD1L und HIRA, sowie einen Einfluss auf die Expressionsmengen der Gene. Dies hat Auswirkungen auf die Modulation der Zellen der Neuralleiste. Wir fanden kein Einfluss auf die EBNA2 und EBNA3C vermittelte Genexpression viraler Promotoren.

In weiteren Untersuchungen soll gezeigt werden, ob eine Co-Lokalisation der Proteine EBNA2 und EBNA3C mit dem DGCR6/L-Protein vorliegt. Dies ließe sich mit einer Co-Immunpräzipitation in vivo mit nativen Zellextrakten zeigen. Desweiteren ist das DGCR6/L-Protein nicht in der Lage die Transaktivierungseigenschaften von EBNA2 zu beeinflussen. Dazu wurden Transaktivierungsassays durchgeführt werden.

Denkbar wäre auch, dass DGCR6/L an Tyrosin phosphoryliert ist und somit einen Einfluss auf die Regulation des Wachstums oder der Differenzierung von Zellen haben kann. Tyrosinphosphorylierte Proteine sind häufig an zellulären Signalwegen beteiligt und könnten so möglicherweise als Substrat der Proteinkinase-C, einen Einfluss auf die Entstehung von Karzinomen haben.

7 Literaturverzeichnis

1. ARMBINDER, R. F., MULLEN, M. A., CHANG, Y. N., HAYWARD, G. S., HAYWARD, S. D. (1991). Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J Virol.*, **65**: 1466-1479
2. ARRAND, J. R., RYMO, L., WALSH, J. E., BJORCK, E., LINDAHL, T., GRIFFIN, B. E. (1981). Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuklease fragments. *Nucleic Acids Res.*, **9**: 2999-3014
3. AUBRY, M. et al. (1993). Isolation of a zinc finger gene consistently deleted in DiGeorge syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **2**: 1583-1587
4. BAER, R., BANKIER, A. T., BIGGIN, M. D., DEININGER, P. L., FARELL, P. J., GIBSON, T. J., HATFUL, G., HUDSON, G. S., SATCHWELL, S. C., SEGUIN, C. et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, **310**: 207-211
5. BAIN, M., WATSON, R. J., FARRELL, P. J., ALLDAY, M. J. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a powerful repressor of transcription when tethered to DNA. *J Virol.*, **70**: 2481-9
6. BARBULESCU M., TURNER G., SEAMAN M.I., DEINARD A.S., KIDD K.K., LENZ J. (1997). Many human endogenous retrovirus K (HERV-K) proviruses are unique to humans. *Curr Biol.*, **9**(16): 861-8
7. BIRNBOIM, H. C., DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**(6): 1513-1523
8. BOLIVAR, F., RODRIGUEZ, R.L., GREENE, P., BETLACH, C. HEYNECKER, H.L., BOYER, H.W., CROSA, J.K.H., FALKOW, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vesicles II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**: 95-101
9. BUDARF, M. L., COLLINS, J., GONG, W., ROE, B., WANG, Z., BAILEY, L. C., SELLINGER, B., MICHAUD, D., DRISCOLL, D. A., EMANUEL, B. S. (1995). Cloning a balanced translocation associated with DiGeorge syndrome and identification of a disrupted candidate gene. *Nat Genet.*, **10**(3): 269-278
10. BUDARF M.L., KONKLE B.A., LUDLOW L.B., MICHAUD D., LI M., YAMASHIRO D.J., MCDONALD-MCGINN D., ZACKAI E.H., DRISCOLL D.A. (1995). Identification of a patient with Bernard-Soulier syndrome and a

- deletion in the DiGeorge/velo-cardio-facial chromosomal region in 22q11.2. *Hum Mol Genet.*, **4**(4): 763-6
11. BURKITT, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg.*, **46**(197): 218-223
 12. BURNETTE W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.*, **112**(2):195-203
 13. CHACONAS, G., VAN DE SANDE, J.H. (1980). Labelling of RNA and DNA restriction fragments. *Enzymol.*, **65**, 75-85
 14. CHIEFFO C., GARVEY N., GONG W., ROE B., ZHANG G., SILVER L., EMANUEL B.S., BUDARF M.L. (1997). Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics*, **43**(3): 267-77
 15. CHISAKA O., CAPECCHI M.R. (1991). Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene hox-1.5. *Nature*, **350**(6318): 473-9
 16. COHEN, J.I., WANG, F.; MANNICK, J., KIEFF, E. (1989). Epstein Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 9558-62
 17. COLLINS J.E., MUNGALL A.J., BADCOCK K.L., FAY J.M., DUNHAM I. (1997). The organization of the gamma-glutamyl transferase genes and other low copy repeats in human chromosome 22q11. *Genome Res.*, **7**(5):522-31
 18. COTTER, M. A., 2nd, ROBERTSON, E. S. (2000). Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of Epstein-Barr nuclear antigen 3C with prothymosin alpha. *Mol Cell Biol.*, **20**: 5722-35
 19. DELOUKAS P., SCHULER G.D., GYAPAY G., BEASLEY E.M., SODERLUND C., RODRIGUEZ-TOME P., HUI L., MATISE T.C., MCKUSICK K.B., BECKMANN J.S., BENTOLILA S., BIHOREAU M., BIRREN B.B., BROWNE J., BUTLER A., CASTLE A.B., CHIANNILKULCHAI N., CLEE C., DAY P.J., DEHEJIA A., DIBLING T., DROUOT N., DUPRAT S., FIZAMES C., FOX S., GELLING S., GREEN L., HARRISON P., HOCKING R., HOLLOWAY E., HUNT S., KEIL S., LIJNZAAD P., LOUIS-DIT-SULLY C., MA J., MENDIS A., MILLER J.,

- MORISSETTE J., MUSELET D., NUSBAUM H.C., PECK A., ROZEN S., SIMON D., SLONIM D.K., STAPLES R., STEIN L.D., STEWART E.A., SUCHARD M.A., THANGARAJAH T., VEGA-CZARNY N., WEBBER C., WU X., HUDSON J., AUFRAY C., NOMURA N., SIKELA J.M., POLYMERPOULOS M.H., JAMES M.R., LANDER E.S., HUDSON T.J., MYERS R.M., COX D.R., WEISSENBACH J., BOGUSKI M.S., BENTLEY D.R. (1998). A physical map of 30,000 human genes. *Science*, **282**(5389):744-6
20. DEMCZUK, S., ALEDO, R., ZUCMAN, J., DELATTRE, O., DESMAZE, C., DAUPHINOT, L., JALBERT, P., ROULEAU, G. A., THOMAS, G., AURIAS, A. (1995), Cloning of a balanced translocation breakpoint in the DiGeorge syndrome critical region and isolation of a novel potential adhesion receptor gene in its vicinity. *Hum Mol Genet.*, **4**(4): 551-558
21. DEMCZUK S., LEVY A., AUBRY M., CROQUETTE M.F., PHILIP N., PRIEUR M., SAUER U., BOUVAGNET P., ROULEAU G.A., THOMAS G., et al. (1995). Excess of deletions of maternal origin in the DiGeorge/velo-cardio-facial syndromes. A study of 22 new patients and review of the literature. *Hum Genet.*, **96**(1): 9-13
22. DEMCZUK S., DELATTRE O., VIGNAL A., WEISSENBACH J., THOMAS G., AURIAS A. (1995). Physical mapping of 30 CA repeats on human chromosome 22. *Genomics*, **27**(2): 345-7
23. DEMCZUK S., AURIAS A. (1995). DiGeorge syndrome and related syndromes associated with 22q11.2 deletions. A review. *Ann Genet.*, **38**(2): 59-76
24. DEMCZUK, S., THOMAS, G., AURIAS, A. (1996). Isolation of a novel gene from the DiGeorge syndrome critical region with homology to *Drosophila* *gdl* and to human *LAMC1* genes. *Hum Mol Genet.*, **5**(5): 633-638
25. DESMAZE C., PRIEUR M., AMBLARD F., AIKEM M., LEDEIST F., DEMCZUK S., ZUCMAN J., PLOUGASTEL B., DELATTRE O., CROQUETTE M.F., et al. (1993). Physical mapping by FISH of the DiGeorge critical region (DGCR): involvement of the region in familial cases. *Am J Hum Genet.*, **53**(6): 1239-49
26. DIGEORGE, A. M. (1968). Congenital absence of the thymus and its immunological consequences: Concurrence with congenital hypoparathyroidism. *Birth Defects*, **4**: 116-123

-
27. DRISCOLL, D. A., SALVIN, J., SELINGER, B., BUDARF, M. L., MC DONALD-MC GINN, D. M., ZACKAI, E. H., EMANUEL, B. S. (1993). Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *J Med Genet.*, **30**(10): 813-817
 28. DRISCOLL, D. A., SPINNER, N. B., BUDARF, M. L., MC DONALD-MC GINN, D. M., ZACKAI, E. H., GOLDBERG, R. B., SHPRINTZEN, R. J., SAAL, H. M., ZONANA, J., JONES, M. C. et al. (1992). Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet.*, **44**(2): 261-268
 29. DUGAICZYK A., BOYER H.W., GOODMAN H.M. (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol.*, **96**(1): 171-84
 30. DUNHAM I., SHIMIZU N., ROE B.A., CHISSOE S., HUNT A.R., COLLINS J.E., BRUSKIEWICH R., BEARE D.M., CLAMP M., SMINK L.J., AINSCOUGH R., ALMEIDA J.P., BABBAGE A., BAGGULEY C., BAILEY J., BARLOW K., BATES K.N., BEASLEY O., BIRD C.P., BLAKEY S., BRIDGEMAN A.M., BUCK D., BURGESS J., BURRILL W.D., O'BRIEN K.P., et al (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*, **402**(6761): 489-95
 31. EDELMANN, L., PANDITA, R. K., MORROW B. E. (1999). Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet.*, **64**(4): 1076-1086
 32. EDELMANN, L., STANKIEWICZ, P., SPITERI, E., PANDITA, R. K., SHAFFER, L., LUPSKI, J. R., MORROW, B. E. (2001). Two functional copies of the DGCR6 gene are present on human chromosome 22q11 due to a duplication of an ancestral locus. *Genome Res.*, **11**(2): 208-217
 33. EPSTEIN, M. A., ACHONG, B. G., BARR, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, **15**: 702-703
 34. EUER, N., SCHEIRZKE, M., EVTIMOVA, V., BURTSCHER, H., JARSCH, M., TARIN, D., WEIDLE, U. H. (2002). Identification of genes associated with metastasis of mammary carcinoma in metastatic versus non-metastatic cell lines. *Anticancer Res.*, **22**(2A): 733-740

-
35. FRAPPIER, L., BOCHKAREV, A. (1997). EBNA1 Structure. *Epstein-Barr Virus Report.*, **4**: 87-90
36. FUNKE B., SAINT-JORE B., PUECH A., SIROTKIN H., EDELMANN L., CARLSON C., RAFT S., PANDITA R.K., KUCHERLAPATI R., SKOULTCHI A., MORROW B.E. (1997). Characterization and mutation analysis of goosecoid-like (GSCL), a homeodomain-containing gene that maps to the critical region for VCFS/DGS on 22q11. *Genomics*, **46**(3):364-72
37. GLUZMAN, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**(1): 175-182
38. GOLDMUNTZ E., WANG Z., ROE B.A., BUDARF M.L. (1996). Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of human citrate transport protein to the DiGeorge/velocardiofacial syndrome minimal critical region. *Genomics*, **33**(2): 271-6
39. GONG, W., EMANUEL, B. S., COLLINS, J., KIM, D. H., WANG, Z., CHEN, F., ZHANG, G., ROE, B., BURDARF, M. H., (1996). A transcription map of the DiGeorge and velocardio-facial syndrome minimal critical region on 22q11. *Hum. Mol. Genet.*, **5**: 789-800
40. GRASSER, F. A., HAISS, P., GOTTEL, S., MUELLER LANTZSCH, N. (1991). Biochemical characterisation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2A. *J Virol.*, **65**: 3779-88
41. GRASSER, F. A., GOTTEL, S., HAISS, P., BOLDYREFF, B., ISSINGER, O. G., MUELLER LANTZSCH, N. (1992). Phosphorylation of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Biochem Biophys Res Commun.*, **186**(3): 1694-1701
42. GROSSMANN, M. H., EMANUEL, B. S., BUDARF, M. L. (1992). Chromosomal mapping of the human catecholamin-O-methyltransferase gene to 22q11.1-q11.2. *Genomics*, **12**: 822-825
43. GROSSMANN, S. R., JOHANNSEN, E., TONG, X., YALAMANCHILI, R., KIEFF, E. (1994). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **91**: 7568-72
44. GRUNDHOFF, A. T., KREMMER, E., TURECI, O., GLIEDEN, A., GINDORF, C., ATZ, J., MUELLER LANTZSCH, N., SCHURBACH, W. H., GRÄSSER, F. A. (1999). Characterization of DP103, a novel DEAD box protein

- that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J. Biol. Chem.*, **274**(27): 19136-19144
45. HALFORD, S., LINDSAY, E., NAYUDU, M., CAREY, A. H., BALDIN, A., SCAMBLER, P. J. (1993). Low-copy-number repeat sequences flank the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome loci at 22q11. *Hum. Mol. Genet.*, **2**(2): 191-196
46. HALFORD S., WADEY R., ROBERTS C., DAW S.C., WHITING J.A., O'DONNELL H., DUNHAM I., BENTLEY D., LINDSAY E., BALDINI A. et al. (1993). 22q11 deleted in DiGeorge syndrome, Shprintzen syndrome and familial congenital heart disease. *Hum. Mol. Genet.*, **2**(12): 2099-107
47. HALFORD, S. WILSON D. I., DAW, S. C., ROBERTS, C., WADEY, R., KAMATH S, WICKREMASINGHE, A., BURN, J., GOODSHIP, J., MATTEI, M. G., et al. (1993). Isolation of a gene expressed during early embryogenesis from the region of 22q11 commonly deleted in DiGeorge syndrome. *Hum Mol Genet.*, **2**: 1577-1582
48. HAMMERSCHMIDT, W., SUDGEN, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human lymphocytes. *Nature*, **340**: 393-7
49. HAYWARD, S. D., KIEFF, E. (1977). DNA of Epstein-Barr virus II. Comparison of the molecular weights of restriction endonuclease fragments of the DNA of Epstein-Barr virus strains and identification of endfragments of the B95-8 strain. *J. Virol.*, **23**: 421-429
50. HENKEL, T., LING, P. D., HAYWARD, S. D., PETERSON, M. G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science*, **265**(5168): 92-95
51. HIERK BEEREND P., DANIËL G.M. MOLIN, MARIT J. BOOT, ROBERT E. POELMANN, ADRIANA C. GITTENBERGER- DE GROOT (2004).
52. A Chicken Model for DGCR6 as a Modifier Gene in the DiGeorge Critical Region. *Pediatric Research*, Vol.**56**, 440-448
53. JACQUET, H., RAUX, G., THIBAUT, F., HECKETSWEILER, B., HOUY, E., DEMILLY, C., HAOUZIR, S., ALLIO, G., FOULDRIN, G., DROUIN, V., BOU, J., PETIT, M., CAMPION, D., FREBOURG, T. (2002). PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Hum Mol Genet.*, **11**(19): 2243-2249

-
54. KARAYIORGOU, M., MORRIS, M. A., MORROW, B., SHPRINTZEN, R. J., GOLDBERG, R., BORROW, J., GOS, A., NESTADT, G., WOLYNIENEC, P. S., LASSETER, V. K. et al. (1995). Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**(17): 7612-7616
55. KEDRA D., PEYRARD M., FRANSSON I., COLLINS J.E., DUNHAM I., ROE B.A., DUMANSKI JP. (1996). Characterization of a second human clathrin heavy chain polypeptide gene (CLH-22) from chromosome 22q11. *Hum. Mol. Gene.*, **5**(5):625-31
56. KIEFF, E. (1996). Epstein-Barr Virus and its replication. In "Fields Virology" (B. Fields, D. Knipe, P. Howley, Eds.), Vol. **2**, pp. 2343-2396. 2 vols. Lippincott-Raven, Philadelphia.
57. KIRBY, K. S. (1957). A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence of the nature of bonds between deoxynucleotide acid and protein. *Biochem. J.*, **66**: 495-504
58. KINTNER, C. R., SUGDEN, B. (1979). The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. *Cell*, **17**: 661-671
59. KURAHASHI, H. et al. (1995). Isolation and characterization of a novel gene deleted in DiGeorge syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 541-549
60. LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(259): 680-685
61. LAMMER, E. J., OPITZ, J. M. (1986). The DiGeorge anomaly as a developmental field defect. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* **2**: 113-127
62. LEDERBERG, E. M., COHEN, S. N. (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, **119**(3): 1072-1074
63. LE ROUX, A., KERDILES, B., WALLS, D., DEDIEU, J. F., PERRICAUDET, M. (1994). The Epstein-Barr virus determined nuclear antigens EBNA-3A, -3B and -3C repress EBNA2-mediated transactivation of the viral terminal protein 1 gene promoter. *Virology*, **205**: 596-602
64. LEVITSKAYA, J., CORAM, M., LEVITSKY, V., IMREH, S., STEIGERWALD MULLEN, P. M., KLEIN, G., KURILLA, M. G., MASUCCI, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, **375**: 685-688

-
65. LEVY-MOZZICONACCI A., WERNERT F., SCAMBLER P., ROUAULT F., METRAS D., KREITMAN B., DEPETRIS D., MATTEI M.G., PHILIP N. (1994). Clinical and molecular study of DiGeorge sequence. *Eur. J. Pediatr.* **153**(11): 813-20
 66. LINDSAY, E. A. (2001). Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat. Rev. Genet.* **2**(11): 858-868
 67. LINDSAY, E. A., BALDINI, A. (1997). A mouse gene (Dgcr6) related to the Drosophila gonadal gene is expressed in early embryogenesis and is the homolog of a human gene deleted in DiGeorge syndrome. *Cytogenet. Cell Genet.* **79**(3-4): 243-247
 68. LINDSAY, E. A., BOTTA, A., JURECIC, V., CARATTINI-RIVERA, S., CHEAH, Y. C., ROSENBLATT, H. M., BRADLEY, A., BALDINI, A. (1999). Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature*, **401**(6751): 379-383
 69. LINDSAY, E. A., GOLDBERG, R., JURECIC, V., MORROW, B., CARLSON, C., KUCHERLAPATI, R. S., SHPRINTZEN, R. J., BALDINI, A. (1995). Velo-cardio-facial syndrome: frequency and extent of 22q11 deletions. *Am. J. Med. Genet.* **57**(3): 514-522
 70. LINDSAY, E. A., HALFORD, S., WADEY, R., SCRAMBLER, P. J., BALDINI, A. (1993). Molecular cytogenetic characterization of the DiGeorge syndrome region using fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, **17**(2): 403-407
 71. LIU, H., ABECASIS, G. R., HEATH, S. C., KNOWLES, A., DEMARS, S., CHEN, Y. J., ROOS, J. L., RAPOPORT, J. L., GOGOS, J. A., KARAYIORGOU, M. (2002a). Genetic variation in the 22q11 locus and susceptibility to schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**(26): 16859-16864
 72. LIU, H., HEATH, S. C., SOBIN, C., ROOS, J. L., GALKE, B. L., BLUNDELL, M. L., LENANE, M., ROBERTSON, B., WIJSMAN, E. M., RAPOPORT, J. L., GOGOS, J. A., KARAYIORGOU, M. (2002b). Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**(6): 3717-3722

-
73. LUPTON, S., LEVINE, A. J. (1985). Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Mol. Cell Biol.*, **5**: 2533-2542
74. MANIATIS, T., SAMBROOK J. A., FRITSCH E. F. (1989). "*Molecular Cloning*, a laboratory manual 2nd ed." Cold Spring Harbor, Laboratory Press 1-3
75. MARSHALL, D., SAMPLE, C. (1995). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a transcriptional regulator. *J. Virol.*, **69**: 3624-30
76. MC DONALD-MC GINN, D. M., KIRSCHNER, R., GOLDMUNTZ, E., SULLIVAN, K., EICHER, P., GERDES, M., MOSS, E., SOLOT, C., WANG, P., JACOBS, I., HANDLER, S., KNIGHTLY, C., HEHER, K., WILSON, M., MINGJ. E., GRACE, K., DRISCOLL, D., PASQUARIELLO, P., RANDALL, P., LAROSSA, D., EMANUEL, B. S., ZACKAI, E.H. (1999). The Philadelphia Story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet. Couns.*, **10**: 11-24
77. MEITINGER, C., STROBEL, L. J., MARSCHALL, G., BORNKAMM, G. W., ZIMBER-STROBEL, U. (1994). Crucial sequences within the Epstein-Barr virus TP1 promoter for EBNA"- mediated transactivation and interaction of EBNA2 with its responsive element. *J. Virol.*, **68**: 7497-506
78. MURPHY, K. C., JONES, L. A., OWEN, M. J. (1999). High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch. Gen. Psychiatry*, **56**(10): 940-945
79. PETTI, L., SAMPLE, C., KIEFF, E. (1990). Subnuclear localisation and phosphorylation of Epstein-Barr virus latent infection nuclear proteins. *Virology*, **176**: 563-574
80. PFUHL, T., DÜRR, M., SPURK, A., SCHWALBERT, B., KREMMER, E., NORD, R., MYSLIWETZ, J., GRÄSSER, F. A. 2005. Biochemical characterization of the proteins encoding the DiGeorge Critical Region 6 (DGCR 6) genes. *Human Genetics*, **117**: 70-80
81. POLACK, A., HARTL, G., ZIMBER, U., FREESE, U. K., LAUX, G., TAKAKI, K., HOHN, B., GISSMANN, L., BORNKAMM, G. (1984). A complete set of overlapping cosmid clones of M-ABA virus derived from nasopharyngeal carcinoma and its similarity to other Epstein-Barr virus isolates. *Gene*, **27**: 279-288

-
82. PRITCHETT, R. F., HAYWARD, S. D., KIEFF, E. (1975). DNA of Epstein-Barr virus I. Comparative studies of the DNA of EBV from HR-1 and B95-8 cells: Size, structure and relatedness. *J. Virol.* **15**: 556-559
83. PULVER, A. E., NESTADT, G., GOLDBERG, R., SHPRINTZEN, R. J., LAMACZ, M., WOLYNIEC, P. S., MORROW, B., KARAYIORGOU, M., ANTONARAKIS, S. E., HOUSMAN, D. et al. (1994). Psychotic illness in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome and their relatives. *J. Nerv. Ment. Dis.*, **182**(8): 476-478
84. RADKOV, S. A., BAIN, M., FARELL, P. J., WEST, M., ROWE, M., ALLDAY, M. J. (1997). Epstein-Barr virus EBNA3C repress Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J. Virol.*, **71**: 8552-62
85. RADKOV, S. A., BAIN, M., FARELL, P. J., WEST, M., ROWE, M., ALLDAY, M. J. (1999). Epstein-Barr virus nuclear antigen3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J. Virol.*, **73**: 5688-5697
86. RAWLINS, D. R., MILMAN, G., HAYWARD, G. S. (1985). Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell*, **42**: 859-868
87. REISMAN, D., SUGDEN, B (1986). trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Mol. Cell Biol.*, **6**: 3838-3846
88. RICKINSON, A., MOSS, D. J. (1997a). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *A. Rev. Immunol.*, **15**: 405-431
89. RICKINSON, A. B., MOSS, D. J. (1997b). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *A. Rev. Immunol.*, **15**: 405-431
90. RICKINSON, A. B., KIEFF, E. (1996). Epstein-Barr Virus. In "Fields Virology" (B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds.), Vol. **2**, pp. 2397-2446. 2 vols. Lippincott-Raven, Philadelphia.
91. RICKSTEN, A., KALLIN, B., ALEXANDER, H., DILLNER, J., FAHRAEUS, R., KLEIN, G., LERNER, R., RYMO, L. (1988). BamHI E region of the Epstein-Barr virus genome encodes three transformation-associated nuclear proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**: 995-999
92. ROBERTSON, E. S., GROSSMAN, S., JOHANNSEN, E., MILLER, C., LIN, J., TOMKINSON, B., KIEFF, E. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 3C

- modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J. Virol.*, **69**: 3108-3116
93. ROBERTSON, E. S., LIN, J., KIEFF, E. (1996). The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B and 3C interact with RBPJ(kappa). *J. Virol.* **70**: 3068-74
94. ROIZMAN, B. (1990). Whither herpesviruses? . *Adv. Exp. Med.Biol.*, **278**: 285-291
95. ROONEY, C., HOWE, J. G., SPECK, S. H., MILLER, G. (1989). Influence of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **63**(4): 1531-1539
96. ROWE, D. T., CLARKE, J. R. (1989). The type-specific epitopes of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 are near the carboxy terminus of the protein. *J. Gen. Virol.*, **70** (Pt 5): 1217-1229
97. SACCONI, S., CACCIO, S., KUSUDA, J., ANDREOZZI, L., BERNARDI, G. (1996). Identification of the gene-richest bands in human chromosomes. *Gene*, **174**(1): 85-94
98. SAIKI R K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**(4839): 487-91
99. SAMPLE, J., YOUNG, L., MARTIN, B., CHATMAN, T., KIEFF, E., RICKINSON, A. (1990). Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J. Virol.* **64**(9): 4084-4092
100. SCHERER, E., TESKE, H. J., KUWERT, E., GRONEMANN, A. (1971). [Cytomorphologic studies on the modification by oxygen of the irradiation effect on tissue cultured tumor cells (HeLa cells)]. *Strahlentherapie*, **141**(5): 591-598
101. SGARAMELLA, V., VAN DE SANDE, J. H., KHORANA, H. G. (1970). Studies on polynucleotides, C. A novel joining reaction catalyzed by the T4-polynucleotide ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **67**(3): 1468-1475
102. SHAIKH, T. H., KURAHASHI, H., EMANUEL, B. S. (2001). Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet. Med.*, **3**(1), 6-13

103. SHIMIZU, N., YAMAKI, M., SAKUMA, S., ONO, Y., TAKADA, K. (1988). Three Epstein-Barr virus (EBV)-determined nuclear antigens induced by the BamHI E region of EBV DNA. *Int. J. Cancer*, **41**: 744-751
104. SIROTKIN H., MORROW B., DASGUPTA R., GOLDBERG R., PATANJALI S.R., SHI G., CANNIZZARO L., SHPRINTZEN R., WEISSMAN S.M., KUCHERLAPATI R. (1996). Isolation of a new clathrin heavy chain gene with muscle-specific expression from the region commonly deleted in velo-cardio-facial syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **5**(5):617-24
105. SIXBEY, J.W., SHIRLEY, P., CHESNEY, P. J., BUNTIN, D. M., RESNIK, L. (1989). Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. *Lancet*, **2**: 761-765
106. SKARE, J., STROMINGER, J. L., (1980). Cloning and mapping of BamHI endonuklease fragments of DNA from transforming B95-8 strain of Epstein-Barr-virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 3860-3864
107. STUDIER, F. W., MOFFATT, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**(1): 113-130
108. SUBRAMANIAN, C., COTTER, M., ROBERTSON, E. S. (2001). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: A molecular link to cancer metastasis. *Nat. Med.*, **7**: 350-355
109. SUBRAMANIAN, C., HASAN, S., ROWE, M., HOTTINGER, M., ORRE, R., ROBERTSON, E. S. (2002a). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J. Virol.*, **76**: 4699-4708
110. SUBRAMANIAN, C., ROBERTSON, E. S. (2002b). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C regulates transcription, cell transformation and cell migration. *Front. Biosci.*, **1**: 704-716
111. SUNG, N. S., KENNEY, S., GUTSCH, D, PAGANO, J. S. (1991). EBNA-" transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **65**: 2164-2169
112. THOMAS J.A., GRAHAM J.M. JR. (1997). Chromosomes 22q11 deletion syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)*.: **36**(5):253-66

113. TOMKINSON, B., ROBERTSON, E., KIEFF, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.*, **67**: 2014-2025
114. TOWBIN H., STAEHELIN T., GORDON J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **76**(9): 4350-4
115. USISKIN, S. I., NICOLSON, R., KRASNEWICH, D. M., YAN, W., LENANE, M., WUDARSKY, M., HAMBURGER, S. D., RAPOPORT, J. L. (1999). Velocardiofacial syndrome in childhood-onset schizophrenia. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*, **38**(12): 1536-1543
116. VANTRAPPEN, G., DEVRIENDT, K., SWILLEN, A., ROMMEL, N., VOGELS, A., EYSKENS, B., GEWILLIG, M., FEENSTRA, L., FRYNS, J. P. (1999). Presenting symptoms and clinical features in 130 patients with the velo-cardio-facial syndrome. The Leuven experience. *Genet. Couns.*, **10**(1): 3-9
117. WADEY, R., DAW, S., TAYLOR, C., ATIF, U., KAMATH, S., HALFORD, S., O'DONNELL, H., WILSON, D., GOODSHIP, J., BURN, J. et al. (1995). Isolation of a gene encoding an integral membrane protein from the vicinity of a balanced translocation breakpoint associated with DiGeorge syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **4**(6): 1027-1033
118. WALTZER, L., LOGEAT, F., BROU, C., ISRAEL, A., SERGEANT, A., MANET, E. (1994). The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements *EMBO. J.*, **13**: 5633-8
119. WALTZER, L., PERRICAUDET, M., SERGEANT, A., MANET, E. (1996). Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa to DNA. *J Virol.* **70**: 5909-15
120. WILSON, J. B., BELL, J. L., LEVINE, A. J. (1996). Expression of Epstein- Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J.*, **15**: 3117-3126
121. WILSON, J. B., LEVINE, A. J. (1992). The ocogenic potential of Epstein- Barr virus nuclear antigen-1 in transgenic mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **182**: 375-384
122. WOISETSCHLAEGER, M., JIN, X., YANDAVA, C. N., FURMANSKI, L. A., STROMINGER, J.L., SPECK, S. H. (1991). Role of the Epstein-Barr virus

- nuclear antigen 2 in viral promoter switching during initial stages of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**: 3942-3946
123. ZHAO, B., SAMPLE, C. E. (2000). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C activates the latent membrane protein 1 promoter in the presence of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 through sequences encompassing an spi-1/Spi-B binding site. *J. Virol.*, **74**(11):5151-60
124. ZIMMER STROBL, U., STROBL, L. J., MEITINGER, C., HINRICHS, R., SAKAI, T., FURUKAWA, T., HONJO, T., BORNKAMM, G. W. (1994). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. *EMBO. J.*, **13**(20): 4973-4982
125. ZIMMER, U., ADLDINGER, H. K., LENOIR, G. M., VUILLAUME, M., KNEBEL DOEBERITZ, M. V., LAUX, G., DESGRANGES, C., WITTMANN, P., FREESE, U. K., SCHNEIDER, U. et al. (1986). Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology*, **154**(1): 56-66

8 Publikationen

Die Experimente zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg / Saar durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgendem Kongress vorgestellt:

März 2004 Annual Meeting of the „Gesellschaft für Virologie“ Joint Meeting with „Società Italiana di Virologia“ in Tübingen (Poster).

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Human Genetics 117: 70-80 (2005)

**Biochemical characterization of the proteins encoding the DiGeorge Critical Region 6
(DGCR 6) genes**

Pfuhl, T., Dürr, M., Spurk, A., Schwalbert, B., Kremmer, E.,
Nord, R., Mysliwietz, J. and Grässer, F. A.

9 Dank

Herrn Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch danke ich für die Überlassung des Themas sowie die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Unterstützung während meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. A. Grässer für sein Vertrauen, seine stete Diskussionsbereitschaft und die hervorragende Betreuung.

Besonders möchte ich mich bei den Herren Dipl. Biol. Andreas Spurk, Dipl. Biol. Thorsten Pfuhl und cand. med. Arne Grün für die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit, sowie das sehr gute Arbeitsklima bedanken

Mein weiterer Dank gilt Frau R. Nord, Frau B. Best und Frau D. Backes für ihre Hilfsbereitschaft bei Problemen mit verschiedenen Arbeitsmethoden, insbesondere aus der Mikrobiologie.

Allen Mitarbeitern der Virologie danke ich herzlich für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich jederzeit bestens unterstützt haben.

10 LEBENSLAUF

Björn Jürgen Schwalbert

Geboren am 19.06.1974, in Calw

Eltern: Jürgen Schwalbert, geb. 1951, Kaufmännisch Angestellter
Ruth Schwalbert, geb. Ungericht, 1951, Verwaltungsangestellte

Geschwister: Andrea Diana Schwalbert, geb. 1982, Rettungsassistentin beim DRK

1981 – 1985 Grundschule, 72224 Ebhausen

1985 – 1990 Hauptschule, 72224 Ebhausen

1990 – 1993 Ausbildung zum Bauzeichner im Ingenieurbau
Ing. Büro Helmut Renz, 72202 Nagold
Heinrich-Schickardt-Schule, Freudenstadt

1993 – 1994 Gewerblich-Technische-Berufsaufbauschule
(Mittelstufe der Berufsoberschule)
Gottlieb Daimler Schule, 71065 Sindelfingen

1994 – 1997 Allgemeine Hochschulreife, Ernährungswissenschaftliches Gymnasium,
Mildred Scheel Schule, 71034 Böblingen

1997 – 1997 Zivildienst als Rettungssanitäter, beim DRK, 75365 Calw

1998 – 2004 Studium der Humanmedizin, an der Universität des Saarlandes,
Medizinische Fakultät, 66424 Homburg /Saar
August 2000, Ärztliche Vorprüfung
März 2002, Erstes Staatsexamen
März 2004, Zweites Staatsexamen
(Promotionsarbeit am Institut für Mikrobiologie u. Hygiene
Abteilung Virologie: Expression des DGCR6 Protein)

2004 – 2005 Praktisches Jahr am Klinikum Offenburg, Lehrkrankenhaus
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 79110 Freiburg/Breisgau
