

Untersuchungen zur Funktion von BAT3-Spleißvarianten

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Andreas Hentsch

aus

Köln

Bonn (Mai) 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1.Referent: Prof. Dr. Norbert Koch

2.Referent: Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann

Tag der Promotion: 07.07.2005

Diese Promotion ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Chromosom 6	1
1.2	Der MHC-Lokus	2
1.3	BAT2	3
1.4	BAT3	6
1.5	Geninaktivierung durch homologe Rekombination	10
1.6	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Geräte	16
2.2	Verbrauchsmaterialien	17
2.2.1	Verwendete Bakterienstämme	20
2.2.2	Zelllinien	20
2.2.3	Antikörper	21
2.2.4	Oligonukleotide	21
2.3	Zellbiologische Methoden	24
2.3.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	24
2.3.2	Zählen, Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
2.3.3	Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für <i>E. coli</i>	25
2.3.4	Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen zur Plasmidpräparation	25
2.3.5	Herstellung elektrokompenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA	25
2.3.6	Transiente Expression von Proteinen in COS-7- und CHO-Zellen	26
2.3.7	Stabile Transfektion von CHO-Zellen	26
2.4	Molekulargenetische Methoden	27
2.4.1	Plasmid-DNA-Präparation	27
2.4.2	Präparation von genomischer DNA aus Kulturzellen	28
2.4.3	Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren	28

2.4.3.1	Phenol/Chloroformextraktion	28
2.4.3.2	Ethanol-Präzipitation	29
2.4.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren	29
2.4.4.1	Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarose-Gelen	29
2.4.4.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	29
2.4.5	Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen	29
2.4.6	DNA-Größen- und Mengenstandard	30
2.4.7	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	30
2.4.8	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	31
2.4.9	Modifizierung von DNA-Fragmenten	31
2.4.9.1	Glätten überhängender Einzelstrang-Enden	31
2.4.9.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	31
2.4.9.3	Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren	32
2.4.10	Klonierung von DNA-Fragmenten	32
2.4.10.1	Ligation von DNA	32
2.4.11	Klonierung von Oligonukleotiden	32
2.4.12	Klonierung von PCR-Produkten durch TOPO-Klonierung	33
2.4.13	Transformation von Bakterien	33
2.4.13.1	Transformation durch Elektroporation	33
2.4.13.2	Transformation durch Hitzeschock	34
2.4.14	Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen	34
2.4.15	Reverse Transkription	35
2.4.16	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
2.4.16.1	Bedingungen für die PCR-Reaktionen	36
2.4.16.2	Reinigung der PCR-Produkte	37
2.4.17	Identifizierung rekombinanter Bakterienkolonien durch Kolonie-PCR	37
2.4.18	Southern Blot	37
2.4.19	Nachweis spezifischer Nukleinsäuren	38
2.4.19.1	Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden	38
2.4.19.2	Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten DNA-Sonden und Autoradiographie	38

2.5	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	39
2.5.1	Herstellung von Zelllysaten	39
2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (1976)	39
2.5.3	Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese	39
2.5.3.1	Verwendete Protein-Größenstandards	40
2.5.4	Nachweis von Proteinen	41
2.5.4.1	Transfer von Proteinen („Western Blot“)	41
2.5.4.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen	41
2.5.5	Immunpräzipitation	41
2.5.6	Fixierung und immunzytochemische Färbung von COS- und CHO-Zellen	42
2.6	Kultur von ES-Zellen	42
2.6.1	Arbeiten mit embryonalen Stammzellen	42
2.6.1.1	Auftauen und Einfrieren von ES-Zellen	43
2.6.1.2	Expansion von ES-Zellen	43
2.6.2	Transfektion embryonaler Stammzellen mit einem Geninaktivierungsvektor	44
2.6.2.1	Vorbereitung des Geninaktivierungsvektors	44
2.6.2.2	Elektroporation von embryonalen Stammzellen zur homologen Rekombination	44
2.6.2.3	Selektion von ES-Zellen	45
2.6.2.4	Isolierung von ES-Zellklonen	45
2.6.3	DNA-Präparation aus embryonalen Stammzellen (modifiziert nach Laird <i>et al.</i> , 1991)	46
2.6.4	Gewinnung des LIF-Proteins	46
3	Ergebnisse	48
3.1	Struktur und Funktion des BAT3 Proteins	48
3.2	Herstellung von BAT3-Spleißvarianten	48
3.3	Expression und Detektion von BAT3-Spleißvarianten	58
3.4	Immunfluoreszenz von BAT3-Isoformen mit transient transfizierten Zellen	59

3.5	Funktion von BAT3 als Kochaperon bei der Proteindegradation des Glukokortikoidrezeptors (GR)	61
3.6	Herstellung von stabilen BAT3- und GR-exprimierenden CHO-Zelllinien	65
3.7	Suche nach Interaktionspartnern von BAT3	67
3.7.1	Nachweis der Interaktion von BAT3-Isoformen mit CHIP und der Assoziation von BAT2 mit CHIP	67
3.7.2	Nachweis der Assoziation von BAT3-Isoformen mit GR	69
3.7.3	Assoziation von BAT3-Isoformen mit Hsp70	70
3.7.4	Assoziation von Smac mit BAT3-Isoformen	72
3.7.5	Assoziation von BAT3-Isoformen mit BAT2	75
3.8	Gezielte Geninaktivierung des BAT2-Gens	77
3.9	Herstellung eines Geninaktivierungsvektors zur Ausschaltung des BAT2-Gens	77
3.9.1	Klonierung der 5'-Region des BAT2-Gens	77
3.9.2	Einfügen einer singulären loxP-Sequenz in die 5'-Region des BAT2-Gens	79
3.9.3	Klonierung des N-terminalen BAT2-loxP-Fragments in einen pBCSK+-Vektor	80
3.9.4	Einfügen einer HPRT-Selektionskassette in Intron 2 des BAT2-Gens	82
3.9.5	Verlängerung der 5'-Region von pBCSK+-BAT2-flox und Einfügen einer TK-Kassette	86
3.9.6	Darstellung und Überprüfung des Geninaktivierungsvektors pBCSK+-BAT2-flox-TK	88
3.9.7	Restriktionsanalyse des pBCSK+-BAT2-flox-TK-Vektors	90
3.9.8	Sequenzierung des pBCSK+-BAT2-flox-TK-Vektors	91
3.10	Cre-vermittelte Deletion der HPRT-Kassette, Exon 1, Exon 2 und der anliegenden Intronbereiche	91
3.11	Klonierung des PCR Testvektors PCR-pBCSK+-BAT2-flox	93
3.11.1	Restriktionsanalyse des PCR-pBCSK+-BAT2-flox-Vektors	94
3.12	Strategie und Etablierung der PCR für den Nachweis von homolog rekombinierter ES-Zellklone	95

3.13	Analyse der mit pBCSK+-BAT2-flox-TK-DNA transfizierten ES-Zellen	96
3.13.1	PCR-Analyse	96
3.13.2	Southern Blot-Analyse	97
4	Diskussion	99
4.1	Klonierung von BAT3-Spleißvarianten	99
4.2	Alle untersuchten BAT3-Isoformen sind im Zellkern lokalisiert	99
4.3	Haben BAT3 und BAT2 einen Einfluss auf die CHIP-vermittelte Degradation des Glukokortikoidrezeptors?	102
4.4	Suche nach neuen Interaktionspartnern von BAT3	104
4.4.1	Mit welchen Proteinen, die eine Rolle in der CHIP-vermittelten Degradation des Glukokortikoidrezeptors spielen, können die BAT3-Isoformen und BAT2 interagieren?	104
4.4.2	Können BAT3-Isoformen mit dem proapoptotischen Smac interagieren?	106
4.4.3	BAT2 assoziiert nicht mit BAT3	107
4.5	Zur konditionalen Inaktivierung des BAT2-Gens	108
4.5.1	Warum konditionale Geninaktivierung?	108
4.5.2	Der pBCSK+-BAT2-flox-TK Geninaktivierungsvektor, die Effizienz der homologen Rekombination und weiterführende Analysen	109
5	Zusammenfassung	113
6	Literaturverzeichnis	114

II Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. bidest	Zweifach destilliertes Wasser
Ac	Acetat
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
amp	Ampizillin-Resistenzgen
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CHIP	Carboxyl-Terminus des Hsc70-interagierenden-Proteins
Ci	Curie
cDNA	reverse transkribierte DNA (<i>complementary DNA</i>)
cpm	Zählereignis pro Minute (<i>counts per minute</i>)
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Polypeptidkette
Cys	Cystein
Da	Dalton
dbEST	Datenbank der EST-Klone am NCBI
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Nuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	Enhanced Chemiluminescence Reaction
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	exprimierte sequenzmarkierte Stelle (<i>expressed sequence tag</i>)
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen der Maus
et al.	et alteri
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g (mg, µg, ng)	Gramm (Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm)
GR	Glukokortikoidrezeptor
h	Stunde(n)
HAT	Hypoxantin-Aminopterin-Thymidin
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'- <i>(Ethansulfonsäure)</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (<i>hpri</i>)
Ig	Immunglobulin
Ii	Invariante Kette
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactosid
kb	Kilobasen(paar)

LIF	Leukämie inhibierender Faktor
l (ml, µl)	Liter (Milliliter, Mikroliter)
m (mm, µm, nm)	Meter (Millimeter, Mikrometer, Nanometer)
M (mM)	Molar (mikromolar)
mAK	Monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (<i>Major histocompatibility complex</i>)
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	Molekulargewicht
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localization signal</i> , NLS)
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette
OD	Extinktion bei der im Index angegebenen Wellenlänge
PBS ⁻	Phosphat-gepufferte Saline ohne Mg ²⁺ - und Ca ²⁺ -Ionen
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde(n)
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Saline (Tris buffered Saline)
TE	Tris-EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TK	Thymidinkinase
T _m	Hybridisierungstemperatur von Primern bei der PCR
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
ü.N.	über Nacht
ÜK	über Nachtkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
Verd.	Verdünnung
v/v	Volumenprozent
W	Watt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid

1 Einleitung

1.1 Chromosom 6

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) ist ein Genlokus, in dem unter anderem die MHC-Moleküle kodiert sind. Beim Menschen ist der MHC auf Chromosom 6 und bei der Maus auf Chromosom 17 lokalisiert. Das humane Chromosom 6 ist ein metazentrisches Chromosom, welches 6 % der genetischen Information des menschlichen Genoms trägt. Im Jahr 2003 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Mungall die Ergebnisse ihrer Sequenzierung und Analyse des Chromosoms 6. Zurzeit repräsentiert das Chromosom 6 mit 166.880.988 Basenpaaren das längste sequenzierte Chromosom. Aus dieser Sequenz wurden 2190 Genstrukturen beschrieben, die 1557 funktionale Gene und 633 Pseudogene beinhalten. Von den 1557 vorhergesagten funktionellen Genen wurden bis jetzt 772 Gene genauer charakterisiert. Beim Vergleich der Gendichte zwischen Chromosom 6 (9,2 Gene pro Megabase) und dem gesamten Genom (10 Gene pro Megabase) fällt auf, dass beide Werte fast übereinstimmen. Die Prozentzahl von sich wiederholenden Sequenzen ist beim Chromosom 6 und dem Genom fast identisch. Für das Chromosom 6 beträgt der Wert 43,95 % und für das Genom 44,80 %. Einige statistische Werte (Gendichte, sich wiederholende Sequenzen) von Chromosom 6 lassen sich auch auf das Genom übertragen (The International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Grimwood & Schmutz, 2003).

Das längste Gen auf Chromosom 6 ist das PARK2-Gen im Bereich der Bande 6q24 mit einer Größe von 1,4 Mb. Das Gen beinhaltet 12 Exons und ist bei Parkinsonpatienten mutiert (Kitada *et al.*, 1998). Das längste kodierende Exon ist 9114 Basenpaare lang und gehört zu dem Gen ZNF451. Das BPAG1 Gen besitzt die meisten Exons (101). Das längste Intron ist das erste Intron von dem Gen TCBA1 mit einer Größe von 479 kb.

Ein auffallendes Merkmal von Chromosom 6 ist die große Ansammlung von tRNA-Genen (transfer RNAs), welche für die Translation der mRNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz verantwortlich sind. Bis jetzt wurden insgesamt 616 tRNA-Gene im gesamten humanen Genom identifiziert, wobei die größte Ansammlung mit insgesamt 157 tRNA-Genen auf Chromosom 6p innerhalb der erweiterten MHC Klasse I-Region zu finden ist. Weitere Ansammlungen von tRNA-Genen sind auf Chromosom 1, 5, 7, 14, 16 und 17 lokalisiert. Auf

Chromosom 7 kodiert die Mehrzahl der tRNA-Gene für Cys-tRNAs (90 %) (Mungall *et al.*, 2003).

1.2 Der MHC-Lokus

Der MHC-Lokus, der beim Menschen auch als HLA (Human Leukocyte Antigen)-Lokus bezeichnet wird, umfasst eine Region von 3,6 Mb mit ca. 224 kodierenden Bereichen, die sich auf dem kleinen Arm im Bereich der Bande 6p21.3 befindet. Der HLA-Lokus spielt eine essentielle Rolle im Immunsystem und wird in drei Bereiche eingeteilt: die Klasse I-Region umfasst über 100 Loci am telomeren Ende, der Klasse II-Bereich umfasst ca. 60 Loci am zentromeren Ende. Die MHC Klasse I- und II-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine. MHC Klasse I-Moleküle präsentieren den CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen endogene Peptide, die aus dem proteasomalen Abbau von Proteinen im Cytosol stammen (Zinkernagel & Doherty, 1974; Yewdell & Bennink, 1990). Die MHC Klasse II-Moleküle präsentieren den CD4⁺ T-Helferzellen Peptidfragmente aus extrazellulären Proteinen. Diese Proteine werden durch rezeptorvermittelte Endozytose, Phagozytose oder Pinozytose von Zellen aufgenommen (Unanue & Allen, 1987) und gelangen in die endosomalen/lysosomalen Kompartimente der Zelle, wo sie mittels saurer Proteasen abgebaut werden. Der Klasse III-Bereich mit ca. 60 Genloci befindet sich zwischen der Klasse I- und II-Region und umfasst 730 kb (The MHC Sequencing Consortium, 1999; Penn, 2000). In Maus und Mensch ist die Klasse III-Region etwa gleich groß, und die Gene sind weitgehend gleich angeordnet. Ein Großteil der Gene aus dem Klasse III-Bereich ist an Funktionen des Immunsystems beteiligt. Einige Gene spielen eine Rolle bei Infektionen oder Entzündungen, wie z.B. AIF, LST-1, NFκBIL oder TNF. Da diese Gene konzentriert in einem Bereich lokalisiert sind, wird dieser Bereich auch als MHC Klasse IV-Bereich bezeichnet (Gruen & Weissmann, 1997). Im Klasse III-Bereich befinden sich auch die BAT (HLA-B-assoziiertes Transkript)-Gene, die sich von BAT 1 bis BAT 9 erstrecken. BAT-Gene werden alternativ auch mit der G-Nomenklatur beschrieben, so sind z.B. BAT2 und BAT3 mit G2 und G3 identisch (Spies *et al.*, 1989; Kendall *et al.*, 1990). Weitere wichtige Gene sind die HSPA1A und B-Gene, die beide für das Hsp70-Protein kodieren. Das benachbarte HSPA1L-Gen kodiert für ein nicht hitzeinduzierbares Hsp70-Homolog (Milner & Campbell, 1990). Das MSH5-Gen kodiert ein Homolog des bakteriellen Mismatch-Reparaturproteins MutS (Her & Doggett, 1998; Winand *et al.*, 1998). Ein weiteres charakterisiertes Gen ist das NOTCH-4, welches ein Mitglied der NOTCH-

Transmembranproteinfamilie kodiert. Diese Proteine spielen eine Rolle bei der Steuerung der Zelldifferenzierung und -entwicklung und bei Zell-Zell-Interaktionen (Fortini & Artavanis-Tsakonas, 1993).

1.3 BAT2

Banerji *et al.* beschrieben 1990 die cDNA-Sequenz von BAT2. Die cDNA war 6,7 kb lang und aus der vorhergesagten Aminosäuresequenz ergab sich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 228 kDa. Dieses Protein besteht aus 2142 Aminosäureresten, wobei 409 der Aminosäurereste Proline sind. 1993 wurde ein 90 kb großer Abschnitt des MHC Klasse III-Bereichs sequenziert, dabei wurde der 5'-Bereich des BAT2-Gens mit seinen ersten 25 Exons sequenziert (Iris *et al.*, 1993). Aufgrund weiterer Klonierungsarbeiten konnte auch die Intron-Exon-Struktur am 3'-Ende des BAT2-Gens aufgeklärt werden. Das BAT2-Gen ist demnach insgesamt 19 kb groß und besteht aus 31 Exons, wobei der Translationsstart in Exon 2 liegt (Winkler, 2003). BAT2 beinhaltet drei Typen von repetitiven Sequenzen: vier Repeats eines Typs A, zwei vom Typ B und drei vom Typ C. Die BAT2-Aminosäuresequenz enthält vier RGD-Motive, wobei drei RGD-Motive innerhalb eines 94 Aminosäure langen Abschnitts liegen (Banerji *et al.*, 1990). RGD-Motive spielen eine Rolle bei der Zelladhäsion, wobei sie die Interaktion von Mitgliedern der Integrinrezeptor-Superfamilie mit ihren Liganden vermittelt. Die meisten der vorkommenden Liganden besitzen ein oder zwei RGD-Motive. Zu diesen Liganden zählen Fibronectin, Osteopontin, Vitronectin, Fibrinogen und Typ 1-Kollagene (Ruoslahti, 1996).

Durch Vakzinierung von Mäusen mit rekombinanten DNA-Molekülen, bestehend aus der Sequenz des BAT2-Gens und der Trimerisierungsdomäne der murinen invarianten Kette Ii41, konnten Antiseren gegen BAT2 gewonnen werden. Mit den Antiseren wurden immunhistochemische Untersuchungen an humanen embryonalen Geweben durchgeführt, die sich in der elften Entwicklungswoche befanden. Im Knochen wurde BAT2 in Osteoblasten und in den nicht mehr teilungsfähigen Osteozyten detektiert. Das BAT2-Protein wurde am stärksten in den Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert (Schneiders *et al.*, 2004). Mit einer N-terminalen BAT2-cDNA-Sonde konnte in einem mRNA-Dotblot (MTE-Blot) gezeigt werden, dass das BAT2-Transkript in humanen Geweben ubiquitär exprimiert wird. Besonders stark wird das BAT2-Gen in Testis exprimiert. Weitere Untersuchungen von Geweben aus Ratte und Java-Affe zeigten, dass das BAT2-Gen in Testis in einem zeitlich eng

umgrenzten Zeitraum transkribiert wird (Winkler, 2003). Ein ähnliches Transkriptionsmuster wird für das humane mutS-Homolog MSH5 beschrieben. MSH5 wird ebenfalls in verschiedenen Geweben und besonders stark in Testis exprimiert. MSH5 wird während der Spermatogenese exprimiert und ist am Prozess der Meiose beteiligt (Bocker *et al.*, 1999).

Ein BAT2-Homolog konnte aufgrund Kreuzhybridisierungen im MHC des Hausschweins *Sus scrofa* nachgewiesen werden (Nunes *et al.*, 1994). Weiterhin wurde ein murines Ortholog zu BAT2 mittels humaner cDNA-Sonden nachgewiesen (Lafuse *et al.*, 1992), und die Lage im murinen H2-Komplex näher bestimmt (Gasser *et al.*, 1994). Beachtenswert ist das humane Gen KIAA1096, welches bis zu 60 % homolog zu dem humanen BAT2-Gen ist. Das KIAA1096-Gen, welches auf Chromosom 1q23-24 lokalisiert ist, besteht aus 33 Exons. Das Gen kodiert ein 10,174-bp großes mRNA-Transkript, wobei das Protein ein Molekulargewicht von 295 kDa aufweist. Das Gen scheint multiple Kernlokalisierungssignale zu besitzen (Boulikas, 1993). Die Arbeitsgruppe um Huang (2002a) konnte die cDNA des KIAA1096-Gens aus TCCs (Transitional Cell Carcinoma) amplifizieren und überexprimieren. Bis jetzt sind keine Funktionen des KIAA1096-Gens bekannt.

BAT2 hat Ähnlichkeit zu einer funktionalen Domäne, der JmjC-Domäne (Lehner *et al.*, 2004). Balciunas und Ronne beschrieben 2000 neben der JmjN-Domäne auch die JmjC-Domäne, wobei beide als Mitglieder der Jumonji-Familie der eukaryotischen Transkriptionsfaktoren eingeordnet werden. Die Autoren vermuteten, dass die separaten JmjC- und die JmjN-Domäne immer zusammen in einem Protein vorkommen und zusammen eine funktionale Einheit bilden. Clissold und Ponting (2001) konnten die JmjC-Domäne in zahlreichen eukaryotischen Proteinen nachweisen, die auch typische Domänen der Transkriptionsfaktoren aufweisen, wie z.B. PHD, C2H2, ARID/BRIGHT oder Zinkfinger. BLAST-Recherchen zeigen signifikante Ähnlichkeiten zwischen der JmjC-Domäne und den Mitgliedern der Cupin-Superfamilie. Cupine sind evolutionär gesehen alte Domänen und kommen z.B. in *Archae*-Bakterien vor. Cupin-Domänen weisen Metalloenzym-Eigenschaften auf (Dunwell *et al.*, 2000; Gane *et al.*, 1998). Fast alle JmjC-haltigen Proteine besitzen potentielle DNA- oder Chromatin-bindende Motive (Clissold & Ponting, 2001).

Mittels des *yeast two-hybrid* (Y2H) *system* konnten potentielle Interaktionspartner von BAT2 identifiziert werden (Lehner *et al.*, 2004). Hierbei wurde das BAT2-Gen in drei Bereiche aufgeteilt (AS: 1-773, 756-1408, 1391-2157). Am N-Terminus (1-773) wurden die meisten Interaktionen beobachtet, insbesondere mit Proteinen, die für die mRNA-Prozessierung verantwortlich sind, z.B. heterogenes nukleares Ribonukleoprotein (hnRNP) A1 und hnRNP M. Beide Proteine gehören zu den Komponenten des Spleißosoms (Mayeda &

Krainer, 1992; Kafasla *et al.*, 2002). HnRNP-Proteine kommen vorwiegend im Zellkern vor und üben verschiedene Aufgaben aus, wie z.B. die Anheftung der poly(A)-Enden an die mRNA oder beim Transport der prozessierten mRNA vom Kern in das Zytoplasma. Die Interaktion von hnRNPs mit prä-mRNAs ist Sequenz- und Transkript-spezifisch (Bennett *et al.*, 1992; Dreyfuss *et al.*, 1993). Ein weiterer Interaktionspartner ist DDX20 (Gemin 3). DDX20 ist eine RNA-Helikase, die eine Komponente vom SMN (Survival of motor neurons)-Komplex ist (Charroux *et al.*, 1999) und für den Zusammenbau verschiedener Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexe, insbesondere der spleißosomalen snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) verantwortlich ist. Das Protein CPSF (cleavage and polyadenylation specific factor), die Methyltransferase HRMT1L1 und das Grb2-Protein interagieren ebenso mit dem N-Terminus von BAT2. Das CPSF-Protein spielt eine Rolle bei der Modifizierung der 3'-Enden von prä-mRNAs, indem es an die AAUAAA Polyadenylierungs-Konsensussequenz bindet und die endonukleolytische Spaltung der RNA ermöglicht (Bienroth *et al.*, 1993). Die Methyltransferase HRMT1L1 modifiziert prä-mRNA Bindungsproteine, indem sie u.a. hnRNPs methyliert (Henry & Silver, 1996). Grb2 kodiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa und besitzt eine SH2- (src-homologe Region 2) und zwei SH3-Domänen. Als Adapterprotein spielt es z.B. eine Rolle in der Wachstumskontrollkaskade von RAS bei Säugetieren. Desweiteren wurde gezeigt, dass Grb2 im Zellkern lokalisiert ist und dort mit hnRNP-Proteinen interagieren kann (Romero *et al.*, 1998). HRMT1L1 und Grb2 besitzen beide eine SH3-Domäne, welche an die prolinreiche Region von BAT2 binden könnte.

Das mittlere Fragment von BAT2 (756-1408) interagiert im two-Hybrid-Versuch mit nur einem Protein, dem C1QBP, welches auch p32 genannt wird. Das zelluläre p32-Protein wurde zuerst aus HeLa-Zellen als Interaktionspartner des ASF/SF2-Proteins aufgereinigt (Krainer *et al.*, 1991). Weitere Studien haben gezeigt, dass p32 mit verschiedenen zellulären und viralen Proteinen, einschließlich dem Lamin B-Rezeptor (Simos & Georgatos, 1994), Herpes simplex 1 ORF-P Protein (Bruni & Roizman, 1996), dem Adenovirus-Polypeptid V (Matthews & Russel, 1998), dem Epstein-Barr-Virusprotein EBNA I (Wang *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998) und dem HIV-Protein Rev (Luo *et al.*, 1994; Tange *et al.*, 1996) interagiert. Weiterhin interagiert das p32-Protein mit dem Spleißfaktor ASF/SF2 (Petersen-Mahrt *et al.*, 1999; Ghebrehiwet *et al.*, 2001). Das ASF/SF2-Protein ist ein Mitglied der SR- (splice regulatory) Familie, die eine Klasse von essentiellen Spleißfaktoren darstellt (Manley & Tacke, 1996). SR-Proteine besitzen eine bzw. zwei N-terminale RNA-Bindungsdomänen und ein RS-Motiv, welches am C-Terminus durch die variablen Dipeptid-

Folgen Arginin-Serin oder Serin-Arginin gekennzeichnet ist (Fu, 1995). In Abhängigkeit ihrer prä-mRNA-Bindungsstellen können sie als Aktivator oder aber auch als Suppressor während des Spleißvorgangs wirken. Typischerweise binden SR-Proteine auch innerhalb von Exons, an den Exon-Spleiß-Enhancer-Elementen (Kanopka *et al.*, 1996). Prä-mRNAs verfügen jeweils über ihre eigenen Exon-Spleiß-Enhancer-Elemente, an denen verschiedene SR-Proteine binden können. Weiterhin können SR-Proteine untereinander interagieren und so nicht-klassische SR-Proteine zum Spleißosom rekrutieren (Zuo & Maniatis, 1996). Die Arbeitsgruppe um Petersen-Mahrt (1999) beschreibt p32 als einen ASF/SF2- inhibitorischen Faktor. Hierbei verhindert p32 die stabile Interaktion von ASF/SF2 mit der RNA und inhibiert dadurch die Aktivator- und Suppressor-Funktion von ASF/SF2. Daher wird das Protein p32 in eine neue Gruppe von Proteinen eingestuft, die den Spleißvorgang der RNA durch Inhibition essentieller Spleißfaktoren kontrollieren können. Die im *yeast two-hybrid* (Y2H) *system* gefundenen Interaktionen von BAT2 mit anderen Proteinen wurden allerdings noch nicht mit anderen Methoden, wie z.B. durch Koisolation der Proteine, verifiziert.

1.4 BAT3

1990 wurde die cDNA-Sequenz des im MHC Klasse III-Region kodierten BAT3-Proteins zusammen mit der Sequenz von BAT2 von Banerji *et al.* veröffentlicht. Das BAT3-Gen liegt direkt benachbart zum BAT2-Gen, wobei die Transkriptionsrichtung der Gene entgegengesetzt ist. Die cDNA des BAT3-Gens ist 3,7 kb groß und kodiert für ein Protein von 1132 Aminosäuren Länge. Das BAT3-Protein ist mit 13,6 % Prolinen sehr prolinreich. Im BAT3-Gen kommen vier Kopien einer repetitiven Sequenz von 29 Aminosäuren Länge vor, die keine Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen aufweisen (Banerji *et al.*, 1990). Am N-Terminus von BAT3 befindet sich ein 75 Aminosäuren langer Bereich, der 35 % zu Ubiquitin homolog ist. Im Gegensatz zum BAT2-Protein, welches im Zytoplasma nachgewiesen wurde, ist das BAT3-Protein ein kernlokalisiertes Protein (Manchen & Hubberstey, 2001). Wie für BAT2 konnte auch für BAT3 im MTE-Blot gezeigt werden, dass das BAT3-Transkript in humanen Geweben ubiquitär exprimiert wird, wobei die Expression in Testis besonders hoch ist. BAT3 wird gegenüber BAT2 in der Spermientwicklung später transkribiert (Winkler, 2003). Ein gleiches Expressionsmuster zeigt das Rattenortholog von BAT3, welches vorwiegend in Testis exprimiert wird (Wang & Liew, 1994; Ozaki *et al.*, 1999). BAT3 besitzt am C-terminalen Bereich eine BAG-Domäne (Thress *et al.*, 2001). Auf der Suche nach

Interaktionspartnern mit dem antiapoptotischen Protein Bcl-2 wurden Proteine der „Bcl-2-associated athanogene“ (BAG)-Familie identifiziert (Takayama *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1999). Proteine der BAG-Familie wurden als Kochaperone charakterisiert, da sie mit den Proteinen Hsp70/Hsc70 interagieren und die Funktion dieser Chaperone regulieren können (Takayama *et al.*, 1997, 1999). BAG-Proteine üben verschiedene zelluläre Funktionen aus, wie z.B. transkriptionale Regulation, Regulation der Aktivität von Proteinkinasen oder von Signaltransduktionsvorgängen (Takayama & Reed, 2001; Doong *et al.*, 2002). Die BAG-Domäne wird im C-Terminus der BAG-Proteine kodiert und ist 110-124 Aminosäuren lang. (Briknarova *et al.*, 2001; Sondermann *et al.*, 2001). Sie umfasst drei antiparallele α -Helizes, wobei jede Helix 30-40 Aminosäuren lang ist. Die erste und zweite Helix ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) können mit der Serin/Threoninkinase Raf-1 interagieren (Wang *et al.*, 1996; Song *et al.*, 2001), und die zweite und dritte Helix ($\alpha 2$ und $\alpha 3$) binden an die ATPase-Domäne von Hsc70/Hsp70 (Höhfeld & Jentsch, 1997, Takayama *et al.*, 1997; Zeiner *et al.*, 1997) sowie an TNF-R1 (Antoku *et al.*, 2001). Durch die Bindung und Aktivierung von Raf-1 fördert BAG-1 das Zellwachstum (Wang *et al.*, 1996). Desweiteren ist die BAG-Domäne evolutionär hoch konserviert, wobei Proteine mit einer BAG-Domäne in vielen Organismen vorkommen, wie z.B. in Maus, *Xenopus*, Seidenwurm, *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* oder *Arabidopsis thaliana* (Takayama *et al.*, 1999, 2001; Thress *et al.*, 1998; Moribe *et al.*, 2001, Briknarova *et al.*, 2001). Gegenwärtig sind sechs humane BAG-Gene bekannt, von denen vier als Proteine (BAG-1, -3, -4 und -6) nachgewiesen wurden. BAG-1 existiert in vier Isoformen (BAG-1L, BAG-1M, BAG-1 und BAG-1S), welche sich in der Länge ihrer aminoterminalen Bereiche unterscheiden und die von einer mRNA ausgehend von alternativen Initiationsstartpunkten translatiert werden (Packham *et al.*, 1997). BAG-1 Isoformen kommen in verschiedenen Zellkompartimenten vor. Die längste Isoform BAG-1L besitzt ein Kernlokalisierungssignal am N-Terminus und ist im Nukleus lokalisiert. Die Isoformen BAG-1M, -1 und -1S sind vorwiegend im Zytoplasma zu finden (Takayama *et al.*, 1998). Allerdings konnte man auch BAG-1 und BAG-1M abhängig vom Zelltyp und von der Stress-Situation der Zelle im Nukleus vorfinden (Liu *et al.*, 1998; Takayama *et al.*, 1998). Die Aktivität des Androgenrezeptors wird durch die Interaktion mit BAG-1L erhöht (Froesch *et al.*, 1998), wobei BAG-1L durch Bindung an den Vitamin D-Rezeptor dessen Trans-Aktivierungsfunktion positiv und negativ beeinflussen kann (Guzey *et al.*, 2000; Witcher *et al.*, 2001). BAG-1M kann an den Glukokortikoidrezeptor binden und diesen inhibieren (Kullmann *et al.*, 1998; Schneikert *et al.*, 2000). BAG-1 Isoformen wurden mit einer hohen Expressionsrate in humanen Tumoren, wie Brustkrebs, gefunden (Brimmel *et al.*, 1999; Tang

et al., 1999; Turner *et al.*, 2001; Townsend *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wurde in resistenten Magenkrebszelllinien eine Überexpression von BAG-1 entdeckt (Naishiro *et al.*, 1999). BAG-1 Isoformen wirken positiv oder negativ auf die Wachstumsrate von bestimmten humanen Tumorarten. BAG-1 kann über die BAG-Domäne an Bcl-2 binden, wobei die Interaktion ATP-abhängig ist und durch die Proteine Hsc70/Hsp70 vermittelt wird. Ein anti-apoptotischer Effekt wurde bei einer gleichzeitigen Überexpression von BAG-1 und Bcl-2 beobachtet (Takayama *et al.*, 1995). Die Bindung von BAG-1 an die Rezeptoren des Hepatozytenwachstumsfaktors (HGFR) und Blutplättchen-Wachstumsfaktors (*platelet-derived growth factor receptor*, PDGFR) wirkt anti-apoptotisch in der Zelle (Bardelli *et al.*, 1996). Weiterhin kann BAG-1 aufgrund der Interaktion mit Steroidhormonrezeptoren deren Aktivität modulieren (Zeiner & Gehring, 1995; Kullmann *et al.*, 1998). Neben dem Signalmolekül RAF-1 kann BAG-1 auch mit dem Glukokortikoidrezeptor (GR) interagieren (Zeiner & Gehring, 1995). GR ist 777 Aminosäuren lang und ist Mitglied der Großfamilie der Kernrezeptoren, zu denen außer den Steroidrezeptoren auch die für Thyroidhormone, Vitamin D und Retinsäure gehören (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). Das Rezeptor-Polypeptid hat ein Molekulargewicht von ca. 90 kDa und befindet sich im inaktivierten Zustand im Zytosol. Das Gen für den humanen Rezeptor ist auf Chromosom 5 lokalisiert (Franke & Foellmer, 1989) und wird in nahezu allen Geweben exprimiert. Das Molekulargewicht des nicht aktivierten Rezeptors liegt bei ca. 330-350 kDa, da diese Rezeptorform außer dem GR-Polypeptid selbst noch zwei weitere Polypeptide, das Hitzeschockprotein Hsp90 und das Protein p59, welches zur Gruppe der Immunophiline gehört, enthält (Gehring, U., 1998; Pratt & Toft, 1997; Renoir *et al.*, 1990). Nach Bindung des hormonalen Liganden wird der Rezeptor durch Dissoziation von Hsp90 und p59 aktiviert. Die Aktivierung nach Ligandenbindung bewirkt eine Translokation des Rezeptors in den Zellkern, wo er z.B. als Transkriptionsfaktor wirken kann (Steinmetz *et al.*, 2001). BAG-1 kann gleichzeitig mit Hsp70 und dem 26S-Proteasom interagieren. Die Interaktion mit dem Proteasom ist ATP-abhängig und wird wahrscheinlich über die ATPase-Untereinheit des 19S-regulatorischen Subkomplexes reguliert. BAG-1 und BAG-1M ko-immunpräzipitieren mit der 19S-Untereinheit des Proteasoms (Lüders *et al.*, 2000a). Alle vier BAG-1 Isoformen besitzen C-terminal eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (ubiquitin-like (UBL)-domain, Doong *et al.*, 2002). Desweiteren kann das BAG-1-Protein mit der Ubiquitin E3-Ligase CHIP (*carboxyl-terminus of Hsc70-interacting protein*) kooperieren und so die proteasomale Degradation von chaperon gebundenen Substraten fördern (Connell *et al.*, 2001; Demand *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2001, Lüders *et al.*, 2000). Neben der Entdeckung, dass CHIP mit dem Motiv von sich

drei wiederholenden Tetratrikopeptiden (TPR) an Hsp70 oder Hsp90 bindet und dadurch die Faltungsaktivität dieser Chaperone inhibieren kann (Ballinger *et al.*, 1999), konnte gezeigt werden, dass CHIP auch die Degradation von Chaperon-Substraten durch das Ubiquitin/Proteasom-System stimuliert (Connell *et al.*, 2001; Meacham *et al.*, 2001). In Eukaryonten ist für die Proteindegredation das Ubiquitin/Proteasom-System verantwortlich (Hochstrasser, 1996; Varshavsky, 1997). Die Degradation eines Proteins erfolgt in zwei Schritten: Zuerst wird das Protein für die Degradation markiert; anschließend wird es proteolysiert. Die Markierung erfolgt mit dem Degradationsmarker Ubiquitin (8,5 kDa), welcher kovalent an das Substratprotein gebunden wird. Das Substratprotein erhält gewöhnlich mehrere Ubiquitinmoleküle. Hierzu sind drei verschiedene Enzyme des Ubiquitinierungssystem verantwortlich. Nach der Aktivierung des Polypeptides Ubiquitin durch das Enzym E1 wird das aktivierte Ubiquitin auf das ubiquitinverknüpfende Enzym E2 transferiert. Die Ubiquitinligase E3 katalysiert den Transfer des Ubiquitins von E2 zum Substratprotein. Das multiubiquitinierte Protein wird nun vom 26S-Proteasom erkannt und degradiert (Baumeister *et al.*, 1998). Das 26S-Proteasom ist ein multikatalytischer Proteasekomplex, in dem Substrate durch eine ATP-verbrauchende Reaktion zu kurzen Peptiden abgebaut werden (Varshavsky, 1997). CHIP wurde zuerst als E4-Enzym (Ubiquitinierungsfaktor) eingestuft, da es ein U-Box Motiv beinhaltet und dieses Motiv auch in dem Multiubiquitinierungsfaktor Ufd2 aus Hefe gefunden wurde (Koeogl *et al.*, 1999). Ufd2 kooperiert mit den Enzymen E2 und E3 und wird daher auch als E4 bezeichnet. Allerdings wurde CHIP als eine E3 Ubiquitin-Ligase verifiziert, die in der Ubiquitinierungsreaktion mit dem spezifischen E2-Enzym kooperiert (Demand *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001). Die Ubiquitinligasefunktion von CHIP ist von der U-box abhängig. Das U-box-Motiv ist strukturell mit dem Ring-Fingermotiv verwandt, welches man in Proteinen mit einer Ubiquitinligasefunktion findet (Aravind & Koonin, 2000; Jackson *et al.*, 2000). BAG-1, -3, -4, -5 und -6 interagieren mit den Proteinen Hsp70/Hsc70. Die Proteine in der BAG-Familie besitzen alle eine singuläre BAG-Domäne außer BAG-5, welches fünf BAG-Domänen aufweist. BAG-3 ist ein 74 kDa großes zytoplasmatisches Protein, welches eine prolinreiche Region (PXXP) besitzt und am N-Terminus als einziges BAG-Protein eine WW-Domäne aufweist. Die Funktion der WW-Domäne in BAG3 ist noch ungeklärt. WW-Domänen interagieren mit prolinreichen Regionen und für einige WW-haltigen Proteine wie Dystrophin, Utrophin und Caveolin-3 konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle in der Verbindung der Zellmembran mit der Struktur des Zytoskeletts spielen (Illsley *et al.*, 2002). Das prolinreiche Motiv „PXXP“ ist eine kanonische Bindungsdomäne für Proteine, die eine SH3-(src-

homologe Region 3) Domäne beinhalten (Sparks *et al.*, 1996; Williamson, 1994; Pawson & Scott, 1997). BAG-4 (60 kDA) ist ein zytosolisches Protein und interagiert mit dem Tumornekrosefaktor-(TNF-)Rezeptor-R1 (TNF-R1) (Jiang *et al.*, 1999; Antoku *et al.*, 2001). Man vermutet, dass TNF-R1 am N-Terminus in der Todesdomäne (*death domain*) eine ATPase-Domäne enthält und dass ATP die Interaktion zwischen BAG-4 und TNF-R1 regulieren kann (Miki & Eddy, 2002). BAG-5 kann gleichzeitig an die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin und an Hsp70 binden. Innerhalb dieses Komplexes kann BAG-5 die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin inaktivieren und die Aktivität von Hsp70 inhibieren (Kalia *et al.*, 2004). BAT3 wird auch als BAG-6 bezeichnet. BAG-6 besitzt am N-Terminus eine Ubiquitin-ähnliche (UBL) Domäne sowie eine prolinreiche-Region (PXXP). Am C-Terminus besitzt es noch ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal. Scythe, das *Xenopus*-Ortholog von BAT3, bindet ebenfalls an Hsp70-Proteine und inhibiert die Neufaltung von Substraten (Thress *et al.*, 2001). Scythe ist auf Aminosäureebene zu 57 % mit BAT3 identisch. Weiterhin kann Scythe im Nukleus mit dem proapoptotischen *Drosophila*-Protein Reaper interagieren (Thress *et al.*, 1998; Ozaki *et al.*, 1999). Das aus 65 Aminosäuren bestehende Reaper wurde bei der Suche nach apoptotischen Regulatoren in *Drosophila melanogaster* gefunden (White *et al.*, 1994, 1996). Wie Reaper können auch die verwandten *Drosophila*-Proteine Grim und Hid an IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) binden und so die Aktivierung von Caspasen bewirken, wodurch der programmierte Zelltod ausgelöst wird (Wang *et al.*, 1997; Goyal *et al.*, 2000). McCarthy und Dixit (1998) konnten zeigen, dass Reaper, Grim und Hid auch in Säugetierzellen Apoptose auslösen können. Ein Säugerprotein mit einer analogen Funktion zu Reaper ist Smac bzw. das Mausortholog Diablo. Smac kann auch durch die Bindung an IAPs diese inaktivieren und so Caspasen aktivieren (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). In *yeast two-hybrid* (Y2H)-Analysen wurden die Proteine DAN (Ozaki *et al.*, 1999) und CAP (Hubberstey *et al.*, 1996) als Interaktionspartner von BAT3 gefunden. DAN wurde als potentieller Tumorsuppressor identifiziert und CAP ist ein Homolog des Adenylzyklase-assoziierten Proteins aus *S. cerevisiae*.

1.5 Geninaktivierung durch homologe Rekombination

Die gezielte Geninaktivierung in der Maus („knock-out“) dient zur Aufklärung der Funktion eines Gens. Hierbei kann man prinzipiell zwei unterschiedliche Ansätze verfolgen, zum einen die konventionelle, zum anderen die konditionale Geninaktivierung. Die konventionelle

Geninaktivierung wurde 1987 von Thomas und Capecchi beschrieben. Mittels homologer Rekombination wird das Ziel-Gen durch eine inaktivierte Kopie ersetzt. Ein geeigneter Geninaktivierungsvektor enthält dabei eine Kopie des Zielgens, in dessen kodierenden Bereich ein selektierbares Gen so eingesetzt wird, dass die kodierende Sequenz des Transgens unterbrochen wird. Bei homologer Rekombination wird das Zielgen nicht mehr funktionsfähig exprimiert. Um die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination zu erhöhen, sollte für diesen Geninaktivierungsvektor das Zielgen aus dem Mausstamm entnommen werden, in dem später auch die homologe Rekombination stattfinden soll (Deng & Capecchi, 1992). Die Frequenz der homologen Rekombination erhöht sich, je größer die Homologie zwischen dem Geninaktivierungsvektor und dem Ziel-Gen ist, je länger die Homologieregionen sind (Thomas & Capecchi, 1987; Hasty *et al.*, 1991) und wenn der Geninaktivierungsvektor vor der Transfektion in embryonale Stammzellen linearisiert wird (Bollag *et al.*, 1989; Hasty *et al.*, 1992). Der Geninaktivierungsvektor wird in pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) transfiziert. Diese ES-Zellen besitzen die Fähigkeit, sich zu allen Zelltypen und Geweben zu entwickeln, nachdem man sie in eine Mausblastozyste injiziert. Martin (1981) und Evans & Kaufmann (1981) isolierten pluripotente Stammzellen aus der inneren Zellmasse (inner cell mass, ICM) von Mausblastozysten. Es ist daher möglich, durch Transfer genetisch veränderter ES-Zellen in Mausblastozysten transgene Mäuse zu erhalten (Thomas & Capecchi, 1981, Mansour *et al.*, 1988). Zuvor ist es aber notwendig, diejenigen ES-Zell-Klone zu identifizieren, in denen das Zielgen durch homologe Rekombination mit dem Geninaktivierungsvektor ausgetauscht wurde. Durch den Einsatz von positiven und negativen Selektionsmarkern werden die homolog rekombinierten Zellen identifiziert (Mansour *et al.*, 1988). Als positiven Selektionsmarker kann man z.B. das Neomycin-Resistenz-Gen (neo) oder die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Kassette einsetzen. In einem Geninaktivierungsvektor wird der Selektionsmarker in der kodierenden Sequenz des Gens eingebaut, welches ausgeschaltet werden soll. Der Marker muss auf beiden Seiten von homologen Sequenzen des Ziel-Gens flankiert sein. Das neo-Gen bzw. die HPRT-Kassette dienen nicht nur als Marker, sondern unterbrechen auch die kodierende Sequenz des Transgens, da sie in ein Exon eingebaut werden. Bei homologer Rekombination wird somit die Translation des betroffenen Proteins unterbrochen. Während der Selektion mit Geneticin (neo) bzw. HAT (HPRT) überleben nur solche ES-Zellen, die den Geninaktivierungsvektor ins Genom aufgenommen haben. In vielen Fällen wird der Geninaktivierungsvektor mitsamt der modifizierten Sequenz des Zielgens aufgrund heterologer Rekombination nicht an der gewünschten Stelle integriert. Um solche illegitimen Rekombinationen zu unterdrücken, kann

eine negative Selektion durchgeführt werden, indem man einen zweiten Selektionsmarker einsetzt, z.B. das Thymidinkinase-Gen (TK) aus dem Herpes simplex-Virus. Das TK-Gen sollte im Geninaktivierungsvektor die modifizierte Ziel-Sequenz an einer Seite flankieren. Wird der Geninaktivierungsvektor mitsamt des negativen Selektionsmarkers TK an einer zufälligen Stelle in das Genom integriert, sterben während der Selektion mit Ganciclovir die ES-Zellen ab, da das TK-Gen das zwecks Selektion ins Medium gegebene Ganciclovir in ein toxisches Nukleotid umwandelt. Bei homologer Rekombination wird das TK-Gen dagegen nicht mitintegriert und die ES-Zellen überleben die Selektion. Durch den Einsatz von molekularbiologischen Methoden wie z.B. Southern Blot oder PCR kann man ES-Zellen identifizieren, die aufgrund homologer Rekombination die modifizierte Wildtyp-Sequenz integriert haben. Zur Erzeugung von Mäusen, die das ausgeschaltete Ziel-Gen beinhalten, werden die so identifizierten ES-Zellen in eine Blastozyste injiziert und diese dann in eine scheinträchtige Maus implantiert (Papaioannou & Johnson, 1993). Die dabei entstehende Maus nennt man Chimäre, da ihr Gewebe teilweise von manipulierten ES- und teilweise von Wildtyp-Zellen abstammt. Die Keimbahntransmission des Geninaktivierungsvektors, also die Weitergabe der eingeführten Mutation, kann anhand der Fellfarbe der Nachkommen abgeschätzt werden (Schwartzberg *et al.*, 1989). Die Fellfarbe ist ein sehr auffälliges Merkmal der Maus und wird durch über 50 Gene beeinflusst (Grüneberg, 1952; Silvers, 1979). Hierzu müssen sich die Fellfarben des Mausstammes, aus dem die Blastozyste entnommen worden ist und der Mausstamm, aus dem die ES-Zellen stammen, sich unterscheiden. Diese chimären Mäuse sind der Ausgangspunkt für die Zucht von homozygot rekombinanten Mausstämmen, bei denen ein spezifisches Gen ausgeschaltet ist. Aus einem daraus resultierenden Phänotyp kann man nun indirekt auf die Funktion des ausgeschalteten Ziel-Gens *in vivo* schließen.

Bei Genen mit unbekannter Funktion besteht die Möglichkeit, dass der Verlust eines Gens Entwicklungsstörungen hervorruft oder letal sein kann und sich der Phänotyp dann nicht mehr postnatal analysieren lässt. Um dieses Problem zu umgehen, wird die konditionale Geninaktivierung eingesetzt, bei der die Geninaktivierung zu einem bestimmten Zeitpunkt ausgelöst oder auf bestimmte Gewebe begrenzt werden kann. Hierzu wird das sequenzspezifische Cre/LoxP-Rekombinationssystem aus dem Bakteriophagen P1 eingesetzt (Gu *et al.*, 1994; Kühn *et al.*, 1995), wobei die Cre Rekombinase (causes recombination) die homologe Rekombination zwischen zwei loxP (locus of crossover (x) in P1)-Sequenzen vermittelt (Sternberg & Hamilton, 1981). Die Cre-Rekombinase ist ein 38 kDa großes Protein, welches in die λ -Integrase-Superfamilie der Sequenz-spezifischen Rekombinasen eingeordnet

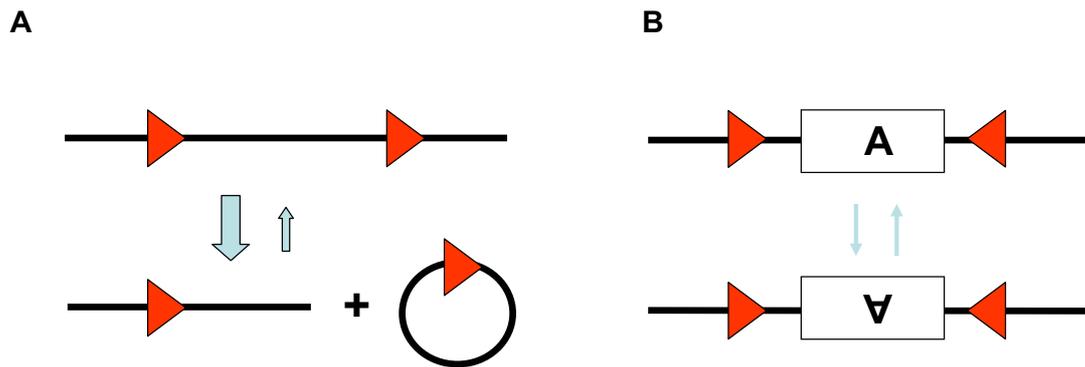


Abb. 1.2: Cre-vermittelte Rekombination zwischen zwei loxP-Sequenzen: (A) Die Cre-vermittelte Rekombination zweier aufeinanderfolgender loxP-Sequenzen gleicher Orientierung führt zur reversiblen Exzision und Zirkularisierung des loxP-flankierten Abschnitts. Auf jedem der beiden entstandenen Rekombinationsprodukte verbleibt eine loxP-Sequenz. (B) Eine Cre-vermittelte Inversion erfolgt, wenn zwei aufeinanderfolgende loxP-Sequenzen eine entgegengesetzte Orientierung aufweisen. (Abbildung entnommen aus Torres, R.M & Kühn, R., 1997)

Um eine Geninaktivierung in der Maus durchzuführen, muss der Ziel-Bereich, der ausgeschaltet werden soll, mit loxP-Sequenzen flankiert („gefloxt“) werden. Zusätzlich sollte noch ein positiver Selektionsmarker in den Zielbereich eingebaut werden, um ein homologes Rekombinationsereignis nachzuweisen. Da der Promotor des Selektionsmarkers die Expression des Zielgens oder benachbarter Gene beeinflussen kann (Pham *et al.*, 1996), sollte der Marker nach der Selektion der positiven ES-Zellen möglichst wieder entfernt werden. Hierzu eignet sich das aufwendige „Hit-and-run“-Verfahren. Bei dieser Methode verbleibt keine heterologe Sequenz im Ziel-Bereich (Valancius & Smithies, 1991). Alternativ verwendet man einen von loxP-Sequenzen flankierten Selektionsmarker, wobei das auszuschaltende Ziel-Gen von der gefloxteten Selektionskassette und von einer zusätzlichen loxP-Sequenz flankiert wird. Durch das homologe Rekombinationsereignis werden drei loxP-Kopien in das Zielgen integriert. Der Selektionsmarker wird *in vitro* durch die transiente Expression der Cre-Rekombinase in den ES-Zellen entfernt (Gu *et al.*, 1994). Aufgrund der Einwirkung der Cre-Rekombinase kann neben dem Selektionsmarker auch direkt der Ziel-Bereich deletiert werden. Ein so erhaltenes Konstrukt entspricht im Prinzip einem konventionellen knockout. Wird die Cre-Rekombinase *in vitro* nicht transient eingesetzt, so kann man Mäuse, die den Geninaktivierungsvektor beinhalten, auch mit „Deleter“-Mäusen kreuzen, bei denen die Cre-Rekombinase bereits in Keimzellen exprimiert wird (Schwenk *et al.*, 1995). Durch den Einsatz von verschiedenen transgenen Mäusen mit gewebespezifischer oder induzierbarer Cre-Expression ist es möglich, das Ziel-Gen zell- oder gewebespezifisch zu deletieren. (Nagy & Mar, 2001) Nach einer Cre-vermittelten Rekombination verbleibt nur eine 34 bp große loxP-Sequenz im veränderten Gen-Bereich.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte BAT3 charakterisiert und in einen möglichen Zusammenhang mit der Expression von BAT2 gebracht werden. Die Gene für BAT2 und BAT3 liegen beim Menschen direkt benachbart in der MHC Klasse III-Region auf dem Chromosom 6. Für das BAT3-Gen wurden verschiedene alternative Transkriptvarianten beschrieben.

Im ersten Teil der Arbeit sollten BAT3-Spleißvarianten kloniert, exprimiert und die zelluläre Lokalisation der BAT3-Isoformen analysiert werden. Da BAT3 mit Proteinen der BAG-Familie verwandt ist, sollte zudem die Frage geklärt werden, ob die hergestellten BAT3-Spleißvarianten eine Rolle bei der CHIP-vermittelten Proteindegradation spielen. Desweiteren sollte für mehrere Proteine untersucht werden, ob diese mit den verschiedenen BAT3-Isoformen interagieren können.

Im zweiten Teil sollte die noch unbekannt Funktion des BAT2-Gens mit Hilfe der konditionellen Geninaktivierung analysiert werden. Aufgrund von Protein-Interaktionsuntersuchungen wird vermutet, dass BAT2 eine Rolle in der Regulation des prä-mRNA-Spleißens spielt. Da das BAT3-Gen alternativ gespleißt wird, könnte das benachbarte BAT2-Gen eine Kontrollfunktion beim differentiellen Spleißen von BAT3 spielen. Um den Einfluss von BAT2 auf BAT3 und die Funktionen von BAT2 zu untersuchen, sollte ein BAT2-Geninaktivierungsvektor, basierend auf dem Cre/LoxP-System, konstruiert werden und die Transfektion von embryonalen Stammzellen durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Agarosegelelektrophorese	Renner, Darmstadt
Analysenwaage	Sartorius
Autoradiographiekassetten	Faust GmbH, Köln
Bakterieninkubator Innova 4300	New Brunswick Scientific, Edison
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Zürich
Biometra T3 Termocycler	Biometra, Göttingen
Elektroporationssystem Gene Pulser II	Bio-Rad, München
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Geldokumentationsapparatur	Cybertech, Berlin
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf GmbH, Hamburg
Kühlschrank	Liebherr
Laborwippe Rocking Platform	Biometra, Göttingen
Mikroliterpipetten	Labsystems, Finnland
Mikroskop Wilovert	Hund, Wetzlar
Mikrowellenherd Micromat	AEG
Netzgeräte	Renner, Darmstadt
Neubauerzählkammer	Faust GmbH, Köln
pH-Meter Orion 42 A	Colora Messtechnik GmbH, Ratingen
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Proteinelektrophoresekammer	cti, Idstein/ Taunus
Rollereinheit	Technomara, Wallisellen, Schweiz
Rüttler Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Semidry Blotting-Apparatur	Biometra, Göttingen und Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	Steag, Pfullingen
Spectrometer U-1100	Hitachi, Japan
Szintillationszähler LS 1801	Beckmann, Hamburg

Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg
Tiefkühltruhe (-80 °C)	Colora, Ratingen
UV-Crosslinker	Stratalinker, Stratagene
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vortex Genie 2	Bender & Holbein, Zürich
Wasserbad Julabo 12 B	Julabo, Houston
Zentrifugen: Biofuge 13	Heraeus, Zürich
Biofuge 22 R	Heraeus, Zürich
Centrifuge 5417 C	Eppendorf GmbH, Hamburg
HL 60 Zentrifuge	Beckmann, Hamburg
J-20HS	Beckmann, Hamburg
HL60	Beckmann, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Zürich

2.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen und Kanülen	Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen
Gel-blotting Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Kammerobjektträger	Nunc, Wiesbaden
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Nitrozellulosemembran BA85	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran Hybond-N	Amersham, Freiburg
Parafilm	American Can Company, Greenwich, USA
Pasteurpipetten	Brand GmbH, Wertheim
PCR-Platten 96-well	Peqlab, Erlangen
Polystyrolröhrchen	Bibby Sterilin Ltd., Staffordshire, England
Reaktionsgefäße; 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme Biomax MR, MS, XOMat-Blue	Kodak Company, New York, USA
Röntgenfilme Hyperfilm ECL	Amersham, Freiburg
Rollerflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen und Flaschen	TPP (Renner, Darmstadt)

Zentrifugierröhrchen

TPP (Renner, Darmstadt)

Reagenzien:

30 % Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)

Roth GmbH, Karlsruhe

Agarose

Serva, Heidelberg

Ammoniumpersulfat

Biorad, Richmond, USA

Amphotericin

Biochrom KG, Berlin

Ampicillin

Sigma GmbH, Deisenhofen

Aprotinin

Sigma GmbH, Deisenhofen

Beta-Mercaptoethanol

Roth GmbH, Karlsruhe

Blasticidin S HCL

Invitrogen, Karlsruhe

Bromphenolblau

Sigma GmbH, Deisenhofen

BSA (Fraktion V)

Serva GmbH, Hamburg

Citrat

Roth GmbH

CL-4B-Sepharose

Pharmacia GmbH, Freiburg

DMEM, 1,5 g/l Glukose

Cambrex BioScience, Verviers, Belgien

DMEM, 4,5 g/l Glikose

Cambrex BioScience, Verviers, Belgien

Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Zellkultur

Sigma GmbH, Deisenhofen

DYT

Difco, Sparks, USA

ECL-Substratlösung

Amersham, Freiburg

MEM-Earle Medium

Biochrom KG, Berlin

Ethidiumbromid

Merck, Darmstadt

DTT

Biorad, Richmond, USA

FCS

Biochrom

Fluoreszenz-Einbettmedium (Moviol)

Calbiochem, Darmstadt

Glyzerin

Roth GmbH, Karlsruhe

Ham's F12 Medium

Cambrex BioScience, Verviers, Belgien

HEPES

Cambrex BioScience, Verviers, Belgien

Hybridisierungslösung UltraHyb

Ambion, Texas

Hybridisierungslösung ExpressHyb

Clontech, Heidelberg

Hygromycin

Applichem, Darmstadt

Lactacystin

Biomol, Hamburg

LB Broth, Lennox

Difco, Sparks, USA

L-Cystein

Sigma GmbH, Deisenhofen

L-Glutamin	Sigma GmbH, Deisenhofen
Nonidet-P40 (NP-40)	Fluka AG, Buchs, Schweiz
PBS	Cambrex BioScience, Verviers, Belgien
Penicillin/Streptomycin, 100U/ml	Cambrex BioScience, Verviers, Belgien
PMSF	Serva, Heidelberg
Proteasen-Inhibitor (complete)	Roche, Mannheim
Protein-A-Sepharose	Amersham, Freiburg
Protein-G-Sepharose	Amersham, Freiburg
Pyruvat	Merck, Darmstadt
Rotiblock	Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640	Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien
SDS	ICN Biomedicals, Eschwege
TEMED	Biorad, Richmond, USA
TRI REAGENT	Sigma GmbH, Deisenhofen
Tris	ICN Biomedicals, Verviers, Belgien
TritonX-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA (0,5 g/l Trypsin 1:250, 0,2 g/l EDTA)	Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien
ULTRAhyp™	Ambion, USA
Radioisotop: [α - ³² P]-dCTP	Amersham, Freiburg

Weitere hier nicht verzeichnete Chemikalien wurden entweder von der Sigma GmbH (Deisenhofen) oder von der Roth GmbH in Karlsruhe bezogen.

Kits:

DNA-Agarose-Elutionskit GeneCleanII	QBiogene, Heidelberg
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
GC-Rich PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Plasmidpräparationskits	Biorad, Sigma (Mini) Peqlab, Erlangen (Mini) Qiagen, Macherey-Nagel (Midi, Maxi)

Random-Priming-DNA-Labeling	Amersham, Freiburg
RNA-Präparationskit	Qiagen, Total RNA-Kit
ThermoScript™ RT-PCR System	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO-Klonierung	Invitrogen, pCRII, pCR2.1, pcDNA3.1-V5-His, pcDNA3.1D-V5-His

Transfektionsreagenzien:

CalPhos™	BD Bioscience, Heidelberg
FuGene 6	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
jetPEI™	QBiogene, Heidelberg

2.2.1 Verwendete Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden *E. coli* Stämme mit folgendem Genotyp benutzt:

BL21 (F⁻, ompT, hsdS (rB⁻, mB⁻), gal)

Dieser Bakterienstamm wurde zur Expression rekombinanter Proteine verwendet.

DH5α (supE44, ΔlacU169 (φ80 lacZ ΔM 15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1)

Dieser Bakterienstamm wurde zur Klonierung von rekombinanten Plasmiden verwendet.

TOP10 (mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80ΔlacΔM15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139 Δ (ara, leu), 7697, galU, galK, lambda⁻, rpsL, endA1, mupG)

Dieser Bakterienstamm wurde für die Transformation von TOPO-Klonierungsprodukten eingesetzt.

2.2.2 Zelllinien

CHO (ATCC CRL-61), Chinese Hamster Ovary, Kultur in Ham's F12, 2 mM Glutamin, 10 % FCS.

COS-1 (ATCC CRL-1650), SV-40-transformierte Affennierenzellen. Diese Zellen enthalten genau eine integrierte Kopie der kompletten frühen Region von SV40. Kultur in DMEM (High Glucose), Glutamin, Pyruvat, Pen/Strep

COS-7 (ATCC CRL-1651), ähnlich COS-1, Kultur wie COS-1

HM-1, embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv129P2/OlaHsd (Magin *et al.*, 1992), Kultur in BHK-21 Medium/Glasgow MEM, Glutamin, Natriumpyruvat, Fötale Kälberserum, Neugeborenen Kälberserum, β -Mercaptoethanol, nicht-essentielle Aminosäuren, humanes LIF und Pen/Strep

2.2.3 Antikörper

anti-Flag	Sigma
anti-His (C-term)	Invitrogen
anti-Maus-Ig Antikörper, HPR-gekoppelt	Sigma
anti-Maus-Ig-Alexa, rot	Molecular Probes, Oregon
anti-Maus-Ig-Alexa, grün	Molecular Probes, Oregon
anti-myc	Invitrogen
anti-V5	Invitrogen
In-1 (anti-invariante Kette)	Koch <i>et al.</i> , 1982
MAR 18.5 (monoklonaler Maus-anti-Ratte-Ig-AK)	Lanier <i>et al.</i> , 1982
CHIP-Antiserum	Höfeld
anti-Hsp70	Stressgen
GR-Antikörper (Polyklonal)	Santa Cruz

2.2.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-ARK (Darmstadt), Metabion (Martinsried) bzw. MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

BAT3

BAT3.766.F:	GACGCAAATGGGCGGTAGGCG
BAT3.2630.R:	CTGAGCCACAAGGACTGGCTG
BAT3.3681.R:	ATCAGCAAAGGCCCGCTGGGC
BAT3.4328.R:	CATCAGCAAAGGCCCGCTGGG

BAT3Ex5.1382.R: AGGAAGATTGAAGGTTCCAAC
 BAT3Ex5.1337.F: GTCATGGTTGGAACCTTCAATCTTCCTAGTG
 AGCCCCGGTACGGCTG
 BAT3Ex11Fusion24.F: CCGTGGTCATGATGCACATGAACATTCAAG
 GCTCCACCCTCATCCAGCTG
 BAT3Ex11.2346.R: CTTGAATGTTTCATGTGCATCA
 BAT3Exon11.12.F: GACCCCCTGGTCATGGCCAAACCCTGGGAC
 AGCAGGTGCCAGGCTTCC
 BAT3Exon11.R: CCAGGGTTTGGCCATGACCAG
 BAT3Ex22.4007.F: GAAAGAGCTTCCCCTGAGCCTCAGGAATGG
 GTCCCTATTATCCAG
 BAT3Ex22.3863.R: CTGAGGCTCAGGGGAAGCTCT
 BAT3Ex24.4141.F: GCTTCTCTCAGAGGCTGTGAG
 BAT3Ex24.4162.R: CTCACAGCCTCTGAGAGAAGC
 BAT3.SEQ.1328.F: GTTCATGACCGGAATGCCAAC
 BAT2.SEQ.1871.F: GCCACCACGGACTACAATAAC
 BAT3.SEQ.2199.F: CTCCGTCTTCTACCAATGTCTG
 BAT3.SEQ.2309.F: GTGGAACCCGTGGTCATGATG

BAT2

BAT2.0043.F: GAGTGCTGTCCGGGCAACTTCC
 BAT2.6349.R: GTGCCAGGACTTTACCCGCTTGG
 Bst1107IPrimerloxP.F: TACGCATCAGGAGTCGAGGCTATAACTTCG
 TATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTA
 Bst1107IPrimerloxP.R: TACATAACTTCGTATAGCATAACATTATACG
 AAGTTATAGCCTCGACTCCTGATGCGTA
 PvuI-EcoRI-AscI-BssHII.sense: GTTTAAACGAATTCGGCGCGCC
 PvuI-EcoRI-AscI-BssHII.antisense: CGCGGGCGCGCCGAATTCGTTTAAACAT
 SacI-EcoRI-SalI-SacI.sense: CGAATTCGTGACAGCT
 SacI-EcoRI-SalI-SacI.antisense: GTCGACGAATTCGAGCT
 BAT2.749.F: GTGCTGAGTACCCAGTGC
 BAT2.1172.R: GTTGAAGTATCCCTATCC
 P.3-PmeI.F: TTGTTTAAACGCCTGGTGGTAGTGGTGC
 P.4-3kb.R: GCGATGCTGCTGTCACTGGTG

P.0724.PmeI.F (TK):	TTGTTTAAACATCGATATCTAGATCTCG
P.2571.PmeI.R (TK):	TTGTTTAAACTCGTCCACCAGACCCAC
P.6061.F:	ATCGCAGCCACTGCCGGC
P.8010-AscI.R:	TTGGCGCGCCTAGATACTCACTGGGTAG
P1.F:	CGGGGCTGCTAAAGCGCATGC
P2.F:	GCAACTAACAGACCAGATGAA
P3.F:	CATATGCTCCAACCCTCTTAC
P4.R:	GAGCCTCAGGAAGTCCCACAG
BAT2.6468.F (es):	AGGAAGTGACCCCATCTGGTG
BAT2.7501.R (es):	CCAAATAGTCATAGTCACCTG
BAT2.IS.F:	GTACCTTCCTCACAAATGTTC
BAT2.IS.R:	CAGATGGACAGCACCGCTGAG

Primer für die BAT2-Sequenzierung:

BAT2.0043.F:	GAGTGCTGTCCGGGCAACTTCC
BAT2.749.F:	GTGCTGAGTACCCAGTGC
BAT2.1979.F:	ATGAGAGTGTGGCGGCAGGCC
BAT2.2585.F:	CATATGGAATCTGAGCTCAGC
BAT2.2624.F:	ACGAATGGACACCAGACC
BAT2.3642.F:	CGTTAGTCGGAGCCCAGCCGC
BAT2.4257.F:	GCCCTATCTCCTCCTCTTCCC
BAT2.4870.F:	GCTATGTAAGGAATAGATGGA
BAT2.5958.F:	CGTCTAAATTAACAATATCAA
BAT2.6479.F:	CGTTGTCTGGGTTTCTACCAA
BAT2.7052.F:	GCATTACTIONTACATTCAAATCC
BAT2.7666.F:	GCCTCCCATCTCCTTCATGAC
BAT2.8173.F:	GCTACTTCCATTTGTCACGTC

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Es wurden COS-7-Zellen und CHO-(Chinesische Hamster-Ovarien)-Zellen kultiviert. Dabei erfolgte die Kultivierung der COS-7-Zellen in DMEM- Medium (mit 10 % hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % Natriumpyruvat) und die der CHO-Zellen in HAM's F-12-Medium (mit 10 % hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % Natriumpyruvat), bei 37 °C, 5 % CO₂. Es wurde immer unter einer Sterilbank (Steag) gearbeitet. Das bei 4 °C gelagerte Medium, Waschpuffer, Serum und Trypsinlösung wurden auf 37 °C vorgewärmt.

2.3.2 Zählen, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Anzahl von Zellen wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Es wurde darauf geachtet, dass an den Kontaktstellen zwischen dem Deckglas und der Neubauer-Zählkammer Newton'sche Ringe zu erkennen waren. Die in Kulturmedium vorliegenden trypsinierten Zellen wurden gut durchmischt und ein Tropfen am Rand der Zählkammer platziert. Der Tropfen wurde durch Kapillarkräfte in die Zählkammer gesogen. Es wurden 4 große Quadrate ausgezählt, der Mittelwert bestimmt und schließlich mit 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

Zum Einfrieren wurden trypsinierte Zellen in Kulturmedium zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4 °C) und der Überstand anschließend entfernt. Das Zellsediment wurde in kaltem Einfriermedium mit 10 % DMSO und 90 % FCS resuspendiert. Nach vorsichtigem Homogenisieren wurde die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt, das in einem Styroporbehälter bei -80 °C eingefroren wurde. Danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen direkt in 37 °C warmes Wasser überführt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und gut mit der Pipette durchmischt. Die Lösung wurde zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4 °C), bevor das Zellsediment in frischem Kulturmedium resuspendiert und in einer Kulturflasche ausgesät wurde. Das Medium wurde nach dem Anwachsen der Zellen erneuert.

2.3.3 Zusammensetzung und Herstellung der Kulturmedien für *E. coli*

LB (Luria-Bertani)-Medium:

1 % Baktotrypton

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

Für LB-Agar-Platten wurden 1,5 % Agar zugesetzt.

Die Flüssigmedien wurden in Portionen aufgeteilt, autoklaviert (20 min, 121 °C) und bei RT gelagert. Agar enthaltende Medien wurden autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen (25-30 ml/Platte). Bei Bedarf wurde Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) oder Chloramphenicol (Endkonzentration: 150 µg/ml) kurz vor dem Gießen der Platten in den höchstens noch 60 °C heißen Agar gegeben. Die Platten wurden bei 4 °C aufbewahrt.

Für den Nachweis von *lacZ*-positiven Klonen wurde auf LB-Agarplatten 50 µl X-Gal (250 mg/ml) und 25 µl IPTG (120 mg/ml) ausgestrichen.

2.3.4 Anzucht von *E. coli*-Zellen zur Plasmidpräparation

E. coli-Zellen einer Bakterienkolonie oder einer Vorkultur wurden mindestens 8 h in LB-Medium bei 37°C in einem Rotationsinkubator inkubiert. Zur Selektion auf Plasmide wurde das Medium mit einem geeigneten Antibiotikum (Ampicillin, Chloramphenicol) versetzt.

2.3.5 Herstellung elektrokompetenter Zellen zur Transformation mit Plasmid-DNA

Elektrokompetente Zellen (DH5α) wurden mit einer modifizierten Methode nach Dower *et al.* (1988) hergestellt. 10 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur (ÜK) wurden in 1 l DYT-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 inkubiert und 30 min auf Eis abgekühlt. Bei den folgenden Arbeitsschritten wurden die Zellen immer auf Eis gehalten und ausschließlich vorgekühlte Gefäße und Lösungen verwendet. Die Zellen wurden 15 min zentrifugiert (4.000 g, 4 °C), das Pellet mehrmals mit 1 mM HEPES-Lösung (pH 7,0) gewaschen und schließlich in 20 ml 10 % Glycerin/1mM Hepes-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden

erneut abzentrifugiert, in 2-3 ml 10 % Glycerin/ 1 mM Hepes-Lösung aufgenommen und in 40 µl-Portionen aliquotiert. Die Zellen wurden sofort mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei 80 °C gelagert. Vor Verwendung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut.

2.3.6 Transiente Expression von Proteinen in COS-7- und CHO-Zellen

Zur Transfektion von COS-7- und CHO-Zellen wurden verschiedene Transfektionsreagenzien (JetPeiTM, KalziumphosphatTM, CytoPureTM-cmn) verwendet. Hierzu wurden 4 h vor der Transfektion ca. 3×10^5 Zellen pro Transfektionsansatz in eine Vertiefung einer 6 Well-Platte mit 3 ml Kompletmedium ausgesät. Nach Absetzen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Für die Transfektion wurde zunächst der erste Ansatz in einem Volumen von 100 µl mit ca. 0,5-3 µg Plasmid-DNA, ddH₂O und mit dem jeweiligen Transfektionsreagenz verdünnt und vorsichtig mit der zweiten Lösung (Transfektionspuffer) gemischt, 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise zu 2 ml Kompletmedium auf die 6-Well Platten verteilt. Der Transfektionsansatz wurde nach 48-72 h für weitere Analysen abgenommen.

Für den Glukokortikoidrezeptor (GR)-Degradationsversuch wurde ausschließlich die Kalziumphosphat-Methode für die Transfektion verwendet.

2.3.7 Stabile Transfektion von CHO-Zellen

Zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden CHO-Zellen mit der Kalziumphosphat Kopräzipitationsmethode transfiziert (Asubel *et al.*, 1994). Bei dieser Methode bildet sich nach Zugabe der DNA zu einer phosphathaltigen Kalziumchlorid-Lösung ein Präzipitat, welches sich auf den Zellen absetzt und aufgenommen wird. 4 h vor der Transfektion wurden 3×10^6 CHO-Zellen auf eine Petrischale (10 cm Durchmesser) ausgesät und in 10 ml Ham's-Kompletmedium kultiviert. Nach Absetzen der Zellen wurde das Medium durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Für die Transfektion wurden jeweils zweimal ca. 5-6 µg Plasmid-DNA mit sterilem ddH₂O und 12,2 µl Kalziumphosphatlösung in einem Volumen von 100 µl verdünnt. Diese Ansätze wurden jeweils zu 100 µl 2 x HBS Puffer unter Schütteln tropfenweise zugegeben, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise, gleichmäßig auf die Petrischale pipettiert. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte am nächsten Tag durch die Zugabe von Puromycin bzw. Blastocidin und wurde bis zum

Einfrieren der stabil transfizierten Zellen beibehalten. Nach drei Tagen wurde das Medium gewechselt, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen. Nach ca. 10-12 Tagen konnten die ersten resistenten Zellklone isoliert und jeweils über 2-4 Passagen bis auf 6 Well-Platten und T25-Kulturflaschen expandiert werden. Die Expression der Proteine wurde in den unterschiedlichen Klonen durch Western Blot-Analysen untersucht.

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 Plasmid-DNA-Präparation

Eine Bakterienkultur mit entsprechendem DNA-Plasmid wurde von einer Platte entnommen und ü.N. bei 37 °C in 3-5 ml LB- bzw. DYT-Medium mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums herangezogen.

Wurde DNA mit hoher Reinheit benötigt, so wurde das „NucleoSpin“- Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet, hierbei wird die Plasmid-DNA über Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. 1,5 ml der Bakterienkultur wurde bei 14000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde im entsprechenden Puffer lysiert, der RNase enthält. Der SDS-Anteil dieses Puffers solubilisierte die Phospholipid- und Proteinkomponenten, während NaOH die DNA und Proteine denaturierte. Die optimierte Lysezeit von 5 min bei RT erlaubte die Denaturierung der chromosomalen DNA bei geringster Denaturierung der Plasmide. Proteine- und Lipidbestandteile, sowie die zellwandgebundene chromosomale DNA wurden durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C präzipitiert. Die im Überstand vorhandene Plasmid-DNA wurde dann auf eine Säule aufgetragen. Die negativ geladene Plasmid-DNA konnte an das positiv geladene Säulenmaterial binden und durch Elutionspuffer, der Anionen enthält, die eine höhere Affinität zu dem Säulenmaterial aufweisen, von der Säule eluiert werden.

Wurde DNA mit geringerer Reinheit für z.B. einen Restriktionsverdau benötigt, so wurde für die Präparation ein modifiziertes alkalisches Lyseprotokoll verwendet. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl 50 mM Tris-HCL pH 7,4 resuspendiert, mit 300 µl 0,2 M NaOH/1 % SDS aufgeschlossen und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl NH₄Ac und fünfzehnminütiger Inkubation auf Eis konnte genomische DNA ausfallen und zelluläre Proteine denaturieren. Anschließend wurde 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert, wobei Plasmid-DNA im Überstand verbleibt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und

fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde die Plasmid-DNA ausgefällt. Das Pellet wurde anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen, 15 min getrocknet und in 50-100 µl sterilem H₂O, oder in TE-Puffer aufgenommen.

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Nucleobond PC 100- und PC 500- Kits der Firma Machery-Nagel nach Herstellerangaben gewonnen. Endotoxin freie Plasmid-DNA wurde durch das Nucleobond PC 500-EF Kit der Firma Machery-Nagel isoliert und für die Elektroporation von embryonalen Stammzellen verwendet. Die DNA wurde anschließend durch Phenol-Extraktion (2.4.3.1) und Ethanol-Präzipitation (2.4.3.2) gereinigt.

2.4.2 Präparation von genomischer DNA aus Kulturzellen

Zellen, die auf 10 cm-Kulturschalen oder in T75-Kulturflaschen bis zur Konfluenz gewachsen waren, wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3-6 ml Lysispuffer und 30-60 µl Proteinase K (20 mg/ml) behandelt und mindestens 3 Stunden unter Rotieren bei 55 °C inkubiert. Dann wurde die Proteinase K durch 20minütiges Erhitzen auf 68 °C inaktiviert, und im nächsten Schritt die RNA durch eine 20 minütige Inkubation mit RNase A (200µg/ml) bei 37 °C abgebaut. Durch Zugabe von 3-6 ml 2-Propanol (abs.) wurde die genomische DNA präzipitiert und mit Hilfe einer zugeschmolzenen Glaskapillare aufgespult. Anschließend wurde die genomische DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (50-200 µl) aufgenommen. Die DNA wurde bei 55 °C ü.N. gelöst und bei 4 °C gelagert.

2.4.3 Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren

2.4.3.1 Phenol/Chloroformextraktion

Verunreinigungen von DNA-Lösungen mit Proteinen, Membranbestandteilen etc., die in organischen Lösungsmitteln löslich sind, wurden durch Phenol/Chloroformextraktion entfernt. Die DNA-Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform versetzt, die Phasen gut gemischt und zur Trennung zentrifugiert (15.000 g, 3 min, RT). Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert (2.4.3.2).

2.4.3.2 Ethanol-Präzipitation

Um DNA zu konzentrieren, kann sie durch Einstellung definierter Salz- und Alkoholkonzentrationen präzipitiert werden. Die DNA-Lösung wurde auf eine NaAc-Konzentration von 0,3 M (pH 4,8) eingestellt und mit dem 2,5-3fachen Volumen absoluten Ethanol versetzt, kurz gemischt und 10 min bei -20 °C inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (18.000 g, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in TE oder ddH₂O aufgenommen.

2.4.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.4.4.1 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Agarose-Gelen

Die Menge an DNA, die auf ein Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (2.4.5) aufgetragen wurde, konnte durch Vergleich mit einem gleichzeitig aufgetragenen Größen- und Mengenstandard (2.4.6) anhand der Intensität der Banden abgeschätzt werden.

2.4.4.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die DNA in ddH₂O verdünnt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Eine OD von 1,0 bei 260 nm entspricht 50 µg DNA/ml. Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten konnten durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm beurteilt werden. Er sollte nicht kleiner als 1,8 sein.

2.4.5 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Für Trennungen im Bereich von 500-10000 bp wurden 0,7-1 % Agarose-Gele verwendet. Zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten wurden höher konzentrierte Agarose-Gele eingesetzt (1,5-2 %).

Die Agarose wurde in 1x TAE aufgekocht, bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf 60 °C wurde die Gellösung mit 1 µg Ethidiumbromid/ml versetzt und in einem Gelträger mit einem Former für die Probenaschen gegossen. Nach dem Erkalten wurden die Proben, die zuvor mit 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt worden waren, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 1x TAE als Laufpuffer bei 120 V bis zur ausreichenden Trennung der Nukleinsäuren durchgeführt. Diese konnten durch die Fluoreszenz von interkaliertem Ethidiumbromid unter UV-Einwirkung (254 nm) sichtbar gemacht werden.

2.4.6 DNA-Größen- und Mengenstandard

Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas). Fragmentgrößen:
3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas). Fragmentgrößen:
10.000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bp.

2.4.7 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Die Reinigung wurde in Anlehnung an das Protokoll der Firma Qbiogene durchgeführt. Das unter langwelligem UV Licht (310 nm) ausgeschnittene Gelstück wurde zerkleinert, in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 3 Vol. 1M Natriumjodidlösung versetzt und 5 min bei 55 °C geschmolzen. Nach Zugabe von 5-10 µl Glasmilch wurde 5 min bei RT inkubiert. Dabei wurde die Matrix durch mehrmaliges invertieren in Suspension gehalten, so dass die DNA daran adsorbieren konnte. Durch Zentrifugation (14000 rpm, 10 s) wurde die Glasmilch mit der daran gebundenen DNA pelletiert und je dreimal mit 800 µl Waschlösung (New Wash) gewaschen. Nach 5-10 min Trocknung bei 37 °C wurde zur Elution der DNA mindestens 5 min mit 12 µl ddH₂O bei RT inkubiert. Die eluierte DNA löst sich in dem Wasser, wonach die Glasmilch durch Zentrifugation (14000 rpm, 1 min) abgetrennt wurde. Die DNA-Ausbeute betrug zwischen 50 % und 70 %, und wurde auf einem Agarose-Gel kontrolliert.

2.4.8 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die Ansätze in 1x Inkubationspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) inkubiert. Inkubationen mit mehreren Enzymen wurden bei übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. Zum Schneiden wurden 3-5 U Enzym/ μg Plasmid-DNA eingesetzt. Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 10 μl durchgeführt und, wenn nicht anders vermerkt, nach 1 h Inkubation vollständig auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Das Volumen für präparative Zwecke betrug 20-60 μl . Genomische DNA wurde über Nacht verdaut. Nach mindestens 8 h Inkubationszeit wurde kontrolliert, ob die DNA vollständig geschnitten worden war und gegebenenfalls erneut Enzym zugegeben. Bei vollständiger Restriktion wurde der Ansatz auf ein präparatives Agarose-Gel aufgetragen.

2.4.9 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.4.9.1 Glätten überhängender Einzelstrang-Enden

Überhängende 5'-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt (5'→3'-Polymeraseaktivität). Durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms wurden überhängende 3'-Enden abgedaut. Der Reaktionsansatz (2 U Klenow-Enzym/ μg DNA, in einem beliebigen Restriktionspuffer, 100 μmol dNTP) wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 5 bis 10 min bei 68 °C inaktiviert.

2.4.9.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Da PCR-Fragmente keine endständigen 5'-Phosphat-Gruppen besitzen, wurden sie vor der Ligation (2.4.10.1) in Vektoren phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5-10 U T4-Polynukleotidkinase in dem mitgelieferten Puffer 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach 10minütiger Hitze-Inaktivierung der Kinase bei 65 °C wurden die Fragmente für die Ligation eingesetzt.

2.4.9.3 Dephosphorylierung geschnittener DNA-Vektoren

Die kompatiblen Enden geschnittener Vektor-DNA wurden mit alkalischer Phosphatase (SAP, Shrimp Alkaline Phosphatase) dephosphoryliert, um eine Religation der Enden zu vermeiden. Dazu wurden 50-100 ng geschnittene Vektor-DNA, 1 µl 10x Dephosphorylierungspuffer und 1 U alkalischer Phosphatase, Shrimp mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65 °C für 15 min beendet. Die DNA wurde anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (2.4.5) eluiert.

2.4.10 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.4.10.1 Ligation von DNA

Zur Ligation wurden ca. 20-50 ng geschnittener und dephosphorylierter Vektor und ein 3-5 facher molarer Überschuss an Fragment in 1x Ligasepuffer gemischt. Fragmente und Vektor wurden mit 0,5 µl 1 U T4-DNA-Ligase 30-60 min in einem Volumen von 10-30 µl bei Raumtemperatur bzw. ü.N. bei 16 °C ligiert. Das Enzym wurde nach der Ligation bei 68 °C 20 min hitzeinaktiviert.

2.4.11 Klonierung von Oligonukleotiden

In der Arbeit wurden während der Klonierungen auch neue Restriktionssequenzen in die Sequenz des zu bearbeiteten Gens eingefügt. Hierzu wurden komplementäre Oligonukleotide mit der gewünschten Sequenz und den erforderlichen einzelsträngigen Überhängen synthetisiert.

Die Klonierung der Oligonukleotide erfolgte entweder über die Annealing- oder nach der von Kang und Inoye (1993) beschriebenen Methode. Bei der Annealing-Methode wurden die Oligonukleotidlinker, bevor sie phosphoryliert wurden, bei 37 °C für 20 min und anschließend bei RT für 10 min inkubiert. Die Ligation mit dem geschnittenen, dephosphorylierten und aufgereinigten Vektor fand mindestens 1 h bei RT oder ü.N. bei 16 °C statt. Nach der von Kang und Inoye beschriebenen Methode wurden die Oligonukleotidlinker, ohne vorherige Behandlung, in 500fachem molarem Überschuss zu dem geschnittenen und aufgereinigten Vektor gegeben. Hier wurde die gleiche Ligation wie in der Annealing-

Methode angewendet. Nach der Ligation wurden die Produkte direkt zur Transformation eingesetzt.

2.4.12 Klonierung von PCR-Produkten durch TOPO-Klonierung

Sollten PCR-Produkte direkt kloniert werden, so wurden TOPO-Vektoren der Firma Invitrogen verwendet. Diese benutzen die Eigenschaft der Taq-Polymerase, die eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität aufweist. Während der Amplifizierung durch die Taq-Polymerase werden an den PCR-Produkten matrizenunabhängig 3'-A-Überhänge angehängt. Diese Produkte konnten nun vereinfacht in einem komplementären ein-Basen-Überhang kloniert werden, wie z.B. in den sog. „TOPO-Vektoren“. Diese „T-Vektoren“ enthalten kovalent mit dem Vektor gekoppelte Topoisomerasen aus dem Vaccinia-Virus. Die Topoisomerase katalysiert die effiziente Verknüpfung von DNA Enden, wobei sich die Topoisomerase freisetzt und das Fragment sich mit dem Vektor verknüpft. Für die Ligation wurden 1-4 µg PCR-Produkt (10-100 ng), 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) und steriles ddH₂O auf ein Volumen von 5,5 µl aufgefüllt und vermischt. Anschließend wurde 0,5 µl TOPO-Vektor (0,5 µg) zugegeben, vorsichtig verrührt und 5 min bei RT inkubiert. Das Ligationsprodukt (ca. 2-3 µl) wurde direkt zur Transformation eingesetzt.

2.4.13 Transformation von Bakterien

2.4.13.1 Transformation durch Elektroporation

Elektrokompetente Zellen wurden durch Elektroporation transformiert. Hierzu wurden 40 µl elektrokompetente Zellen, 3-5 µl Ligationsansatz und 150 µl ddH₂O vermischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation der DNA erfolgte bei einer Spannung von 2500 V, 40 µF Kapazität und 192 Ω Entladungswiderstand. Die Feldstärke betrug 12,5 kV/cm. Nach dem Elektroschock wurden die Zellen in 350 µl SOC-Medium überführt und bei 37 °C 60 min geschüttelt, bevor sie auf LB-Agar mit dem entsprechenden Selektionsmittel ausplattiert wurden (jeweils 1/10 und 9/10 des Transformationsansatzes). Die Platten wurden bei 37 °C ü.N. in einem Brutschrank inkubiert.

2.4.13.2 Transformation durch Hitzeschock

Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, je 50-100 μl in ein vorgekühltes Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 3-5 μl des Ligationsansatzes (2.4.10.1) gegeben, vorsichtig gemischt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Nach 30-60 s bei 42 °C („Hitzepuls“) und 2 min auf Eis wurden 600 μl SOC-Medium zugegeben und 60 min bei 37 °C geschüttelt. Nach dieser Regenerationszeit, die der Ausprägung der Antibiotika-Resistenz dient, wurden die Zellen auf LB-Agar (100 μg Ampicillin/ml, bzw. 150 μg Chloramphenicol/ml) ausplattiert (jeweils 1/10 und 9/10 des Transformationsansatzes) und ü.N. bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

2.4.14 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

TRI Reagenz (Sigma) ist eine gebrauchsfertige Lösung, die eine RNA-, DNA- und Proteinisolation aus Zellen ermöglicht. Das monophasische Reagenz besteht aus saurem Phenol und dem chaotropen Salz Guanidinisothiocyanat. Beide Komponenten ermöglichen eine Lysis der Zellen und eine Denaturierung der Proteinbestandteile. Die Zugabe von Chloroform und eine folgende Zentrifugation trennt das Gemisch in eine wässrige und eine organische Phase. RNA befindet sich ausschließlich in der wässrigen oberen Phase, während DNA und Proteine im sauren Phenol, der organischen Phase, gelöst sind. Nach einem Transfer der wässrigen Phase kann die RNA durch 2-Propanol gefällt werden.

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation bei 300 x g für 10 min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in einem entsprechenden Volumen TRI Reagenz (1 ml TRI Reagenz / 1×10^6 Zellen) aufgenommen. Durch Auf- und Abpipettieren und einer Inkubation für 5 min bei RT wurde die Lysis vervollständigt. Es wurden 0,2 ml Chloroform/ml TRI Reagenz hinzu gegeben, die Probe sorgfältig geschüttelt und für 3 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 12000 x g für 15 min wurden höchstens 60 % der oberen wässrigen Phase vorsichtig abgenommen und in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,5 ml 2-Propanol/ml TRI Reagenz und einer Inkubation für 10 min bei RT wurde die RNA präzipitiert und durch Zentrifugation mit 12000 x g für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet einmal mit 1 ml 75 % Ethanol/ml TRI Reagenz gewaschen. Das Pellet wurde nach einer Zentrifugation (7500 x g, 5 min) für 10 min bei RT luftgetrocknet. Zur Resuspension wurde das Pellet in 50 μl RNase freiem Wasser aufgenommen. Um die RNA vollständig zu lösen,

wurde das Aliquot für 20 min bei 60 °C im Thermoblock erhitzt und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.15 Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase SuperscriptTM II wurde Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Für einen 20 µl RT-Ansatz wurden ca. 2-4 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Dieser hatte folgende Zusammensetzung:

2-4 µl (ca.2-4 µg) Gesamt-RNA
1 µl p(dN)₆ 50 µM (Roche)
ad. 20 µl H₂O

Nach einer 10minütigen Inkubation bei 70 °C wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und mit folgenden Reagenzien versetzt:

4 µl 5x F.S. Puffer
2 µl 0,1 M DTT
1 µl 10 mM dNTPs
2 µl RNasin 40U/µl

Danach wurden zwei aufeinander folgende Inkubationsschritte durchgeführt (10 min bei RT, 2 min bei 42 °C). Nach Zugabe von 1 µl Superskript II (200 U/µl) folgte eine 50minütige Inkubation bei 42 °C. Die Proben wurden 15 min bei 70 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.4.16 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA-Fragmente spezifischer Länge und Sequenz amplifiziert werden. In mehreren Zyklen wird die Matrizen-DNA hitzedenaturiert, mit geeigneten Oligonukletiden („Primern“) hybridisiert und diese mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase verlängert (Mullis *et al.*, 1986). Das PCR-Produkt kann über Schnittstellen in einen Vektor, oder direkt in einen „Topo-Vektor“ kloniert werden.

2.4.16.1 Bedingungen für die PCR-Reaktionen

Die Reaktionen wurden in einem Biometra T3 Thermocycler durchgeführt. Für die Amplifizierung von DNA wurden ca. 200-500 ng genomische DNA oder 1-10 ng Plasmid-DNA mit je 50-300 ng der jeweiligen Primer in einem Endvolumen von 25-100 μ l eingesetzt. Für diese Arbeit wurde entweder das Polymerasegemisch Expand Long Template DNA-Polymerase von der Firma Boehringer Mannheim eingesetzt, welches für die Amplifizierung von größeren genomischen DNA-Fragmenten geeignet ist, oder die *Taq*-Polymerase der Firma MBI. Das Polymerasegemisch Expand Long besteht aus *Taq*-Polymerase und fehlerkorrigierenden Polymerasen, dadurch wiesen die amplifizierten Produkte eine sehr geringe Fehlerrate auf. Der Reaktionsansatz enthielt jeweils den 1 x Puffer des jeweiligen Herstellers, wobei für die Expand Long der detergenzhaltige Puffer 3 und für die MBI *Taq*-Polymerase den Ammoniumsulfathaltige Puffer verwendet wurde. Ansonsten wurde die optimale $MgCl_2$ -Konzentration für jede Reaktion individuell bestimmt. Bei Regionen mit hohem GC-Gehalt wurde der Reaktion bei Bedarf 1,5-2 % DMSO zugefügt. Die Amplifikation erfolgte in 30-35 Zyklen. Die Hybridisierungstemperatur wurde für die Oligonukleotidprimerpaare optimiert, diese entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer. Die Elongationszeit wurde der Größe des zu amplifizierenden Fragments angeglichen (ca. 1 min/kb), wobei das Temperaturoptimum bei der Expand Long-Polymerase bei 68 °C liegt und das der *Taq*-Polymerase von MBI bei 72 °C. Die terminale Kettenverlängerung fand bei 72 °C für 7 min statt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	
1	94 °C	2 min	1	
2	94 °C	30 s	30-35	Denaturierung
3	5x °C- 65 °C	30 s	30-35	Anlagerung der Primer
4	68-72 °C	1-4 min	30-35	Elongation
5	72 °C	7 min	1	terminale Kettenverlängerung
6	4 °C	∞	1	

Tab. 2.1: Standard PCR-Profil

Das PCR-Profil für den Nachweis der homologen Rekombination von BAT2-flox in ES-Zellen wurde modifiziert, da hier ein Heißstart („Hot-start“) angewendet wurde, um im ersten Schritt die in den DNA-Lysaten enthaltende Proteinase K zu hitzeinaktivieren (1. Schritt:

96 °C, 15 min). Im zweiten Schritt wurde bei 80-90 °C der Reaktionsmix mit der Taq-Polymerase zugegeben und im dritten Schritt wurde die PCR fortgesetzt.

2.4.16.2 Reinigung der PCR-Produkte

Waren Nebenprodukte vorhanden oder sollten die PCR-Produkte in Plasmidvektoren rückkloniert werden, wurde die DNA auf ein Gel aufgetragen (2.4.5) und die Fragmente der gewünschten Größe eluiert (2.4.7).

2.4.17 Identifizierung rekombinanter Bakterienkolonien durch Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR konnten gleichzeitig mehrere Bakterienkolonien untersucht werden. Hierzu wurden mit einem sterilen Zahnstocher die Bakterienkolonien in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min in der Mikrowelle lysiert. Zu den lysierten Bakterienkolonien wurde ein entsprechender PCR-Ansatz pipettiert und ein dazu passendes PCR-Programm verwendet. Der anfängliche Denaturierungsschritt wurde bei Bakterien 5 min verlängert. Von positiv rekombinanten Bakterienkolonien wurden Flüssigkulturen angelegt und nach Plasmidpräparation durch Restriktionsverdau erneut getestet.

2.4.18 Southern Blot

Genomische Southern Blot Analysen wurden zur Identifizierung homologer ES-Zell-Rekombinationen eingesetzt. 10-20 µg genomische DNA wurde ü.N. mit dem jeweiligen Restriktionsenzym geschnitten und dann in einem 0,8 %igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht mit einem angelegten Fluoreszenz-Lineal fotografiert, um nach der Hybridisierung die Größen der hybridisierten DNA-Fragmente zu bestimmen. Das Gel wurde 10 min in 0,25 M HCl depuriniert, mit ddH₂O gewaschen und anschließend 60 min im Transferpuffer (0,4 M NaOH, 1 M NaCl) denaturiert. Die Membran wurde vor dem Auflegen auf das Gel in ddH₂O und dann in Transferpuffer befeuchtet. Der DNA-Transfer erfolgte durch Kapillarkraft auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham) über Nacht. Im Anschluss wurde die Membran nach

Markierung der Lage der Geltaschen im UV-Crosslinker behandelt, um die DNA auf der Membran zu fixieren.

2.4.19 Nachweis spezifischer Nukleinsäuren

2.4.19.1 Radioaktive Markierung spezifischer DNA-Sonden

Nukleinsäuren wurden durch spezifische DNA-Sonden nachgewiesen, die mit der „random priming-Methode“ (Feinberg und Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert worden waren. Die Markierung wurde mit dem „Megaprime DNA Labelling Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Radionukleotid diente [α - 32 P]-dCTP (spezifische Aktivität > 6.000 Ci/mM, Amersham Pharmacia Biotech). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Filtrationssäulen (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) abgetrennt. Die Markierungseffizienz wurde in einem Szintillationszähler bestimmt.

2.4.19.2 Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten DNA-Sonden und Autoradiographie

Zur Vorhybridisierung wurde die Nylonmembran mit gebundenen Nukleinsäuren 30-60 min bei 42 °C in 12 ml vorgewärmte ULTRAhybTM-Lösung (Ultrasensitive Hybridization Buffer, Ambion) inkubiert. Anschließend wurde die Vorhybridisierungslösung durch 12 ml auf 42 °C erwärmte ULTRAhybTM-Lösung ausgetauscht. Denaturierte radioaktiv markierte DNA-Sonden wurden zur ULTRAhybTM-Lösung hinzugefügt, wobei die Hybridisierung 12 bis 24 h bei 42 °C im Rollinkubator erfolgte. Nach der Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung entsorgt und die Membran in mehreren Schritten gewaschen. Unspezifisch gebundene DNA wurde bei 42 °C in folgenden Waschschrritten entfernt:

2 x 5 min	2X	SSC/0,1 % SDS
2 x 15 min	1X	SSC/0,1 % SDS
2 x 15 min	0,5X	SSC/0,1 % SDS
2 x 15 min	0,1X	SSC/0,1 % SDS

Spezifische Hybride, die aus Nukleinsäuren und radioaktiv markierten DNA-Sonden bestanden, wurden 2-3 Tage bei -80 °C autoradiographisch nachgewiesen (Röntgenfilm X-Omat AR, X-Omat Blue; Kodak).

2.5 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

COS-Zellen wurden durch Trypsinisieren von der Schale gelöst, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (4000 rpm, 4 min) pelletiert. Durch Zugabe von 50-70 µl eiskaltem Lysepuffer (1 % NP-40 in PBS, 1 mM PMSF, 0,1 % Aprotinin) wurden die Zellen bei 4 °C für 30 min aufgeschlossen. Anschließend wurden die Lysate zentrifugiert (14000 rpm, 5 min).

CHO-Zellen, die für den GR-Degradationsversuch eingesetzt wurden, wurden mechanisch vom Zellkulturgefäß abgelöst, einmal mit PBS gewaschen und 4 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Lyse erfolgte mit RIPA + Complete (Proteasen-Inhibitoren-Cocktail, Roche) für 15 min auf Eis. Die Lysate wurden zentrifugiert (14000 rpm, 20 min bei 4 °C) und der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (1976)

Für die Proteinbestimmung wurde das „Protein Assay“-Farbreagens von BioRad verwendet. Die zu vermessende Proteinprobe wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Farbreagens vermischt. Danach wurde die OD₅₉₅ bestimmt. Die Eichkurve wurde mit BSA (1 µg/µl) erstellt.

2.5.3 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

Proteine wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde in einer Kammer von der Firma cti durchgeführt. Es wurden 5 %ige Sammelgele und 7,5-12 %ige Trenngele verwendet. Die Proben wurden mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt und durch Aufkochen unter reduzierenden

Bedingungen denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 12 V/cm.

2.5.3.1 Verwendete Protein-Größenstandards

Als Größenstandards bei der SDS-Page dienten die Proteine des „Prestained Proteinmarker wide-range“ von NEB und die Proteine des “Kaleidoscope Prestained Standards“ von BioRad.

Prestained Proteinmarker wide-range	
Molekulargewicht (kDa)	Protein
175	MBP- β -galactosidase
83	MBP-paramyosin
62	Glutamic dehydrogenase
47	Aldolase
32	Triosephosphate isomerase
25	β -Lactoglobulin A
16,5	Lysozyme

Kaleidoscope Prestained Standards	
Molekulargewicht (kDa)	Protein und Farbe
221	Myosin (Blau)
128	β -galactosidase (Magenta)
82	Albumin (Grün)
43	Carbonic anhydrase (Violet)
32	Soybean trypsin inhibitor (Orange)
17	Lysozyme (Rot)
7	Aprotinin (Blau)

2.5.4 Nachweis von Proteinen

2.5.4.1 Transfer von Proteinen („Western Blot“)

Die Proteine wurden mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid Gelen aufgetrennt (2.5.3) und nun auf eine Schleicher & Schüll BA85-Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel für 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer („Western Blot“) wurde in einem Graphit-Elektroblot im Halbtrockenverfahren durchgeführt. Der Blotaufbau bestand aus drei Lagen S&S Blotpapier, der Membran, dem Gel und drei weiteren Lagen Papier alle drei Lagen wurden in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer fand bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm^2 für 60-90 min statt.

2.5.4.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der immunologische Nachweis von immobilisierten Proteinen erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die freien Bereiche der Membran mit synthetischem Rotiblock (einfach konzentriert) oder mit 5 % Milchpulver und 0,2 % Tween blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (1. Antikörper) inkubiert. Der spezifische Antigen-Antikörperkomplex wurde dann mit einem sekundären Antikörper (2. Antikörper) nachgewiesen, der an einer Peroxidase (HRPO) gekoppelt war. Die Inkubationsschritte wurden entweder 60 min bei RT oder ü.N. bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Membran jeweils dreimal 10 min bei RT mit 0,25 % Tween in PBS gewaschen. Alle Inkubationsschritte- und Waschschrte erfolgten unter Schütteln. Die Nachweisreaktion wurde mit dem „ECL Westernblot Detection Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben detektiert. Das Signal wurde auf Kodak X-Omat Blue-, oder BioMax MR-Film festgehalten.

2.5.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde angewendet, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Die hergestellten Zellysate (2.5.1) wurden in einem Gesamtvolumen von $250 \text{ } \mu\text{l}$ mit $30 \text{ } \mu\text{l}$ CL4B Sepharose 1h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ rotierend präinkubiert. Hierdurch wurden unspezifisch an Sepharose bindende Proteine entfernt. Nach Zentrifugation (4000 rpm, 1 min) wurde der

Überstand mit 10 µl Protein-A-Sepharose oder 7 µl Protein-G-Sepharose und mit 0,5-1 µg Antikörper über Nacht, rotierend, bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Antikörper-Antigenkomplexe durch Zentrifugation abgetrennt (4000 rpm, 3 min) und dreimal mit dem Waschpuffer (TBS + 0,25 % NP-40) gewaschen. Um das Protein von der Matrix zu lösen, wurde es in 25 µl Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (14000 rpm, 1 min), und in der SDS-Page (2.5.3) aufgetrennt.

2.5.6 Fixierung und immunzytochemische Färbung von COS- und CHO-Zellen

Transient transfizierte COS-7-Zellen, die mit Antikörpern gefärbt werden sollten, wurden vor der Transfektion auf Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden am zweiten Tag nach der Transfektion zweimal mit PBS gewaschen und 15 min mit 4 % Paraformaldehyd in PBS bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit 0,5 % Triton-X-100 15 min permeabilisiert und mit 5 % BSA in PBS bei 4 °C ü.N. blockiert. Die Färbung von transfizierten und fixierten COS-7-Zellen erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (verdünnt in 5 % BSA, 0,1 % Triton-X-100) inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis des spezifischen Antigen-Antikörperkomplexes mit einem sekundären Antikörper. Die Inkubationsschritte wurden 60 min bei RT in Dunkelheit durchgeführt. Im dritten Schritt erfolgte die DAPI-Kernfärbung, 15 min bei RT in Dunkelheit. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Zellen dreimal für je 10 min bei RT gewaschen. Für die Doppelfärbungen wurde die Schritte eins und zwei mit dem jeweiligen Antikörper wiederholt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit Mowiol (2,4 g Mowiol 4-88 in 6 g Glycerin, 6 ml ddH₂O, 12 ml 0,2 M Tris pH 8,8) überzogen und unter einem Phasenkontrast-Mikroskop analysiert.

2.6 Kultur von ES-Zellen

2.6.1 Arbeiten mit embryonalen Stammzellen

HM-1 embryonale Stammzellen (ES-Zellen) wurden immer in einem Heraeus-Inkubator in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Dabei erfolgte

die Kultivierung der ES-Zellen in Glasgow MEM-Medium (mit 5,6 ml Natriumpyruvat; 5,6 ml nicht-essentielle Aminosäuren; 5,6 ml Glutamin; 28 ml sterilfiltriertes fötales Rinderserum; 28 ml sterilfiltriertes Neugeborenen Kälberserum; 0,57 ml β -Mercapthoethanol; 0,57 ml humanes LIF [1000-1500x]; 5,6 ml Penicillin/Streptomycin) in Gelatine-beschichteten Zellkulturgefäßen. Die Böden der Zellkulturgefäße wurden mit 0,1 % Gelatinelösung bedeckt und nach ca. 15 min Inkubation vollständig wieder entfernt und die ES-Zellen darauf ausgesät. Die Zentrifugationen erfolgten bei 1200 x g für 5 min bei RT. Alle verwendeten Medien, Lösungen und Materialien wurden vor Gebrauch sterilfiltriert, wobei das Arbeiten unter der Sterilbank ausschließlich mit Einmal-Plastik-Materialien durchgeführt wurde.

2.6.1.1 Auftauen und Einfrieren von ES-Zellen

Zum Auftauen wurden die über flüssigem Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen mit den gefrorenen ES-Zellen in 37 °C warmen Wasser erwärmt. Die Zellen wurden dann vollständig in 6 ml vorgewärmtes ES-Medium überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in Medium wieder aufgenommen und auf gelatinisierte Zellkulturgefäße ausgesät. Hierzu wurden die ES-Zellen trypsiniert, abzentrifugiert und in 1 ml Medium resuspendiert. Danach wurde das gleiche Volumen Einfrier-Medium (2x) zugefügt und auf Kryoröhrchen aufgeteilt. Jetzt wurden die ES-Zellen mit einer Abkühlungsrate 1 °C/min für 24 h in 2-Propanol bei 70 °C eingefroren (Einfriersystem von Nalgene) und anschließend über Stickstoff gelagert.

2.6.1.2 Expansion von ES-Zellen

Vor der Expansion wurden die ES-Zellen zweimal mit 6 ml PBS und einmal mit Trypsin (2 ml) gewaschen. Durch Zugabe von 2 ml Trypsin und 3 bis 5-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die ES-Zellen vom Kulturgefäßboden gelöst und vereinzelt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe des dreifachen Volumens an ES-Medium gestoppt. Nach einer Zentrifugation wurden die ES-Zellen in frisches ES-Medium überführt und im gewählten Verhältnis auf weitere Kulturgefäße ausgesät. Nach 2-3 Tagen bei täglichem Mediumwechsel erreichten die ES-Zellen dann die Dichte für eine weitere Passage.

2.6.2 Transfektion embryonaler Stammzellen mit einem Geninaktivierungsvektor

2.6.2.1 Vorbereitung des Geninaktivierungsvektors

Für die Transfektion von ES-Zellen mit dem Geninaktivierungsvektor wurden 200-250 µg der endotoxinfrei präparierten Geninaktivierungsvektor-DNA in einem Volumen von 600 µl mit 200 Einheiten der Restriktionsendonuklease AscI linearisiert. Anschließend wurde die DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und bis zum Tag der Elektroporation in 300 µl endotoxinfreiem 70 % Ethanol bei -20 °C gelagert. Am Tag der Transfektion wurde die geschnittene DNA unter der Sterilbank an der Luft getrocknet und in 100 µl sterilfiltriertem, endotoxinfreiem TE-Puffer gelöst.

2.6.2.2 Elektroporation von embryonalen Stammzellen zur homologen Rekombination

Am Tag vor der Transfektion wurden die ES-Zellen passagiert und mit einer höheren Dichte auf T75-Kulturflaschen ausplattiert. Vier Stunden vor der Transfektion wurde das Medium der ES-Zellen erneuert. Für die Transfektion wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml 1x Trypsin 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml HM-1-Medium wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und das trypsinhaltige Medium wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Für eine effektive Transfektion mit 200-250 µg Vektor-DNA sollten ca. 20-30 Millionen ES-Zellen für eine Transfektion eingesetzt werden. Die ES-Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 800 µl sterilem HPS aufgenommen. Schließlich wurden die Zellen mit dem linearisierten Geninaktivierungsvektor vermischt und in eine Elektroporationsküvette (4 mm) überführt. Die Elektroporation wurde bei 3,0 µF, 0,8 kV und für 0,1 s durchgeführt. Die elektroporierten ES-Zellen wurden unter einer Sterilbank für 10 min bei RT inkubiert und anschließend auf Schalen und Kontrollschalen verteilt, die vorher mit Gelatin beschichtet wurden und frisches HM-1-Medium enthielten. Betrug die Zellzahl ca. 30 Millionen Zellen, so wurden die nicht transfizierten- und transfizierten- Zellen wie folgt auf Schalen (Ø 10 cm) verteilt:

Vor der Transfektion wurden Kontrollschalen angelegt: 1. 2×10^6 und 4×10^6 nicht transfizierte Zellen wurden jeweils auf 10 cm Schalen ausgesät und mit HAT (Sigma)

behandelt. Diese Schale diente zur Kontrolle der Stringenz der Selektion. 2. 2×10^6 nicht transfizierte Zellen wurden auf eine 10 cm Schale ausgesät und die Koloniezahl nach einer Woche mit derjenigen von 2×10^6 transfizierten Zellen verglichen, um die Überlebensrate bei der Elektroporation zu bestimmen.

Nach der Transfektion wurden die transfizierten ES-Zellen auf 20 x 10 cm-Schalen verteilt: 4 x $0,5 \times 10^6$ transfizierte Zellen, 4 x 2×10^6 transfizierte Zellen und 12 x $1,5 \times 10^6$ transfizierte Zellen.

2.6.2.3 Selektion von ES-Zellen

Die transfizierten ES-Zellen wurden die ersten 24 h ruhen gelassen, bevor die Positivselektion eingeleitet wurde. Hierzu wurde bei den elektroporierten ES-Zellen 24 h nach Aussäen das HM-1 Zellkulturmedium vollständig entfernt und durch HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin)-haltiges HM-1 Kulturmedium ersetzt. Ein weiterer Mediumwechsel erfolgte erst nach 5 Tagen, um eine Konditionierung des Mediums durch die stabil transfizierten ES-Zellen zu ermöglichen. Am Tag 5 nach der Transfektion wurde mit Ganciclovir-Selektion begonnen. Ganciclovir musste täglich frisch zu dem ES-HAT-Medium hinzugegeben werden. Hierzu wurden 4,3 mg Ganciclovir abgewogen und in 80 μ l PBS aufgenommen. 10 μ l dieser Lösung wurden zu jeweils 10 ml ES-HAT-Medium gegeben (Endkonzentration: 2×10^{-6} M). Die Ganciclovir-Selektion wurde für 3-6 Tagen durchgeführt, wobei die HAT-Selektion bei allen ES-Zellklonen beibehalten wurde.

2.6.2.4 Isolierung von ES-Zellklonen

Die für HAT und Ganciclovir resistenten ES-Zellkolonien wurden am Tag 11 nach der Transfektion isoliert. Jeweils eine Schale wurde mit PBS gewaschen und erneut mit 13 ml Medium bedeckt. Mit einer 200 μ l-Pipette wurden unter dem Lichtmikroskop in einer Sterilbank einzelne ES-Klone, die einen undifferenzierten Phänotyp zeigten, mit der Pipettenspitze vorsichtig vom Boden der Platte gelöst und in einem Volumen von 150-200 μ l aufgesogen. Die nun gelöste Kolonie wurde in eine 96- oder 48-Loch-Schale überführt und durch Resuspendieren vereinzelt. Die Wells der Loch-Schalen wurden anschließend mit frischem ES-HAT-Medium aufgefüllt. Die isolierten ES-Zellklone wurden jeweils über 4-6 Passagen bis auf 10 cm- Kulturschalen und T25-Kulturflaschen expandiert.

2.6.3 DNA-Präparation aus embryonalen Stammzellen (modifiziert nach Laird *et al.*, 1991)

Zur schnellen Isolation von genomischer DNA aus ES-Zellen, wurden konfluent gewachsene ES-Zellkolonien in 24-Loch-Platten präpariert. Hierzu wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden je 450 µl Lysis-Puffer mit frisch hinzugefügter Proteinase K (200 µg/ml) in alle Vertiefungen gegeben und für 3-6 h bei 55 °C inkubiert. Dann wurde die Suspension in ein steriles 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (12000 rpm, 10 min) die Zell- und Gewebeteile sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl 2-Propanol vermischt. Nach der Präzipitation der genomischen DNA wurde diese erneut zentrifugiert (12000 rpm, 10 min), der Überstand abgenommen und die an der Luft getrocknete DNA in 30-50 µl ddH₂O bei 65 °C für 20 min gelöst.

2.6.4 Gewinnung des LIF-Proteins

Das Cytokin LIF (Leukämie inhibierender Faktor) inhibiert die Differenzierung embryonaler Stammzellen während ihrer Kultivierung *in vitro*. In dieser Arbeit wurde das LIF hergestellt und getestet. Für die Herstellung wurden COS-7-Zellen transient mit dem Plasmid pC10 transfiziert, welches das Gen für das menschliche LIF (hLIF) enthält. Dadurch erhielten die COS-7 Transfektanten die Fähigkeit das LIF Protein zu exprimieren und in das Wachstumsmedium zu sezernieren. Das Wachstumsmedium mit dem enthaltenen LIF wurde gesammelt und auf seine differenzierungshemmende Wirkung getestet. COS-7-Zellen wurden in dem Kulturmedium Glasgow MEM in drei 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Bei vollständiger Konfluenz wurden die Zellen abgelöst und in HBS resuspendiert. Dazu wurden die Zellen zunächst trypsiniert und dann durch Zentrifugation (1200 rpm, 5 min) sedimentiert. Das Sediment wurde in 1,6 ml HBS aufgenommen. Jeweils 0,8 ml der Zellsuspension wurden mit ca. 120 µg pC10-LIF-Expressionsvektor transient bei 200 V und 500 µF transfiziert. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Zellen in 30 ml HM-1-Kulturmedium resuspendiert und jeweils 10 ml der Zellsuspension auf 75 cm² Zellkulturflaschen, die schon 20 ml HM-1-Kulturmedium enthielten, überführt. Diese Transfektanten wurden nun auf 15 x 75 cm² Kulturflaschen in je 25 ml HM-1 Medium bis zur Konfluenz expandiert. Das LIF-haltige Medium wurde nach drei Tagen, ohne Mediumwechsel, gesammelt (Charge 1). Zu den

Kulturflaschen wurde erneut 25 ml HM-1 Medium zugegeben und nach dreitägiger Kultur wieder das LIF enthaltende Medium entnommen (Charge 2). Zelltrümmer wurden vor dem Sterilfiltrieren (0,2 µm Filterporen) aus diesem Wachstumsmedium durch Zentrifugation abgetrennt und in Aliquots bei -70 °C gelagert. Vor dem Einsatz wurde der Überstand auf ES-Zellen getestet, um die benötigte Menge zu bestimmen, die eine Differenzierung der ES-Zellen verhindert. Hierzu wurden ES-Zellen gezählt und jeweils 500 ES-Zellen/Loch in eine gelatinisierte 24-Loch Zellkulturplatte überführt. Am nächsten Tag wurde das ES-Medium gewechselt und das neue LIF mit verschiedenen Verdünnungen zugegeben. Die Aufteilung der Verdünnungen auf der 24 Well-Platte sah wie folgt aus: 6 Löcher ohne LIF, 6 Löcher mit aktuell verwendetem LIF (erhalten von Dr. T. Magin) und 12 Löcher mit neuem LIF (Verdünnungen: 1:500, 1:1000, 1:2000). Nach 5-7 Tagen wurden die Zellen für 10 min mit Ethanol fixiert und mit Giemsa gefärbt. Es wurde die Konzentration gewählt, bei der die ES-Zellen gleiche Merkmale (hohe Zelldichte, undifferenzierter und kissenförmiger Wuchs) mit den ES-Zellen aufwiesen, die mit dem aktuell verwendeten LIF behandelt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Struktur und Funktion des BAT3 Proteins

Bei der Klonierung und Analyse der BAT3 cDNA durch J. Winkler (2003) wurde eine neue Transkriptionsvariante aus Raji-Zellen charakterisiert. Im Vergleich zu der von Banerji *et al.* (1990) publizierte Sequenz der BAT3-cDNA unterschied sich diese cDNA in ihrer Exonzusammensetzung: das 147 bp lange Exon 24 fehlt, und zusätzlich befindet sich zwischen Exon 11 und 12 ein weiteres 108 bp langes Exon, das als Exon 11b bezeichnet wurde. Desweiteren wurden putative Spleißvarianten mittels der PALS-Datenbank (PALSdb, Putative alternative splicing database, Huang *et al.*, 2002b) identifiziert (Winkler, 2003). Hierdurch konnten vier weitere putative Spleißvarianten im kodierenden Bereich von BAT3 ermittelt werden. Zu den oben genannten Spleißvarianten (Exon 11b, Exon 24) kommen noch weitere Spleißvarianten hinzu, in denen jeweils das Exon 5, Exon 11 oder Exon 22 fehlt. Das Leseraster wird in keiner dieser differenziellen Spleißereignisse verschoben. Angesichts der großen Anzahl der Spleißvarianten (rechnerisch sind 25 Spleißvarianten der BAT3 cDNA unter Berücksichtigung von fünf differenziell gespleißten Exons möglich) könnte BAT3 ein breites Spektrum von Funktionen ausüben. Unter den alternativ gespleißten Exons ist Exon 24 von besonderem Interesse, da sich hier eine BAG-Domäne befindet (Thress *et al.*, 2001). Die BAG-Domäne besteht aus drei α -Helizes. In dem uns vorliegenden BAT3 cDNA-Klon fehlt das Exon 24 und somit ein größerer Teil der BAG-Domäne (α 1- und α 2-Helix). Aufgrund der unvollständigen Sequenz der BAG-Domäne könnte deren Funktion eingeschränkt sein. Da die Funktion der putativen Spleißvarianten noch unbekannt ist, sollten BAT3 cDNA-Spleißvarianten kloniert werden, um diese in Vergleichsexperimenten zu charakterisieren.

3.2 Herstellung von BAT3-Spleißvarianten

Die Deletion der Exons 5, 11 und 11b wurde mit Hilfe der Fusions-PCR durchgeführt. Als Ausgangsvektor und somit als Matrize diente der Vektor pcDNA3.1-BAT3-V5, der freundlicherweise von Johannes Winkler zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Vektor beinhaltet eine Spleißvariante des BAT3-Gens. In dieser Variante ist das Exon 24 nicht

vorhanden, und am C-Terminus von BAT3 befindet sich ein V5-Epitop. Ausgehend von diesem Konstrukt wurden fünf verschiedene BAT3-Konstrukte hergestellt, die den oben beschriebenen Spleißvarianten entsprechen: BAT3 Δ Exon 5_{AS142-159}, BAT3 Δ Exon 11_{AS457-482}, BAT3 Δ Exon 11b_{AS483-518}, BAT3 Δ Exon 22_{AS999-1046} und BAT3+Exon 24_{AS1083-1132}. Abb. 3.1 zeigt exemplarisch die Deletion des Exons 11b aus dem BAT3-Gen mittels Fusions-PCR. Für die Fusions-PCR wurden zunächst zwei teilweise überlappende Abschnitte des BAT3-Gens in getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert (Abb. 3.1 A und Abb. 3.2). Das erste Teilprodukt wurde mit dem Primerpaar BAT3.766.F und BAT3Exon11.R amplifiziert. Der Vorwärts-Primer BAT3.766.F lagert sich stromabwärts von der ersten KpnI-Restriktionsschnittstelle an die cDNA an und der Rückwärts-Primer BAT3Exon11.R lagert sich am 3'-Ende von Exon 11 an. Für das zweite Teilstück wurden die Primer BAT3Exon11.12.F und BAT3.2630.R verwendet, wobei sich der Vorwärts-Primer BAT3Exon11.12.F stromaufwärts flankierend zum Exon 11b an die cDNA anlagert und der Rückwärts-Primer BAT3.2630.R stromaufwärts von der zweiten KpnI-Schnittstelle bindet. Die so generierten PCR-Produkte überlappen sich um 26 bp. Die Amplifikate wurden aufgereinigt und in äquimolaren Mengen in der Fusions-PCR mit den Primern BAT3.766.F und BAT3.2630.R eingesetzt. Die Teilprodukte hybridisierten mit ihren überlappenden Bereichen miteinander, so dass im neu amplifizierten Fragment kein Exon 11b mehr enthalten ist. Das so modifizierte Fragment wurde in einen pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Parallel hierzu wurde aus dem Ausgangsvektor pcDNA3.1-BAT3 mit dem Restriktionsenzym KpnI ein ca. 1,6 kb große Fragment, welches Exon 11b beinhaltet, aus dem Konstrukt entfernt (siehe Abb. 3.1 B). Das hergestellte Fusions-Produkt ohne Exon 11b wurde in den KpnI-geschnittenen und dephosphorylierten modifizierten pcDNA3.1-BAT3- Δ KpnI-Fragment-Vektor kloniert. Klone mit der gewünschten Deletion wurden durch Kolonie-PCR mit den Primern BAT3.766.F und BAT3.2630.R identifiziert, die sich jeweils stromaufwärts und stromabwärts vom deletierten Exon 11b anlagerten. Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch für die Deletion des Exons 11b die erzeugten Amplifikate: das amplifizierte 1889 bp große Fusions-Produkt, sowie die amplifizierten 1579 bp- und 310 bp-großen Teilprodukte nach Auftrennung auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel. Das neue 1,6 kb große KpnI-Insert wurde nach der Klonierung komplett sequenziert. Auf gleiche Weise wurden die Exons 5 und 11 deletiert (nicht dargestellt), wobei folgende Primer eingesetzt wurden: Δ Exon 5: BAT3.766.F, BAT3Ex5.1382.R, BAT3Ex5.1337.F und BAT3.2630.R; Δ Exon 11: BAT3.766.F, BAT3Ex11.2346.R, BAT3Ex11Fusion24.F und BAT3.2630.R. Die Teilfragmente für die Fusions-PCR hatten folgende Größe: Δ Exon 5: 616 bp und 1193 bp (Fusionsprodukt: 1809 bp); Δ Exon 11: 313 bp und 1658 bp (Fusionsprodukt: 1971 bp).

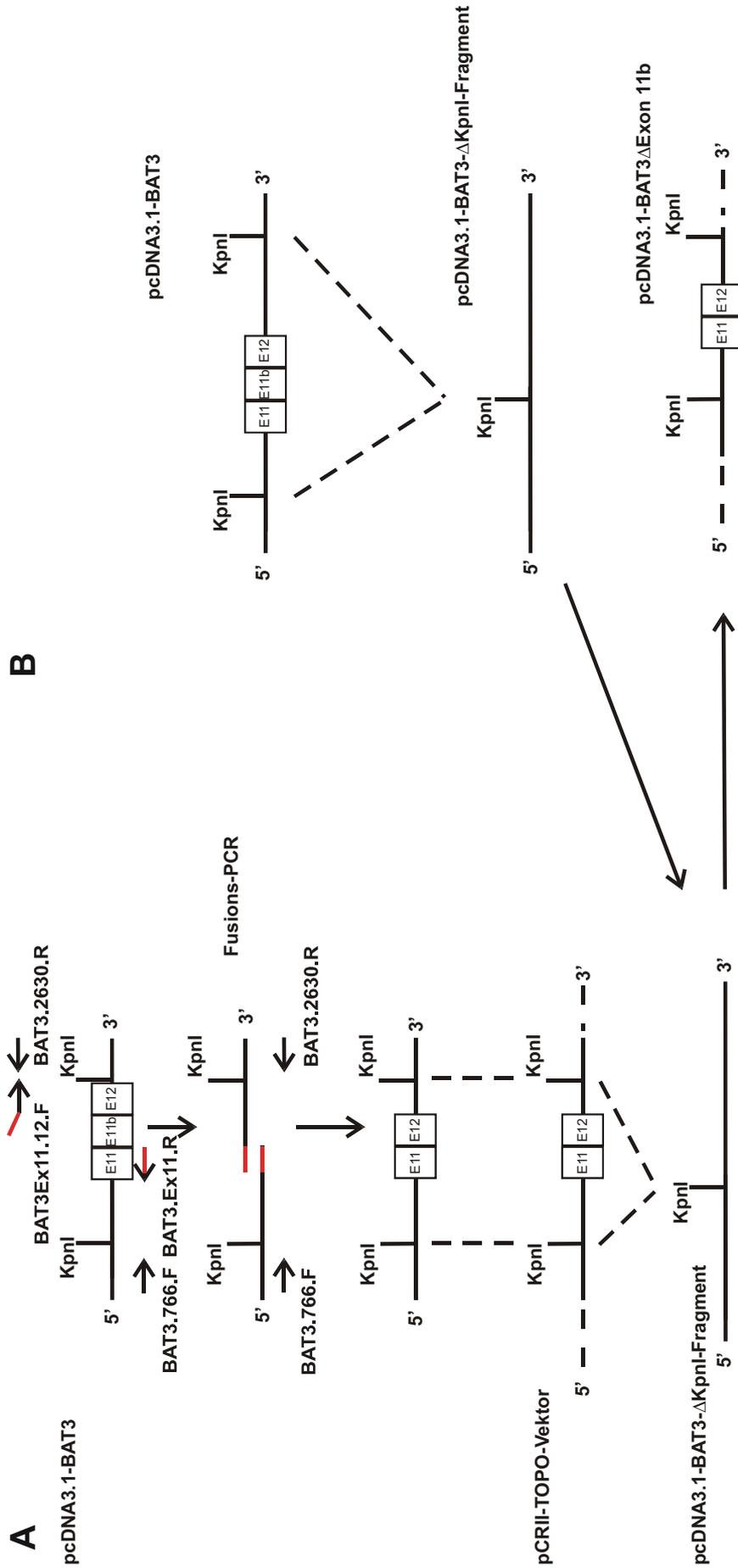


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Deletion des Exons 11b aus pcDNA3.1-BAT3 Vektor. (A) Mittels Fusions-PCR wurde das Exon 11b aus dem pcDNA3.1-BAT3 Vektor deletiert. Für das Teilprodukt 1 wurde der Primer BAT3.766.F, welcher sich vor der ersten KpnI-Schnittstelle anlagert, und der Primer BAT3.Ex11.R, der sich stromaufwärts von Exon 11b anlagert, verwendet. Das Teilprodukt 2 wurde mit den Primern BAT3Ex11b.12.F und BAT3.2630.R amplifiziert. BAT3Ex11.12.F lagert sich stromabwärts von Exon 11b an und ist komplementär zu dem Primer BAT3.Ex11.R. Primer BAT3.2630.R lagert sich stromabwärts der zweiten KpnI-Schnittstelle an die cDNA. In der nun folgenden Fusions-PCR wurden beide Teilprodukte eingesetzt und durch Zugabe der Primer BAT3.766.F und BAT3.2630.R nun die mutierte cDNA, ohne Exon 11b, amplifiziert. (B) Aus dem pcDNA3.1-BAT3-Vektor wurde das N-terminale 1,6 kb große KpnI-Fragment ausgeschnitten und der Vektor, ohne das KpnI-Fragment, ligiert (pcDNA3.1-BAT3ΔKpnI-Fragment). Aus dem pCRII-TOPO-Vektor wurde das modifizierte KpnI-Fragment über die KpnI-Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten und in den KpnI geschnittenen modifizierten pcDNA3.1-BAT3ΔKpnI-Fragment-Vektor kloniert.

Auch hier wurde das deletierte Fragment über KpnI-Schnittstellen kloniert. Klone mit korrekter Orientierung und den gewünschten Deletionen wurden durch Restriktionsverdau und Kolonie-PCR identifiziert und anschließend sequenziert.

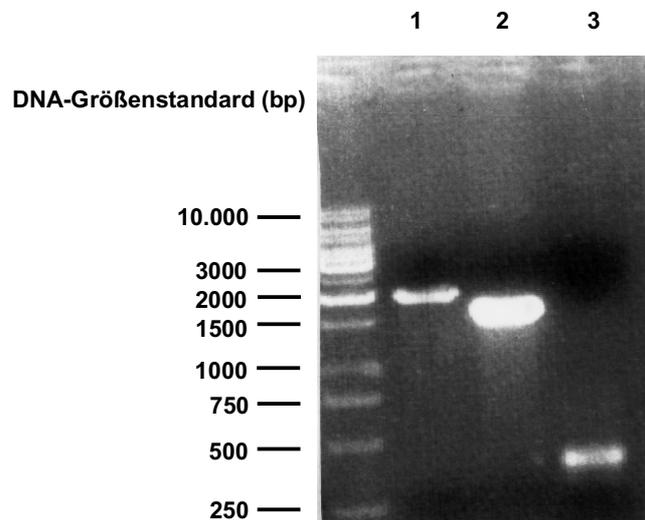


Abb. 3.2: Deletion des Exons 11b. Die PCR Produkte wurden in einem 1,5 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Die Abbildung zeigt eine Zusammenstellung der erhaltenen Amplifikate: Fusionsprodukt ohne Exon 11b (1889 bp), welches aus Teilprodukt 1 und 2 besteht und mit den Primern BAT3.766.F und BAT3.2630.R amplifiziert wurde (Spur 1); Teilprodukt 1 (1579 bp), welches mit den Primern BAT3.766.F und BAT3Exon11.R amplifiziert wurde (Spur 2). Teilprodukt 2 (310 bp) wurde mit den Primern BAT3Exon11b.12.F und BAT3.2630.R amplifiziert (Spur 3). Links befindet sich der DNA-Größenstandard.

Die richtige Orientierung des KpnI-Fragments wurde durch Restriktion mit HindIII überprüft, siehe Abb. 3.3.

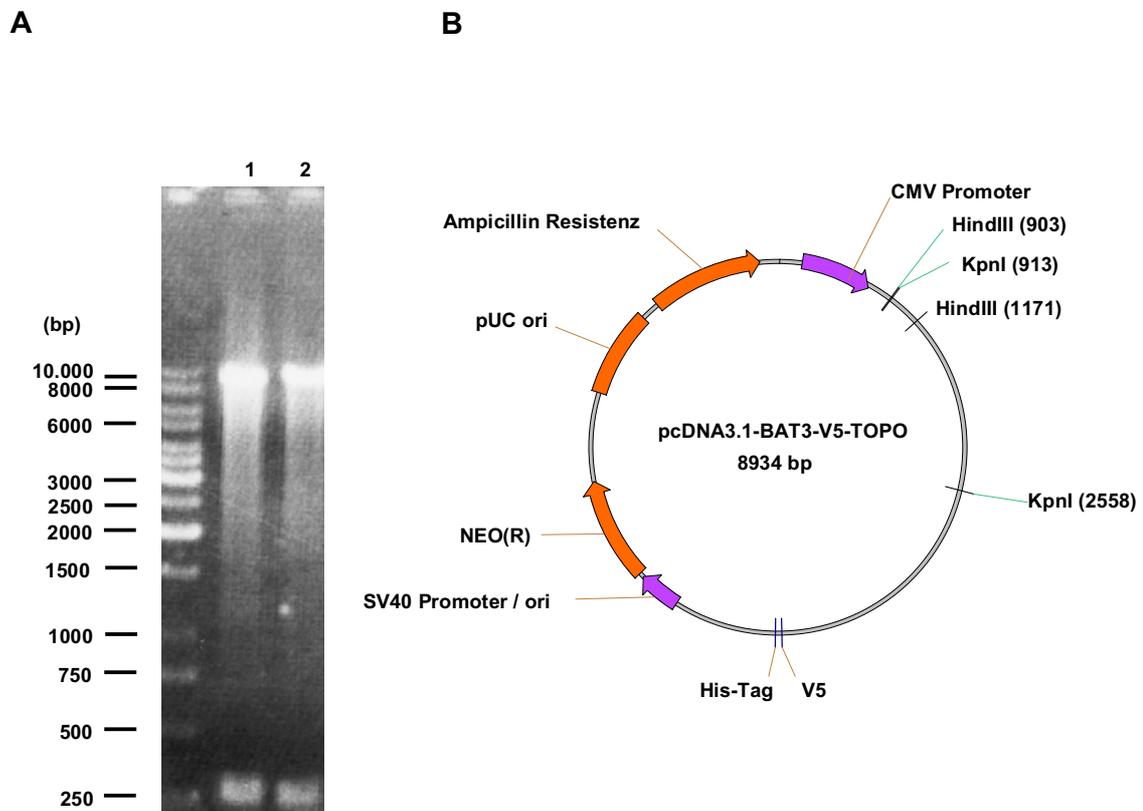


Abb. 3.3: Restriktionsanalyse der modifizierten pcDNA3.1-BAT3 Vektoren. Nachdem das KpnI-Fragment eingefügt wurde, musste überprüft werden, ob das KpnI-Fragment in korrekter Orientierung im Vektor vorliegt. (A) Hierzu wurden die pcDNA-BAT3- Δ Exon 5, $-\Delta$ Exon 11, $-\Delta$ Exon 11b, $-\Delta$ Exon 22 und +Exon 24 Vektoren mit der Restriktionsendonuklease HindIII für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und in einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Liegt das KpnI-Fragment in sense-Richtung, dann ergeben sich aufgrund der Lage der HindIII-Restriktionsschnittstellen Fragmentgrößen von 8666 und 268 bp. Befindet sich das KpnI-Fragment in antisense-Richtung, dann ergeben sich Fragmentlängen von 7547 und 1387 bp. In der Abbildung ist exemplarisch der Verdau von pcDNA3.1-BAT3 Δ Exon 5 (Spur 1) und $-\Delta$ Exon 11b (Spur 2) gezeigt. (B) Vektorkarte des pcDNA-BAT3-V5 Vektors, mit den Restriktionsschnittstellen von HindIII und KpnI.

Für die Deletion des Exons 22 und die Insertion des Exons 24 diente als Ausgangsvektor wieder der pcDNA3.1-BAT3-V5 Vektor. Beide Exons liegen in einer 3'-Region der BAT3-cDNA, die von Restriktionsschnittstellen für EcoRI und Eco47III flankiert wird. Über diese beiden Schnittstellen ist es möglich, beide Exons mit flankierenden Sequenzen auszuschneiden bzw. einzufügen. Allerdings liegt eine zweite Eco47III-Schnittstelle im 5'-Bereich der BAT3-cDNA, die vorher entfernt werden musste, um eine singuläre Eco47III-Schnittstelle in der 3'-Region zu erhalten. Die erste Eco47III-Schnittstelle wird von zwei

KpnI-Schnittstellen flankiert und konnte über diese Schnittstellen ausgeschnitten werden, so dass der Vektor eine singuläre Eco47III-Schnittstelle aufweist. Nach der Deletion von Exon 22 bzw. dem Einfügen von Exon 24 konnte das KpnI-Fragment mit der ersten Eco47III-Schnittstelle zurück in den pcDNA3.1-BAT3 Vektor kloniert werden. In Abb. 3.5 ist exemplarisch die Klonierung des zusätzlichen Exons 24 beschrieben, wobei die Arbeitsschritte A und C auch für die Deletion des Exon 22 verwendet wurden. Für die Deletion von Exon 22 wurden die Primer BAT3.2918.F, BAT3Ex22.3863.R, BAT3Ex22.4007.F und BAT3.4338.R verwendet. Das erste Teilprodukt für die Fusions-PCR wurde mit den Primern BAT3.2918.F (lagert sich in 5'-Richtung von der EcoRI-Schnittstelle in Exon 19 an) und den Rückwärts-Primer BAT3.3863.R (lagert sich in 3'-Richtung von Exon 22 an das 5'-Ende von Exon 21 an) amplifiziert. Für das zweite Teilfragment wurde der Primer BAT3Ex22.4007.F (lagert sich stromabwärts von Exon 22 an die 3'-Leserichtung von Exon 23 an) und der Primer BAT3.4338.R (lagert sich stromabwärts von der Eco47III-Schnittstelle in Exon 25 an) eingesetzt. Der Primer BAT3Ex22.4007.F ist am 5'-Ende komplementär zum BAT3.3863.R Primer. Die nach der PCR aufgereinigten Teilprodukte 1 (256 bp) und 2 (320 bp) wurden im Verhältnis 1:1 in der Fusions-PCR mit dem Primerpaar BAT3.2918.F/BAT3.4338.R eingesetzt. Das resultierende 576 bp große Fragment, in dem das Exon 22 deletiert ist, wurde in einen pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Die Rückklonierung des modifizierten Fragments (über die flankierenden EcoRI und Eco47III-Restriktionsschnittstellen) in den pcDNA3.1-BAT3 Vektor wird im folgenden Abschnitt anhand der Insertion von Exon 24 beschrieben.

Zu Beginn der Klonierung des Exons 24 in den pcDNA3.1-BAT3-Vektor sollte das Exon 24 zuerst aus Raji Zellen amplifiziert werden. Hierzu wurden in der RT-PCR die Primer BAT3.2918.F und BAT3.4328.R eingesetzt. Beide Primer flankieren ein 784 bp großes Fragment, welches die Exons 19 bis 25 sowie die Restriktionsschnittstellen EcoRI und Eco47III einschließt. Da es BAT3-Spleißvarianten mit und ohne Exon 24 gibt, sollten nach der RT-PCR zwei unterschiedlich große Amplikons entstehen. Es konnten zwei unterschiedlich große Fragmente detektiert werden. Ein kleineres Fragment (637 bp, ohne Exon 24) wurde mit einer hohen Ausbeute detektiert und ein größeres Fragment (784 bp), welches das Exon 24 (147 bp) beinhaltet, wurde mit einer sehr schwachen Ausbeute detektiert. Das größere der beiden Fragmente wurde nach gel-elektrophoretischer Trennung aus dem Agarose-Gel eluiert, aufgereinigt und die Ausbeute auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel kontrolliert. Auch nach mehrmaligen Versuchen gelang es nicht das größere Fragment mit dem Exon 24 zu klonieren, da die Ausbeute nach der Aufreinigung zu gering war. Daher

wurde das Exon 24 mit Hilfe der Fusions-PCR amplifiziert (siehe Abb. 3.4 und Abb. 3.5). Hierzu wurden zwei Teilfragmente, die jeweils die Hälfte des Exon 24 beinhalten, amplifiziert und in der Fusions-PCR vereinigt. Für das erste Teilfragment wurde der in 5'-Richtung gelegene Primer BAT3.2918.F und der Gegenprimer BAT3Ex24.4162.R verwendet, die ein Amplikon mit einer Größe von 574 bp definieren. Dieses Produkt beinhaltet die Hälfte der Sequenz von Exon 19 einschließlich der vorhandenen EcoRI-Schnittstelle, Exon 20 bis 23 und die 5'-Hälfte von Exon 24. Das zweite Teilfragment wurde mit dem Primerpaar BAT3Ex24.4141.F/BAT3.4328.R amplifiziert. Das 210 bp große Fragment beinhaltet die 3'-Hälfte von Exon 24 und die Sequenz von Exon 25 einschließlich der Eco47III-Schnittstelle. Die Primer BAT3Ex24.4141.F und BAT3Ex24.4162.R sind zueinander komplementär, so dass in der anschließenden Fusions-PCR beide Teilprodukte hybridisieren und unter Einsatz der Primer BAT3.2918.F und BAT3.4328.R ein 784 bp großes Fragment mit der kompletten Sequenz von Exon 24 amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und in einen pCRII-TOPO-Vektor kloniert

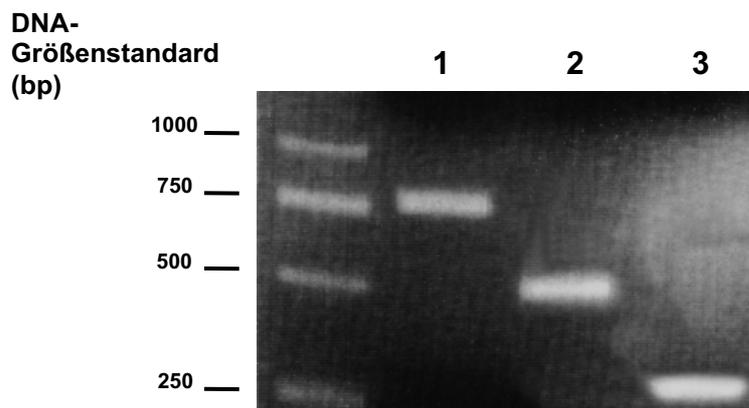


Abb. 3.4: Amplifizierung von Exon 24: Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt eine Zusammenstellung der erhaltenen Amplifikate: Fusionsprodukt (784 bp), welches aus Teilprodukt 1 und 2 besteht und mit den Primern BAT3.2918.F und BAT3.4328.R amplifiziert wurde (Spur 1); Teilprodukt 1 (574 bp), welches mit den Primern BAT3.2918.F und BAT3Ex24.4162.R amplifiziert wurde (Spur 2). Teilprodukt 2 (210 bp) wurde mit den Primern BAT3Ex24.4141.F und BAT3.4328.R amplifiziert (Spur 3). Links befindet sich der DNA-Größenstandard.

Um das so erhaltene EcoRI/Eco47III-Fragment in den pcDNA3.1-BAT3 Vektor zu klonieren, musste dieser aufgrund seiner zwei vorhandenen Eco47III-Schnittstellen modifiziert werden (siehe Abb. 3.5). Der Bereich mit der ersten Eco47III-Schnittstelle wurde über zwei vorhandene KpnI-Schnittstellen ausgeschnitten und der Vektor religiert. Das KpnI-Fragment wurde aufgereinigt. Der so erhaltene pcDNA3.1-BAT3 Δ Ex2-12 Vektor besitzt am 3'-Ende des klonierten Fragments eine singuläre Eco47III-Schnittstelle.

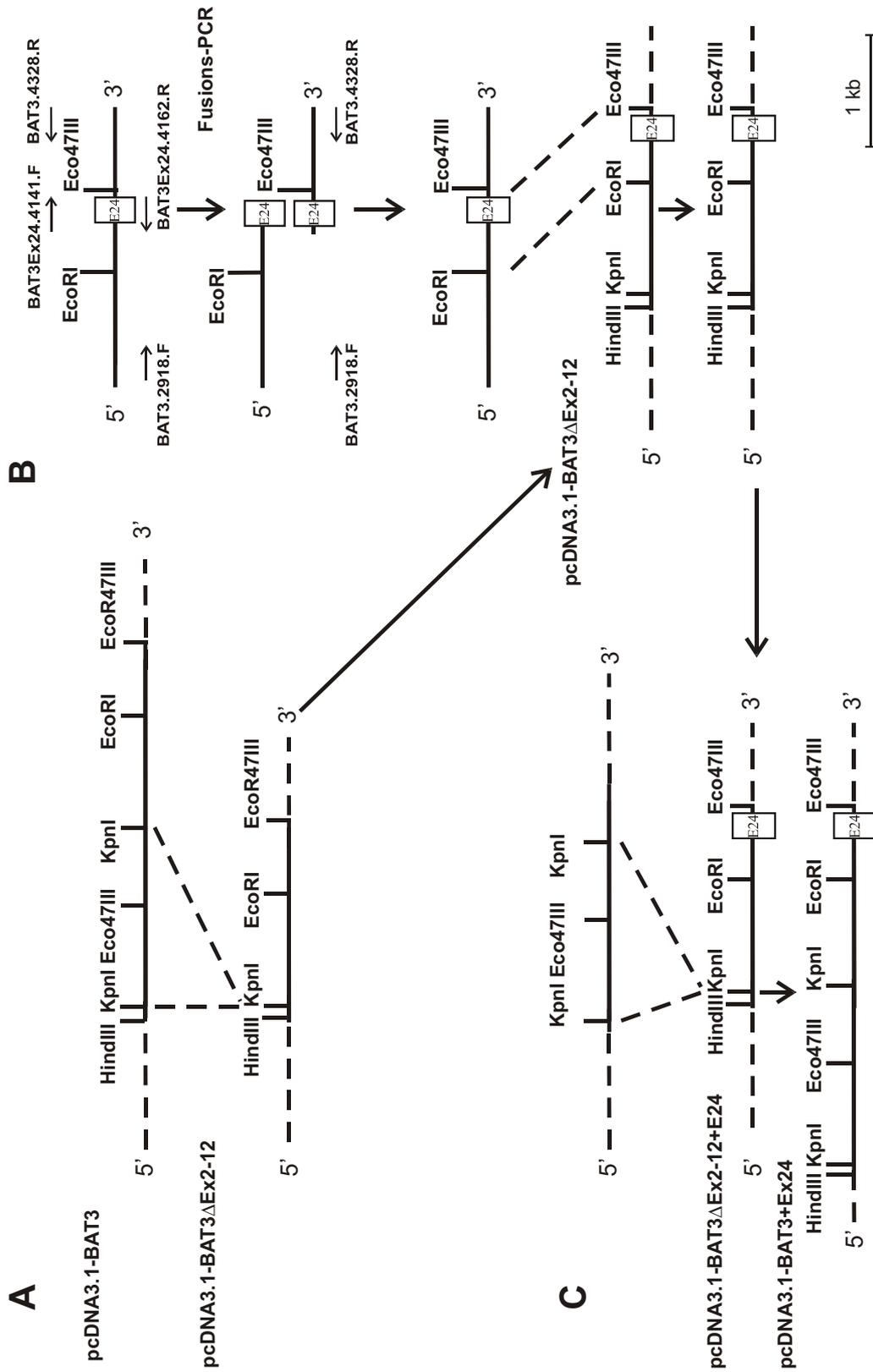


Abb. 3.5: Amplifizierung des Exons 24 und die Klonierung in den pcDNA3.1-BAT3-Vektor. (B) Das Exon 24 wurde mit Hilfe der Fusions-PCR amplifiziert, wobei Raji-RNA als Matrize diente. Mit den Primerpaaren BAT3.2918.F/BAT3Ex24.4162.R und BAT3.4328.R wurden die zwei Teilprodukte amplifiziert. In der folgenden Fusions-PCR wurden beide PCR Produkte eingesetzt, sowie die Primer BAT3.2918.F und BAT3.4328.R. Das Amplicon, welches Exon 24 beinhaltet, sowie von den Restriktionsschnittstellen EcoRI und Eco47III flankiert wird, wurde in einen pCRII-TOPO-Vektor kloniert. (A) Da der pcDNA3.1-BAT3-Vektor zwei Eco47III Restriktionsschnittstellen aufweist, wurde die erste 5'-liegende Eco47III-Schnittstelle über zwei KpnI-Schnittstellen deletiert. Anschließend wurde der KpnI-geschrittene Vektor ligiert (pcDNA3.1-BAT3 Δ Ex2-12). (C) Das fehlende KpnI-Fragment wurde nun wieder in den modifizierten pcDNA3.1-BAT3 Δ Ex2-12+Exon 24 zurück kloniert.

Anschließend wurde das mit EcoRI/Eco47III ausgeschnittene Fragment mit Exon 24 in den mit EcoRI und Eco47III geschnittenen pcDNA3.1-BAT3 Δ Ex2-12 kloniert. Abschließend wurde noch das zuvor am 5'-Ende entfernte KpnI-Fragment in den pcDNA3.1-BAT3 Δ Ex2-12+Ex24 Vektor zurückkloniert. Abb. 3.5 zeigt die Amplifizierung des Exon 24 und die Klonierung in den pcDNA3.1-BAT3-Vektor. Die Rückklonierung der oben genannten Deletion von Exon 22 erfolgte auf demselben Weg. Die Deletion bzw. die Insertion der Exons wurde mit Hilfe der Kolonie-PCR überprüft, und die neu eingefügten Fragmente wurden sequenziert.

Die korrekte Orientierung des KpnI-Fragments am 5'-Bereich wurde mit einem HindIII-Restriktionsendonukleaseverdau getestet (siehe exemplarisch Abb. 3.3).

Die so hergestellten BAT3-Spleißvarianten unterscheiden sich aufgrund der jeweiligen deletierten bzw. eingefügten Exons in ihrer Größe. In Abb. 3.6 sind die BAT3-Konstrukte dargestellt.

Die untenstehende Tabelle 3.1 zeigt die Größe der jeweiligen bearbeiteten Exons.

Exon	Größe Bp
Δ 5, 24	- 54, - 147
Δ 11, 24	- 78, - 147
Δ 11b, 24	- 108, - 147
Δ 22, 24	- 144, - 147
+ 24	+ 147

Tab. 3.1: Größe der deletierten und eingefügten Exons

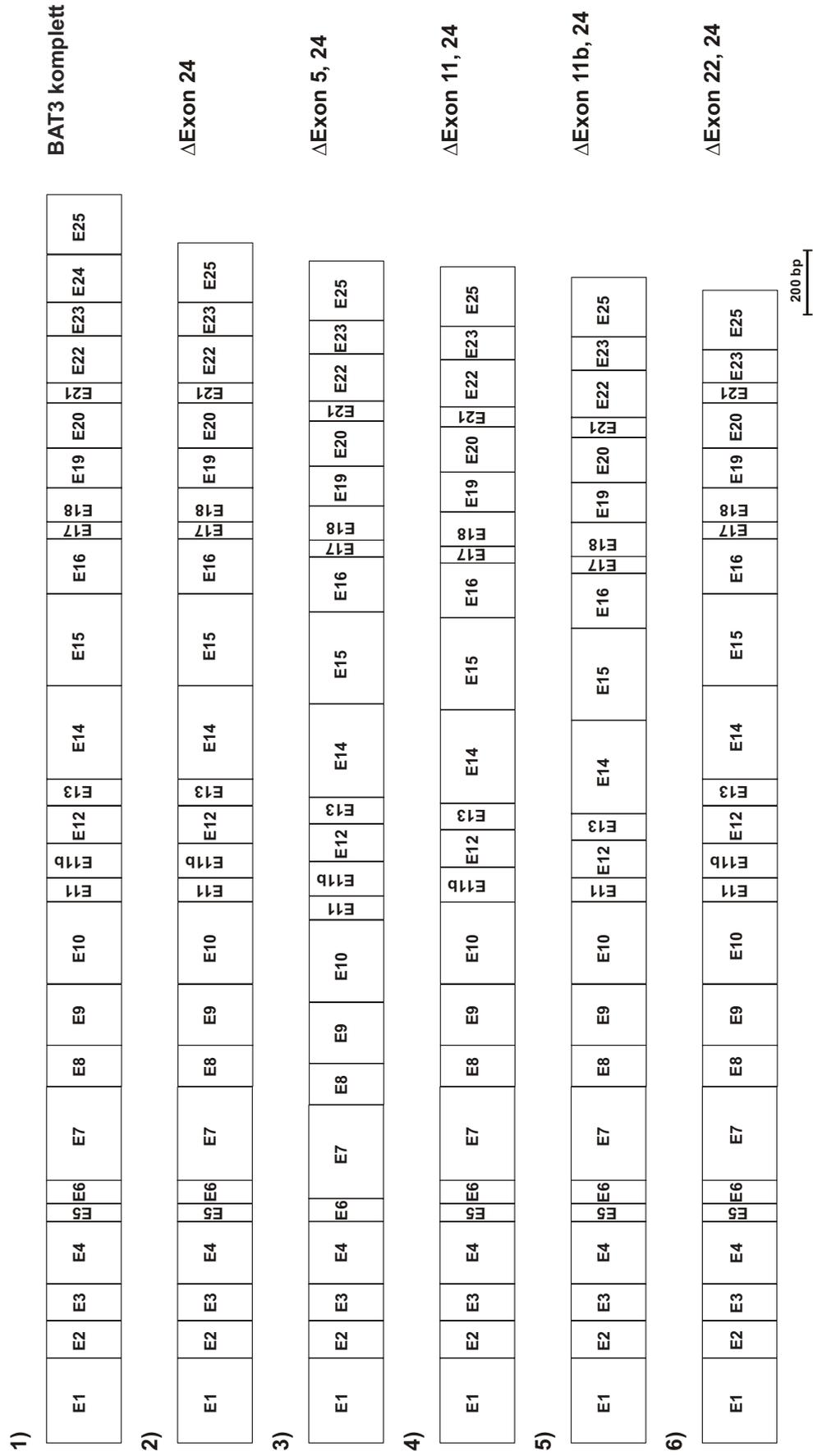


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der BAT3-cDNA Splicevarianten. Ausgehend von der klonierten BAT3-cDNA, in der das Exon 24 fehlt (BAT3ΔExon 24) wurden die BAT3-Splicevarianten mit Hilfe der Fusions-PCR hergestellt. Alle BAT3-cDNA-Splicevarianten wurden in den Vektor pcDNA3.1-V5-His-Topo kloniert. 1) BAT3-cDNA in der das Exon 24 inseriert wurde; 2) ausgehendes BAT3-Konstrukt, ohne Exon 24; 3) BAT3-cDNA mit der Deletion Exon 5; 4) BAT3-cDNA in der das Exon 11 deletiert wurde; 5) BAT3-cDNA in der das Exon 11b deletiert wurde und 6) BAT3-cDNA in der das Exon 22 deletiert wurde. Die Exons 1-25 wurden mit E1-25 gekennzeichnet.

3.3 Expression und Detektion der BAT3-Spleißvarianten

Nach der Fertigstellung der BAT3-Spleißvarianten wurde die jeweilige BAT3 cDNA mit V5-Epitop in COS-7-Zellen transient zur Expression gebracht. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Western Blot, hierzu wurden entsprechende NP-40-Lysate von transfizierten Zellen in einem 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die BAT3-Deletionskonstrukten wurden mit dem anti-V5-Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.7). Das apparente Molekulargewicht der verschiedenen BAT3-Varianten beträgt ca. 130 kDa.

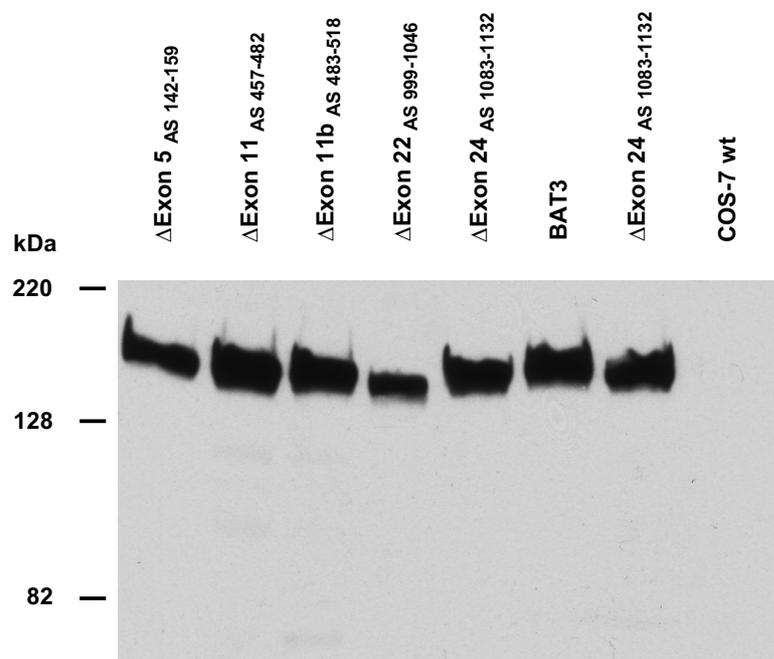


Abb. 3.7: Western Blot-Detektion von BAT3 Spleißvarianten in transfizierten COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden mit je 1 μ g der jeweiligen BAT3-cDNA transfiziert und nach 72 h mit NP-40 lysiert. Die Lysate wurden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die aufgetragenen Proben wurden mit Hilfe eines 7,5 % SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Antikörper anti-V5. Die Molekulargewichte der Größenstandards sind links in kDa angegeben. Das Molekulargewicht der BAT3 Spleißvarianten entspricht ca. 130 kDa.

3.4 Immunfluoreszenz von *BAT3*-Isoformen mit transient transfizierten Zellen

BAT3 ist ein nukleäres Protein. Manchen und Hubberstey (2001) haben anhand von BAT3-Deletionsmutanten und Sequenzanalysen herausgefunden, dass BAT3 ein zweiteiliges funktionelles Kernlokalisierungssignal (nuclear localization sequence, NLS) am C-Terminus besitzt, welches von Exon 23 kodiert wird. Alle hergestellten BAT3-Spleißvarianten besitzen ein komplettes Kernlokalisierungssignal. Aufgrund der fehlenden Exons könnte das Kernlokalisierungssignal eventuell aus sterischen Gründen unzugänglich sein. Daher sollte überprüft werden, ob die hergestellten BAT3-Spleißvarianten alle im Zellkern zu finden sind. COS-7-Zellen wurden für die Transfektion mit cDNA-Konstrukten der BAT3-Spleißvarianten auf Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden am zweiten Tag nach der Transfektion mit Paraformaldehyd fixiert. Die Präparate wurden mit DAPI (Kernfärbung, blau) und mit dem primären Antikörper anti-V5 und dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus Ig; Alexa Fluor 488 (Cy2, grün) gefärbt (Abb. 3.8). Alle der getesteten BAT3-Isoformen waren im Kern lokalisiert. Im Zytoplasma wurde kein BAT3 nachgewiesen.

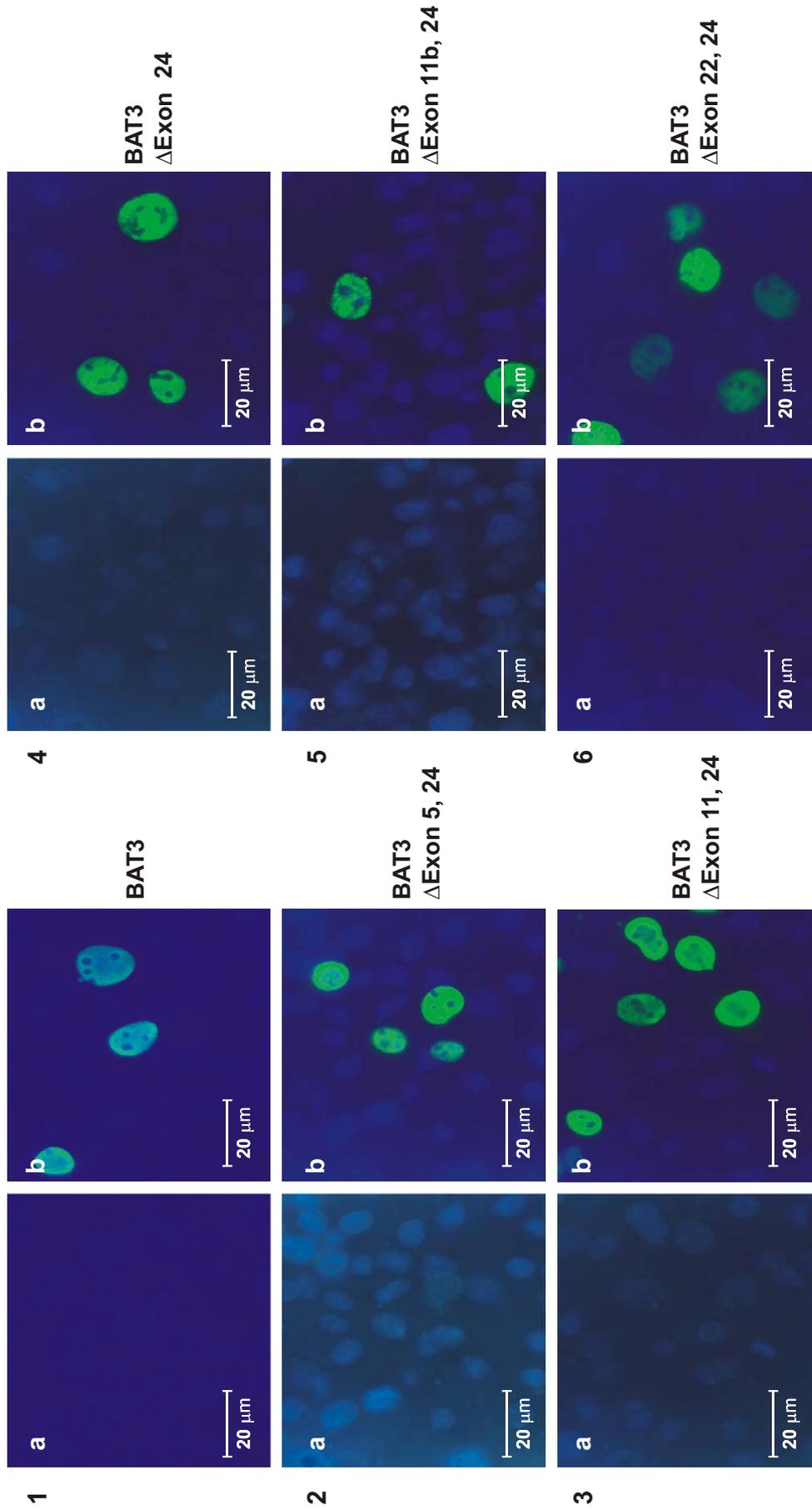


Abb. 3.8: Immunfluoreszenzfärbung von BAT3-Spleißformen: COS-7-Zellen wurden transient mit cDNAs von BAT3-Spleißvarianten transfiziert und mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die Präparate wurden mit a) DAPI (Kernfärbung, blau) und b) mit den Antikörpern anti-V5 und Ziege-anti-Maus Ig: Alexa Fluor 488 (Cy2, grün) inkubiert. Die Überlagerung der Färbungen ist in b) dargestellt. Bilder 1 a, b: Transfektion von BAT3; Bilder 2 a, b: Transfektion von BAT3 Δ Exon 5, 24; Bilder 3 a, b: Transfektion von BAT3 Δ Exon 11, 24; Bilder 4 a, b: Transfektion von BAT3 Δ Exon 24; Bilder 5 a, b: Transfektion von BAT3 Δ Exon 11b, 24; Bilder 6 a, b: Transfektion von BAT3 Δ Exon 22, 24. Die Bilder 1 a, b - 6 a, b entsprechen jeweils einer 63fachen Vergrößerung.

3.5 Funktion von BAT3 als Kochaperon bei der Proteindegradation des Glukokortikoidrezeptors (GR)

In diesen Versuch sollte untersucht werden, ob BAT3 einen Einfluss auf die CHIP-vermittelte Degradation des Glukokortikoidrezeptors besitzt. BAT3-Proteine besitzen wie BAG-1 eine aminoternale ubiquitinähnliche Domäne und eine carboxyterminale BAG-Domäne. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wird das BAT3-Protein auch als BAG-6 bezeichnet (Doong *et al.*, 2002). BAG-1 gehört zur BAG-Familie, die als Kochaperone charakterisiert worden sind (Takayama *et al.*, 1997). Demand *et al.* (2001) zeigen, dass BAG-1 und CHIP zusammen an den Hsc70/Hsp70-Komplex binden und dabei als Chaperon-Kofaktoren die Degradation des Substrats GR fördern. CHIP wirkt hierbei als E3-Ubiquitinligase und fördert die Degradation von GR. BAG-1 kann mit CHIP auch direkt interagieren und so die CHIP-vermittelte Degradation von GR fördern. Um den Einfluss von BAT3-Spleißvarianten auf die CHIP-vermittelte Degradation des Glukokortikoidrezeptors zu untersuchen, wurden COS-7-Zellen gleichzeitig mit GR, CHIP und BAT3-Spleißvarianten transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit RIPA/complete lysiert und von jeder Probe gleiche Mengen Protein für den Western Blot eingesetzt. Die Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper anti-V5 (gegen V5-BAT3), anti-Aktin, anti-GR und einem CHIP-Antiserum detektiert. Das Ergebnis in Abb. 3.9 A zeigt, dass CHIP alleine das GR-Protein (Spur 5), allerdings BAT3 bzw. BAT3 Δ Exon 24 alleine kein GR-Protein abbaut (Spur 3 und 4). Während die Koexpression von CHIP und BAT3 bzw. BAT3 Δ Exon 24 den Abbau von GR-Protein (Spur 6 und 7), gegenüber Zellen, die nur CHIP- und GR-Protein exprimieren (Spur 5), verstärkt. Abb. 3.10 A zeigt die Expressionsdaten nach Kotransfektion von COS-7-Zellen mit BAT3 Δ Exon 5- und BAT3 Δ Exon 11-cDNA mit GR- und CHIP-cDNA. Auch hier konnte nachgewiesen werden, dass in CHIP-exprimierenden Zellen in Anwesenheit von BAT3 Δ Exon 5 (Spur 5) und BAT3 Δ Exon 11b (Spur 6) gegenüber CHIP- und GR-Protein exprimierenden Zellen (Spur 4) verstärkt GR abgebaut wird. Abb. 3.11 A zeigt, dass die Koexpression von CHIP und BAT3 Δ Exon 11b bzw. BAT3 Δ Exon 22 zu einer stärkeren Reduzierung der GR-Menge führt (Spur 6 und 7), im Vergleich zur Expression von CHIP mit GR allein (Spur 5). Desweiteren wurde BAT2 getestet. Abb. 3.12 A zeigt, dass BAT2 keinen Einfluss auf die CHIP-induzierte Degradation des Glukokortikoidrezeptor besitzt. In Abb. 3.9- bis 3.12-B wurde die Menge von GR-Protein densitometrisch bestimmt und als relative Menge zu GR-alleine in einem Säulendiagramm dargestellt. Mit dem Aktin-Antikörper wurde überprüft, ob vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen wurden.

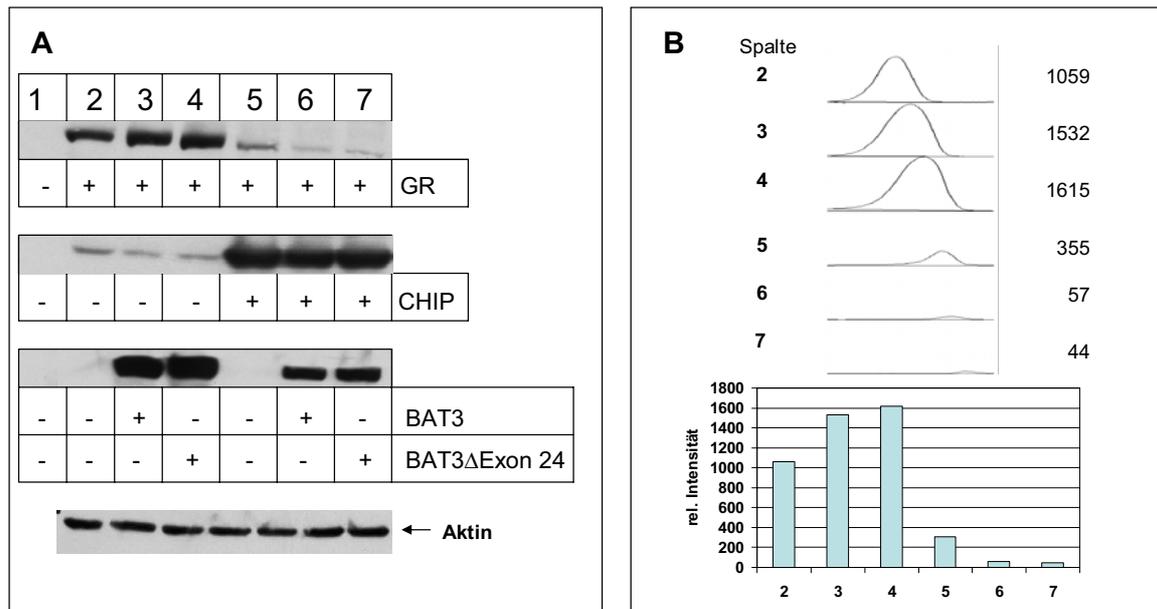


Abb. 3.9: Funktion von BAT3 und BAT3 Δ Exon 24 als Kochaperon bei der Proteindegradation des Glukokortikoidrezeptors (GR). (A) Degradation des Glukokortikoidrezeptors. BAT3, GR und CHIP, sowie BAT3 Δ Exon 24, GR und CHIP wurden transient in COS-7-Zellen kotransfiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass in jedem Experiment die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde. Nach 72 h wurde mit RIPA/complete lysiert und anschließend eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt. Es wurden vergleichbare Proteinmengen aufgetragen, mit Hilfe eines 7,5 %igen- bzw. 12 %igen-SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Detektion wurden die Antikörper anti-V5 (gegen V5-BAT3), anti-Aktin (gegen Aktin), anti-GR (gegen GR), sowie ein CHIP-Antiserum (gegen CHIP), verwendet. Spur 1: nicht transfizierte COS-7-Zellen; Spur 2: Transfektion GR; Spur 3: Doppeltransfektion von BAT3 und GR; Spur 4: Doppeltransfektion von BAT3 Δ Exon 24 und GR; Spur 5: Doppeltransfektion von GR und CHIP; Spur 6: Dreifachtransfektion von BAT3, GR und CHIP; Spur 7: Dreifachtransfektion von BAT3 Δ Exon 24, GR und CHIP. Die vergleichbaren Proteinmengen wurden im Western Blot zusätzlich noch mit Aktin überprüft (B) Die Menge von GR wurde densitometrisch bestimmt und als relative Menge zu GR alleine in einem Säulendiagramm dargestellt.

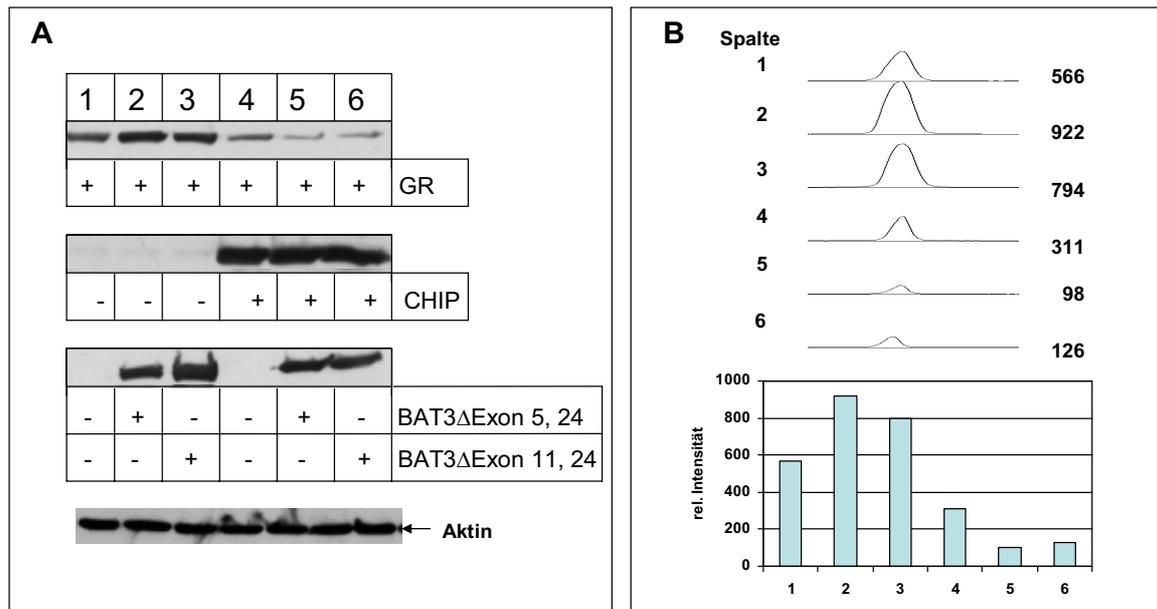


Abb. 3.10: Funktion von BAT3ΔExon 5 und BAT3ΔExon 11 als Kochaperon bei der Proteindegradation des Glukokortikoidrezeptors (GR). (A) Degradation des Glukokortikoidrezeptors BAT3ΔExon 5, GR und CHIP, sowie BAT3ΔExon 11, GR und CHIP wurden transient in COS-7-Zellen kotransfiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass in jedem Experiment die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde. Nach 72 h wurde mit RIPA/complete lysiert und anschließend eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt. Es wurden vergleichbare Proteinmengen aufgetragen, mit Hilfe eines 7,5 %igen- bzw. 12 %igen- SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Detektion wurden Antikörper anti-V5 (gegen V5-BAT3), anti-GR (gegen GR) und anti-Aktin (gegen Aktin), sowie ein CHIP-Antiserum (gegen CHIP) verwendet. Spur 1: GR Transfektion; Spur 2: Doppeltransfektion von BAT3ΔExon 5 und GR; Spur 3: Doppeltransfektion von BAT3ΔExon 11 und GR; Spur 4: Doppeltransfektion von GR und CHIP; Spur 5: Dreifachtransfektion von BAT3ΔExon 5, GR und CHIP; Spur 6: Dreifachtransfektion von BAT3ΔExon 11, GR und CHIP. Die vergleichbaren Proteinmengen wurden im Western Blot zusätzlich noch mit Aktin überprüft. (B) Die Menge von GR wurde densitometrisch bestimmt und als relative Menge in einem Säulendiagramm dargestellt.

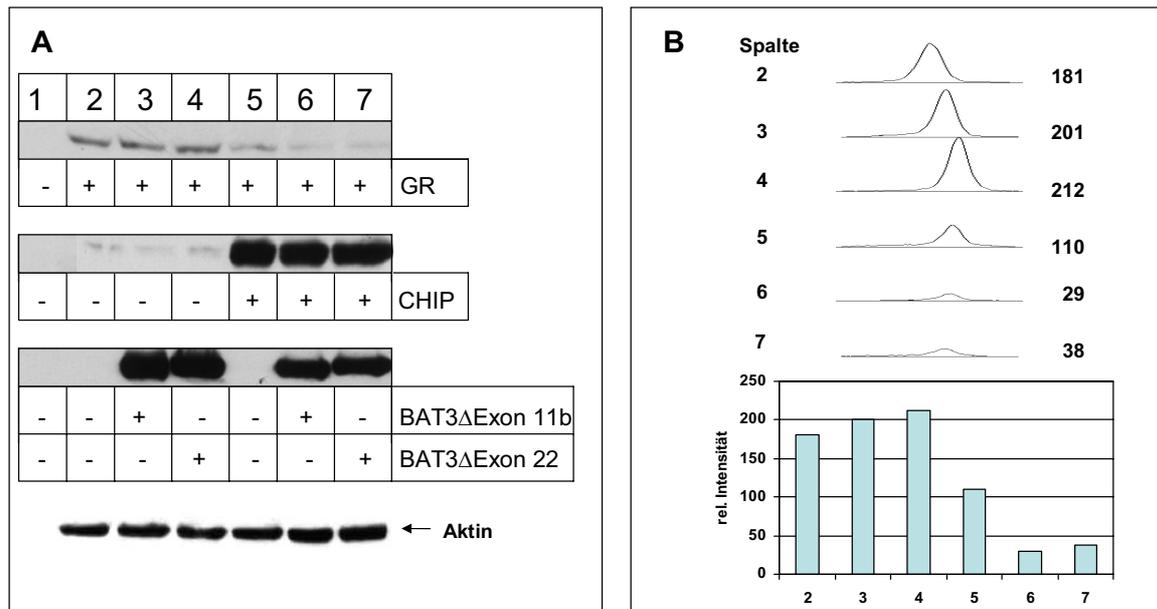


Abb. 3.11: Funktion von BAT3ΔExon 11b und BAT3ΔExon 22 als Kochaperon bei der Proteindegradation des Glukokortikoidrezeptors (GR). (A) Degradation des Glukokortikoidrezeptors. BAT3ΔExon 11b, GR und CHIP, sowie BAT3ΔExon22, GR und CHIP wurden transient in COS-7-Zellen kotransfiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass in jedem Experiment die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde. Nach 72 h wurde mit RIPA/complete lysiert und anschließend eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt. Es wurden vergleichbare Proteinmengen aufgetragen, mit Hilfe eines 7,5 %igen- bzw. 12 %igen- SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Detektion wurden die Antikörper anti-V5 (gegen V5-BAT3), anti-GR (gegen GR) und anti-Aktin (gegen Aktin), sowie ein CHIP-Antiserum (gegen CHIP) verwendet. Spur 1: GR Transfektion; Spur 2: Doppeltransfektion von BAT3ΔExon 11b und GR; Spur 3: Doppeltransfektion von BAT3ΔExon 22 und GR; Spur 4: Doppeltransfektion von GR und CHIP; Spur 5: Dreifachtransfektion von BAT3ΔExon 11b, GR und CHIP; Spur 6: Dreifachtransfektion von BAT3ΔExon 22, GR und CHIP. Die vergleichbaren Proteinmengen wurden im Western Blot zusätzlich noch mit Aktin überprüft. (B) Die Menge von GR wurde densitometrisch bestimmt und als relative Menge in einem Säulendiagramm dargestellt.

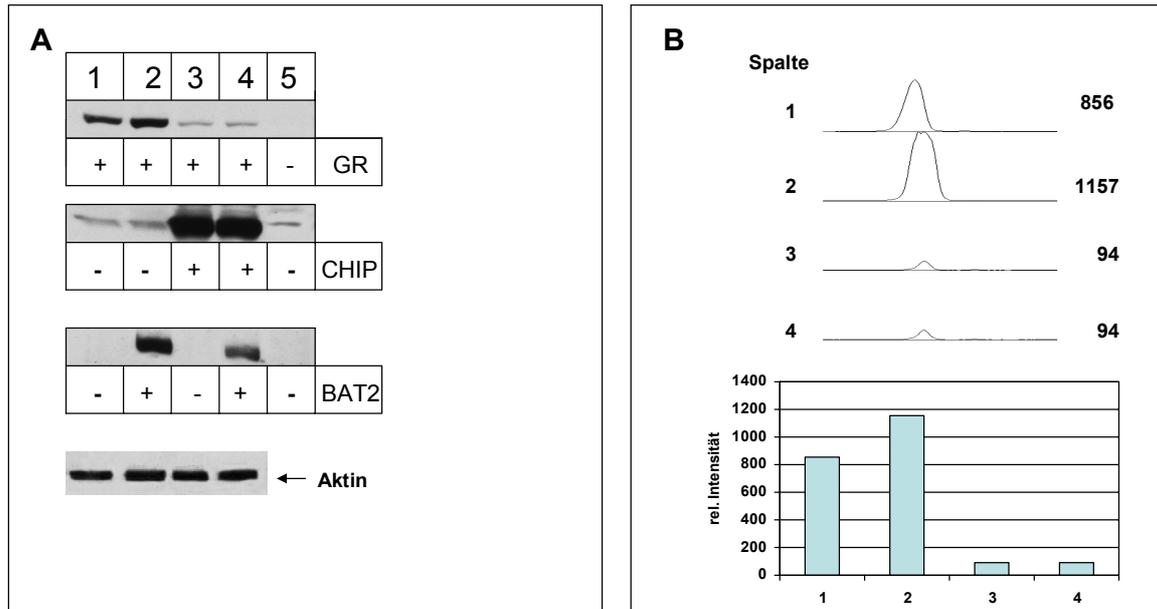


Abb. 3.12: Koexpression von BAT2 mit CHIP und dem Glukokortikoidrezeptor (GR). (A) Degradation des Glukokortikoidrezeptors. BAT2, GR und CHIP wurden transient in COS-7-Zellen kotransfiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass in jedem Experiment die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde. Nach 72 h wurde mit RIPA/complete lysiert und anschließend eine Konzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt. Es wurden äquivalente Mengen an Proteinen aufgetragen, mit Hilfe eines 7,5 %- bzw. 12 %igen- SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Detektion wurden die Antikörper In-1 (gegen In-1-BAT2), anti-GR (gegen GR), CHIP-Antiserum (gegen CHIP), sowie anti-Aktin (gegen Aktin) verwendet. Spur 1: GR Transfektion; Spur 2: Doppeltransfektion von BAT2 und GR; Spur 3: Doppeltransfektion von GR und CHIP; Spur 4: Dreifachtransfektion von GR, CHIP und BAT2; Spur 5: nicht transfizierte COS-7-Zellen. Die vergleichbaren Proteinmengen wurden im Western Blot mit Aktin überprüft. (B) Die Menge von GR wurde densitometrisch bestimmt und als relative Menge in einem Säulendiagramm dargestellt.

3.6 Herstellung von stabilen BAT3- und GR-exprimierenden CHO-Zelllinien

Die transiente Transfektion von Zellen hat oft den Nachteil, dass nur ein Teil der Zellen transfiziert wird, oder dass die Expression verschiedener Konstrukte nicht konstant ist. Um die GR-Degradationsversuche zu optimieren und eine konstante Expression zu gewährleisten, wurden CHO-Zellen stabil mit je BAT3+Exon 24 (Abb. 3.13), GR (Abb. 3.14) bzw. mit GR+BAT3 (Abb. 3.15) transfiziert. Diese Zelllinien stehen zur weiteren Analyse bereit.

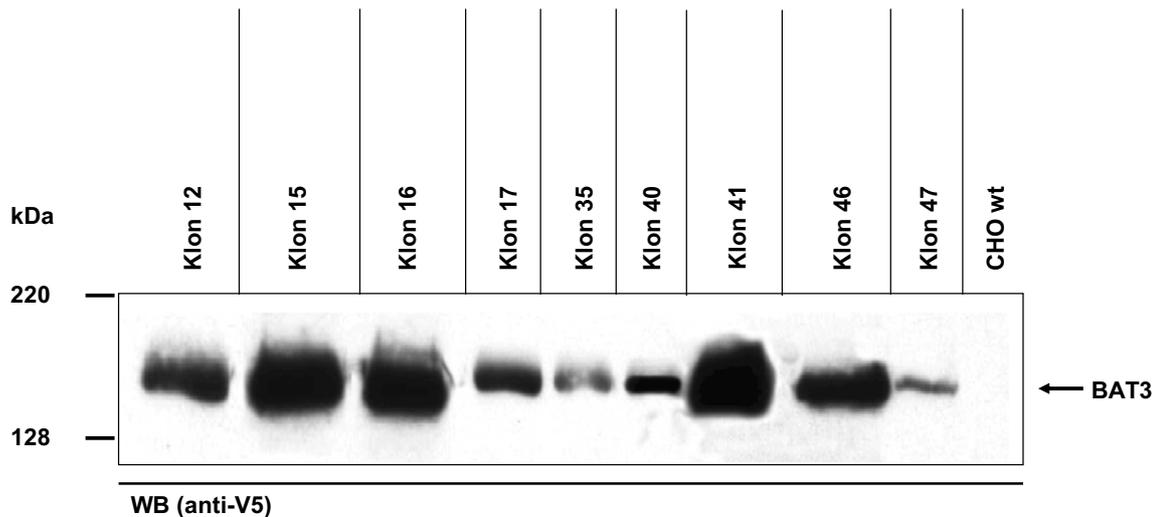


Abb. 3.13: Western Blot-Analyse von stabilen BAT3+Exon 24-exprimierenden CHO-Klonen. CHO-Zellen wurden mit Hilfe von Kalziumphosphat mit BAT3+Exon 24-cDNA und einem Leer-Vektor (Puromycin-Resistenz) transfiziert. Puromycin-resistente Zellklone wurden vermehrt und kultiviert. Zellklone wurden mit NP-40 lysiert, in reduzierendem Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 5 min inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Antikörper anti-V5. Das Molekulargewicht von BAT3 entspricht ca. 130 kDa. Die Molekulargewichte der Größenstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben.

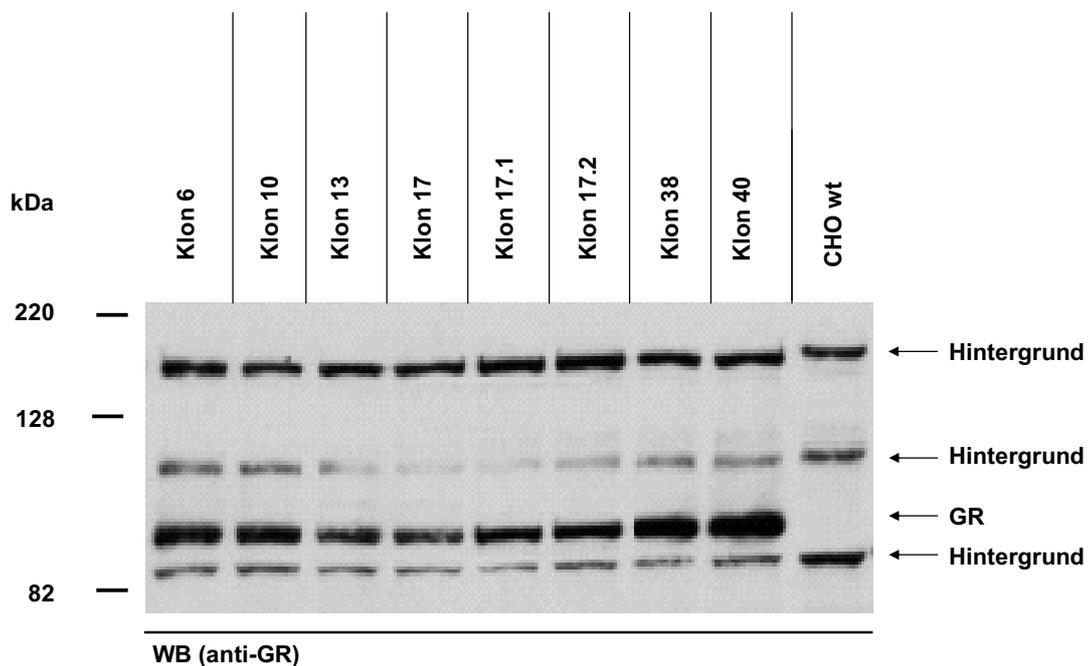


Abb. 3.14: Western Blot-Analyse der stabilen GR-exprimierenden CHO-Zelllinien. CHO-Zellen wurden mit Hilfe von Kalziumphosphat mit GR-cDNA und einem Leer-Vektor (Puromycin-Resistenz) transfiziert. Puromycin-resistente Zellklone wurden vermehrt und kultiviert. Zellklone wurden mit NP-40 lysiert, in reduzierendem Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 5 min inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem GR-Antiserum. Die Molekulargewichte der Größenstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben. Das Molekulargewicht von GR entspricht ca. 90 kDa. Rechts sind die Positionen von GR und den Hintergrundbanden mit Pfeilen markiert.

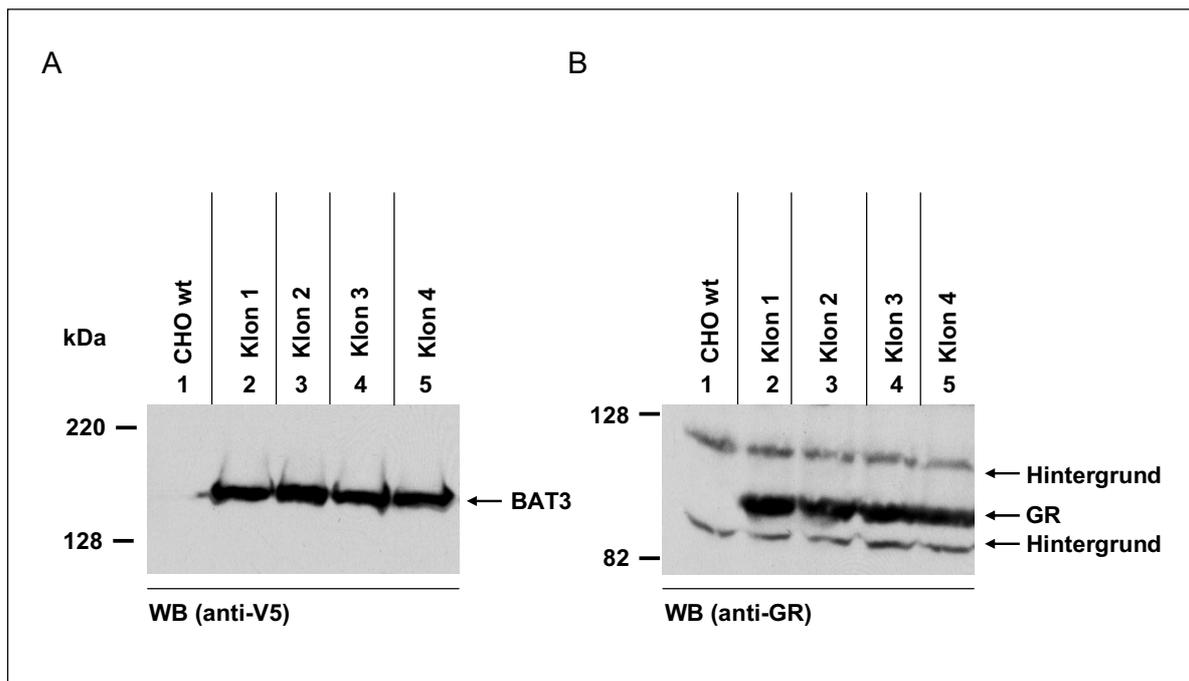


Abb. 3.15: Western Blot-Analyse der doppelstabilen GR- und BAT3-exprimierenden CHO-Zelllinien. GR stabile CHO-Zellen wurden mit Hilfe von Kalziumphosphat mit BAT3-cDNA und pcDNA6/V5-His-Vektor (Blasticidin-Resistenz) transfiziert. Blasticidin-resistente Zellklone wurden vermehrt und kultiviert. Zellklone wurden mit NP-40 lysiert, in reduzierendem Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 5 min inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Der Nachweis erfolgte mit den Antikörpern anti-V5 (gegen V5-BAT3) und anti-GR (gegen GR). In den Abbildungen A, B Spur 1 bis 5 wurden die gleichen Lysate aufgetragen. Die Molekulargewichte der Größenstandards sind jeweils links der Abbildung in kDa angegeben. Rechts sind die Positionen von BAT3, GR und Hintergrundbanden mit Pfeilen markiert.

3.7 Suche nach Interaktionspartnern von BAT3

3.7.1 Nachweis der Interaktion von BAT3-Isoformen mit CHIP und der Assoziation von BAT2 mit CHIP

Die Proteindegradationsversuche haben gezeigt, dass BAT3-Spleißvarianten einen Einfluss auf die Degradation des Glukokortikoidrezeptors haben können. Um eine mögliche Interaktion von BAT3-Isoformen mit CHIP nachzuweisen, wurde ein Koisolationsversuch durchgeführt. COS-7-Zellen wurden transient mit cDNAs von CHIP und den jeweiligen BAT3-Spleißvarianten transfiziert. Die Lyse erfolgte nach 72 h und im Anschluss wurden die Lysate jeweils zur Hälfte für eine Immunpräzipitation mit dem anti-V5 Antikörper (gegen das BAT3-Protein) und mit dem Antiserum gegen CHIP verwendet. Im Western Blot wurde die Assoziation von BAT3 mit CHIP in beiden Richtungen überprüft. Abb. 3.16 A zeigt, dass die BAT3-Isoformen erfolgreich in COS-7-Zellen exprimiert wurden (Spur 2, 5, 7, 9, 11 und 13) und außerdem eine Assoziation der BAT3-Isoformen über CHIP-Präzipitate möglich ist (Spur

1, 4, 6, 8, 10 und 12). In einem weiteren Western Blot (Abb. 3.16 B) konnte gezeigt werden, dass CHIP über die BAT3-Isoformen-Präzipitate koisoliert wurde (Spur: 1, 4, 6, 8, 10 und 12) und das CHIP-Protein in COS-7-Zellen exprimiert wird. Lysat von untransfizierten COS-7-Zellen diente als Kontrolle (A, B, Spur 3). Die Ergebnisse zeigen zusammen eine direkte Assoziation zwischen CHIP und BAT3-Isoformen. In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob BAT2 mit CHIP interagieren kann (Abb. 3.17). COS-7-Zellen wurden dazu transient mit BAT2- und CHIP-cDNA kotransfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert und die geteilten Lysate für Immunpräzipitationen gegen BAT2 (In-1-Antikörper) und CHIP (CHIP-Antiserum) eingesetzt. Beide Proteine konnten im Western Blot (Abb. 3.17, BAT2: A, Spur 3; CHIP: B, Spur 3) nachgewiesen werden. Eine Assoziation der beiden Proteine (A, B, Spur 2) war nicht nachweisbar.

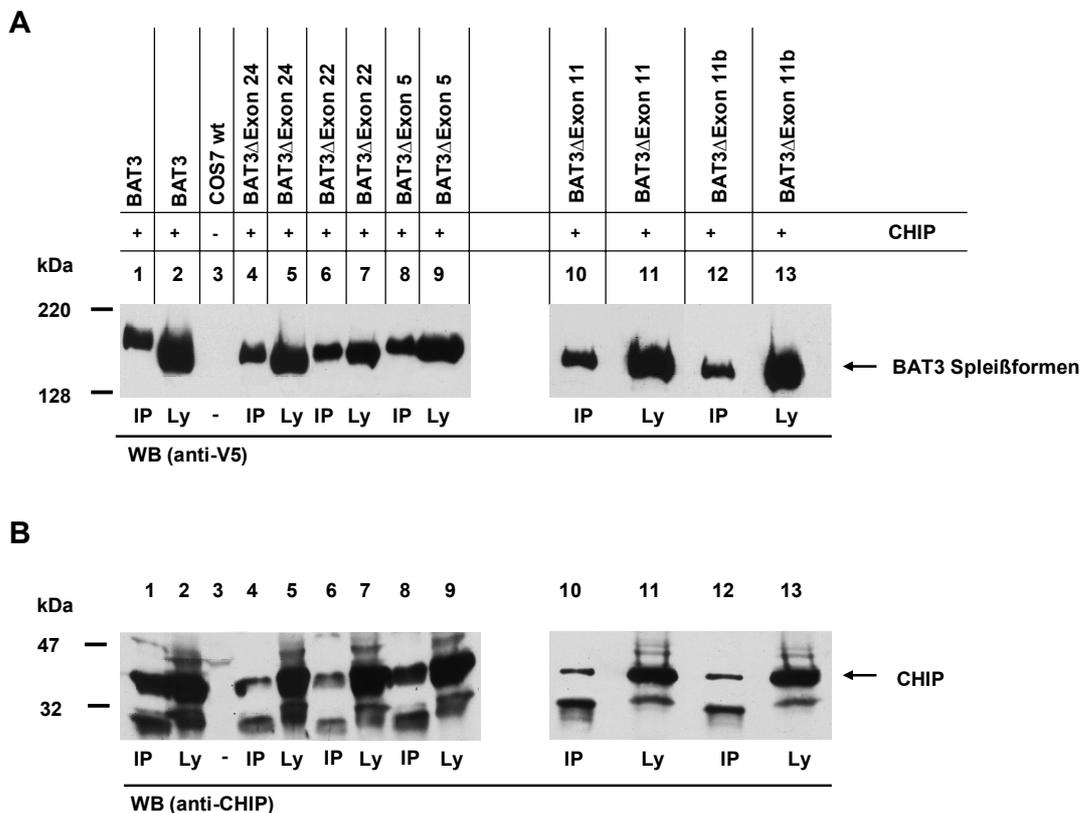


Abb. 3.16: Assoziation von BAT3-Isoformen mit CHIP. COS-7-Zellen wurden transient mit cDNAs von CHIP und BAT3-Spleißvarianten transfiziert. Nach 72 h wurden die Proben mit RIPA/complete lysiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit dem CHIP-Antiserum (gegen CHIP) und mit dem anti-V5 Antikörper (gegen BAT3) durchgeführt. Die Proben wurden in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die aufgetragenen Proben wurden mit Hilfe eines 7,5 %igen (A) und eines 12 %igen (B) SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach dem Transfer erfolgte im Western Blot die Detektion mit dem anti-V5 Antikörper (A) bzw. mit dem CHIP-Antiserum (B). Die Proben wurden folgendermaßen aufgetragen: A) Laufspur 1, 4, 6, 8, 10 und 12: BAT3-Isoformen wurden über CHIP-Präzipitate koisoliert; Laufspur 2, 5, 7, 9, 11 und 13: (Gesamt-)Lysat der transfizierten Zellen (Ly); Laufspur 3: Lysat untransfizierter COS-7-Zellen. B) Laufspur 1, 4, 6, 8, 10 und 12: CHIP wurde über BAT3-Isoformen koisoliert; Laufspur 2, 5, 7, 9, 11 und 13: (Gesamt-) Lysat der transfizierten Zellen (Ly); Laufspur 3: Lysat untransfizierter Zellen. Links sind die Größenstandards in kDa angegeben. Rechts sind die Positionen von BAT3 und CHIP mit Pfeilen markiert. Immunpräzipitationen wurden mit IP gekennzeichnet.

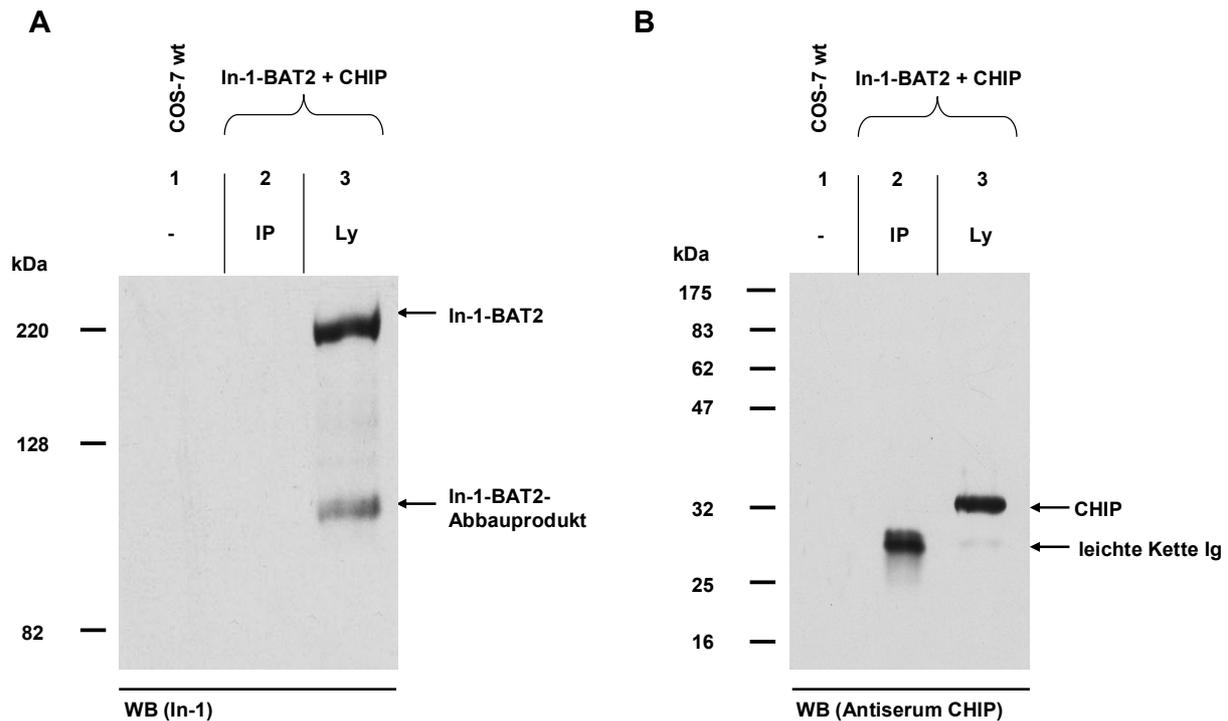


Abb. 3.17: Immunpräzipitation von BAT2 und CHIP. COS-7-Zellen wurden transient mit In-1-BAT2- und CHIP-cDNA transfiziert, nach 72 h mit NP-40 lysiert und eine Immunpräzipitation (A) mit CHIP-Antiserum gegen CHIP und (B) mit dem In-1-Antikörper gegen BAT2 durchgeführt. Die Proben wurden anschließend mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 5 min inkubiert. Die aufgetragenen Proben wurden mit Hilfe eines (A) 7,5 %igen- und (B) 12 %igen-SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte (A) mit dem monoklonalen Antikörper In-1 (gegen BAT2) und (B) mit dem CHIP-Antiserum (gegen CHIP). Die Proben wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen: nicht transfizierte COS-7-Zellen (Spur 1 A, B); Lysatkontrollen (Spur 3 A, B); Immunpräzipitation (A) gegen CHIP und (B) gegen BAT2 (Spur 2). Links sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. Rechts markieren Pfeile die Positionen der Proteine BAT2, CHIP, BAT2-Abbauprodukte und die leichte (L) Antikörperkette Ig. BAT2 hat ein Molekulargewicht von 220 kDa und CHIP hat ein Molekulargewicht von ca. 32 kDa.

3.7.2 Nachweis der Assoziation von BAT3-Isoformen mit GR

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es in Anwesenheit von BAT3-Spleißvarianten zu einer stärkeren Degradation des Glukokortikoidrezeptors kommt, wurde exemplarisch untersucht, ob BAT3 bzw. BAT3 Δ Exon 24 mit GR interagieren kann. Um die Interaktion von BAT3-Isoformen und GR zu untersuchen wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt (Abb. 3.18). COS-7-Zellen wurden mit den cDNAs von BAT3 und GR bzw. von BAT3 Δ Exon 24 und GR transfiziert. Die Immunpräzipitationen wurden mit einem anti-V5 Antikörper (gegen BAT3) und mit einem GR-Antiserum durchgeführt. Mit Hilfe eines 7,5 % SDS-Polyacrylamid-Gels wurden die Proteine aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und das kopräzipitierte BAT3 Δ Exon 24- (Spur 1) und BAT3-Protein (Spur 4) mit dem anti-V5-Antikörper nachgewiesen. Die Expression von BAT3 Δ Exon 24- und BAT3-

Proteinen in COS-7-Zellen wurde in den Spuren 2 und 5 detektiert. In den Spuren 7 und 9 wurde kein GR-Protein über BAT3- bzw. BAT3 Δ Exon 24-Präzipitate detektiert. Eine schwache Expression von GR ist in den Spuren 8 und 10 erkennbar. Die Assoziation von BAT3 Δ Exon 24 und BAT3 mit GR konnte nur in eine Richtung gezeigt werden.

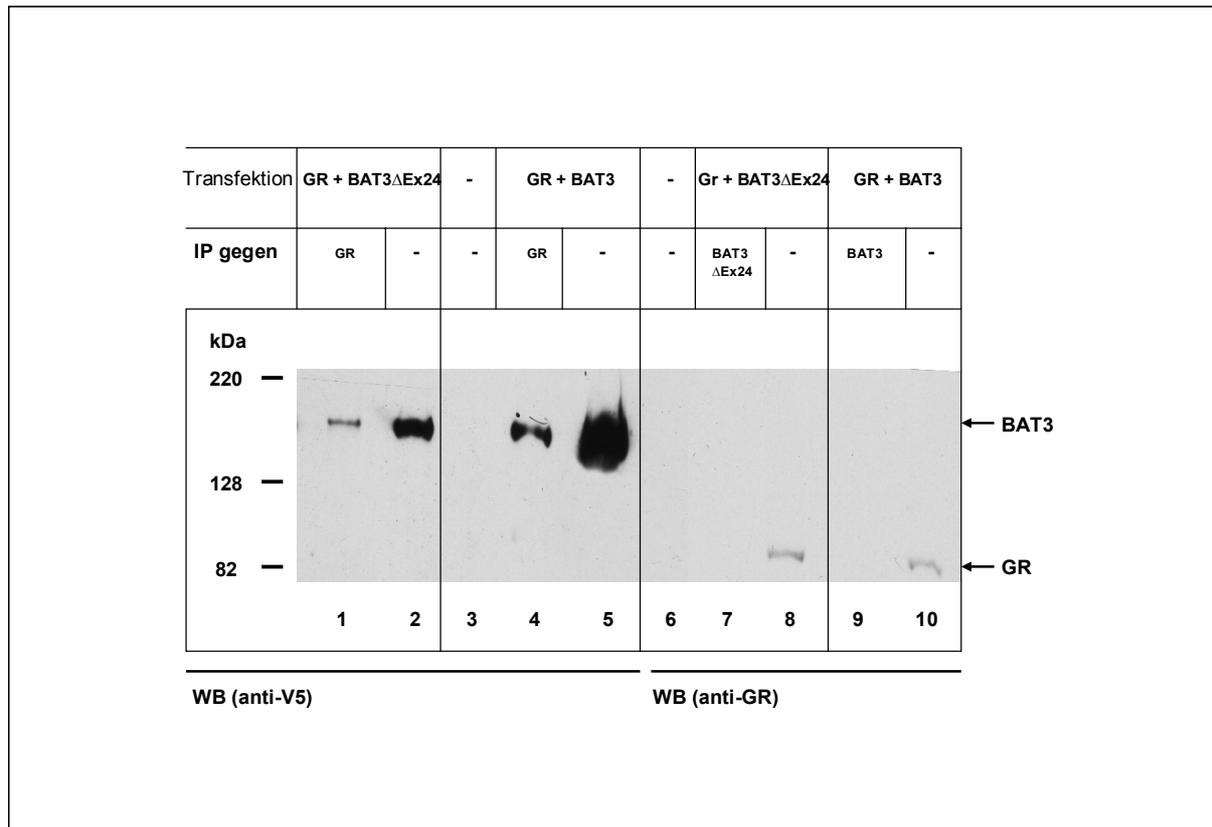


Abb. 3.18: Koisolierung von BAT3 Δ Exon 24 mit GR und BAT3 mit GR. COS-7-Zellen wurden transient mit GR + BAT3 Δ Exon 24 bzw. GR + BAT3 transfiziert und nach 72 h mit NP-40 lysiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit dem GR-Antiserum (gegen GR) und mit dem anti-V5 Antikörper (gegen BAT3) durchgeführt. Die Proben wurden in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurden sie mit Hilfe eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit anti-V5 Antikörper (gegen V5-BAT3) und mit anti-GR (gegen GR). Spur 1 und 4: Koisolation von BAT3 Δ Exon 24 und BAT3 über GR-Präzipitate; Spur 2 und 5: Lysatkontrollen der transfizierten Zellen; Spur 3 und 6: Lysat nicht-transfizierter COS-7-Zellen; Spur 7: Immunpräzipitation von BAT3 Δ Exon 24; Spur 9: Immunpräzipitation von BAT3; Spur 8 und 10: Lysatkontrollen der transfizierten COS-7-Zellen. Links sind die Größenstandards in kDa angegeben. Rechts sind die Positionen von BAT3, BAT3 Δ Exon 24 und GR mit Pfeilen markiert.

3.7.3 Assoziation von BAT3-Isoformen mit Hsp70

In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob BAT3 bzw. BAT3 Δ Exon 24 an Hsp70 binden kann. Hsp70-Proteine sind eine ubiquitär vorkommende Gruppe von molekularen Chaperonen. Diese Proteine sind für zahlreiche Funktionen in der Zelle verantwortlich, wie z.B. die Regulation der Hitzeschockantwort oder die korrekte Faltung von Proteinen in der Zelle. Die

Hsp70-Proteine besitzen ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Thress *et al.* (2001) konnten zeigen, dass Scythe, ein BAT3-Homolog aus *Xenopus*, an Hsp70-Proteine bindet und dadurch die Chaperon-vermittelte Proteinfaltung inhibieren kann. Reaper, welches in *Xenopus*-Oozyten Apoptose auslöst (Aktivierung von Caspasen und Cytochrom C-Freisetzung), kann die Aktivität von Scythe inhibieren. Es wird ein Modell vorgeschlagen, in dem Scythe und ein hypothetischer proapoptotischer BAT3 Ligand an Hsp70 binden kann (Thress *et al.*, 2001). Scythe bindet dabei an die ATPase Domäne von Hsp70 (BAG-1 bindet an die gleiche Domäne), und der postulierte Ligand bindet an die substratbindende Domäne von Hsp70. Durch den Einsatz von Reaper könnte das Protein Scythe von Hsp70 verdrängt werden und somit den hypothetischen/postulierten Liganden in seiner nativen Form freigeben. Dadurch wird die mitochondriale Cytochrom-C Ausschüttung und die Caspase Aktivität hochreguliert. Scythe könnte so eine regulierende Rolle bei der Apoptose spielen. Da Scythe auf Aminosäureebene zu 57 % homolog zum humanen BAT3 ist (Thress *et al.*, 1998), liegt die Vermutung nahe, dass BAT3 eine ähnliche Funktion wie Scythe in diesem Modell ausübt.

COS-7-Zellen wurden entweder mit BAT3 oder BAT3 Δ Exon 24 transfiziert, wobei COS-7-Zellen endogenes Hsp70 besitzen. Nach 72 h wurden die Proben lysiert und die Proteine BAT3 (mit dem monoklonalen anti-V5 Antikörper) und Hsp70 (mit dem monoklonalen Hsp70 Antikörper) präzipitiert. Im Western Blot (Abb. 3.19) wurden zur Detektion der Proteine die Antikörper anti-V5 (gegen BAT3) und der anti-Hsp70 Antikörper verwendet. In den Spuren 1 und 10 wurden Lysate untransfizierter COS-7-Zellen aufgetragen. Dabei konnte BAT3 (Spur 3), BAT3 Δ Exon 24 (Spur 5) und Hsp70 (Spur 7 und 9) in den Lysaten detektiert werden. In der Immunpräzipitation gegen Hsp70 konnte kein BAT3/BAT3 Δ Exon 24 (Spur 2, 4) und in der Immunpräzipitation gegen BAT3 und BAT3 Δ Exon 24 konnte kein Hsp70 (Spur 6, 8) nachgewiesen werden. Es konnte also keine Assoziation zwischen BAT3 und Hsp70 bzw. BAT3 Δ Exon 24 und Hsp70 gezeigt werden.

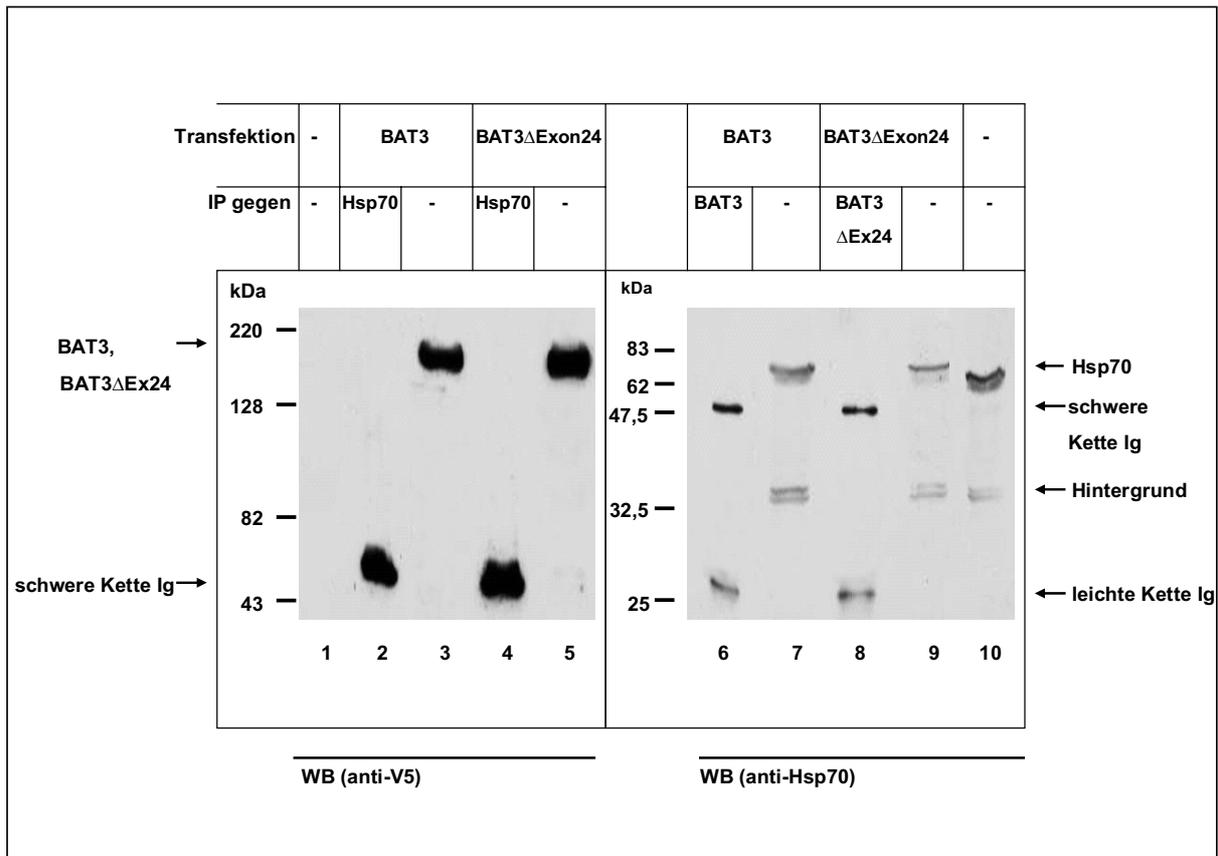


Abb. 3.19: (Ko-) Immunpräzipitation von V5-BAT3 mit Hsp70 und V5-BAT3 Δ Exon24 mit Hsp70. COS-7-Zellen wurden transient mit BAT3 und BAT3 Δ Exon 24 transfiziert und nach 72 h mit NP-40 lysiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper Hsp70 (gegen Hsp70) und mit dem anti-V5 Antikörper (gegen BAT3) durchgeführt. Die Proben wurden in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die aufgetragenen Proben wurden mit Hilfe eines 7,5 %igen- und 12-%igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit anti-V5 Antikörper (gegen V5-BAT3) und mit dem anti-Hsp70 Antikörper (gegen Hsp70). Die Proben wurden wie folgt aufgetragen: Spur 2 und 4: Immunpräzipitation gegen Hsp70; Spur 3 und 5: Lysatkontrollen der transfizierten Zellen; Spur 1 und 10: Lysat nicht-transfizierter COS-7-Zellen; Spur 6: Immunpräzipitation gegen BAT3; Spur 8: Immunpräzipitation gegen BAT3 Δ Exon 24; Spur 7 und 9: Lysatkontrollen der transfizierten COS-7-Zellen. Auf der linken Seite sind die Größenstandards in kDa angegeben. Links und rechts sind die Positionen von BAT3, BAT3 Δ Exon 24, Hsp70, Hintergrundbanden, sowie die leichte und schwere Antikörperkette (Ig) mit Pfeilen markiert.

3.7.4 Assoziation von Smac mit BAT3-Isoformen

Scythe und BAT3 kodieren jeweils ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa und beide besitzen eine Ubiquitin-domäne im N-terminalen Bereich. Desweiteren sind beide Gene sehr prolinreich (Banerji *et al.*, 1990). In Interaktionsversuchen wurde gezeigt, dass das *Drosophila*-Protein Reaper (rpr) mit Scythe aus *Xenopus* interagiert (Thress *et al.*, 1998). Reaper, ein Protein mit 65 Aminosäuren wurde durch die Suche nach apoptotischen Regulatoren in *Drosophila melanogaster* identifiziert. Reaper ist ein wichtiger Mediator in der Apoptose im Verlauf der Embryonalentwicklung und nach DNA-Schädigung (White *et al.*,

1994, 1996). Reaper bindet an Inhibitoren der Apoptose (IAPs = Inhibitor of apoptosis proteins) und fördert so die Aktivierung von proapoptotischen Caspasen (Goyal *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Die Expression von Reaper kann auch in Säugetierzellen Apoptose auslösen (Goyal *et al.*, 2000; McCarthy und Dixit, 1998). Bisher wurde in Säugerzellen kein sequenzhomologes Protein zu Reaper identifiziert. In Säugetieren findet man mit Smac bzw. mit dem Mausortholog Diablo ein Protein mit einer analogen Funktion zu Reaper (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Um eine mögliche Interaktion von Smac mit BAT3 zu testen, wurden vor der Immunpräzipitation die Expression und der Nachweis des Smac-myc-Konstruktes in COS-7-Zellen etabliert (Abb. 3.20). Hierzu wurde das Smac-myc-his Konstrukt transient in unterschiedlichen Mengen in COS-7-Zellen transfiziert.

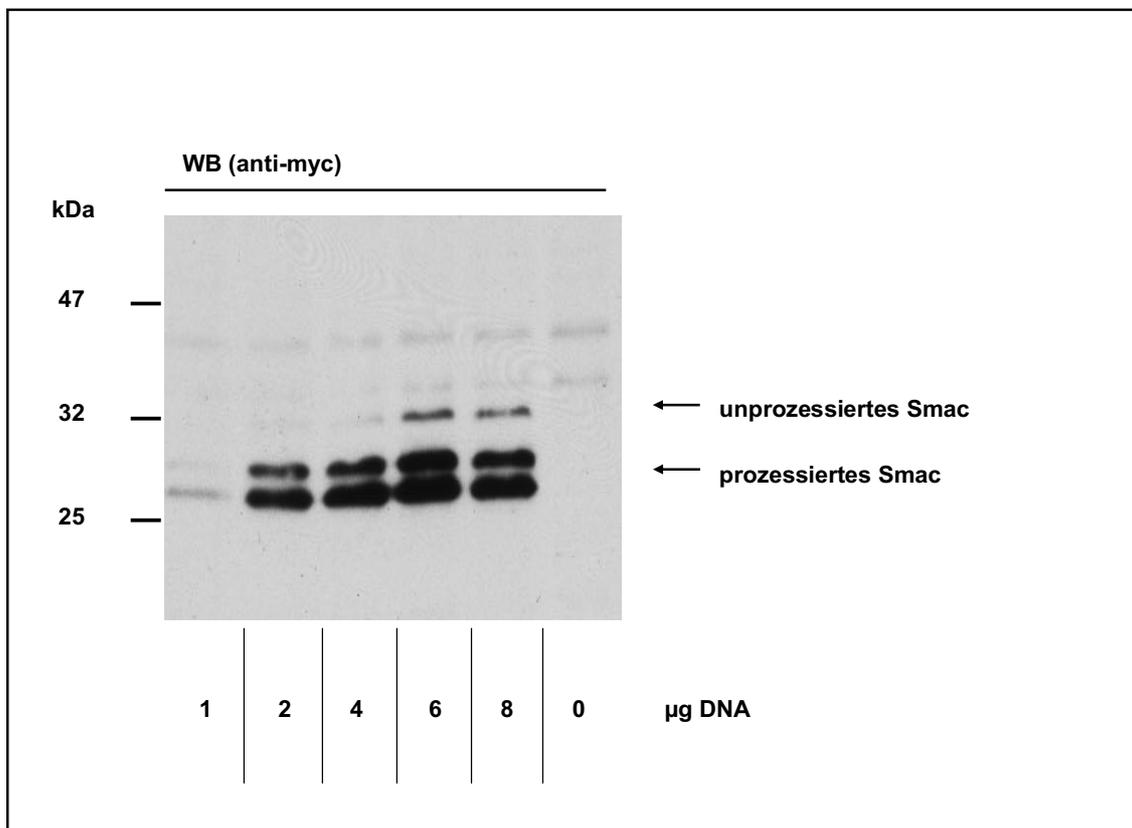


Abb. 3.20: Expression von Smac-myc-his in COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden transient mit je 1, 2, 4, 6 und 8 µg Smac-myc-his cDNA transfiziert und nach 72 h mit NP-40 lysiert. Die Lysate wurden mit Hilfe eines 7,5 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper anti-myc. Smac-myc-his konnte mit anti-myc im Westernblot nachgewiesen werden. Es wurden drei Banden detektiert: eine Bande von 31 kDa, was dem Molekulargewicht von unprozessiertem Smac entspricht und eine Doppelbande bei 26 kDa, was dem Molekulargewicht der prozessierten Form von Smac entspricht. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. Rechts markieren Pfeile die Position der entsprechenden Proteine von Smac.

Mit dem monoklonalen anti-myc Antikörper konnte die Expression von Smac nachgewiesen werden. Es wurden drei Banden detektiert. Eine Bande bei ca. 31 kDa entspricht dem Molekulargewicht von unprozessiertem Smac und eine Doppelbande wurde bei ca. 26-28 kDa detektiert, welches dem Molekulargewicht von prozessiertem Smac entspricht.

Für den möglichen Nachweis der Interaktion von BAT3-Isoformen und Smac wurden COS-7-Zellen mit den jeweiligen cDNA-Konstrukten transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden nach 72 h lysiert, und ein Teil der Lysate für eine Immunpräzipitation gegen Smac (anti-myc) bzw. BAT3 (anti-V5) eingesetzt. Die Immunpräzipitationen, Lysate aus BAT3 und CHIP transfizierten Zellen und Lysate aus untransfizierten Zellen wurden auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. In Abb. 3.21 ist exemplarisch die Auswertung von BAT3 (Vollängenkonstrukt) mit Smac beschrieben.

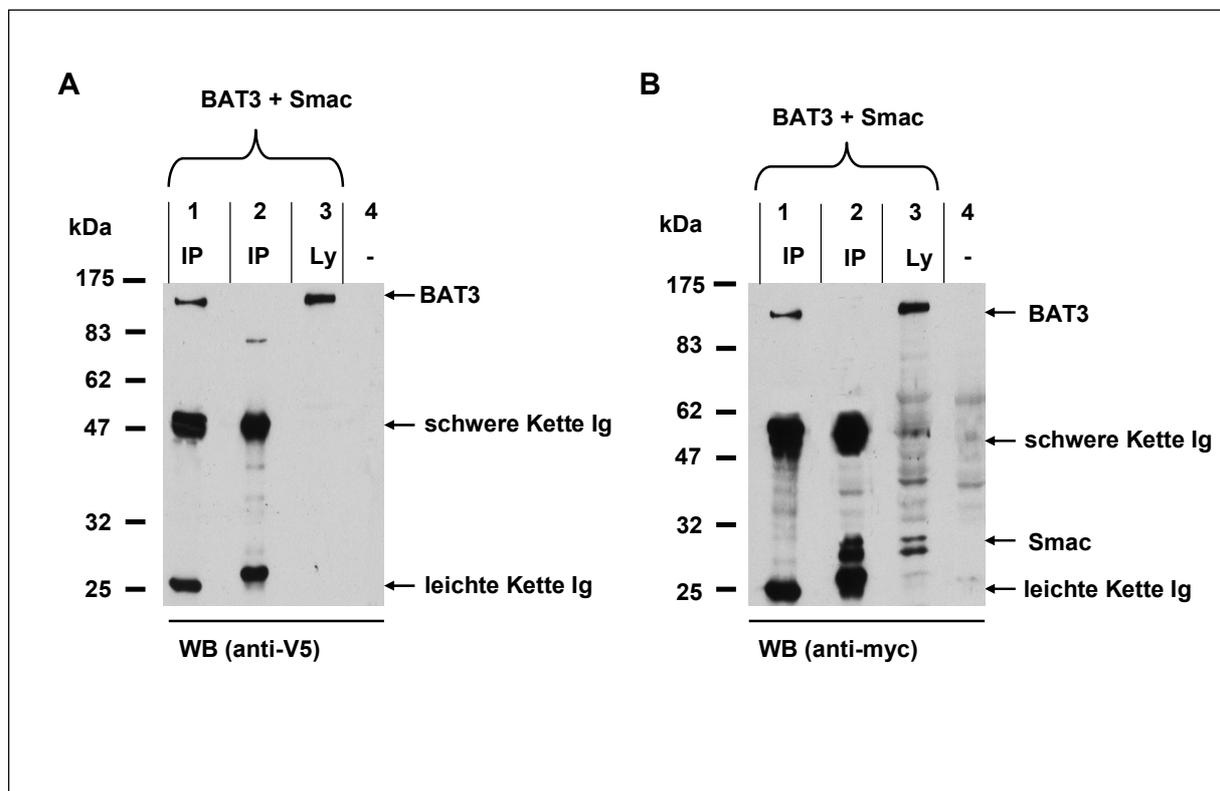


Abb. 3.21: Immunpräzipitation von BAT3 und Smac. COS-7-Zellen wurden transient mit BAT3- und Smac-cDNA transfiziert, nach 72 h mit NP-40 lysiert und eine Immunpräzipitation (IP) (A, B, Spur 1) mit anti-V5 gegen BAT3 und (A, B, Spur 2) mit anti-myc gegen Smac durchgeführt. Die Proben wurden anschließend mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 5 min lang inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte in (A) mit dem monoklonalen Antikörper anti-V5 (gegen V5-BAT3) und in (B) wurde dieselbe Membran mit dem monoklonalen Antikörper anti-myc (gegen Smac) nach detektiert. Die Proben wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen: Immunpräzipitation gegen BAT3 (A, B, Spur 1); Immunpräzipitation gegen Smac (A, B, Spur 2); Lysatkontrollen (A, B, Spur 3); nicht-transfizierten COS-7-Zellen (A, B, Spur 4). Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. Rechts markieren Pfeile die Position der Proteine BAT3, Smac und die leichte und schwere Antikörperkette Ig.

Im Western Blot sollte die BAT3-Expression mit dem monoklonalen Antikörper anti-V5 nachgewiesen werden. In der Immunpräzipitation gegen Smac (Abb. 3.21 A, Spur 2) konnte dagegen kein BAT3-Protein nachgewiesen werden. In der Lysatkontrolle (Abb. 3.21 A, Spur 3) konnte BAT3-Protein detektiert werden. Nach dem Western Blot wurde die Membran gewaschen und für einen zweiten Western Blot eingesetzt. Hier erfolgte der Nachweis der Expression von Smac mit dem monoklonalen Antikörper anti-myc. Das Smac Protein konnte in der Lysatkontrolle nachgewiesen werden, allerdings konnte man in der Immunpräzipitation gegen BAT3 (Abb. 3.21 B, Spur 1) kein Smac detektieren. Auch über die anderen eingesetzten BAT3-Spleißvarianten konnte das Smac-Protein nicht präzipitiert werden (nicht gezeigt).

3.7.5 Assoziation von BAT3-Isoformen mit BAT2

Die BAT2- und die BAT3-Gene liegen benachbart in der MHC Klasse III-Region und haben ein ähnliches Expressionsmuster. Beide Proteine sind ubiquitär exprimiert, wobei die Expression in Testis besonders hoch ist. Es galt die Frage zu klären, ob BAT2 und BAT3 in der Immunpräzipitation koisoliert werden. Hierzu wurden COS-7-Zellen transient mit cDNAs für In-1-BAT2 und verschiedene BAT3-V5 Spleißvarianten transfiziert. Die Immunpräzipitation wurde mit dem monoklonalen Antikörper anti-V5 (gegen BAT3) und mit dem monoklonalen Antikörper In-1 (gegen BAT2) durchgeführt. In Abbildung 3.22 ist exemplarisch die Immunpräzipitation von BAT3 (Vollängenkonstrukt) und BAT2 zu sehen. Mit der gleichen Methode wurden auch die restlichen BAT3-Spleißvarianten untersucht (hier nicht dargestellt). Die präzipitierten Proteine wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die BAT2- und BAT3-Proteine mithilfe der jeweiligen Antikörper nachgewiesen. Die Abbildung 3.22 A zeigt, dass im Western Blot in den Lysatkontrollen das BAT3-Protein vorhanden ist (Spur 2 und 4). Allerdings konnte kein BAT3 über BAT2-Präzipitate koisoliert werden (Spur 3). In der Abbildung 3.22 B sieht man die Expression von BAT2 in den Lysatkontrollen (Spur 2 und 4). In der Immunpräzipitation konnte BAT2 nicht über BAT3-Präzipitate koisoliert werden. In beiden Versuchen wurden zur Kontrolle untransfizierte COS-7-Zellen eingesetzt (Spur 1 A, B). Es konnte keine Assoziation von BAT2 und BAT3 gezeigt werden. Das gleiche Resultat ergab sich auch bei der Immunpräzipitation von BAT2 und den restlichen BAT3-Isoformen (hier nicht gezeigt), die in dieser Arbeit hergestellt wurden.

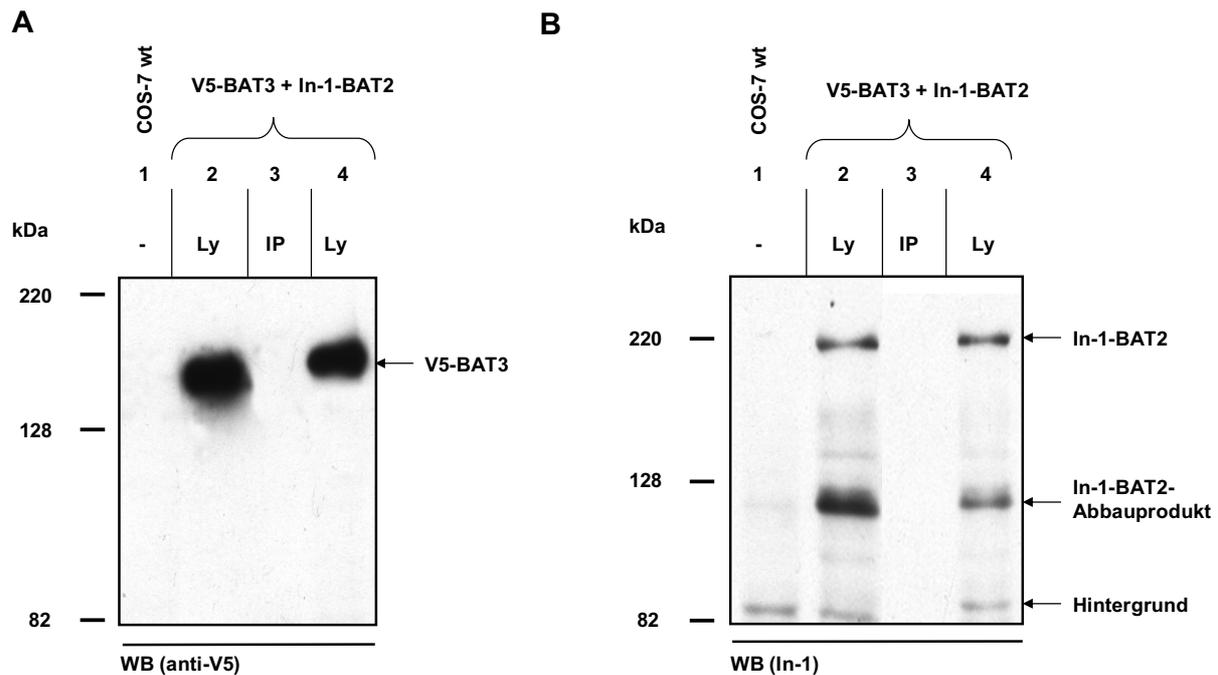


Abb. 3.22: Immunpräzipitation von BAT3 und BAT2. COS-7-Zellen wurden transient mit V5-BAT3- und In-1-BAT2-cDNAs transfiziert, nach 72 h mit NP-40 lysiert und eine Immunpräzipitation (A) mit dem In-1-Antikörper gegen BAT2 und (B) mit dem V5-Antikörper gegen BAT3 durchgeführt. Die Proben wurden anschließend mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 5 min lang inkubiert. Die aufgetragenen Proben wurden mit Hilfe eines 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte in (A) mit dem monoklonalen Antikörper anti-V5 (gegen BAT3) und in (B) mit dem monoklonalen Antikörper In-1 (gegen BAT2). Die Proben wurden in dieser Reihenfolge aufgetragen: untransfizierte COS-7-Zellen (Spur 1 A, B); Lysatkontrollen (Ly) (Spuren 2, 4; A, B); Immunpräzipitation (IP) (Spur 3, A) gegen BAT2 und (Spur 3, B) gegen BAT3. Auf der linken Seite sind die Molekulargewichte (MW) in kDa angegeben. Rechts markieren Pfeile die Position der Proteine BAT2, BAT3; BAT2-Abbauprodukte und Hintergrund-Banden. BAT2 hat ein Molekulargewicht von 220 kDa und BAT3 hat ein MW von 130 kDa.

Im Laufe dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das BAT2 eine Funktion in der Regulation des Spleißens der prä-mRNA besitzen könnte (Lehner *et al.*, 2004). Das BAT2-Gen könnte einen Einfluss auf die Transkription und die Funktionsweise bzw. Variation von BAT3-Spleißvarianten ausüben, und so das Auftreten verschiedener Spleißvarianten des BAT3 beeinflussen. Um diese Vermutung zu analysieren, sollte in der vorliegenden Arbeit das BAT2-Gen inaktiviert werden.

3.8 Gezielte Geninaktivierung des BAT2-Gens

BAT2 wurde mit den Spleißen von RNA in Zusammenhang gebracht (Lehner *et al.*, 2004). Um die mögliche Bedeutung von BAT2 für die Expression der BAT3-Spleißvarianten nachzuweisen und die Funktionen von BAT2 aufzuklären, sollte eine Strategie zur BAT2-Gen-Inaktivierung entwickelt werden. Hierzu wurde ein BAT2-Geninaktivierungsvektor konstruiert und Transfektion von embryonalen Stammzellen durchgeführt.

Um den Geninaktivierungsvektor zu konstruieren, wurde die 5'-Region des BAT2-Gens mit den ersten vier Exons amplifiziert. In dieser Region wurde im Intron 2 des BAT2 Gens eine mit loxP-Sequenzen flankierte HPRT-Kassette eingefügt, sowie stromabwärts in der untranslatierten Region eine singuläre loxP-Sequenz. Durch den Einsatz der Cre-Rekombinase kann nun eine Deletion des von loxP-Sequenzen flankierten Bereichs (also Exon 1-2, somit auch der Translationsstart und die flankierenden Intronsequenzen) des BAT2-Gens erreicht werden und somit das BAT2-Gen inaktiviert werden. Aufgrund des eigenen Promotors des HPRT-Gens, kann unter Umständen das Expressionsmuster des Ziel-Gens (hier BAT2), sowie der benachbarten Gene, wie z.B. BAT3 beeinflusst werden (Pham *et al.*, 1996). Daher wurde eine mit loxP-Sequenzen flankierte HPRT-Kassette verwendet, die man aufgrund der beiden loxP-Sequenzen entfernen kann. Hierzu wird die Cre-Rekombinase in ES-Zellen transient exprimiert, wobei die HPRT-Kassette vor der Injektion doppelt-resistenter Klone in Blastocysten entfernt wird (Gu *et al.*, 1993). Die Methode für den Nachweis der homologen Rekombination des BAT2-Gens wird in den Abschnitten 3.12 und 3.13 beschrieben.

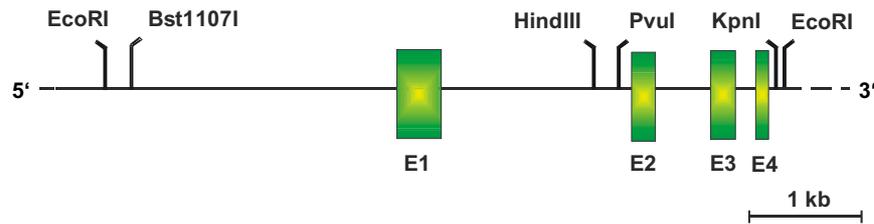
3.9 Herstellung eines Geninaktivierungsvektors zur Ausschaltung des BAT2-Gens

3.9.1 Klonierung der 5'-Region des BAT2-Gens

Zunächst wurde die 5'-Region des BAT2-Gens mittels PCR amplifiziert. Der Geninaktivierungsvektor sollte ausgehend vom zweiten Intron, in der die HPRT-Kassette eingefügt wird, stromabwärts einen langen homologen Arm (ca. 6-9 kb) und stromaufwärts einen kurzen homologen Arm (ca. 1-2 kb) besitzen. Zur Konstruktion wurden verschiedene

Primerpaare getestet und die PCR-Bedingungen optimiert. Die zunächst geplante Amplifikation von 9 kb des BAT2-Gens konnte aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Ein 7 kb großes Fragment des BAT2-Gens wies Mutationen im translatierten Bereich auf. Daher wurde zunächst ein ca. 6,3 kb großes Fragment amplifiziert und anschließend der 5'-Bereich um 3 kb verlängert, um das Risiko von PCR-bedingten Mutationen zu verringern. Die Amplifizierung des 6,3 kb großen Fragments konnte nur mit dem *Expand Long Template PCR System* (Roche) erreicht werden. Für die Amplifikation wurden die Primer BAT2.0043.F (Vorwärts-Primer) und BAT2.6349.R (Rückwärts-Primer) verwendet. Das ca. 6,3 kb große genomische Fragment beinhaltet Exon 1-4 des murinen BAT2-Gens und wurde unter Verwendung von genomischer DNA aus HM-1 ES-Zellen amplifiziert. In Abb. 3.23 ist die genomische Struktur des N-terminalen Bereichs des BAT2-Gens dargestellt und die verschiedenen BAT2-Amplifikate gezeigt. Das PCR-Produkt wurde auf ein 0,7 %iges Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend aus dem Gel eluiert und aufgereinigt. Das aufgereinigte Fragment wurde in einen pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Der so hergestellte Vektor wurde mittels Restriktionsanalyse untersucht. Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden mit den erwarteten Fragmentgrößen verglichen. Alle eingesetzten Restriktionsendonukleasen lieferten Restriktionsfragmente der erwarteten Größe. Das Fragment wurde von einem kommerziellen Anbieter sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit der genomischen Sequenz des Balb/c Mausstammes aus der Datenbank verglichen, wobei keine Mutationen im translatierten Bereich festgestellt wurden. Der pCRII-TOPO-Vektor mit dem 6,3 kb großen Fragment des Maus BAT2 Gens diente als Ausgangsvektor für die Herstellung eines Geninaktivierungsvektor für die homologe Rekombination. Im Folgenden werden die einzelnen Klonierungsschritte beschrieben.

A



B

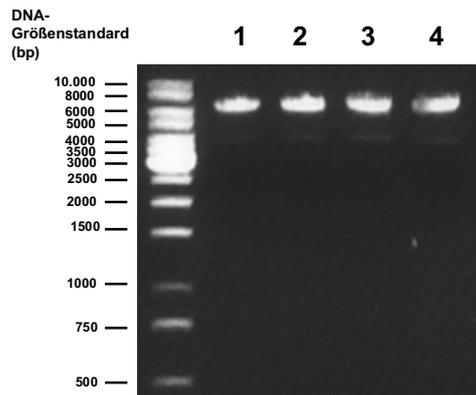


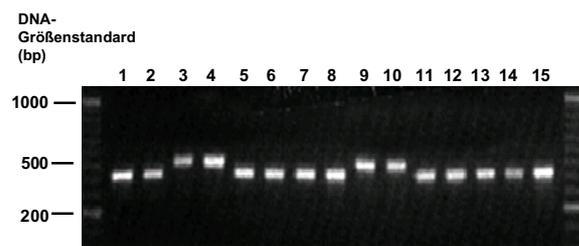
Abb. 3.23: Schematische Darstellung der genomischen Struktur des BAT2-Gens im 5'-Bereich und Nachweis der BAT2-Amplifikate im Agarose-Gel. (A) Schematische Darstellung des BAT2-Fragments, welches als Ausgangsmaterial für die Klonierung des Zielgenvektors dient. Das 6,3 kb genomische Fragment beinhaltet Exon 1-4 (E1-E4) des BAT2-Gens. **(B)** Das N-terminale BAT2-Fragment wurde unter Verwendung von genomischer DNA aus HM-1 ES-Zellen als Matrice durch PCR amplifiziert. Hierzu wurden die Primer BAT2.0043.F und BAT2.6349.R verwendet. Spur 1-4: BAT2-Amplifikate, die mit unterschiedlichen PCR-Bedingungen amplifiziert wurden. Das erhaltene Produkt wurde in einem pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Links befindet sich der DNA-Größenstandard.

3.9.2 Einfügen einer singulären loxP-Sequenz in die 5'-Region des BAT2-Gens

Das amplifizierte und klonierte 6,3 kb große genomische BAT2-Fragment besitzt in der 5'-Region eine singuläre Bst1107I-Restriktionsschnittstelle, die auch nicht im pCRII-TOPO-Vektor vorkommt. Diese Schnittstelle wurde genutzt, um eine singuläre loxP-Sequenz in das BAT2-Konstrukt einzubauen. Hierzu wurde ein Oligonukleotidlinker eingesetzt, der eine von Bst1107I flankierte loxP-Sequenz beinhaltet (Bst1107IPrimerloxP.F, Bst1107IPrimerloxP.R). Zwecks Anlagerung der eingesetzten Oligonukleotide wurde vor der Ligation bei 37 °C für 20 min und anschließend bei RT für 10 min inkubiert. Danach wurde der Oligonukleotidlinker phosphoryliert. Der pCRII-TOPO-5'BAT2-Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym Bst1107I geschnitten, dephosphoryliert und direkt im Anschluss mit dem phosphorylierten Linker ligiert. Die bakteriellen Klone wurden mit Hilfe einer Kolonie-PCR nach rekombinanten Bakterienkolonien untersucht, die den Bst1107I-loxP-Bst1107I-Oligonukleotidlinker enthalten. Hierzu wurden die Primer BAT2.749.F und BAT2.1172.R verwendet, die sich jeweils stromaufwärts und stromabwärts von der Bst1107I-Restriktionsschnittstelle anlagern. Nach der PCR-Reaktion wurden die Proben auf einem 2 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 3.24 zeigt den Einbau der loxP-

Sequenz in das 5'-BAT2-Fragment. Von 32 untersuchten Klonen wurden vier Klone identifiziert, die die loxP-Sequenz besaßen. Diese vier Klone wurden sequenziert, um die Orientierung der loxP-Sequenz in den einzelnen Klonen zu bestimmen. Für die Sequenzierung wurde der Primer BAT2.749.F verwendet. Zwei der vier Klone wiesen die korrekte Orientierung der loxP-Sequenz auf und wurden für die weiteren Klonierungsschritte verwendet.

A



B

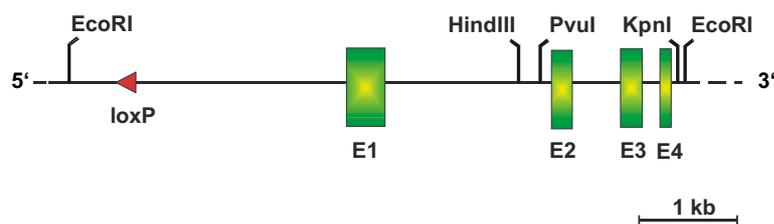


Abb. 3.24: Nachweis der singulären loxP-Erkennungsstelle in dem 5'-untranslatierten Bereich von pCRII-TOPO-BAT2-loxP Vektor. Mit Hilfe des Bst1107I-loxP-Bst1107I Oligonukleotidlinker, welcher die loxP-Sequenz beinhaltet, sowie an beiden Enden komplementär (Bst1107I-Sequenz) zur Zielsequenz ist, wurde die loxP-Erkennungsstelle (roter Pfeil) in den pCRII-TOPO-BAT2 Vektor kloniert. Rekombinante Bakterienkolonien wurden mit Hilfe der Kolonie-PCR identifiziert. Für die Kolonie-PCR wurden die Primer BAT2.749.F und BAT2.1172.R verwendet. Nach der PCR wurden die Proben in einem 2 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Spur 1, 15: Kontrolle (pCRII-TOPO-BAT2, Vektor ohne loxP-Sequenz); Spur 3, 4, 9, 10: Bakterienkolonien, in denen die loxP-Sequenz kloniert wurde; Spur 2, 5-8, 11-14: Bakterienkolonien in denen keine loxP-Sequenz kloniert wurde. Links der Abbildung befindet sich der DNA-Größenstandard. (B) Schematische Darstellung des pCRII-TOPO-BAT2-loxP Vektors.

3.9.3 Klonierung des N-terminalen BAT2-loxP-Fragments in einen pBCSK+-Vektor

Das klonierte 6,3 kb große N-terminale BAT2-Fragment sollte aus dem pCRII-TOPO-Vektor über die flankierenden EcoRI-Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten und in den Vektor pBCSK+ kloniert werden. Der Vektor pBCSK+ besitzt ein Chloramphenicol-Resistenzgen. Da dieser Vektor keine EcoRI-Restriktionsschnittstelle im Polylinker-Bereich aufwies, musste zuerst der Oligonukleotidlinker „PvuI-PmeI-EcoRI-AscI-BssHII“ in die multiple

Klonierungsschnittstelle (MCS) des pBCSK+-Vektors eingefügt werden. Da eine singuläre PvuI-Restriktionsschnittstelle im N-terminalen BAT2-Fragment für die Klonierung der HPRT-Kassette vorhanden sein musste, wurde der Linker so konzipiert, dass nach Einbau des Fragments keine PvuI- und BssHIII-Schnittstelle mehr vorhanden war. Desweiteren wurde eine AscI-Restriktionsschnittstelle zugefügt, um das Konstrukt für die Transfektion des Vektors in ES-Zellen am 3'-Ende linearisieren zu können. Die zusätzliche PmeI-Schnittstelle dient der Klonierung einer TK-Kassette. Für den Einbau des Linkers wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen PvuI und dem BssHIII (Isoschizomer Paul) geschnitten und mit dem Oligonukleotidlinker im 100fachen molaren Überschuss ligiert. Durch Restriktionsanalyse wurde der Einbau des Linkers bestätigt und somit das Einfügen einer singulären EcoRI- und AscI-Restriktionsschnittstelle, sowie das Ausschalten der PvuI- und der BssHIII-Restriktionsschnittstelle. In den modifizierten pBCSK+-Vektor konnte nun das N-terminale BAT2-Fragment über die EcoRI-Schnittstellen eingefügt werden. Mittels Restriktionsanalyse wurde die Orientierung des N-terminalen BAT2-Fragments überprüft. In Abb. 3.25 ist schematisch die Klonierung des N-terminalen BAT2-Fragment in den modifizierten pBCSK+-Vektor dargestellt.

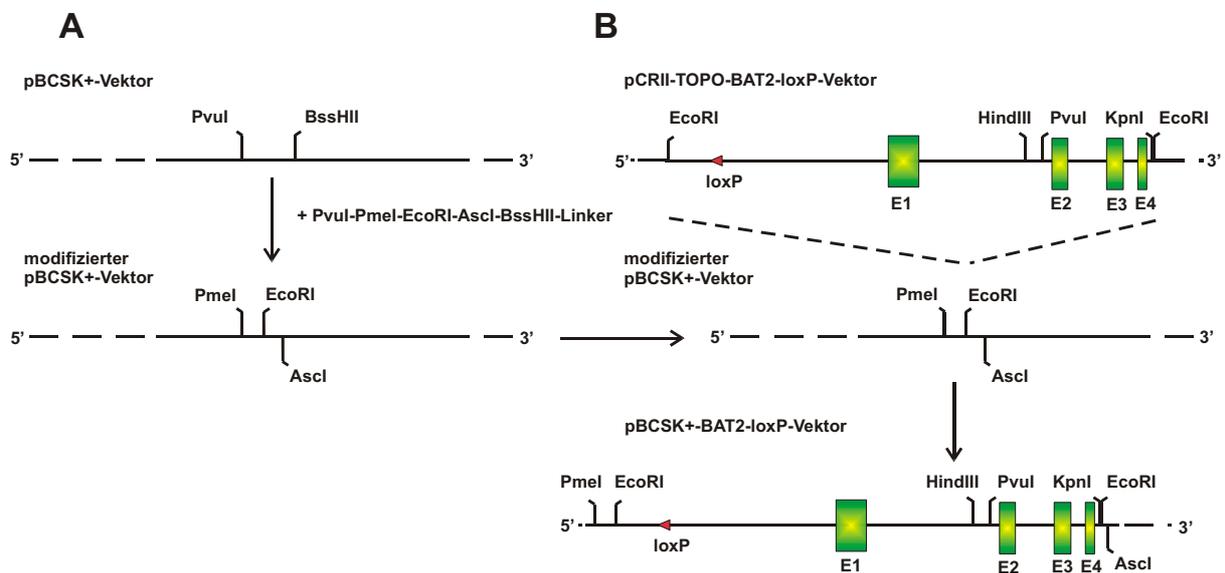


Abb. 3.25: Klonierung des N-terminalen BAT2-loxP-Fragments in den pBCSK+-Expressionsvektor. (A) Modifizierung des pBCSK+-Vektors, durch Klonierung des Oligonukleotidlinkers PvuI-PmeI-EcoRI-AscI-BssHIII über die Restriktionsschnittstellen PvuI und BssHIII. Hierdurch erhält der pBCSK+-Vektor eine singuläre EcoRI-Schnittstelle, in der das BAT2-loxP-Fragment eingesetzt wird. Zusätzlich erhält der Vektor aufgrund des Linkers eine zusätzliche AscI-Restriktionsschnittstelle, mit der der Zielvektor für die Elektroporation mit ES-Zellen linearisiert werden kann. Desweiteren besitzt der pBCSK+-Vektor eine singuläre PmeI-Restriktionsschnittstelle, in der später eine TK-Kassette kloniert werden kann. Die Sequenz der PvuI- und der BssHIII-Restriktionsschnittstelle im Oligonukleotidlinker wurde so gelegt, dass nach der Klonierung die PvuI- und die BssHIII-Restriktionsschnittstelle keine Funktionsfähigkeit mehr aufwies. **(B)** Aus dem Vektor pCRII-TOPO-BAT2-loxP wurde das BAT2-loxP Fragment über die EcoRI Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten und in den EcoRI geschnittenen modifizierten pBCSK+-Vektor kloniert.

3.9.4 Einfügen einer HPRT-Selektionskassette in Intron 2 des BAT2-Gens

In den Geninaktivierungsvektor sollte ein positiver Selektionsmarker eingefügt werden. Hierzu wurde eine mit loxP-Sequenzen flankierte Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Kassette gewählt (pHWlox1, freundlicherweise von Prof. T. Magin zur Verfügung gestellt). Die HPRT-Kassette erlaubt bei Verwendung HPRT-negativer ES-Zellen positive Selektion durch Verwendung von HAT-Medium nach der Transfektion. Diese Kassette steht unter der Kontrolle eines Phosphoglycerat-Kinase (PGK)-Promotors. Um eine gegenseitige Beeinflussung der Transkription von BAT2 und HPRT durch die jeweiligen Promotoren ausschließen zu können, wurde die Selektionskassette entgegengesetzt der Transkriptionsrichtung von BAT2 in den Zielgenvektor eingefügt. Das Einfügen der HPRT-Kassette in den pBCSK+-BAT2-loxP-Vektor wurde durch verschiedene Klonierungsschritte ermöglicht, da im Intron 2 zwar eine SacI-Restriktionsschnittstelle zur Verfügung stand, die aber mehrfach im BAT2-Fragment vorkommt. Neben der SacI-Restriktionsschnittstelle sollte noch eine Sall-Schnittstelle eingefügt werden, um anschließend die HPRT-Kassette in diese beiden Schnittstellen einzusetzen. Folgende Klonierungsschritte wurden durchgeführt:

- 1) Herstellung einer singulären SacI-Restriktionsschnittstelle, indem das Intron 2 in einen pSP72-Vektor kloniert wird
- 2) Einfügen eines Sall-Oligonukleotidlinker in die singuläre SacI-Sequenz
- 3) Klonierung der HPRT-Kassette in die SacI und Sall-Restriktionsschnittstellen
- 4) Rückklonierung der so modifizierten Intron 2-Sequenz in den pBCSK+-BAT2-loxP-Vektor

Abbildung 3.26 zeigt schematisch die ersten Klonierungsschritte, um eine singuläre SacI- und eine zusätzliche Sall-Restriktionsschnittstelle zu erhalten. Aus dem pCRII-TOPO-BAT2-loxP-Vektor wurde mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und EcoRV ein 1,4 kb großes Fragment mit den Exons 2, 3 und 4 sowie den dazwischen liegenden und flankierenden Intronbereichen ausgeschnitten. Dieses Fragment wurde in einen mit HindIII und EcoRV geschnittenen pSP72-Vektor kloniert. In die nun singuläre SacI-Schnittstelle wurde der Oligonukleotidlinker „SacI-EcoRI-Sall-SacI“ eingefügt, wobei die SacI-Schnittstelle am 3'-Ende des Linkers zerstört wurde, um nur eine einzige SacI-Schnittstelle zu behalten. Die Sequenz des so erzeugten pSP72-Sall-Vektors wurde bestimmt, um die Orientierung der SacI- und Sall-Schnittstelle zu überprüfen, da im folgenden Schritt die HPRT-Kassette in antisense-Orientierung in das Fragment kloniert werden sollte.

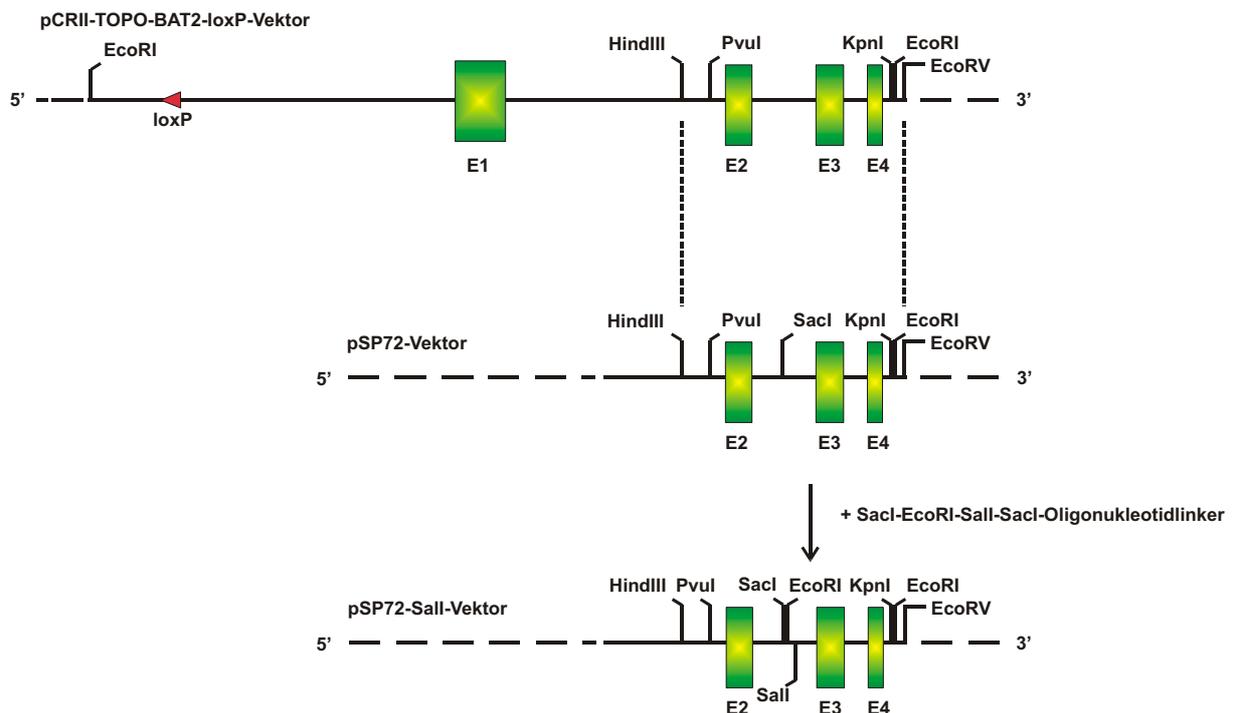


Abb. 3.26: Klonierung des pSP72-Sall-Vektors. Um eine singuläre SacI-Schnittstelle zu erhalten, wurde aus dem Vektor pCRII-TOPO-BAT2-loxP am 3'-Bereich ein ca. 1,4 kb großes Fragment mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRV ausgeschnitten und in einen mit HindIII und EcoRV geschnittenen pSP72-Vektor kloniert. In der singulären SacI-Schnittstelle wurde der Oligonukleotidlinker SacI-EcoRI-Sall-SacI kloniert, um eine zusätzliche Sall-Schnittstelle einzuführen. Die SacI- und Sall-Schnittstelle konnten nun zur Klonierung der HPRT-Kassette verwendet werden.

In der Abbildung 3.27 ist schematisch die Klonierung der HPRT-Kassette in den pSP72-Sall-Vektor zu sehen. Zuerst wurde die mit loxP-Sequenzen flankierte HPRT-Kassette aus dem pHWlox1-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen SacI und Sall ausgeschnitten und in den ebenfalls mit den Enzymen SacI und Sall geschnittenen Vektor ligiert. Der Einbau des HPRT-Gens wurde mittels Restriktionsanalyse bestätigt.

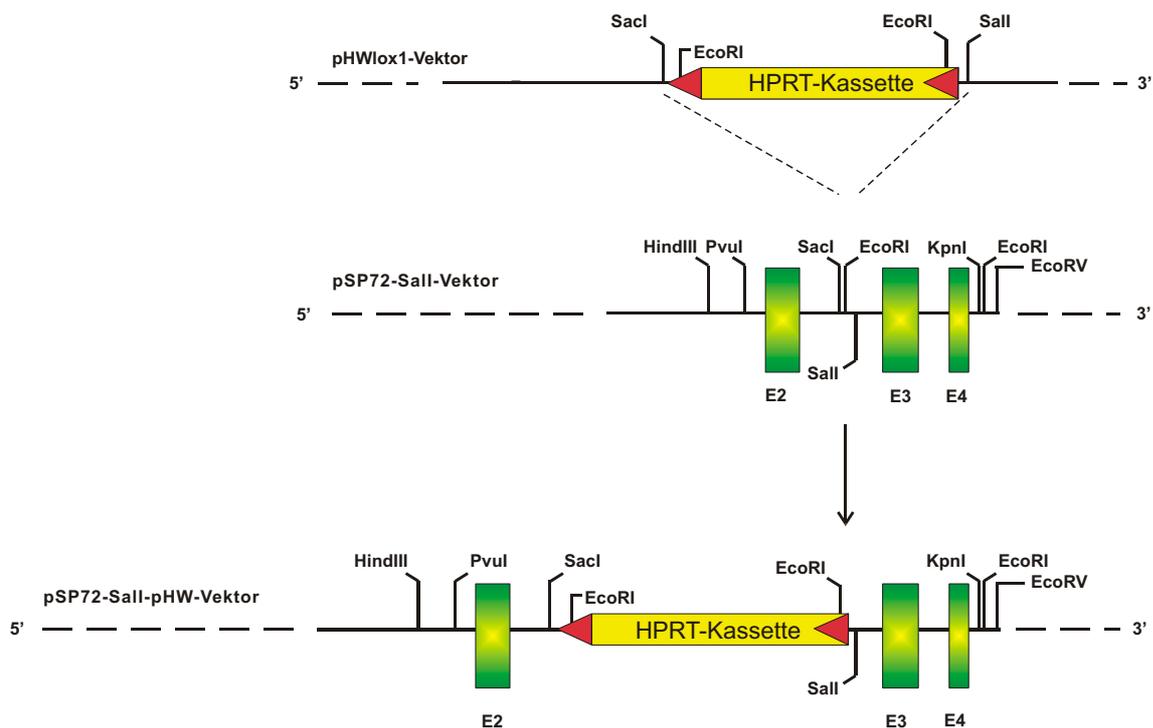


Abb. 3.27: Klonierung der loxP-HPRT-loxP-Kassette in den pSP72-Sall-Vektor. Aus dem Vektor pHWlox1 wurde die ca. 2,7 kb große loxP-HPRT-loxP-Kassette mit den Restriktionsendonukleasen SacI und Sall ausgeschnitten und in den SacI- und Sall- geschnittenen pSP72-Sall-Vektor kloniert. Aus dem vorliegenden pSP72-Sall-pHW-Vektor konnte nun die HPRT-Kassette in den Vektor pBCBAT2-loxP umkloniert werden.

Im letzten Schritt wurde ein ca. 4 kb großes Fragment, bestehend aus Exon 2, 3, 4, der HPRT-Kassette und den direkt flankierenden Intronsequenzen aus dem pSP72-Sall-pHW-Vektor geschnitten und in den pBCSK+-BAT2-loxP-Vektor kloniert. Abbildung 3.28 zeigt schematisch den letzten Klonierungsschritt der Rückklonierung der HPRT-Kassette. Aus dem pSP72-Sall-pHW-Vektor wurde das ca. 4 kb große Fragment mit den Restriktionsenzymen PvuI und KpnI ausgeschnitten. Aus dem pBCSK+-BAT2-loxP-Vektor wurde das vorhandene, von den Restriktionsenzymen PvuI und KpnI flankierte 1,4 kb große Fragment ohne die HPRT-Kassette ausgeschnitten und die verdauete Probe in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Der geschnittene Vektor wurde aus dem Agarose-Gel eluiert und mit dem modifizierten 4 kb großen Fragment ligiert.

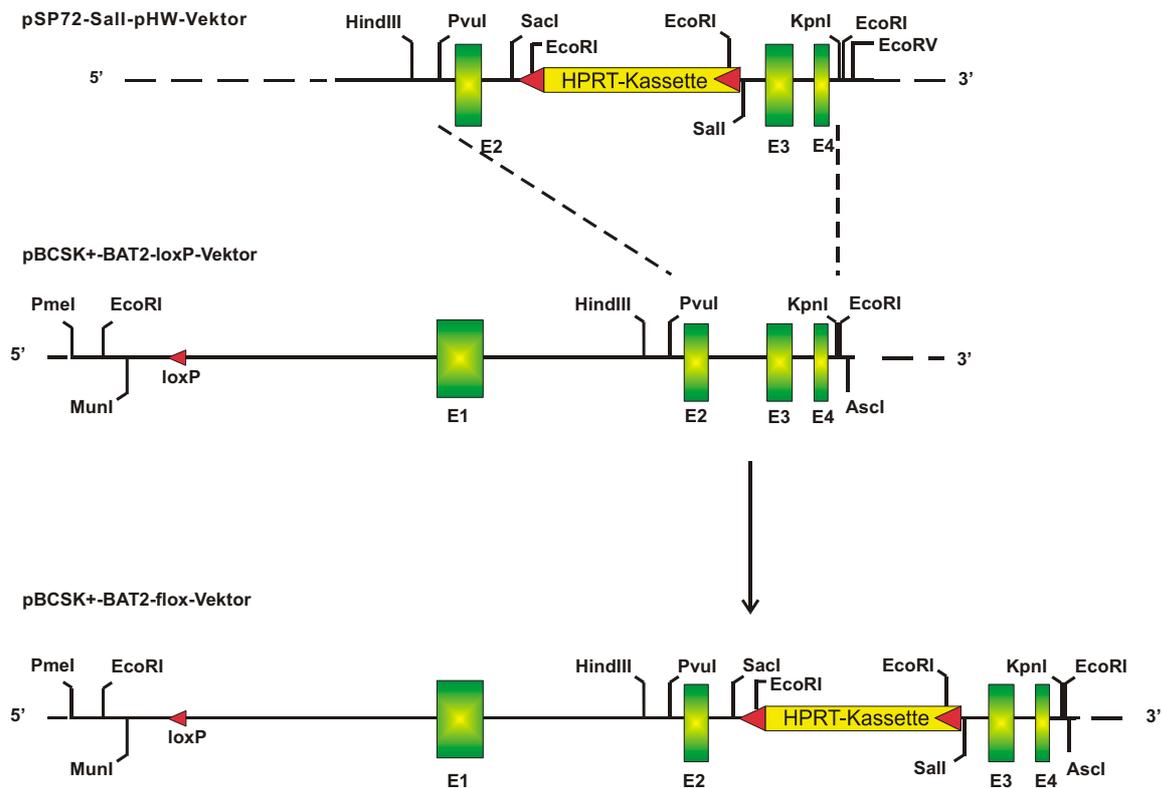


Abb. 3.28: Rückklonierung der HPRT-Kassette aus dem pSP72-Sall-pHW-Vektor in den pBCSK+-BAT2-loxP-Vektor. Das aus dem pSP72-Sall-pHW geschnittene PvuI/KpnI-Fragment enthält die HPRT-Kassette, Exon 2-4, sowie die anliegenden Intronbereiche. Dieses Fragment wurde über die Schnittstellen PvuI/KpnI in den geschnittenen pBCSK+-BAT2-loxP-Vektor kloniert.

Zur Kontrolle wurde der pBCBAT2-flox Vektor mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und PvuI/KpnI verdaut. Alle eingesetzten Restriktionsendonukleasen lieferten Restriktionsfragmente von erwarteter Größe. In Abbildung 3.29 ist die Restriktionsanalyse und der dazugehörige Vektor dargestellt.

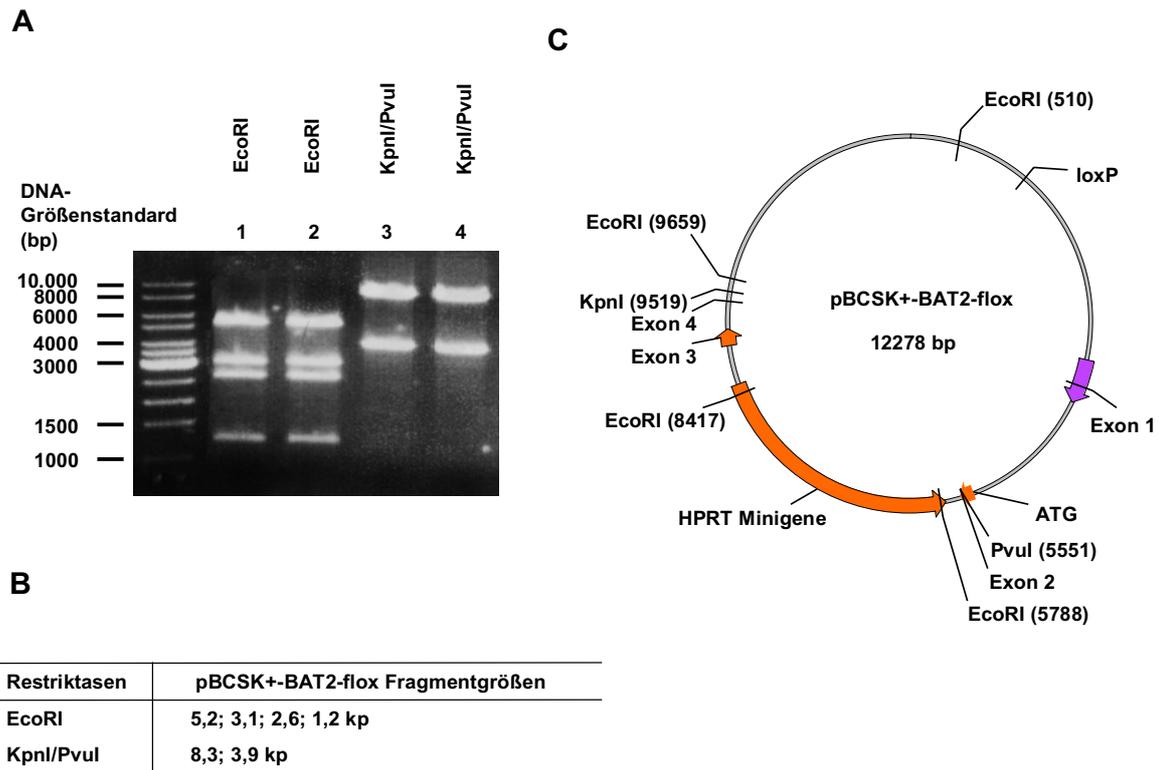


Abb. 3.29: Restriktionsanalyse des pBCSK+-BAT2-flox Vektors. (A) Restriktionsanalyse des Vektors pBCSK+-BAT2-flox. Es wurden jeweils zwei Klone mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und in einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen ergaben Fragmente erwarteter Größe. Spur 1, 2: (EcoRI) 5,2; 3,1; 2,6; 1,2 kb; Spur 3, 4: (KpnI/PvuI) 8,3; 3,9 kb. Links befindet sich der DNA Größenstandard. (B) Tabelle in der die Fragmentgrößen des geschnittenen Konstruktes angegeben sind. (C) Vektorkarte des pBCSK+-BAT2-flox Vektors, mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen.

3.9.5 Verlängerung der 5'-Region von pBCSK+-BAT2-flox und Einfügen einer TK-Kassette

Nach Fertigstellung des pBCSK+-BAT2-flox-Vektors sollte dieser weiter modifiziert werden, um die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination zu erhöhen. Je größer der lange 5'-gelegene Homologiearm des Zielvektors ist, umso günstiger ist die homologe Rekombination (Deng & Cappecchi, 1992; Hasty *et al.*, 1991). Zu Beginn der Klonierung des pBCSK+-BAT2-flox-Vektors wurde ein 6,3 kb großes Fragment amplifiziert, welches die N-terminale Sequenz des BAT2-Gens beinhaltet. Es war technisch nicht möglich ein größeres genomisches Fragment zu klonieren, da beim Versuch, zwischen 7 und 9 kb große genomische DNA Fragmente zu amplifizieren, keine Produkte zustande kamen. Desweiteren sollte noch ein HSV-TK Gen, welches für eine Thymidinkinase des *Herpes simplex* Virus kodiert, zwischen dem langen Homologiearm und dem Plasmidrückgrat des pBCSK+-BAT2-flox-Vektors eingefügt werden. Durch die Verwendung eines solchen Plasmids mit zwei

selektionierbaren Markern wird eine Positiv-Negativ-Selektion möglich (Mansour *et al.*, 1988). Die meisten stabilen Transfektanten entstehen nicht durch homologe Rekombination, sondern durch zufällige Integration des Vektors einschließlich des TK-Gens in das Zielgenom. Bei homologer Rekombination wird das TK-Gen dagegen nicht mitintegriert. Die TK wandelt unter Selektion das ins Medium gegebene Guanosin-Analogon Ganciclovir in ein toxisches Nukleotid um, so dass Zellen mit zufälliger Integration des Plasmides sterben und nur Zellen überleben, bei denen tatsächlich eine homologe Rekombination stattgefunden hat. Zu Beginn wurde der pBCSK+-BAT2-flox Vektor am 5'-untranslatierten Bereich um 3 kb erweitert. Hierzu wurde zunächst ein 3 kb Fragment unter Verwendung von genomischer DNA aus HM-1 ES-Zellen als Matrize und den Primern P.3-PmeI.F und P.4-3kb.R durch PCR amplifiziert. Aufgrund des modifizierten P.3-PmeI.F Primers, enthält das amplifizierte Fragment eine zusätzliche PmeI-Restriktionsschnittstelle im 5'-Bereich. Die Primersequenz P.4-3kb.R liegt 3 kb stromabwärts von dem Vorwärts-Primer und beinhaltet die dort vorkommende MunI-Schnittstelle. Nach der Klonierung des Fragments in einen pCRII-TOPO-Vektor wurde das 3 kb große Fragment über die Restriktionsendonukleasen PmeI und MunI ausgeschnitten und in den PmeI- und MunI-geschnittenen pBCSK+-BAT2-flox Vektor kloniert. In den vorliegenden pBCSK+-BAT2-flox-5'3kb Vektor konnte nun das TK-Gen in die neu eingefügte PmeI-Restriktionsschnittstelle eingefügt werden. Das TK-Gen, welches im pBS-TK Vektor vorliegt (freundlicherweise von Dr. A. Weissmann zur Verfügung gestellt), konnte nicht über die vorhandenen Restriktionsschnittstellen aus dem Vektor geschnitten werden. Die TK-Kassette wurde mit den Primern P.0724.PmeI.F und P.2571.PmeI.R amplifiziert und mit PmeI-Schnittstellen flankiert. Dieses modifizierte Fragment wurde in einen pCRII-TOPO Vektor kloniert und sequenziert, um unerwünschte Mutationen auszuschließen. Das Fragment wurde über die PmeI-Restriktionsschnittstelle ausgeschnitten und in den PmeI-geschnittenen pBCSK+-BAT2-flox-5'3kb Vektor kloniert. Die Schritte der Klonierung des 3 kb großen Fragments und des TK-Gens sind in der Abbildung 3.30 dargestellt. Der nun fertiggestellte pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektor musste vor der Transfektion in ES-Zellen mit verschiedenen Methoden auf seine Richtigkeit überprüft werden.

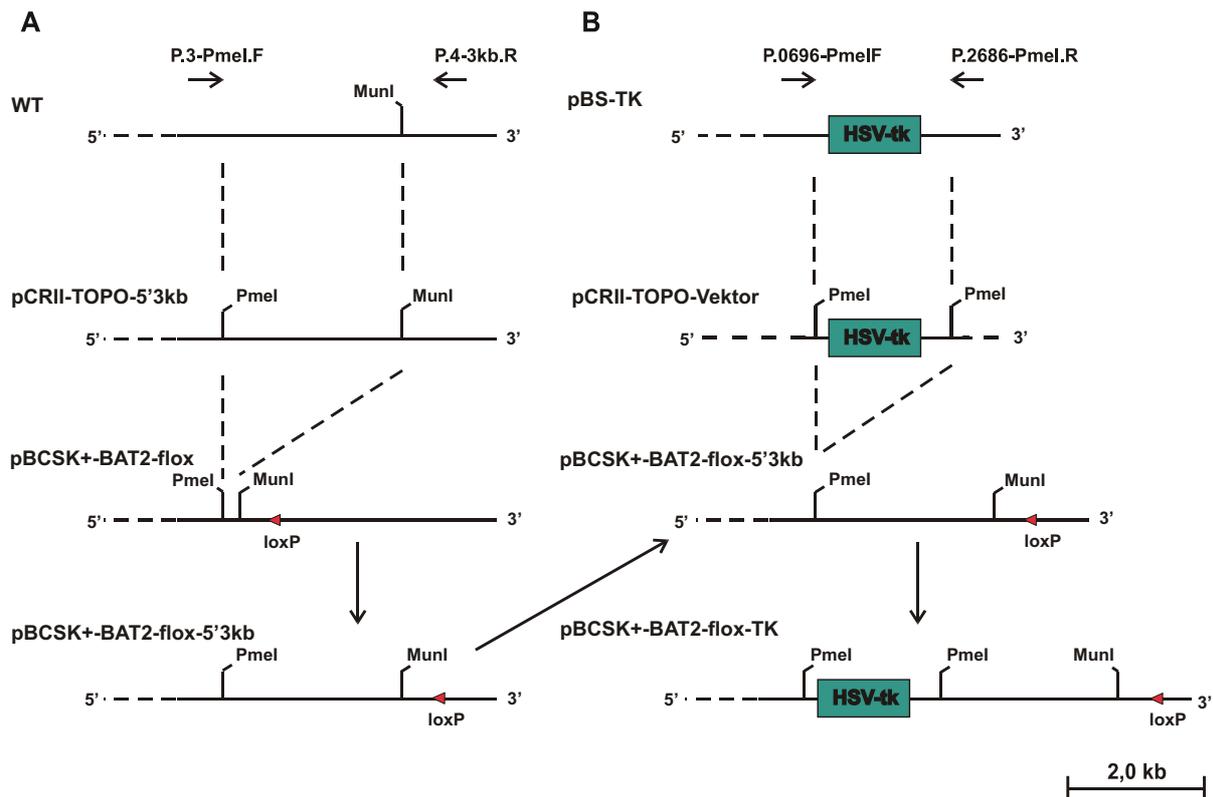


Abb. 3.30: Verlängerung des Konstruktes pBCSK+-BAT2-flox um 3 kb am 5'-Bereich und Klonierung der Thymidinkinase (TK)-Kassette in den pBCSK+-BAT2-flox5'3kb Vektor. (A) Der 5'-untranslatierte Bereich des N-terminalen BAT2-flox-Fragments soll um ein ca. 3 kb großes Fragment verlängert werden. Das ca. 3 kb große Fragment wurde unter Verwendung von genomischer DNA aus HM-1 ES-Zellen (wt) als Matrice durch PCR amplifiziert. Hierzu wurden die Primer P.3-PmeI.F und P.4-3kb.R verwendet. In dem Primer P.3-PmeI.F wurde die Sequenz einer PmeI-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Das erhaltene Produkt wurde in einem pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Aus dem pCRII-TOPO-5'3kb Vektor wurde das ca. 3 kb große Fragment mit den Restriktionsenzymen PmeI und MunI ausgeschnitten und in einen mit PmeI/MunI geschnittenen pBCSK+-BAT2-flox-Vektor umklontiert. In diesem Vektor (pBCSK+-BAT2-flox-5'3kb) konnte nun das TK-Gen eingefügt werden. **(B)** Da der pBS-TK-Vektor keine geeignete Schnittstelle aufweist, musste das TK-Gen mit den Primern P.0724.PmeI.F und P.2571.PmeI.R amplifiziert werden, um an den flankierenden Enden des ca. 2 kb großen Fragments PmeI-Schnittstellen einzufügen. Dieses Fragment wurde in einen pCRII-TOPO-Vektor kloniert, aus diesen mit dem Restriktionsenzym PmeI ausgeschnitten und in den PmeI- geschnittenen pBCSK+-BAT2-flox-5'3kb-Vektor kloniert.

3.9.6 Darstellung und Überprüfung des Geninaktivierungsvektors pBCSK+-BAT2-flox-TK

In der Abbildung 3.31 ist die schematische Darstellung des Wildtyp N-terminalen BAT2-Fragments und des Geninaktivierungsvektors pBCSK+-BAT2-flox-TK zu sehen. Die 9 kb große genomische N-terminale BAT2 Wildtyp DNA wurde im pBCSK+-BAT2-flox-TK in einigen Punkten modifiziert. Der Vektor enthält zusätzliche Schnittstellen für SacI, Sall, PmeI und AscI und in der 5'-Region eine singuläre loxP-Sequenz, sowie eine loxP-HPRT-loxP-Sequenz im Intron 2 des BAT2-Gens. Die von loxP-Sequenzen flankierte HPRT-Kassette

wird am 5'-Bereich durch einen 8 kb langen Arm, bestehend aus Exon 1, Exon 2, flankierender Intronsequenz, einer singulären loxP-Sequenz und am 3'-Bereich durch einen 1,1 kb kurzen Arm, bestehend aus Exon 3, Exon 4 und flankierender Intronsequenz, begrenzt. Desweiteren wurde zwischen dem langen Homologiearm und dem Plasmidrückgrat des pBCSK+-BAT2-flox Vektors eine TK-Kassette eingefügt. Der Translationsstart (Pfeil) befindet sich im zweiten Exon des BAT2-Gens.

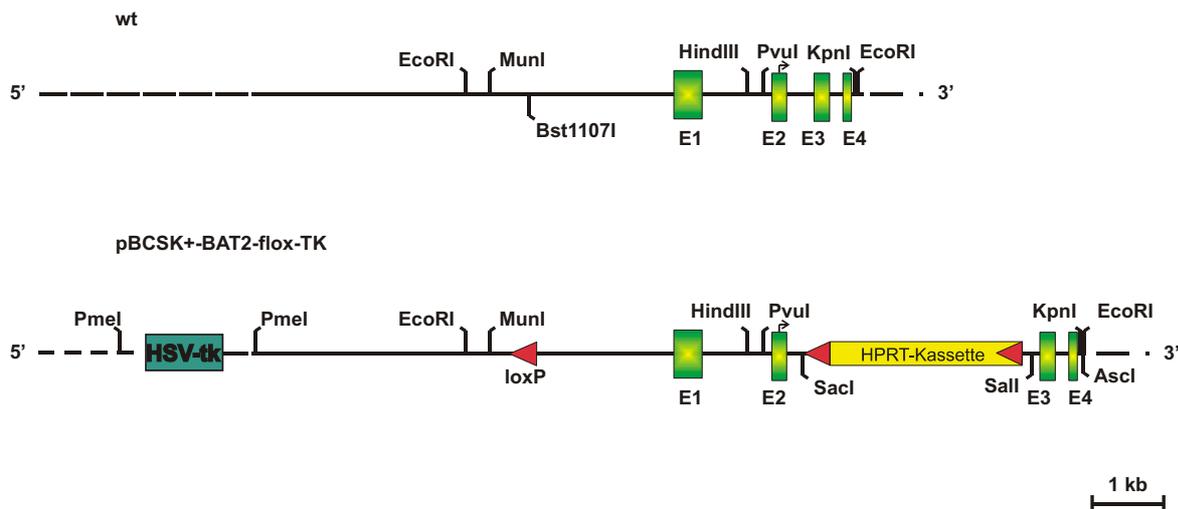


Abb. 3.31: Schematische Darstellung des Wildtyp (wt) N-terminalen BAT2-Fragments und des Zielgenvektors pBCSK+-BAT2-flox-TK. Das modifizierte BAT2-Fragment wurde in einem pBCSK+-Vektor kloniert. Der Translationsstart (Pfeil) befindet sich im zweiten Exon. Eine mit loxP Sequenzen flankierte Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Kassette, die von einem Phosphoglycerat-Kinase (PGK) Promotor angesteuert wird, wurde am 3'-Bereich im zweiten Intron kloniert. Das Resistenzgen erlaubt die Selektion der transfizierten Zellen, in die der Vektor integriert wurde. Eine singuläre loxP- (locus of crossover) Sequenz wurde in der 5'-untranslatierten Region eingefügt. Die HPRT-Kassette wird am 5'-Bereich durch einen 7 kb langen Arm, bestehend aus Exon 1, Exon 2 und Intronsequenz, und am 3'-Bereich durch einen 1,1 kb kurzen Arm, bestehend aus Exon 3, Exon 4 und flankierender Intronsequenz, begrenzt. Am 5'- Bereich des langen Arms liegt eine HSV-TK-Kassette, die eine Negativselektion transfizierter Klone ermöglicht.

Nach Abschluss der Klonierungsarbeiten wurde der fertige Austauschvektor pBCSK+-BAT2-flox-TK mit unterschiedlichen Methoden überprüft:

1. Restriktionsanalyse
2. Sequenzierung
3. Funktion der loxP-Sequenzen

3.9.7 Restriktionsanalyse des pBCSK+-BAT2-flox-TK-Vektors

Zuerst wurde die Plasmid-DNA des pBCSK+-BAT2-flox-TK-Vektors mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten. Zum einen wurde überprüft, ob der Vektor für die Transfektion von ES-Zellen mit *AscI* linearisierbar ist. Mit den Restriktionsenzymen *EcoRV*, *HindIII*, *SacI* und *XhoI* wurde die Anwesenheit und Orientierung der HPRT- und der TK-Kassetten überprüft. Der pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektor wurde mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen für 1 h bei 37 °C inkubiert und in einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden mit den erwarteten Fragmentgrößen verglichen. Alle eingesetzten Restriktionsendonukleasen lieferten Restriktionsfragmente von erwarteter Größe. In Abbildung 3.32 ist die Restriktionsanalyse und der dazugehörige Vektor dargestellt. Tabelle 3.2 zeigt die Fragmentgrößen nach der Restriktion.

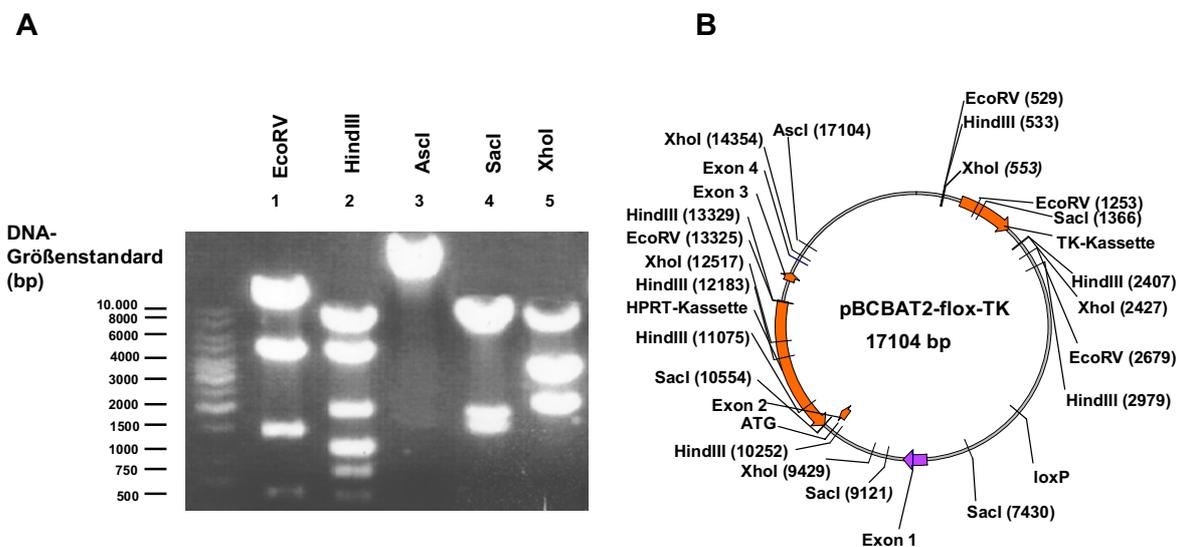


Abb. 3.32: Restriktionsanalyse des Vektors pBCSK+-BAT2-flox-TK. Der Austauschvektor wurde nach Fertigstellung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten, um die Richtigkeit des Vektors zu überprüfen. Der pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektor wurde mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und in einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen ergaben Fragmente erwarteter Größe. Spur 1: (*EcoRV*) 10,6; 4,3; 1,4; 0,6 kb; Spur 2: (*HindIII*) 7,2; 4,3; 1,8; 1,1; 1,1; 0,8; 0,5 kb; Spur 3: (*AscI*) 17,1 kb, linearisiert; Spur 4: (*SacI*): 7,9; 6,0; 1,6; 1,4 kb; Spur 5 (*XhoI*): 7,0; 3,3; 3,0; 1,8; 1,8 kb. Links befindet sich der DNA-Größenstandard. (B) Vektorkarte des pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektors, mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen.

Restriktasen	pBCSK+-BAT2-flox-TK Fragmentgrößen
EcoRV	10,6; 4,3; 1,4; 0,6 kb
HindIII	7,2; 4,3; 1,8; 1,1; 1,1; 0,8; 0,5 kb
AscI	17,1 kb, linearisiert
SacI	7,9; 6,0; 1,6; 1,4 kb
XhoI	7,0; 3,3; 3,0; 1,8; 1,8 kb

Tab. 3.2: Fragmentgrößen der Überprüfungsrestriktionen vom pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektor.

3.9.8 Sequenzierung des pBCSK+-BAT2-flox-TK-Vektors

Nach der Beendigung der Klonierungen des pBCSK+-BAT2-flox-TK Konstruktes wurde dieses sequenziert. Zum einen wurde die komplette amplifizierte genomische DNA des BAT2 Gens sequenziert, wie auch die wichtigsten Klonierungsschritte überprüft, z.B. das Einfügen der Selektionsmarker, die loxP-flankierte HPRT-Kassette und die TK-Kassette sowie das Einfügen der Oligonukleotidlinker Bst1107I-loxP-Bst1107I (die singuläre loxP-Sequenz muss in der gleichen Orientierung, wie die HPRT-Kassette flankierenden loxP-Sequenzen, vorliegen), SacI-EcoRI-SalI-SacI (zum Klonieren der HPRT-Kassette) und PvuI-EcoRI-AscI-BssHII (zur Klonierung des BAT2loxP-Fragments in den Vektor pBCSK+, sowie das Einfügen einer singulären AscI-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende des N-terminalen BAT2-Fragments). Alle Primer für die Sequenzierungen sind im „Material und Methoden“ Teil aufgelistet (Kapitel 2.2.4).

3.10 Cre-vermittelte Deletion der HPRT-Kassette, Exon 1, Exon 2 und der anliegenden Intronbereiche

In diesem Versuch wurde die Funktionsfähigkeit der eingefügten loxP-Sequenzen überprüft. Der pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektor wurde mit drei loxP Sequenzen ausgestattet. Die erste loxP-Sequenz liegt am N-terminalen Teil des langen homologen Armes, desweiterem flankieren zwei loxP-Sequenzen eine HPRT-Kassette, die in das Intron 2 von BAT2 eingefügt wurde. Die Funktionsfähigkeit wurde überprüft, indem das pBCSK+-BAT2-flox-TK Konstrukt in Cre-Rekombinase ausprägende *E. coli* Bakterien (MM294-Cre) transformiert wurde (Buchholz *et al.*, 1996). Die konstitutiv exprimierte Sequenz-spezifische DNA-Rekombinase Cre sollte die von loxP Sequenzen eingefassten Bereiche; Exon 1, Exon 2 (und

damit auch den vermutlichen Promotorbereich im Exon 1 und das Startcodon in Exon 2), die mit loxP-Sequenzen flankierte HPRT-Kassette, sowie die anliegenden Intronbereiche aus dem pBCSK+-BAT2-flox-TK-Vektor heraustrennen. Um die herausgetrennten Bereiche darzustellen, wurde parallel zum pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektor, der in Cre-Rekombinase ausprägende *E. coli* Bakterien transformiert wurde, das pBCSK+-BAT2-flox-TK Konstrukt, welches nicht mit der Cre-Rekombinase behandelt wurde, mit den Restriktionsendonukleasen AscI/PmeI und mit PmeI geschnitten und auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die errechneten Fragmentgrößen stimmten mit den nachgewiesenen Fragmentgrößen überein, womit das Fehlen der mit loxP-Sequenzen flankierte Bereich und damit die Funktionsfähigkeit der loxP-Sequenzen innerhalb des pBCSK+-BAT2-flox-TK Konstrukt gezeigt werden konnte. Die Restriktionsanalyse und die dazugehörigen Vektorkarten sind in Abbildung 3.33 zu sehen. Die nach der Restriktion entstandenen Fragmentgrößen sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

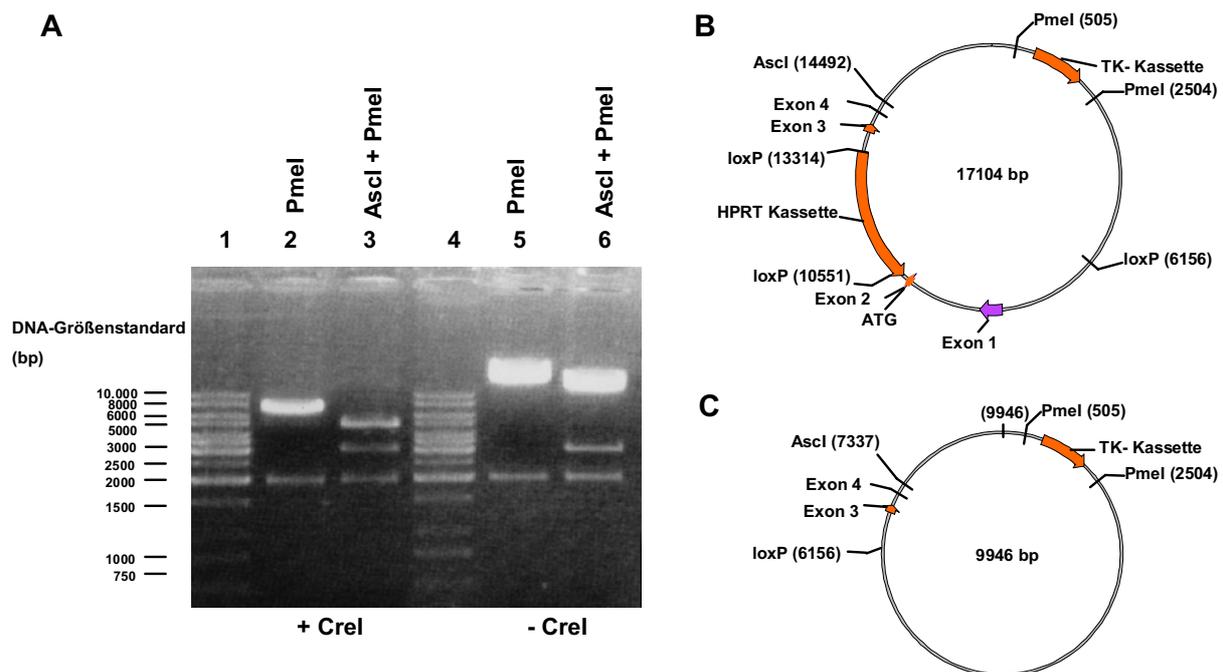


Abb. 3.33: Überprüfung der Funktionsfähigkeit der loxP-Sequenzen des pBCSK+-BAT2-flox-TK Konstrukts. Die Funktionsfähigkeit der loxP-Sequenzen des BAT2-flox-TK Konstrukts wurde durch Transformation von pBCSK+-BAT2-flox-TK in Cre-Rekombinase ausprägende *E. coli* Bakterien (MM294-Cre) überprüft. Von den Klonen wurden Bakterienkulturen angelegt und daraus die Plasmid-DNA gewonnen. Die DNA wurde entweder mit den Restriktionsenzymen PmeI (Spur 2, 5) oder mit AscI/ PmeI (Spur 3, 6) geschnitten und in einem 1,5 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Spur 1, 4: DNA-Größenstandard; Spur 2, 3: Spaltmuster vom pBCSK+-BAT2-flox-TK Konstrukt, welches in Cre-Rekombinase ausprägende *E. coli* Bakterien transformiert wurde; Spur 5, 6: Spaltmuster vom unbehandelten pBCSK+-BAT2-flox-TK Konstrukt (welches nicht in Cre-Rekombinase ausprägende *E. coli* Bakterien transformiert wurde). Das Fehlen von loxP flankierenden Sequenzen bewirkte bei aus den Transformanten präparierten Plasmiden ein im Vergleich zum unbehandelten pBCSK+-BAT2-flox-TK Konstrukt verändertes Spaltmuster. PmeI-Spaltsmuster: (Spur 2) pBCSK+-BAT2-flox-TK/MM294-Cre (9,9 kb): 7,9; 2,0 kb; (Spur 5) pBCSK+-BAT2-flox-TK (17,1 kb): 15,1; 2,0 kb; AscI/PmeI-Spaltsmuster: (Spur 3) pBCSK+-BAT2-flox-TK/MM294-Cre (9,9 kb): 4,8; 3,1; 2,0 kb; (Spur 6) pBCSK+-BAT2-flox-TK (17,1 kb): 12,0; 3,1; 2,0 kb. (B) Vektorkarte des Konstrukts pBCSK+-BAT2-flox-TK und (C) des Konstrukts pBCSK+-BAT2-flox-TK/MM294-Cre mit den jeweils verwendeten Restriktionsendonukleasen.

Restriktasen	pBCSK+-BAT2-flox-TK	pBCSK+-BAT2-flox-TK/MM294-Cre
PmeI	15,1; 2,0 kb	7,9; 2,0 kb
AscI/PmeI	12,0; 3,1; 2,0 kb	4,8; 3,1; 2,0 kb

Tab. 3.3: Fragmentgrößen von pBCSK+-BAT2-flox-TK und pBCSK+-BAT2-flox-TK/MM294-Cre nach Restriktionsanalyse mit PmeI und AscI/PmeI.

3.11 Klonierung des PCR Testvektors PCR-pBCSK+-BAT2-flox

Für die Etablierung der PCR zum Nachweis homolog rekombinierter ES-Klone wurde der PCR-Testvektor PCR-pBCSK+-BAT2-flox hergestellt. Dieser Vektor wurde auch als Positivkontrolle zur PCR-Analyse von homolog rekombinierten ES-Klonen eingesetzt. Um geeignete Reverse-Primer zu testen sollte der pBCSK+-BAT2-flox-Vektor am kurzen homologen Arm am 3'-Ende um ein ca. 1,8 kb großes Fragment verlängert werden. Für die Verlängerung wurde aus genomischer DNA von HM-1-Zellen ein ca. 1,8 kb großes Fragment, welches Exon 5-10 sowie die flankierenden Introns beinhaltet, mit den Primern P.6061.F und P.8010-AscI.R amplifiziert. Am 5'-Ende liegt die KpnI-Restriktionsschnittstelle. Da am 3'-Ende keine passende Restriktionsschnittstelle zur Verfügung stand, wurde über den Primer P.8010-AscI.R eine zusätzliche AscI-Restriktionsschnittstelle eingebracht. Das amplifizierte KpnI/AscI-Fragment wurde in einen pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Aus dem pCRII-TOPO-Vektor wurde das ca. 1,8 kb große Fragment mit den Restriktionsenzymen KpnI und AscI ausgeschnitten und in einen mit KpnI/AscI geschnittenen pBCSK+-BAT2-flox-Vektor umklont. Der auf diese Weise erzeugte PCR-pBCSK+-BAT2-flox Vektor enthält nun am 3'-Ende des kurzen Arms eine 1,8 kb große Verlängerung der homologen Sequenz des BAT2-Gens (Abb. 3.34).

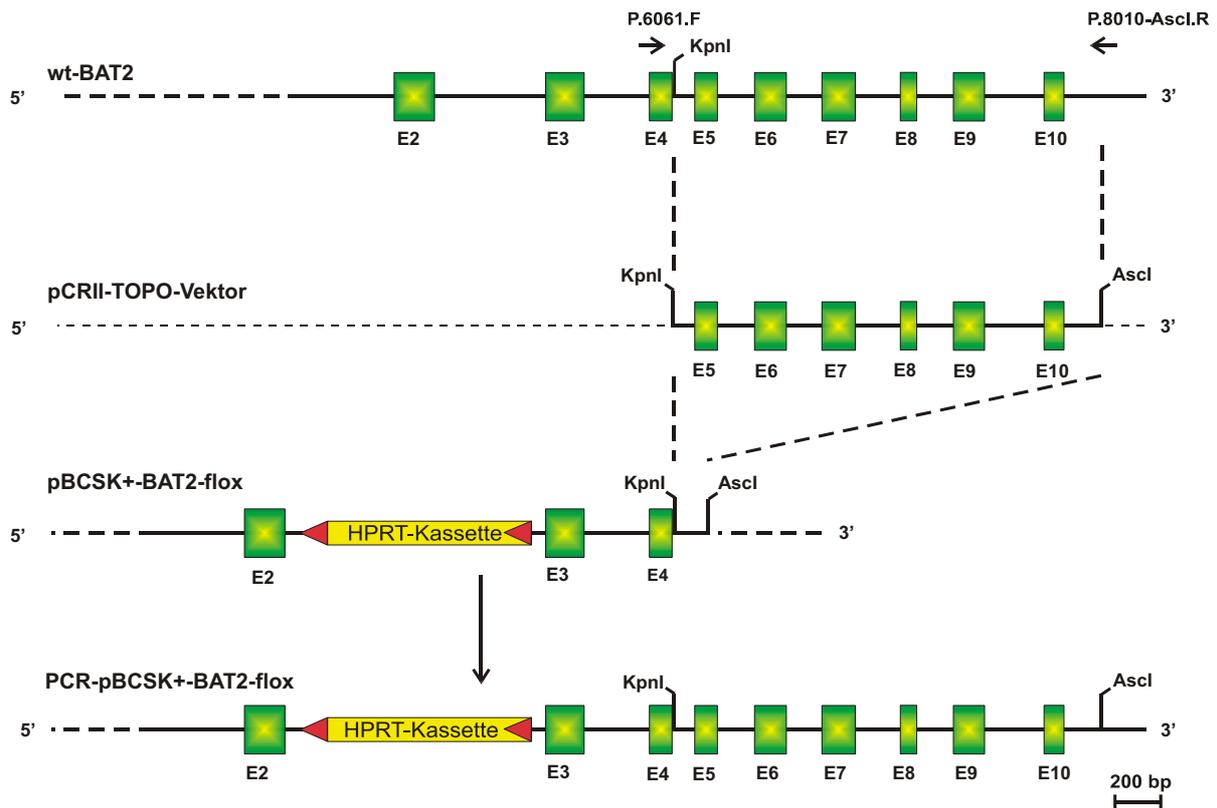


Abb. 3.34: Klonierung des PCR-pBCSK+-BAT2-flox-Test-Vektors. Der 3'-untranslatierte Bereich des N-terminalen BAT2-flox Fragments, der als kurzes homologes Fragment eingesetzt wird, sollte um ein ca. 1,8 kb großes homologes Fragment erweitert werden. Das 1,8 kb große genomische Fragment beinhaltet Exon 5-10, sowie die zugehörigen Introns des BAT2 Gens. Das Fragment wurde unter Verwendung von genomischer DNA aus HM-1 ES-Zellen als Matrize durch PCR amplifiziert. Hierzu wurden die Primer P.6061.F und P.8010-Ascl.R verwendet. In dem Primer P.8010-Ascl.R wurde noch die Sequenz einer Ascl-Restriktionsschnittstelle eingefügt. Das erhaltene Produkt wurde in einen pCRII-TOPO-Vektor kloniert. Aus dem pCRII-TOPO wurde das ca. 1,8 kb große Fragment mit den Restriktionsenzymen KpnI und Ascl ausgeschnitten und in einen mit KpnI/Ascl geschnittenen pBCSK+-BAT2-flox-Vektor umklontiert.

3.11.1 Restriktionsanalyse des PCR-pBCSK+-BAT2-flox-Vektors

Nach Beendigung der Klonierung des PCR-pBCSK+-BAT2-flox Konstruktes, wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe der Restriktionsanalyse auf Einbau des KpnI/Ascl-Fragments an der 3'-erweiterten Region von pBCSK+-BAT2-flox untersucht. Hierzu wurde die Plasmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen Ascl/KpnI und EcoRV/KpnI für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und auf einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen ergaben Fragmente von erwarteter Größe (Abb. 3.35).

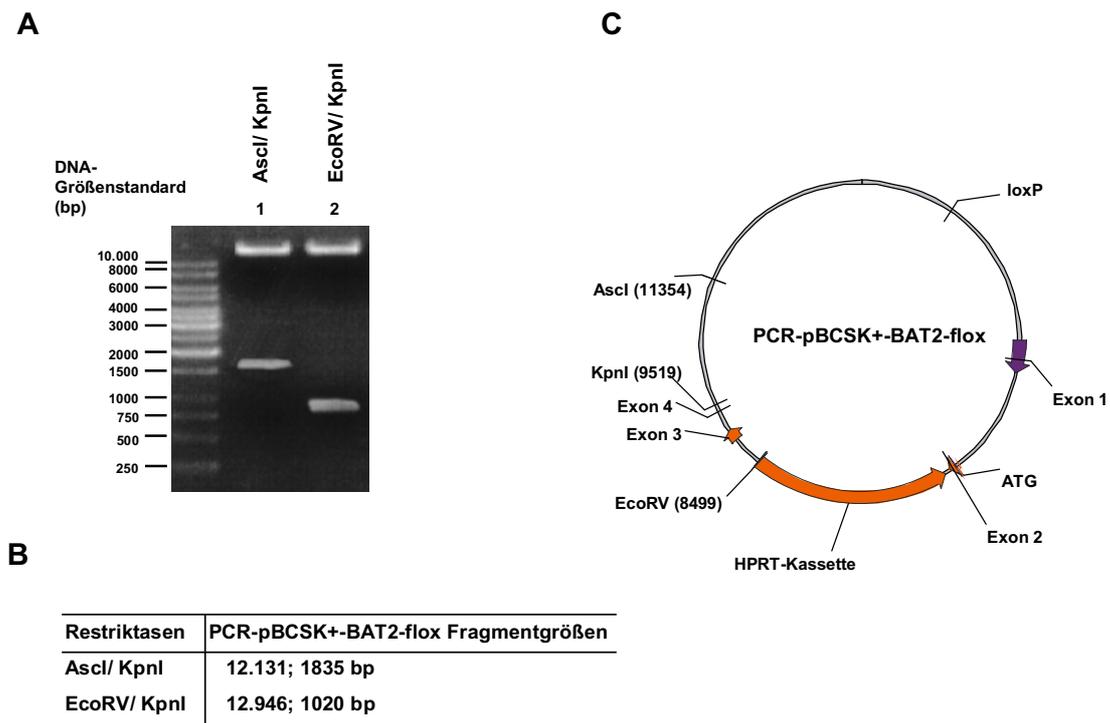


Abb. 3.35: Restriktionsanalyse des Vektors PCR-pBCSK+-BAT2-flox. Zur Überprüfung wurde der fertige PCR-Testvektor nach Fertigstellung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Der Verdau des PCR-pBCSK+-BAT2-flox-Vektors mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen erfolgte über 1 Stunde bei 37 °C. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1 %igen Agarose-Gel. (A) Die eingesetzten Restriktionsendonukleasen ergaben Fragmente erwarteter Größe. Spur 1: (AsclI/KpnI) 12.131; 1835 bp; Spur 2: (EcoRV/KpnI) 12.946; 1020 bp. Links befindet sich der DNA Größenstandard. (B) Tabelle der Restriktasen und der PCR-pBCSK+-BAT2-flox Fragmentgrößen. (C) Vektorkarte von PCR-pBCSK+-BAT2-flox.

3.12 Strategie und Etablierung der PCR für den Nachweis von homolog rekombinierter ES-Zellklone

Die Strategie der PCR beruht darauf, dass ein Primer gerade außerhalb des kurzen Armes der homologen Sequenz des pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektors und der andere Primer innerhalb des Plasmids in einer eingeführten nicht-genomische Sequenz gewählt wird. Eine Amplifikation ist nur dann möglich, wenn sich der Vektor durch homologe Rekombination in den gewünschten Locus inseriert hat. Der Forward-Primer P1.F zum Nachweis der homologen Rekombination, lagert sich am 3'-Ende der HPRT-Kassette an. Der zugehörige Reverse-Primer P3.R bindet ca. 1,3 kb außerhalb des Vektors stromabwärts an der genomischen DNA. Zwei weitere Primerpaare (P1.F und P4.R: Fragmentgröße 611 bp; P2.F und P3.R: Fragmentgröße 1142 bp) wurden zur Kontrolle der PCR-Reaktion eingesetzt (Abb. 3.36). Mit dem PCR-pBCSK+-BAT2-flox Vektor und in Gegenwart von HM-1

genomischer DNA wurden alle Primerpaare getestet und das PCR-Programm für den Nachweis etabliert. Dazu wurde die PCR mit 30-35 Zyklen bei verschiedenen Anlagerungs-Temperaturen durchgeführt und die PCR-Bedingungen durch Verwendung weniger ES-Zellen optimiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Amplifikat schon beim Einsatz von genomischer DNA aus 20 ES-Zellen nachgewiesen werden kann (nicht dargestellt).

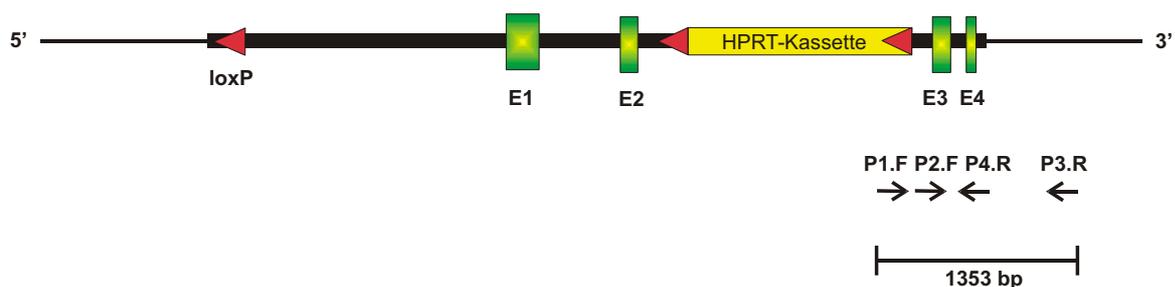


Abb. 3.36: PCR-Strategie für die Analyse von pBCSK+-BAT2-flox-TK transfizierten ES-Zellen auf homologe Rekombination. Dargestellt ist der mutierte Locus nach der homologen Rekombination. Würde man mit der genomischen DNA der isolierten ES-Zellen eine PCR durchführen, so erhielte man mit den Primern P1.F, welcher sich am 3'-Ende der HPRT-Kassette anlagert, und P3.R ein 1353 bp großes Amplifikat. Der verwendete Primer P3.R liegt außerhalb des transfizierten Vektors und lagert sich somit nur im Wildtyp-Allel an. Die Primerpaare P1.F und P4.R (Fragmentgröße: 611 bp), sowie P2.F und P3.R (Fragmentgröße: 1142) dienen zur Kontrolle der PCR-Reaktion. Primer sind als kleine Pfeile dargestellt.

3.13 Analyse der mit pBCSK+-BAT2-flox-TK-DNA transfizierten ES-Zellen

3.13.1 PCR-Analyse

Nach Beendigung der Klonierung des pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektors wurde dieser für die Transfektion mit ES-Zellen eingesetzt. Hierzu wurden ca. 200-250 µg Plasmid-DNA des pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektors mit der Restriktionsendonuklease *AscI* linearisiert. Mit dem linearisierten Vektor wurden anschließend ES-Zellen durch Elektroporation transfiziert. Am Tag 11-13 nach der Transfektion wurden die HAT- und Ganciclovir-resistenten ES-Zellkolonien isoliert und eine Hälfte der jeweiligen Zellkolonie auf eine 48-Loch-Schale überführt und subkultiviert. Die andere Hälfte wurde für die PCR-Analyse verwendet. Für die PCR-Analyse wurden jeweils 10-15 µl genomische DNA aus dem jeweiligen ES-Zellklon

eingesetzt und die Primer P1.F und P3.R verwendet. Von 1443 isolierten ES-Zellklonen zeigten 10 Klone ein positives PCR-Signal und waren somit homolog rekombiniert. In Abbildung 3.37 sind die positiven ES-Zellen mit rot gekennzeichnet.

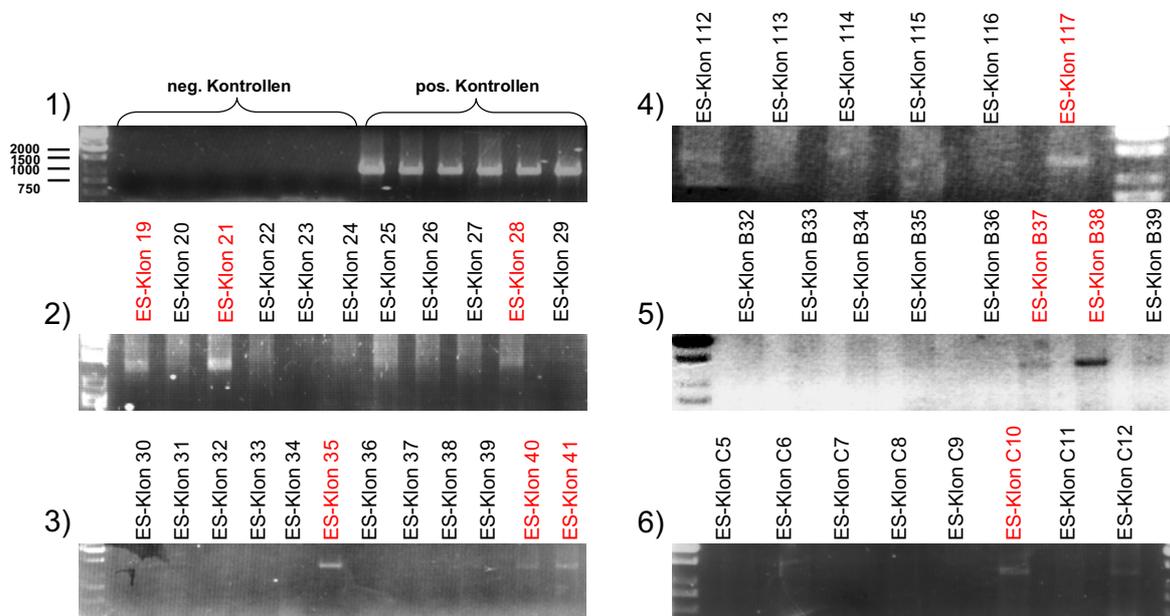


Abb. 3.37: Überprüfung der homologen Rekombination des pBCSK+-BAT2-flox-TK-Konstrukts im BAT3 Locus von HAT- und Ganciclovir-resistenten ES-Zellklonen mit Hilfe der PCR. Nach der PCR wurden je 15 μ l des PCR-Reaktionsansatzes pro Tasche in einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. 1) Zu jedem PCR-Ansatz wurden negativ-Kontrollen (Mock) und positiv-Kontrollen (PCR-pBCSK+-BAT2-flox Vektor mit den Primern P2.F/P3.R) mitgeführt. Die Abbildung zeigt 10 ES-Klone, die ein Signal bei 1,3 kb aufweisen: 2) ES-Klon 19, ES-Klon 21, ES-Klon 28; 3) ES-Klon 35, ES-Klon 40 und ES-Klon 41; 4) ES-Klon 117; 5) ES-Klon B37, ES-Klon B38; 6) ES-Klon C10. Diese Klone haben anscheinend das Allel BAT2-flox homolog im BAT2 Locus rekombiniert. Die übrigen 1433 isolierten ES-Klone waren negativ. Der 1 kb-DNA-Größenstandard wurde exemplarisch links in 1) eingezeichnet.

3.13.2 Southern Blot-Analyse

Die anhand der PCR-Analyse nachgewiesenen positiven ES-Zellen wurden weiterhin durch Southern Blot Hybridisierung unter Verwendung einer extern vom Austauschvektor gelegenen Sonde und einer intern gelegenen Sonde auf homologe Rekombination des Genaktivierungsvektors im BAT2 Locus und auf einfache Integration getestet (siehe Abb. 3.38). Hierzu wurde die genomische DNA der Klone mit der Restriktionsendonuklease ScaI geschnitten, auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit einem radioaktiv markierten IS-Fragment (1108 bp) hybridisiert. Das IS-Fragment diente als interne Sonde und wurde aus der HPRT-Kassette mit den Primern BAT2.IS.F und BAT2.IS.R amplifiziert. Im Falle der Einzelintegration ist im

Autoradiogramm eine einzelne Bande bei 3,8 kb zu erwarten. Um die homologe Rekombination nachzuweisen, wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten externen Sonde hybridisiert. Die externe Sonde (1033 bp) wurde unter Verwendung von genomischer DNA aus HM-1 ES-Zellen durch PCR mit Hilfe der Primer BAT2.6468.F und BAT2.7501.R amplifiziert. Im Falle einer homologen Rekombination hybridisiert neben dem 5,3 kb langen Wildtyp-Fragment ein zusätzliches 3,8 kb großes Fragment. Die Sonden wurden im Vorfeld auf genomische DNA von Wildtyp-Mäusen bzw. mit dem PCR-Testvektor getestet (nicht gezeigt). Die in der PCR-Analyse positiv nachgewiesenen ES-Zellen konnten in Southern Blot-Analysen nicht verifiziert werden (nicht gezeigt).

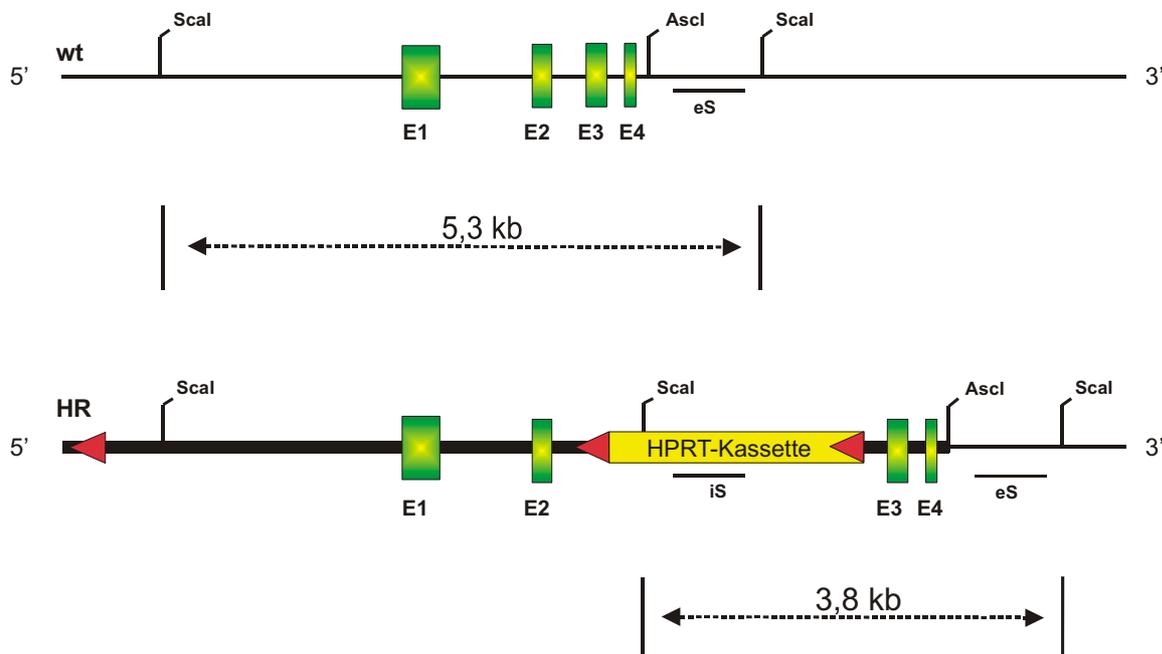


Abb. 3.38: Southern Blot-Strategie, für die Analyse der mit pBCSK+-BAT2-flox-Konstrukten transfizierten ES-Zellen auf homologe Rekombination. Dargestellt ist der N-terminale Wildtyp (wt) Locus des BAT2-Gens, sowie der mutierte Locus nach der homologen Rekombination (HR). Die genomische DNA der transfizierten ES-Zellen wird mit der Restriktionsendonuklease Scal geschnitten und im Southern Blot mit der externen Sonde (eS) und der internen Sonde (iS) untersucht. Die externe Sonde hybridisiert im Wildtyp-Lokus, ist also nicht Bestandteil des transfizierten Vektors. Erfolgt eine homologe Rekombination, so hybridisiert neben dem 5,3 kb langen Wildtyp-Fragment ein zusätzliches 3,8 kb großes Fragment des mutierten Allels. Mit der Hybridisierung der internen Sonde wird die Anzahl der integrierten Kopien des Vektors ermittelt.

4 Diskussion

4.1 Klonierung von *BAT3*-Spleißvarianten

Banerji *et al.* veröffentlichten 1990 die cDNA-Sequenz von *BAT3*. Die cDNA-Sequenz von *BAT3* ist 3,7 kb groß und kodiert für ein Protein von 1132 Aminosäuren. In der Arbeit von Winkler (2003) wurde mittels RT-PCR aus der Raji-Zelllinie eine *BAT3*-cDNA amplifiziert und kloniert. Diese neu klonierte *BAT3*-cDNA unterscheidet sich in drei Merkmalen von der von Banerji *et al.* (1990) beschriebenen *BAT3*-cDNA. So enthielt die von Winkler klonierte cDNA einen verschobenen Startpunkt für Exon 7, ein zusätzliches Exon 11b und es fehlte in dieser cDNA das Exon 24. Das zusätzliche Exon 11b ist 108 bp lang. Analysen der EST-Datenbank ergaben, dass 25 % aller *BAT3*-Klone das Exon 11b enthalten. Wie Exon 11b ist auch Exon 24 alternativ gespleißt. Ein Drittel der *BAT3*-cDNA-Klone der dbEST enthält kein Exon 24 (Winkler, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Fusions-PCR fünf *BAT3*-Spleißvarianten kloniert: *BAT3*ΔExon 5, *BAT3*ΔExon 11, *BAT3*ΔExon 11b, *BAT3*ΔExon 22 und *BAT3*+Exon 24, wobei die Nukleotide an den Intron-Exon-Grenzen den kanonischen Spleißsequenzen entsprechen. Die klonierten *BAT3*-Spleißvarianten wurden erfolgreich in COS-7-Zellen exprimiert und für die folgenden Experimente verwendet.

4.2 Alle untersuchten *BAT3*-Isoformen sind im Zellkern lokalisiert

BAT3 besitzt eine zweigeteilte Kernlokalisierungssequenz. Mutationen in der Kernlokalisierungssequenz führen zu zytoplasmatischen Formen von *BAT3*. Es konnte aber auch ein C-terminales *BAT3*-Fragment ohne Kernlokalisierungssignal (*BAT3*-313ΔNLS, 32 kDa), im Nukleus nachgewiesen werden (Manchen & Hubberstey, 2001). Diese Beobachtung könnte allerdings darauf beruhen, dass kleine Proteine (kleiner als 40 kDa) passiv durch die Kernporen-Komplexe transportiert werden können (Robbins *et al.*, 1991). Studien, in der die *BAT3*-cDNA (ebenfalls ohne Exon 24) aus der Ratte kloniert und charakterisiert wurde, zeigen, dass das *BAT3*-Rattenortholog im Zytoplasma lokalisiert ist (Ozaki *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit hergestellten *BAT3*-Spleißvarianten besitzen alle ein komplettes Kernlokalisierungssignal. Das Kernlokalisierungssignal könnte aus sterischen

Gründen unzugänglich sein, wenn andere Exons aufgrund differentiellen Spleißens fehlen und somit die Lokalisierung von BAT3 verändert sein. Nachdem zunächst die Expression der BAT3-Spleißvarianten mittels Western Blot nachgewiesen wurde, wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz die Lokalisation der jeweiligen Isoformen untersucht. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass alle BAT3-Isoformen ausschließlich im Zellkern vorkommen. Die Deletionen der verschiedenen Exons haben also keinen Einfluss auf die Lokalisation von BAT3.

BAT3 besitzt eine kanonische Caspase-3-Spaltungssequenz (DEQD¹⁰⁰¹, Talanian *et al.*, 1997; Thornberry *et al.*, 1997) in der C-terminalen Region. Manchen *et al.* (2001) vermuten daher, dass nach Induktion der Apoptose BAT3 geschnitten wird. Durch die Abspaltung des C-terminalen Abschnitts (enthält die Kernlokalisierungssequenz), sollte die Ansammlung von BAT3 im Zellkern verhindert werden. Hierfür wurde in Hela-Zellen nach der Transfektion mit BAT3 Apoptose durch Behandlung mit Staurosporin induziert. Immunofluoreszenz-Daten zeigten allerdings, dass BAT3 trotzdem im Nukleus lokalisiert bleibt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass BAT3 während der Apoptose nicht an der Caspase-3-Spaltungssequenz geschnitten wird. Die Arbeitsgruppe um Wu (2004) konnte jedoch zeigen, dass das toxische Protein Rizin mittels Caspase-3-Aktivierung zur Spaltung von BAT3 führt (siehe Abb. 4.1). Das dabei freigewordene C-terminale Fragment besteht aus 131 Aminosäureresten und wird als CTF-131 bezeichnet. Die Expression von CTF-131 vermittelt morphologische Veränderungen wie z.B. Schrumpfen des Kerns und Verlust der Membranasymmetrie (Exposition von Phosphatidylserin nach außen), während die DNA-Fragmentierung durch andere Faktoren ausgelöst wird (Wu *et al.*, 2004).

Caspase-3-Aktivität kann zuerst im Zytosol nachgewiesen werden und erst später im Kern (Takemoto *et al.*, 2003). Da das menschliche BAT3 ein kernlokalisiertes Protein ist und die Caspase-3 im Zytoplasma nachweisbar ist, muss Caspase-3 während der Apoptose vom Zytosol in den Kern gelangen, um BAT3 zu spalten. Faleiro und Lazebnik (2000) vermuten, dass während der Apoptose die im Vergleich zu Caspase-3 früher aktivierte Caspase-9 die Durchlässigkeit der Kernporen erhöht und so u.a. der Caspase-3 die Diffusion in den Kern ermöglicht. Obwohl das CTF-13 Kernlokalisierungssignale besitzt, wurde es vorwiegend im Zytoplasma nachgewiesen (Wu *et al.*, 2004). Um die Aufgabe der BAG-Domäne zu untersuchen wurde die im rekombinanten CTF-131-Molekül vorhandene BAG-Domäne deletiert (CTF-ΔBAG). Für das neu hergestellte CTF-ΔBAG wurde eine verstärkte Ansammlung im Kern beobachtet, wobei sich die Morphologie in den CTF-ΔBAG-exprimierenden Zellen nicht verändert. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die BAG-

Domäne eine wichtige Rolle für die zytoplasmatische Lokalisierung von CTF-131 nach der Spaltung von BAT3 durch Caspase-3 spielt bzw. die BAG-Domäne möglicherweise ein zytoplasmatisches Zielsignal besitzt, welches erst nach der Spaltung von BAT3 durch die Caspase-3 aktiv wird (Wu *et al.*, 2004).

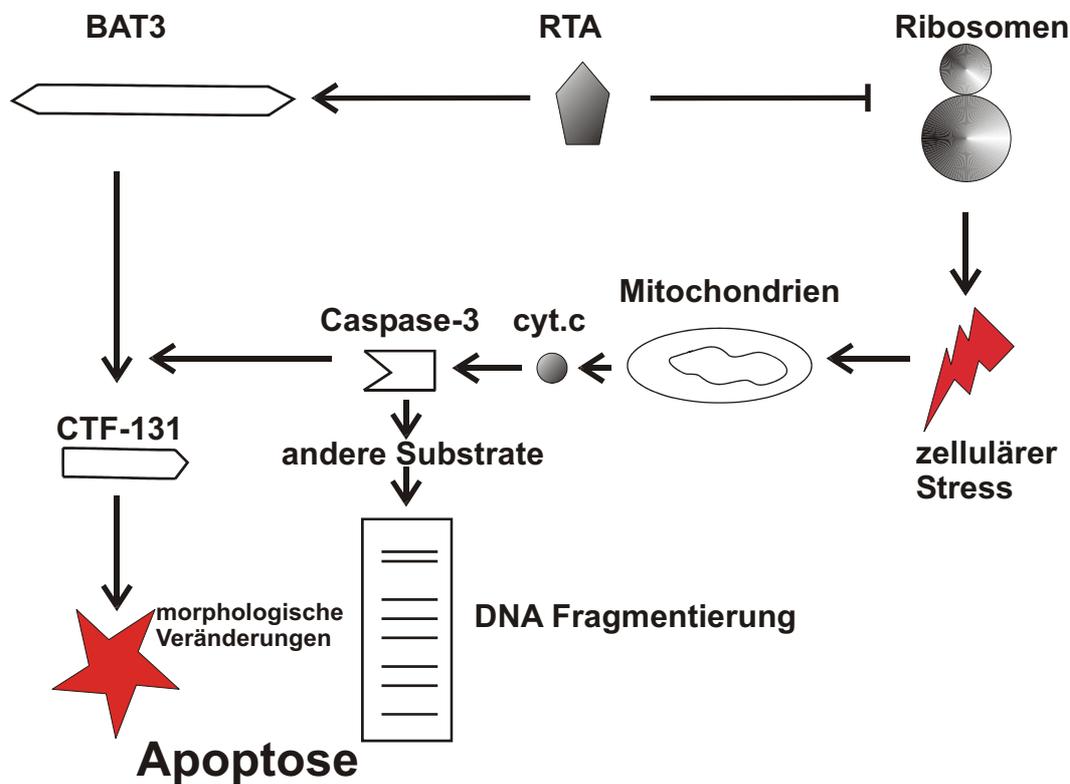


Abb. 4.1: Modell für Rizin-induzierte Apoptose. Rizin aus dem Samen von *Ricinus communis* (Lin *et al.*, 1970) hemmt den Stoffwechsel durch Inhibition der Proteinbiosynthese und induziert dadurch Apoptose (Baluna *et al.*, 2000; Brigotti *et al.*, 2002). Es besteht aus einer toxischen A-Kette (RTA) mit einer RNA N-Glykosidaseaktivität und einer galaktosebindenden B-Kette (RTB) mit Lektinaktivität (Endo & Tsurugi, 1988; Lord *et al.*, 1994). Die A-Kette (RTA) von Rizin induziert programmierten Zelltod, indem ihre RNA durch N-Glykosidaseaktivität die Translation inhibiert und so zellulären Stress verursacht. Aufgrund des zellulären Stresses wird über die Mitochondrien die Caspase-Kaskade ausgelöst, welche Apoptose induziert. Die Bindung von RTA an BAT3 fördert die Spaltung von BAT3 durch die Caspase-3. Das durch die Spaltung freigewordene C-terminale BAT3-Fragment, CTF-131, vermittelt morphologische Veränderungen in der Zelle. Die DNA-Fragmentierung erfolgt durch andere Substrate, die durch Rizin indirekt aktiviert worden sind. Cyt.c steht für Cytochrom C. (Abbildung verändert nach Wu *et al.*, 2004).

Beim Vergleich der Ergebnisse von Manchen & Hubberstey (2001) und Wu *et al.* (2004) stellt sich die Frage, warum BAT3 nach der Induktion der Apoptose durch Staurosporin bzw. Rizin in einem Fall durch die aktivierte Caspase-3 geschnitten (Rizin) und im anderen Fall durch die aktivierte Caspase-3 nicht geschnitten wird (Staurosporin). Vergleicht man Rizin mit anderen Induktoren der Apoptose, wie z.B. Cycloheximid, Thapsigargin, Tunikamyzin,

Camtothezin oder Etoposid, so kann nur das Rizin die Spaltung von BAT3 induzieren und so das Fragment CTF-131 freisetzen (Wu *et al.*, 2004). Welchem Mechanismus unterliegt BAT3, der entscheidet, ob BAT3 während der Apoptose durch die Caspase-3 geschnitten wird oder nicht und ob BAT3 aufgrund dessen einen Einfluss auf die Zelle ausübt?

Interessant ist die Lage der kanonischen Caspase-3-Spaltungssequenz (DEQD¹⁰⁰¹) im Exon 22 des BAT3-Gens. Da es vom BAT3-Transkript mehrere Spleißvarianten gibt, darunter auch eine Spleißvariante BAT3 Δ Exon 22, stellt sich die Frage, welche Funktion diese Spleißvariante ohne Caspase-3-Spaltungssequenz hat. Diese BAT3-Variante kann nicht geschnitten werden und könnte ein Antagonist zu BAT3 während der Apoptose sein.

Ein weiterer Antagonist könnte die Spleißvariante BAT3 Δ Exon 24 sein, da hier ein Teil der BAG-Domäne fehlt. Im Gegensatz zu CTF-131, welches apoptosetypische morphologische Veränderungen in der Zelle induziert, verändert sich der morphologische Zustand der Zelle in Gegenwart von rekombinanten CTF- Δ BAG nicht. Nach Spaltung der Isoform BAT3 Δ Exon 24, also ohne BAG-Domäne, würden keine morphologischen Veränderungen in der Zelle auftreten. Die Frage nach der Rolle der BAT3-Isoformen (Δ Exon 22 bzw. Δ Exon 24) bei der Rizin-induzierten Apoptose muss in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

4.3 Haben BAT3 und BAT2 einen Einfluss auf die CHIP-vermittelte Degradation des Glukokortikoidrezeptors?

BAG-1 kann gleichzeitig mit Hsp70 und dem Proteasom interagieren, wobei BAG-1 als Adaptermolekül zwischen Hsp70 und dem Proteasom fungiert und somit das Chaperonsystem mit dem System der proteasomalen Proteindegradation verbindet (Lüders *et al.*, 2000a). Desweiteren kann BAG-1 zusammen mit CHIP die Degradation Chaperon-gebundener Substrate fördern (Demand *et al.*, 2001). Während für CHIP gezeigt wurde, dass es auch alleine die Degradation des Glukokortikoidrezeptors (GR) in der Zelle fördert, ist dies für BAG-1 alleine nicht nachgewiesen worden (Connell *et al.*, 2001). In Koexpressionsversuchen mit CHIP und BAG-1 nimmt die Proteinmenge von GR stärker ab als bei alleiniger Expression von CHIP. Beide Proteine, CHIP und BAG-1, assoziieren miteinander, regulieren und induzieren zusammen die Degradation von Chaperonsubstraten (Demand *et al.*, 2001). BAT3 ähnelt in dieser Hinsicht BAG-1, da es auch zwei unterschiedliche Domänen aufweist. BAT3 besitzt am N-Terminus eine Ubiquitin-ähnliche Domäne, die auch in allen BAG-1-Isoformen vorhanden ist. Weiterhin besitzt das in dieser Arbeit hergestellte Konstrukt

BAT3+Exon 24 eine vollständige BAG-Domäne, während bei den anderen BAT3-Konstrukten das Exon 24 und somit auch die BAG-Domäne fehlt. Aufgrund der Ähnlichkeiten zu BAG-1 wurde der Einfluss der hergestellten BAT3-Konstrukte auf die CHIP-vermittelte Degradation des GR untersucht. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass alle untersuchten BAT3-Isoformen in der Gegenwart von CHIP die Menge von GR stärker reduzieren als CHIP alleine. Die Isoformen BAT3 Δ Exon 5, BAT3 Δ Exon 11, BAT3 Δ Exon 11b, BAT3 Δ Exon 22 und BAT3 Δ Exon 24, die keine BAG-Domäne besitzen, zeigen den gleichen Einfluss auf die Degradation von GR wie ein BAT3 mit intakter BAG-Domäne. Anscheinend hat die BAG-Domäne von BAT3 im Degradationsversuch keinen Einfluss. BAG-Proteine können über ihre BAG-Domäne an die ATPase-Domäne von Hsc70/Hsp70 binden (Takayama *et al.*, 1997). BAG-1 bindet über die Ubiquitin-ähnliche Domäne an das Proteasom (Lüders *et al.*, 2000). Es ist möglich, dass der Einfluss von BAT3 auf die Degradation von GR auf die Ubiquitin-ähnliche Domäne zurückzuführen ist. In zukünftigen Versuchen könnte diese Ubiquitin-ähnliche Domäne deletiert werden, um zu untersuchen, ob sie für den Einfluss auf die Proteindegradation notwendig ist. Weiterhin sollte die Wirkung der Spleißform BAT3 Δ Exon 11b genauer untersucht werden. Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Spleißform BAT3 Δ Exon 11b auch ohne CHIP einen Einfluss auf die GR-Degradation besitzt, da Transfektionen mit BAT3 Δ Exon 11b alleine in verschiedenen Versuchen ein inkonsistentes Bild bezüglich des GR-Abbaus ergaben (nicht gezeigt).

Da in den bisherigen Versuchen immer die gleiche Proteinmenge verwendet wurde, sollte in zukünftigen Versuchen die Proteinmenge von BAT3 variiert werden, um zu untersuchen, ab welcher Menge BAT3 einen Einfluss auf die CHIP-vermittelte Degradation von GR ausübt. BAT2 hat dagegen keinen Einfluss auf die CHIP-vermittelte Degradation des GR. In Anwesenheit von CHIP und BAT2 wurde GR nicht stärker degradiert als in Zellen, die nur CHIP exprimieren. Dies weist darauf hin, dass die CHIP-vermittelte Degradation des GR spezifisch durch BAT3-Spleißvarianten gefördert wird. In zukünftigen Experimenten muss der gleiche Versuchsansatz in Gegenwart eines Proteasominhibitors wie z.B. Laktazystin durchgeführt werden, um zu kontrollieren, dass es sich um proteasomale Abbauprozesse handelt. Da die cDNA-Menge bei der transienten Transfektion von Zellen begrenzt ist, ist es vorteilhaft, transiente Transfektionen mit mehreren cDNAs zu vermeiden. Daher wurde für zukünftige Versuche die Hamster-Fibroblasten-Zelllinie CHO jeweils stabil mit GR, BAT3+Exon24, bzw. GR+BAT3 transfiziert. Die Expressionsstärke der Proteine in den verschiedenen Zelllinien wurde mit dem jeweiligen Antikörper im Western Blot bestimmt.

Mit diesen Zelllinien kann ein Zellkultursystem mit homogener und stabiler BAT3-Expression für die Degradationsversuche etabliert werden.

Alle untersuchten BAT3-Isoformen fördern gleichermaßen die CHIP-vermittelte Degradation des Glukokortikoidrezeptors. Es ist möglich, dass die verschiedenen BAT3-Isoformen außer mit CHIP auch mit anderen Kofaktoren interagieren und die Degradation von GR beeinflussen. Daher wäre es interessant weitere Kofaktoren in Zusammenhang mit BAT3 zu analysieren. Weitere BAT3-assoziierte Proteine könnten bei der Proteindegradation eine Rolle spielen: mit Hilfe des *yeast two-hybrid* (Y2H) *system* wurden mit MGC14421, FLJ20552 und SGT1 drei Interaktionspartner von BAT3 identifiziert, die mit der ubiquitin-ähnlichen Domäne am N-terminalen Abschnitt des BAT3-Proteins (Aminosäuren 1-96) interagieren (Lehner *et al.*, 2004). SGT1 zeigt große Ähnlichkeit zu CHIP, so besitzt SGT1 auch eine sich wiederholende Tetratrikopeptiddomäne (TPR), welche eine Protein-Protein-Interaktion vermittelt, wie z.B. bei der Bindung von Hsp70 mit anderen Kochaperonen (Scheufler *et al.*, 2000). SGT1 kann ebenfalls mit Hsp70 interagieren (Tobaben *et al.*, 2001) und gehört zu einem Teil des SCF E3 Ubiquitinligasekomplexes (Kitagawa *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten könnte SGT1 bzw. der SCF-Komplex mit BAT3 kooperieren und in die Proteinfaltung und -degradation eingreifen, ähnlich der Interaktion von CHIP mit BAG-1. Die Proteine MGC14421 und FLJ20552 sind weitgehend uncharakterisiert, allerdings enthalten sie Domänen, die häufig in Proteinen mit einer Rolle bei der Proteindegradation vorkommen. FLJ20552 enthält eine Ringfinger-Domäne, und das Protein MGC14421 besitzt eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (Buchberger, 2002). Die beschriebenen *yeast two-hybrid*-Daten sind bisher nicht mit anderen Versuchsmethoden verifiziert, die Interaktion der genannten Proteine mit BAT3 muss daher durch Koisolationsexperimente bestätigt werden.

4.4 Suche nach neuen Interaktionspartnern von BAT3

4.4.1 Mit welchen Proteinen, die eine Rolle in der CHIP-vermittelten Degradation des Glukokortikoidrezeptors spielen, können die BAT3-Isoformen und BAT2 interagieren?

In den oben diskutierten Degradationsversuchen wurde gezeigt, dass die BAT3-Isoformen zusammen mit CHIP die Degradation des GR fördern. In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus in der Immunpräzipitation eine Interaktion von BAT3 und CHIP

nachgewiesen werden. Die Koisololation konnte dabei in beide Richtungen gezeigt werden, zum einen wurde CHIP präzipitiert und BAT3 detektiert, und zum anderen wurden die jeweiligen BAT3-Isoformen präzipitiert und hierüber CHIP detektiert. Die Interaktion mit CHIP wurde für alle BAT3-Isoformen nachgewiesen. Alle Isoformen besitzen wie BAG-1 eine Ubiquitin-ähnliche Domäne und BAT3+Exon 24 besitzt zusätzlich eine intakte BAG-Domäne. BAT3 könnte daher eine ähnliche Funktion wie BAG-1 ausüben. Die BAG-Domäne hat dabei anscheinend keinen Einfluss auf die Interaktion mit CHIP, da alle BAT3-Varianten ohne eine komplette BAG-Domäne mit gleicher Stärke wie BAT3 mit einer kompletten BAG-Domäne an CHIP binden. Hsc/Hsp70 und die beiden Kofaktoren BAG-1 und CHIP bilden zusammen einen trimeren Komplex. BAG-1 bindet über die BAG-Domäne- und CHIP über die drei N-terminalen Tetratrikoptiddomänen an Hsc/Hsp70. Eine direkte Interaktion zwischen BAG-1 und CHIP konnte auch nach Freisetzung von Hsc/Hsp70 nach ATP-Zugabe gezeigt werden (Demand *et al.*, 2001). In der Immunpräzipitation wurde ein CHIP-Antiserum verwendet, welches unspezifisch an Hsp70 binden kann. Die Vermutung, dass die Interaktion von BAT3-Isoformen mit CHIP unspezifisch über Hsp70 erfolgte, kann aufgrund der nicht vorhandenen BAG-Domänen in den BAT3-Isoformen ausgeschlossen werden. Diese BAT3-Isoformen sollten nicht an Hsp70 binden und daher sollte die Interaktion von BAT3-Isoformen mit CHIP spezifisch sein.

In einem weiteren Versuch wurde die Interaktion zwischen BAT2 und CHIP untersucht. Eine Interaktion konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, was mit dem Ergebnis des Degradations-Versuchs übereinstimmt; auch hier hat BAT2 keinen Einfluss auf die Degradation des GR. Weiterhin konnte in dieser Arbeit in Koisololationsexperimenten mit transfizierten Zellen eine direkte Assoziation der Proteine GR und BAT3 bzw. BAT3 Δ Exon 24 nachgewiesen werden. Die Assoziation von BAT3 und GR konnte allerdings nur in Richtung des GR gezeigt werden. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Expression des GR's schwach war und daher die präzipitierte GR-Menge zu gering war, um BAT3 bzw. BAT3 Δ Exon 24 zu detektieren. In einem weiteren Koisolationsversuch wurde untersucht, ob BAT3 bzw. BAT3 Δ Exon 24 mit dem Protein Hsp70 interagieren können. BAG-1 assoziiert mit den Hsc70/Hsp70-Proteinen und kann die korrekte Faltung von Proteinen durch Hsc70/Hsp70 negativ regulieren (Takayama *et al.*, 1997; Bimston *et al.*, 1998; Nollen *et al.*, 2000). Die gleichen Eigenschaften wurden auch für Scythe aus *Xenopus* (xScythe), mit intakter BAG-Domäne, nachgewiesen (Thress *et al.*, 2001). Die Bindung von BAG-1 an Hsp70 sowie die Interaktion von xScythe mit Hsp70 verläuft über die C-terminale BAG-Domäne von BAG-1 und xScythe. Diese Domäne bindet an die ATPase-Domäne von

Hsc70/Hsp70 (Takayama *et al.*, 1999; Thress *et al.*, 2001). xScythe ist auf Aminosäureebene zu 57 % homolog zum humanen BAT3 (Thress *et al.*, 1998). Es ist daher denkbar, dass BAT3-Varianten mit einer kompletten BAG-Domäne mit Hsp70 interagieren können. In Koisolationsversuchen mit BAT3 und Hsp70 bzw. BAT3 Δ Exon 24 und Hsp70 konnte allerdings keine Assoziation nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass das Hsp70-Protein zu schwach exprimiert wurde, um eine Interaktion nachzuweisen oder dass die mögliche Interaktion in den verwendeten Detergenzien nicht stabil war.

4.4.2 Können BAT3-Isoformen mit dem proapoptotischen Smac interagieren?

Thress *et al.* (1998) haben gezeigt, dass Scythe, das *Xenopus*-Homolog von BAT3, mit dem *Drosophila*-Protein Reaper interagieren kann. Reaper bindet an Inhibitoren der Apoptose (IAP), kann so die Aktivierung von Caspasen fördern und in Säugerzellen Apoptose auslösen. Ein mögliches funktionales Homolog zu Reaper ist das Protein Smac (im Menschen, Du *et al.*, 2000) bzw. das Mausortholog Diablo (Verhagen *et al.*, 2000). Sequenzähnlichkeiten von Reaper und Smac beschränken sich auf die N-terminale Region (Silke *et al.*, 2000). Smac ist im Intermembranbereich von Mitochondrien lokalisiert. Es wird als inaktive Proform mit einer amphipatischen mitochondrialen Lokalisierungssequenz (MLS) am N-Terminus synthetisiert. Nach dem Transport in die Mitochondrien wird Smac prozessiert. Die Lokalisierungssequenz wird abgespalten und die reife (aktive) Form liegt vor. In apoptotischen Zellen ist die Membranpermeabilität der Mitochondrien erhöht (Martinou & Green, 2001), hierbei werden unter anderem Cytochrom C und Smac ins Zytoplasma freigesetzt. Daraufhin kann Smac durch die direkte Interaktion mit der BIR-3 (Baculovirus-Inhibitory-Repeat)-Domäne direkt an IAPs (inhibitor of apoptosis protein) binden (Liu *et al.*, 2000; Chai *et al.*, 2000) und die bestehenden Interaktionen von IAPs mit Caspasen aufheben. Über diese Aktivierung von Caspasen übt Smac seine proapoptotische Wirkung aus (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Um eine mögliche Interaktion von Smac mit den jeweiligen BAT3-Isoformen nachzuweisen, wurden in der vorliegenden Arbeit Koisolationsversuche durchgeführt. Es konnte jedoch keine Interaktion zwischen dem Smac-Protein und den Proteinen der BAT3-Isoform gezeigt werden.

Nur während der Apoptose liegt das prozessierte Smac im Zytoplasma vor, eventuell kann es nur hier mit prozessiertem/gespaltetenen BAT3 interagieren und zusammen verstärkt die

Apoptose induzieren. Thress *et al.* (1989) konnten zeigen, dass das *in vitro* translatierte und ³⁵S-markierte ScytheC312, bestehend aus 312 Aminosäuren des C-terminalen-Abschnittes, mit dem rekombinanten Protein Reaper (funktionales Säugerhomolog zu Reaper ist Smac) interagieren kann. Dadurch werden Caspasen aktiviert und Apoptose induziert. Die Bindung des 312 AS großen C-terminalen Abschnitts von Scythe an Reaper muss sehr spezifisch sein, da ScytheC235 (beinhaltet die letzten 235 AS) und ScytheN435 (beinhaltet die ersten 435 AS) nicht an das rekombinante Reaper binden können und so auch die Fähigkeit zur Induzierung der Apoptose eingeschränkt ist. ScytheC312 kann auch ohne die Bindung an Reaper Apoptose induzieren (Thress *et al.*, 1989).

Ein alternatives Modell für die Bindung von BAT3 mit Smac ist denkbar. So könnte BAT3 nur mit gewissen Smac-Isoformen interagieren, wie z.B. mit Smac3. Die Isoform Smac3 hat dieselben Eigenschaften wie Smac und kann noch zusätzliche Funktionen ausführen (Fu *et al.*, 2003). Bei Smac3 fehlt aufgrund alternativen Spleißens das Exon 4. Nach apoptotischen Stimuli wird Smac3 aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt, wo es an die zweite und dritte BIR-Domäne von XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) bindet. Dadurch wird die Bindung von Caspase-9 an XIAP unterdrückt, die Aktivierung der Caspase-3 wird gefördert und hiermit die Apoptose verstärkt. Im Gegensatz zu Smac kann Smac3 die Autoubiquitinierung und somit den Abbau von XIAP beschleunigen (Fu *et al.*, 2003).

4.4.3 BAT2 assoziiert nicht mit BAT3

Die BAT2- und die BAT3-Gene liegen benachbart am telomeren Ende der MHC Klasse III-Region und weisen einige Ähnlichkeiten auf. Die Transkripte von BAT2 und BAT3 kodieren jeweils ein prolinreiches Polypeptid. Beide Proteine sind ubiquitär exprimiert, wobei die Expression in Testis besonders hoch ist. Beide Gene werden während der Spermatogenese zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt transkribiert. Weiterhin enthalten beide Gene repetitive Sequenzen. Es wurde der Frage nachgegangen, ob die beiden Proteine miteinander interagieren können. In Immunpräzipitationen aus transfizierten Zellen konnte keine direkte Assoziation von BAT2 mit den verschiedenen BAT3-Isoformen nachgewiesen werden. Das BAT3-Protein wird im Zellkern exprimiert, während das BAT2-Protein im Zytoplasma nachzuweisen ist. Da die Funktionen beider Proteine nicht aufgeklärt sind, ist es möglich, dass nur Fragmente von BAT3, die im Zellkern durch Spaltung von BAT3 entstehen und dann ins Zytoplasma gelangen, mit BAT2 interagieren. Es ist auch denkbar, dass BAT2 einen

Einfluss auf BAT3 ausübt, ohne mit BAT3 zu interagieren. *Yeast two-hybrid*-Versuche legen nahe, dass BAT2 eine Funktion bei der Regulation des Spleißens der prä-mRNA besitzen könnte (Lehner *et al.*, 2003). Es ist möglich, dass BAT2 und BAT3 koreguliert werden und das BAT2 ein möglicher Spleißfaktor ist, der am BAT3-Spleißen beteiligt ist.

4.5 Zur konditionalen Inaktivierung des BAT2-Gens

In der vorliegenden Arbeit wurden die Promotorregion und die ersten vier Exons von BAT2 kloniert, um die Inaktivierung dieses Gens in der Maus zu ermöglichen. Die gezielte Geninaktivierung kann zur Aufklärung der Funktion eines Gens beitragen (Capecchi, 1989). Das BAT2-Gen liegt direkt benachbart zum BAT3-Gen in der MHC Klasse III-Region. Beide Proteine haben ein ähnliches Expressionsmuster (Winkler, 2003). Desweiteren sind beide BAT-Polypeptide sehr prolinreich und weisen beide repetitive Sequenzen auf (Banerji *et al.*, 1990).

Ausgehend von der Vermutung, dass es einen funktionellen Zusammenhang zwischen BAT2 und dem benachbarten BAT3 gibt, sollte das BAT2-Gen inaktiviert werden. Da BAT3 als Kofaktor bei der CHIP-vermittelten Degradation von Proteinen eine Rolle spielt, könnte in BAT2-defizienten Mäusen die proteasomale Proteindegradation gestört sein. In der Arbeit von Lehner *et al.* (2004) wird anhand der Untersuchungen von Protein-Interaktionen vermutet, dass BAT2 eine Rolle in der Regulation des prä-mRNA Spleißens spielt. Da das BAT3-Gen alternativ gespleißt werden kann, könnte das benachbarte BAT2-Gen am differentiellen Spleißen von BAT3 beteiligt sein. Bis jetzt sind noch keine relevanten Funktionen des BAT2-Gens bekannt. Die Analyse des Phänotyps einer BAT2 knockout-Maus könnte Anhaltspunkte für die Funktion des BAT2-Gens liefern.

4.5.1 Warum konditionale Geninaktivierung?

Um das BAT2 Gen gezielt zu inaktivieren, sind eine konventionelle sowie eine konditionelle Geninaktivierung möglich. BAT2 wird in fötalen und adulten Geweben sowie verschiedenen Zelllinien (HeLa, K562 und SW480) ubiquitär exprimiert, wobei eine überdurchschnittlich starke Expression im adulten Gewebe vor allem in den Geweben des zentralen und peripheren

Nervensystems, Niere und Lunge zu beobachten ist. Besonders stark wird BAT2 im Hodengewebe exprimiert. In fötalen Geweben wird BAT2 in Herz und Niere exprimiert (Winkler, 2003). Desweiteren konnte in Rattengewebe gezeigt werden, dass BAT2 in unreifen Spermien in der Außenzone der Samenkanäle exprimiert ist. Da BAT2 in verschiedenen Geweben und auch in einem eng umgrenzten Zeitraum während der Spermatogenese exprimiert wird, könnte BAT2 eine Rolle bei Entwicklungsprozessen wie z.B. der Embryonalentwicklung spielen. Eine konventionelle BAT2-Inaktivierung könnte zu einem embryonal letalen Phänotyp führen. Deshalb haben wir eine Strategie der konditionalen Geninaktivierung basierend auf dem Cre/LoxP-System gewählt. Nun können die Funktionsverluste dank der konditionellen Geninaktivierung gezielt in bestimmten Zelltypen oder zu einem späteren Lebensalter induziert und analysiert werden. Desweiteren kann mit einem konditionalen Geninaktivierungsvektor das Zielgen auch konventionell ausgeschaltet werden, indem man homolog rekombinierte ES-Zellen vor der Injektion in Blastozysten transient mit der Cre-Rekombinase behandelt.

4.5.2 Der pBCSK+-BAT2-flox-TK Geninaktivierungsvektor, die Effizienz der homologen Rekombination und weiterführende Analysen

Um das BAT2-Gen zu inaktivieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der pBCSK+-BAT2-flox-TK Vektor konstruiert. Dieser Vektor beinhaltet die Promotorregion, die ersten vier Exons und die angrenzenden Intronbereiche des BAT2-Gens sowie eine singuläre loxP-Sequenz in der 5'-untranslatierten Region und eine mit loxP-Sequenzen flankierte HPRT-Kassette im Intron 2. Der kurze Homologiearm hat eine Länge von 1,1 kb und ermöglicht die Analyse transfizierter ES-Zellklone. Der kürzere homologe Arm sollte nicht kleiner als 1 kb sein (Deng & Cappecchi, 1992). Der lange Homologiearm hat eine Länge von 8 kb. Die Länge der homologen Sequenzen im Geninaktivierungsvektor ist eine wichtige Voraussetzung für die homologe Rekombination und sollte zwischen 8-15 kb liegen (Deng & Cappecchi, 1992; Hasty et al., 1991; Hasty & Bradley, 1993). Desweiteren besitzt das Konstrukt pBCSK+-BAT2-flox-TK eine TK-Selektionskassette, die an den 5'-homologen Bereich der BAT2-Sequenz angrenzt. Zusätzlich enthält das Konstrukt am 3'-Ende eine AscI-Restriktionsschnittstelle, um das Konstrukt vor der Elektroporation in ES-Zellen zu linearisieren und die Frequenz der homologen Rekombination zu erhöhen (Hasty *et al.*, 1992; Bollag *et al.*, 1989). Der komplette, aus HM-1 ES-Zellen amplifizierte 5'-terminale Bereich

des BAT2-Gens wurde sequenziert, wobei im Vergleich zur murinen genomischen Sequenz keine Mutationen nachgewiesen wurden. Der sequenzierte Bereich wurde auch mit der Sequenz des humanen BAT2-Gens verglichen. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Sequenz, so dass man sagen kann, dass die Sequenz des BAT2-Gens zwischen den Spezies hoch konserviert ist. Aufgrund der Geninaktivierung sollte es zu einem vollständigen Funktionsverlust des Zielgens kommen. Daher wurde für das BAT2-Gen die N-terminale Region, welche den Promotor-Bereich und die ersten vier Exons beinhaltet, mit loxP-Sequenzen flankiert, um diese später mit Hilfe der Cre-Rekombinase zu deletieren. So sollte keine Aktivität des BAT2-Gens mehr zu erwarten sein. Die für die konditionelle Geninaktivierung eingesetzten loxP-Sequenzen sollten die normale Funktion des BAT2-Gens möglichst nicht beeinträchtigen. So wurde die singuläre loxP-Sequenz ca. 4300 bp stromaufwärts vom BAT2 Startcodon kloniert und die HPRT-flankierenden loxP-Sequenzen wurden in das Intron 2 des BAT2-Gens eingefügt, so dass sie nicht von funktioneller Bedeutung für die Expression des Gens sind. LoxP-Sequenzen sind von geringer Größe (34 bp), so dass die Expression des Gens ungestört sein sollte. Falls der Selektionsmarker vor allem dessen Promotor, die Expression des Gens beeinflusst, kann der Marker *in vitro* durch transiente Expression der Cre-Rekombinase in den ES-Zellen entfernt werden (Gu *et al.*, 1994). Mit Hilfe von Cre-Rekombinase ausprägenden *E. coli* Bakterien (MM294-Cre, Buchholz *et al.*, 1996) konnte einerseits die Funktionsfähigkeit und die korrekte Orientierung der loxP-Sequenzen für das pBCSK+-BAT2-flox-TK Konstrukt nachgewiesen werden. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die mit loxP-Sequenzen flankierten Bereiche in der BAT2-Sequenz vollständig deletiert wurden. Das linearisierte pBCSK+-BAT2-flox-TK-Konstrukt wurde für die Elektroporation von embryonalen Stammzellen zwecks homologer Rekombination eingesetzt. Aufgrund der 5'-gelegenen TK-Kassette musste nur der 3'-Bereich nach homologen Rekombinationen analysiert werden. Für die PCR-Analytik wurde die genomische DNA aus dem jeweiligen ES-Klon isoliert und das Primerpaar P1.F/P3.F eingesetzt. Der P.1F-Primer lagert sich am 3'-Ende der HPRT-Kassette an, und der P3.R-Primer lagert sich außerhalb des transfizierten Vektors im Wildtyp-Allel an. Von 1443 isolierten ES-Klonen ergaben 10 Klone ein positives PCR-Signal. Die Rekombinationsfrequenz von 10/1443 (0,69 %) ist sehr gering. Anscheinend wird der Geninaktivierungsvektor trotz negativer Selektion über die TK vorwiegend heterolog ins Genom integriert. Im Southern Blot konnten diese 10 positiven ES-Zellen leider nicht verifiziert werden. Warum die in der PCR positiven ES-Zellen im Southern-Blot nicht

nachweisbar sind, ist unklar. Aufgrund der niedrigen Frequenz der homolog rekombinierten ES-Zellen sollte die Anzahl der zu untersuchenden ES-Zellen vergrößert werden.

Nachdem positive ES-Zellen mittels PCR und Southern Blot verifiziert worden sind, sollte der Euploidiegrad der homolog rekombinierten ES-Zellklone mittels Karyotyp-Analyse ermittelt werden. Anschließend können mittels Blastozysteninjektion die homolog rekombinierten ES-Zellen zur Erzeugung einer transgenen BAT2-Mauslinie eingesetzt werden. Nach Züchtung von homozygot geflochten BAT2 Mäusen, können diese mit Cre-exprimierenden Mausstämmen gekreuzt werden. Aufgrund des Einsatzes von transgenen Mausstämmen, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle von induzierbaren oder gewebespezifischen Promotoren exprimieren (Kühn *et al.*, 1995; Nagy & Mar, 2001), wird es möglich sein, das BAT2-Gen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und spezifisch in verschiedenen Geweben auszuschalten. Für immunologische Fragestellungen könnten folgende Mausstämme eingesetzt werden, die z.B. B- oder T-Zell-spezifische Cre-Expressionen zeigen: CD19:Cre (Expressionsort: B-Zellen; keine Induzierbarkeit; Rickert *et al.*, 1997), E_{μ} /P_{SV40}:CreER (Expressionsort: B-Zellen; Induzierbarkeit: Tamoxifen; Schwenk *et al.*, 1998) oder Ick:Cre (Expressionsort: T-Zelle; keine Induzierbarkeit; Orban *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1994). Für gewebespezifische oder ubiquitäre Expression könnten die Mausstämme MMTV(LTR):Cre (Expressionsort: CNS, Herz, Milz, Niere, Muskel; keine Induzierbarkeit; Wagner *et al.*, 1997) oder TetO:Cre (ubiquitäre Expression; Induzierbarkeit durch das Tet-System, Inaktivierung aufgrund Tetracyclin; St-Onge *et al.*, 1996) verwendet werden. Der Phänotyp der *knockout*-Mäuse sollte auch mit dem der allein Cre-transgenen Mäuse verglichen werden, da die Cre-Rekombinase in seltenen Fällen im Säugetiergenom vorkommende Pseudo-loxP-Sequenzen rekombinieren kann (Thyagarajan *et al.*, 2000). Weiterhin wurden zeit- und dosisabhängige Schädigungen der Zellen durch die Cre-Rekombinase in der Zellkultur beobachtet (Loonstra *et al.*, 2001). BAT2-defiziente Mäuse sollten zuerst auf anatomische oder physiologische Auffälligkeiten und auf ihr Verhalten untersucht werden. Da das BAT2-Gen in einer Region liegt, in der zahlreiche Gene eine Funktion für das Immunsystem haben, sollte auch der immunologische Phänotyp der BAT2-defizienten Mäuse untersucht werden. So können zelluläre Reaktionen, wie Mitogenstimulierung von B- und T-Lymphozyten, Antikörperproduktion und Antigen-spezifische T-Zellproliferationen getestet werden.

Analysen der Expression der verschiedenen BAT3-Isoformen könnten Aufschluss darüber geben, ob BAT2 eine Rolle bei der Regulation der Spleißvorgänge von BAT3-Varianten spielt. Falls spezielle BAT3-Spleißvarianten aufgrund vermutlicher BAT2-Spleißaktivitäten transkribiert werden, könnte in BAT2-defizienten Mäusen die Proteindegradation durch

Proteasomen gestört sein. Eine so reduzierte Proteindegradation könnte sich auf die Beladung von Klasse I-Molekülen mit Peptiden im ER auswirken. So könnte untersucht werden, ob in BAT2-defizienten Mäusen die Oberflächenexpression von MHC Klasse I-Molekülen erniedrigt ist. BAT2 könnte aber auch auf andere Gene, deren Transkripte alternativ gespleißt werden, einen Einfluss ausüben. So weiß man, dass z.B. für die ebenfalls MHC-kodierten Gene LST-1, 1C7 und AIF1, die auch eine immunologische Relevanz aufweisen, durch alternatives Spleißen eine Anzahl verschiedener Transkripte entstehen können (Neville & Campbell, 1997, 1999). So ist die Isoform 1C7c an der Erkennung von Zielzellen beteiligt, da sie als Rezeptor auf natürlichen Killerzellen exprimiert wird (Pende *et al.*, 1999). AIF1 spielt eine Rolle bei chronischen Abstoßungsreaktionen während Allotransplantationen (Utans *et al.*, 1996).

5 Zusammenfassung

BAT3 und BAT2 sind zwei benachbarte Gene in der MHC Klasse III-Region. In der vorliegenden Arbeit wurden BAT3-Spleißvarianten hergestellt und mit molekularbiologischen sowie biochemischen Methoden untersucht. Ausgehend von einem BAT3 Δ Exon 24-Konstrukt wurden fünf BAT3-Spleißvarianten mittels PCR kloniert: BAT3 Δ Exon 5, BAT3 Δ Exon 11, BAT3 Δ Exon 11b, BAT3 Δ Exon 22 sowie ein BAT3-Volllängenkonstrukt. Um die Funktion und die Lokalisation dieser BAT3-Isoformen zu analysieren, wurden die Konstrukte transient in COS-7-Zellen exprimiert. Zunächst wurde untersucht, ob alle BAT3-Isoformen sowie das Volllängen-BAT3 kernlokalisiert sind. In Immunfluoreszenz-Analysen waren alle untersuchten Isoformen im Zellkern lokalisiert. BAT3 gehört zur Familie der BAG-Proteine, die eine Rolle als Kochaperone bei der zytoplasmatischen Degradation von Proteinsubstraten spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von BAT3 auf die E3-Ubiquitinligase-CHIP vermittelte Degradation des Glukokortikoidrezeptors (GR) gemessen. GR wird in Anwesenheit jeder der sechs getesteten BAT3-Isoformen und CHIP stärker degradiert, als bei alleiniger Expression von CHIP. In Koisolationsversuche wurde demonstriert, dass alle BAT3-Isoformen jeweils mit CHIP und mit dem GR interagieren können. Die Funktion des zu BAT3 benachbarten BAT2-Gens ist weitgehend unbekannt. BAT2- und BAT3-Proteine sind sehr prolinreich und werden in zahlreichen Zelltypen exprimiert. Bei der Spermatogenese werden BAT2 und BAT3 aufeinander folgend exprimiert. Es wird vermutet, dass BAT2 ein RNA Spleißfaktor ist. BAT2 könnte deshalb am differentiellen Spleißen von BAT3 beteiligt sein. Um die Funktion von BAT2 zu analysieren, wurde ein BAT2-Geninaktivierungsvektor hergestellt. Die BAT2-Geninaktivierung ist möglicherweise embryonal letal. Mit dem Ziel eine lebensfähige BAT2-defiziente Maus zu erzeugen, wurde in dieser Arbeit eine Cre/LoxP-basierte Strategie eingesetzt, mit der das BAT2-Gen konditional ausgeschaltet werden kann. Alternativ zur *in vivo* Geninaktivierung ist mit dem Geninaktivierungsvektor auch eine konventionelle Geninaktivierung möglich, indem der mit loxP-Sequenzen flankierte BAT2-Bereich *in vitro* durch die transiente Expression der Cre-Rekombinase in den homolog rekombinanten ES-Zellen entfernt wird. Die Funktionsfähigkeit der loxP-Sequenzen in der rekombinanten BAT2-DNA konnte mit Hilfe von Cre-Rekombinase-ausprägenden *E. coli*-Bakterien gezeigt werden. Transfektionen mit dem BAT2-Geninaktivierungsvektor in embryonale Stammzellen zeigten eine äußerst niedrige Rekombinationsfrequenz. Es konnten zehn homologe Rekombinanten aus 1443 ES-Klonen mittels PCR-Analyse identifiziert werden. Allerdings konnte die homologe Rekombination dieser Klone durch Southern Blot-Analyse nicht bestätigt werden.

6 Literaturverzeichnis

Abremski, K., Hoess, R. & Sternberg, N. (1983): Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* **32**, 1301-1311.

Abremski, K. & Hoess, R. (1984): Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J. Biol. Chem.* **259**, 1509-1414.

Antoku, K., Maser, R.S., Scully, W.J., Delach, Jr., S.M. & Johnson, D.E. (2001): Isolation of bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and suppressor of death domains protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 1003-1010.

Aravind, L. & Koonin, E.V. (2000): The U box is a modified RING finger – a common domain in ubiquitination. *Curr. Biol.* **10**, R132-R134.

Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J.B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R.H., Kahn, M.L., Kalionis, B., Narayana, S.V., Pierson, L.S., et al. (1986): The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *Embo J.* **5**, 433-440.

Asubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1994): Current Protocols in Molecular Biology (New York: GreenePublishing Associates and Wiley-Interscience).

Balciunas, D. & Ronne, H. (2000): Evidence of domain swapping within the jumonji family of transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 274-276.

Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J, Yin, L.Y. & Patterson, L. (1999): Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone function. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4535-4545.

Baluna, R., Coleman, E., Jones, C., Ghetie, V. & Vitetta, E.S. (2000): The effect of a monoclonal antibody coupled to ricin. A chain-derived peptides on endothelial cells in vitro: insights into toxin-mediated vascular damage. *Exp. Cell Res.* **258**, 417-424.

Banerji, J., Sands, J., Strominger, J.L. & Spies, T. (1990): A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2374-2378.

Bardelli, A., Longati, P., Albero, D., Goruppi, S., Schneider, C., Ponzetto, C. & Comoglio, P.M. (1996): HGF Rezeptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J.* **15**, 6205-6212.

Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. & Seemüller, E. (1998): The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380.

- Bayley, C.C., Morgan, M., Dale, E.C. & Ow, D.W. (1992): Exchange of gene activity in transgenic plants catalyzed by the Cre-lox site-specific recombination system. *Plant Mol. Biol.* **18**, 353-361.
- Bennett, M., Pinol-Roma, S., Staknis, D., Dreyfuss, G., Reed, R. (1992): Differential binding of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins to mRNA precursors prior to spliceosome assembly in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3165-3175.
- Bienroth, S., Keller, W. & Wahle, E. (1993): Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO J.* **12**, 585-594.
- Bimston, D., Song, J., Winchester, D., Takayama, S., Reed, J.C. & Morimoto, R.I. (1998): BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. *EMBO J.* **17**, 6871-6878.
- Bocker, T., Barusevicius, A., Snowden, T., Rasio, D., Guerrette, S., Robbins, D., Schmidt, C., Burczak, J., Groce, C.M., Copeland, T., Kovatich, A.J. & Fishel, R. (1999): hMSH5: A human MutS Homologue that forms a Heterodimer with hMSH4 and is expressed during Spermatogenese. *Cancer Res.* **59**, 816.
- Bollag, R.J., Waldman, A.S. & Liskay, R.M. (1989): Homologous recombination in mammalian cells. *Annu. Rev. Genet.* **23**, 199-225.
- Boulikas, T. (1993): Nuclear localization signals (NLS). *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp.* **3**, 193-227.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brigotti, M., Alfieri, R., Sestili, P., Bonelli, M., Petronini, P.G., Guidarelli, A., Barbieri, L., Stirpe, F. & Sperti, S. (2002): Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB J.* **16**, 365-372.
- Briknarova, K., Takayama, S., Brive, L., Havert, M.L., Knee, D.A., Velasco, J., Homma, S., Cabezas, E., Stuart, J., Hoyt, D.W., Satterthwait, A.C., Linas, M., Reed, J.C. & Ely, K.R. (2001): Structural analysis of BAG1 cochaperone and its interactions with Hsc70 heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 349-352.
- Brimmel, M., Burns, J.S., Munson, P., McDonald, L., O'Hare, M.J. & Packham, G. (1999): High level expression of differentially localized BAG-1 isoforms in some oestrogen receptor-positive human breast cancers. *Br. J. Cancer* **81**, 1042-1051.
- Broach, J.R. & Hicks, J.B. (1980): Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle. *Cell* **21**, 501-508.
- Bruni, B. & Roizman, B. (1996): Open reading frame P--a herpes simplex virus gene repressed during productive infection encodes a protein that binds a splicing factor and reduces synthesis of viral proteins made from spliced mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10423-10427.

-
- Buchberger, A. (2002): From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends Cell Biol.* **12**, 216-221.
- Buchholz, F., Angrand, P.O. & Stewart, A.F. (1996): A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Research* **24**, 3118-3119.
- Capecchi, M.R. (1989): Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-1292.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X. & Shi, Y. (2000): Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**, 855-862.
- Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R.A., Shevchenko, A., Mann, M. & Dreyfuss, G. (1999): Gemin3: a novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J. Cell Biol.* **147**, 1181-1194.
- Chen, M.R., Yang, J.F., Wu, C.W., Middeldorp, J.M. & Chen, J.Y. (1998): Physical association between the EBV protein EBNA-1 and p32/TAP/hyaluronectin. *J. Biomed. Sci.* **5**, 173-179.
- Clissold, P.M. & Ponting, C.P. (2001): JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 7-9.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J. & Patterson, C. (2001): The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Natl. Cell Biol.* **3**, 93-96.
- Dale, E.C. & Ow, D.W. (1990): Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene* **1**, 79-85.
- Demand, J., Alberti, S., Patterson, C. & Hohfeld, J. (2001): Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr. Biol.* **11**, 1569-1577.
- Deng, C. & Capecchi, M.R. (1992): Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol. Cell Biol.* **8**, 3365-71.
- Doong, H., Vrailas, A. & Kohn, E.C. (2002): What's in the "BAG"?- a functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer letters* **188**, 25-32.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S. & Burd, G.G. (1993): hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 289-321.
- Du, C., Fang, M., Li, L. & Wang, X. (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.

-
- Dunwell, J.M., Khuri, S. & Gane, P.J. (2000): Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: Conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 153-197.
- Endo, Y. & Tsurugi, K. (1988): The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. *J. Biol. Chem.* **263**, 8735-8739.
- Evans M. J. & Kaufmann M.H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **92**, 154-156.
- Faleiro, L. & Lazebnik, Y. (2000): Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J. Cell Biol.* **151**, 951-959.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt. Biochem.* **132**, 6-13.
- Fortini, M.E. & Artavanis-Tsakonas, S. (1993): Notch: neurogenesis is only part of the picture. *Cell* **75**, 1245-1247.
- Franke, U. & Foellmer, B.E. (1989): The glucocorticoid receptor gene in 5q-q32. *Genomics* **4**, 610-612.
- Freisewinkel, I. (1995): Die Assoziation der MHC Klasse II Moleküle mit der Invarianten Kette. Universität Bonn, Dissertation.
- Froesch, B.A., Takayama, S. & Reed, J.C. (1998): BAG-1L protein enhances androgen receptor function. *J. Biol. Chem.* **273**, 11660-11666.
- Fu, J., Jin, Y. & Arend, L.J. (2003): Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of XIAP. *J. Biol. Chem.* **52**, 52660-52672.
- Fu, X.D. (1995): The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* **1**, 663-680.
- Gane, P.J., Dunwell, J.M. & Warwicker, J. (1998): Modeling based on the structure of vicins predicts a histidine cluster in the active site of oxalate oxidase. *J. Mol. Evol.* **46**, 488-493.
- Gasser, D.L., Sternberg, N.L., Pierce, J.C., Goldner-Sauve, A., Feng, H., Haq, A.K., Spies, T., Hunt, C., Buetow, H.H. & Chaplin, D.D. (1994): P1 and cosmid clones define the organization of 280 kb of the mouse H-2 complex containing the Cps-1 and Hsp70 loci. *Immunogenetics* **39**, 48-55.
- Gehring, U. (1998): Steroid hormone receptors and heat shock proteins. Litwack, G., ed. *San Diego: Academic Press, Vitamins and hormones*, **54**, 167-205.
- Ghebrehiwet, B., Lim, B.L., Kumar, R., Feng, X. & Peerschke, E.I. (2001): gC1q-R/p33, a member of a class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection. *Immunol. Rev.* **180**, 65-77.

- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E. & Steller, H. (2000): Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *Embo J.* **19**, 589.
- Grimmwood, J. & Schmutz, J. (2003): Six is seventh. *Nature* **425**, 775-776.
- Gruen, J.R. & Weissmann, S.M. (1997): Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* **90**, 4252-5265.
- Grüneberg, H. (1952): The genetics of the mouse. *Martinus Nijhoff, The Hague*.
- Gu, H., Zou, Y.R. & Rajewsky, K. (1993): Independent control of immunoglobulin switch recombination individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155-64.
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H. & Rajewsky, K. (1994): Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**, 103-106.
- Guzey, M., Takayama, S. & Reed, J.C. (2000): BAG-1L enhances trans-activation function of the vitamin D Receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 40749-40756.
- Hamilton, D.L. & Abremski, K. (1984): Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J. Mol. Biol.* **178**, 481-486.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J., Chang, C. & Bradley, A. (1991): Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **11**, 4509-17.
- Hasty, P., Rivera-Perez, J. & Bradley, A. (1992): The role and fate of DNA ends for homologous recombination in embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **12**, 2464-74.
- Hasty, P. & Bradley, A. (1993): Gene Targeting. A Practical Approach. *The Practical Approach Series. IRL Press*.
- Henry, M.F. & Silver, P.A. (1996): A Novel Methyltransferase (HMT1) Modifies Poly(A)+ RNA-Binding Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3668-3678.
- Her, C. & Doggett, N.A. (1998): Cloning, Structural Characterizations, and Chromosomal Localization of the Human Orthologue of *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 Gene. *Genomics* **52**, 50-61.
- Hochstrasser, M. (1996): Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* **22**, 813-815.
- Hoess, R.H., Ziese, M. & Sternberg, N. (1982): P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining site loxP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **11**, 3398-3402.
- Hoess, R.H. & Abremski, K. (1984): Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1086-1029.
- Höhfeld, J. & Jentsch, S. (1997): GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J.* **16**, 6209-6216.

- Huang, W.C., Taylor, S., Nguyen, T.B., Tomaszewski, J.E., Libertino, J.A., Malkowicz, S.B. & McGarvey, W. (2002a): KIAA1096, a Gene on Chromosome 1q, is amplified and overexpressed in Bladder Cancer. *DNA and Cell Biology* **10**, 707-715.
- Huang, Y.H., Chen, Y.T., Lai, J.J., Yang, S.T. & Yang, U.C.: (2002b): PALS db: Putative Alternative Splicing database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 186-190.
- Hubberstey, A., Yu, G., Loewith, R., Lakusta, C. & Young, D. (1996): Mammalian CAP interacts with CAP, CAP2, and actin. *J. Cell Biochem.* **61**, 459-466.
- Illsley, J.L., Sudol, M. & Winder, S.J. (2002): The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cell Signal* **14**, 183-189.
- Iris, F.J., Bougueleret, L., Prieur, S., Caterina, D., Primas, D., Perrot, V., Jurka, J., Rodriguez-Tome, P., Claverie, J.M. & Dausset, J. (1993): Dense Alu clustering and a potential new member of the NF kappa B family within a 90 kilobase HLA class III segment. *Nat. Genet.* **3**, 137-145.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K. & Reimann, J.D. (2000): The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* **10**, 429-439.
- Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Hohfeld, J. & Patterson, C. (2001): CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **276**, 42938-42944.
- Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W. & Goeddel, D.V. (1999): Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* **283**, 543-546.
- Kafasla, P., Patrino-Georgoula, M., Lewis, J.D. & Guialis, A. (2002): Association of the 72/74-kDa proteins, members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M group, with the pre-mRNA at early stages of spliceosome assembly. *Biochem. J.* **363**, 793-799.
- Kalia, S.K., Lee, S., Smith, P.D., Liu, L., Crocker, S.J., Thorarinsdottir, T.E., Glover, J.R., Fon, E.A., Parks, D.S. & Lozano, A.M. (2004): BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration. *Neuron* **44**, 931-45.
- Kang, I. & Inoye, M. (1993): One-step insertion of oligonucleotide linkers or adaptors to DNA using unphosphorylated oligonucleotides. *Biotechniques* **15**, 659-667.
- Kanopka, A., Mühlemann, O. & Akusjärvi, G. (1996): Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA. *Nature* **381**, 535-538.
- Kendall, E., Sargent, C.A. & Campbell, R.D. (1990): Human major histocompatibility complex contains a new cluster of genes between the HLA-D and complement C4 loci. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7251-7257.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minos, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. & Shimizu, N. (1998): Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608.

- Kitagawa, K., Skowrya, D., Elledge, S.J., Harper, J.W. & Hieter, P. (1999): SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell* **4**, 21-33.
- Koch, N., Koch, S. & Hammerling, G.J. (1982): Ia invariant chain detected on lymphocyte surface by monoclonal antibody. *Nature* **299**, 644-645.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. & Jentsch, J. (1999): A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**, 635-644.
- Komatsu, N., Oda, T. & Muramatsu, T. (1998): Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and pseudomonas toxin. *J. Biochem. (Tokyo)* **124**, 1038-1044.
- Krainer, A.R., Mayeda, A., Kozak, D. & Binns, G. (1991): Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K and Drosophila splicing regulators. *Cell* **66**, 383-394.
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M. & Rajewsky, K. (1995): Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427-1429.
- Kullmann, M., Schneikert, J., Moll, J., Heck, S., Zeiner, M., Gehring, U. & Cato, A.C. (1998): RAP46 is a negative regulator of glucocorticoid receptor action and hormone-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 14620-14625.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafuse, W.P., Lanning, D., Spies, T. & David, C.S. (1992): PFGE mapping and RFLP analysis of the S/D region of the mouse H-2 complex. *Immunogenetics* **36**, 110-116.
- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, A., Jaenisch, R. & Berns, A. (1991): Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research* **15**, 4293
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Lee, E.J., Manning, S.H. Yu, Mulder, K.L. & Westphal, H. (1992): Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6232-6236.
- Lanier, L.L., Gutman, G.A., Lewis, D.E., Griswold, S.T. & Warner, N.L. (1982): Monoclonal antibodies against rat immunoglobulin kappa chains. *Hybridoma* **1**, 125-131.
- Lee, J.H., Takahashi, T., Yasuhara, N., Inazawa, J., Kamada, S. & Tsujimoto, Y. (1999): Bis, a Bcl-2-binding protein that synergizes with Bcl-2 in preventing cell death. *Oncogene* **18**, 6183-6190.
- Lehner, B., Semple, J.I., Brown, S.E., Counsell, D., Campbell, R.D. & Sanderson, C.M. (2004). Analysis of a high-throughput yeast two-hybrid system and its use to predict the function of intracellular proteins encoded within the human MHC class III region. *Genomics* **83**, 153-167.

-
- Lin, J.Y., Tserng, K.Y., Chen, C.C., Lin, L.T. & Tung, T.C. (1970): Abrin and ricin: a new anti-tumour substances. *Nature* **227**, 292-293.
- Liu, R., Takayama, S., Zheng, Y., Froesch, B., Chen, G. & Zhang, X. (1998): Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 16985-16992.
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Betz, S.F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J.C. & Fesik, S.W. (2000): Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP B-domain. *Nature* **408**, 1004-8.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. & Jonkers, J. (2001): Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9209-9214.
- Lord, J.M., Roberts, L.M. & Robertus, J.D. (1994): Ricin: structure, mode of action, and some current application. *FASEB J.* **8**, 201-208.
- Luo, Y., Yu, H. & Peterlin, B.M. (1994): Cellular protein modulates effects of human immunodeficiency virus type 1. *Rev. J. Virol.* **68**, 3850-3856.
- Lüders, J., Demand, J. & Hohfeld, J. (2000a): The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J. Biol. Chem.* **275**, 4613-4617.
- Lüders, J., Demand, J., Papp, O. & Hohfeld, J. (2000): Distinct isoforms of the cofactor BAG-1 differentially affect Hsc70 chaperone function. *J. Biol. Chem.* **275**, 14817-14823.
- Magin, T.M., McWhir, J., Melton, D.W. (1992): A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3795-3796.
- Manchen, S.T. & Hubberstey, A.V. (2001): Human Scythe contains a functional nuclear localization sequence and remains in the nucleus during staurosporine-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 1075-1082.
- Manley, J.L. & Tacke, R. (1996): SR proteins and splicing control. *Genes Dev.* **10**, 1569-1579.
- Mansour, S.L., Thomas, K.R. & Capecchi, M.R. (1988): Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**, 348-352.
- Martin, G. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7634.
- Martinou, J.C. & Green, D.R. (2001): Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 63-67.
- Maruyama, I.N. & Brenner, S. (1992): A selective lambda phage cloning vektor with automatic excision of the insert in a plasmid. *Gene* **120**, 135-141.

- Matsuzaki, H., Araki, H. & Oshima, Y. (1988): Gene conversion associated with site-specific recombination in yeast plasmid pSR1. *Mol. Cell Biol.* **8**, 955-962.
- Matthews, D.A. & Russell, W.C. (1998): Adenovirus core protein V interacts with p32-a protein which is associated with both the mitochondria and in the nucleus. *J. Gen. Virol.* **79**, 1677-1685.
- Mayeda, A. & Krainer, A.R. (1992): Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* **68**, 365-375.
- McCarthy, J.V. & Dixit, V.M. (1998): Apoptosis Induced by Drosophila Reaper and Grim in a Human System. Attenuation by inhibitor of apoptosis proteins (cIAPs). *J. Biol. Chem.* **273**, 24009.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M. & Cyr, D. (2001): The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* **2**, 100-105.
- Miki, K. & Eddy, E.M. (2002): Tumor necrosis factor receptor 1 is an ATPase regulated by silencer of death domain. *Mol. Cell Biol.* **22**, 2536-5243.
- Milner, C.M. & Campbell, R.D. (1990): Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* **32**, 242-251.
- Morelle, G. (1982): A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. *BRL Focus* **11**, 7-8.
- Moribe, Y., Niimi, T., Yamashita, O. & Yaginuma, T. (2001): Samui, a novel cold-inducible gene, encoding a protein with a BAG domain similar to silencer of death domains (SODD/BAG4), isolated from bombyx diapause eggs. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3432-3442.
- Mullis, K.B., Faron, F.A., Schar, S., Saiki, R., Horn, G. & Ehrlich, H. (1986): Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273.
- Mungall, A.J., Palmer, S.A., Sims, S.K., Edwards, C.A., Ashurst, J.L., Wilming, L., Jones, M.C., Horton, R., Hunt, S.E., Scott, C.E., Gilbert, J.G., Clamp, M.E., Bethel, G., Milne, S., Ainscough, R., Almeida, J.P., Ambrose, K.D., Andrews, T.D., Ashwell, R.I., Babbage, A.K., Bagguley, C.L., Bailey, J., Banerjee, R., Barker, D.J., Barlow, K.F., Bates, K., Beare, D.M., Beasley, H., Beasley, O., Bird, C.P., Blakey, S., Bray-Allen, S., Brook, J., Brown, A.J., Brown, J.Y., Burford, D.C., Burrill, W., Burton, J., Carder, C., Carter, N.P., Chapman, J.C., Clark, S.Y., Clark, G., Clee, C.M., Clegg, S., Cobley, V., Collier, R.E., Collins, J.E., Colman, L.K., Corby, N.R., Coville, G.J., Culley, K.M., Dhimi, P., Davies, J., Dunn, M., Earthrowl, M.E., Ellington, A.E., Evans, K.A., Faulkner, L., Francis, M.D., Frankish, A., Frankland, J., French, L., Garner, P., Garnett, J., Ghori, M.J., Gilby, L.M., Gillson, C.J., Glithero, R.J., Grafham, D.V., Grant, M., Gribble, S., Griffiths, C., Griffiths, M., Hall, R., Halls, K.S., Hammond, S., Harley, J.L., Hart, E.A., Heath, P.D., Heathcott, R., Holmes, S.J., Howden, P.J., Howe, K.L., Howell, G.R., Huckle, E., Humphray, S.J., Humphries, M.D., Hunt, A.R., Johnson, C.M., Joy, A.A., Kay, M., Keenan, S.J., Kimberley, A.M., King, A., Laird, G.K., Langford, C., Lawlor, S., Leongamornlert, D.A., Leversha, M., Lloyd, C.R., Lloyd, D.M., Loveland, J.E., Lovell, J., Martin, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Maslen, G.L., Matthews, L., McCann, O.T., McLaren, S.J., McLay, K., McMurray, A., Moore, M.J., Mullikin, J.C.,

Niblett, D., Nickerson, T., Novik, K.L., Oliver, K., Overton-Larty, E.K., Parker, A., Patel, R., Pearce, A.V., Peck, A.I., Phillimore, B., Phillips, S., Plumb, R.W., Porter, K.M., Ramsey, Y., Ranby, S.A., Rice, C.M., Ross, M.T., Searle, S.M., Sehra, H.K., Sheridan, E., Skuce, C.D., Smith, S., Smith, M., Spraggon, L., Squares, S.L., Steward, C.A., Sycamore, N., Tamlyn-Hall, G., Tester, J., Theaker, A.J., Thomas, D.W., Thorpe, A., Tracey, A., Tromans, A., Tubby, B., Wall, M., Wallis, J.M., West, A.P., White, S.S., Whitehead, S.L., Whittaker, H., Wild, A., Willey, D.J., Wilmer, T.E., Wood, J.M., Wray, P.W., Wyatt, J.C., Young, L., Younger, R.M., Bentley, D.R., Coulson, A., Durbin, R., Hubbard, T., Sulston, J.E., Dunham, I., Rogers, J. & Beck, S. (2003): The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* **23**; 775-6.

Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. & Tanaka, K. (2001): CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.* **2**, 1133-1138.

Nagy, A. & Mar, L. (2001): Creation and use of a Cre recombinase transgenic database. *Methods Mol. Biol.* **158**, 95-106.

Nashiro, Y., Adachi, M., Okuda, H., Yawata, A., Mitaka, T., Takayama, S., Reed, J.C., Hinoda, Y. & Imai, K. (1999): BAG-1 accelerates cell motility of human gastric cells. *Oncogene* **18**, 3244-3251.

Neville, M.J. & Campbell, R.D. (1997): Alternative splicing of the LST-1 gene located in the Major Histocompatibility Complex on human chromosome 6. *DNA Seq.* **8**, 155-160.

Neville, M.J. & Campbell, R.D. (1999): A new member of the Ig superfamily and a V-ATPase G subunit are among the predicted products of novel genes close to the TNF locus in the human MHC. *J. Immunol.* **162**, 4745-4754.

Nollen, E.A., Brunsting, J.F., Song, J., Kampinga, H.H. & Morimoto, R.I. (2000): Bag1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1083-1088.

Nuclear Receptors Nomenclature Committee. (1999): A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161-163.

Nunes, M., Peelman, L., Vaiman, M., Bourgeaux, N. & Chardon, P. (1994): Characterization of six new loci within the swine major histocompatibility complex class III region. *Mamm. Genome* **5**, 616-622.

Orban, P.C., Chui, D. & Marth, J.D. (1992): Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6861-6865.

Ozaki, T., Hanaoka, E., Naka, M., Nakagawara, A. & Sakiyama, S. (1999): Cloning and characterization of rat BAT3 cDNA. *DNA Cell Biol.* **18**, 503-512.

Packham, G., Brimmell, M. & Cleveland, J.L. (1997): Mammalian cells express two differently localized BAG-1 isoforms generated by alternative translation initiation. *Biochem. J.* **328**, 807-813.

Papayioannou, V. & Johnson, R. (1993): in Gene Targeting. *A Practical Approach.* (Joyner, A.L. ed.), Oxford University Press, Oxford, UK.

- Pawson, T. & Scott, J.D. (1997): Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science* **278**, 2075-2080.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. & Moretta, A. (1999): Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **190**, 1505-1516.
- Penn, D.J. (2000): Major Histocompatibility Complex: Human. In: Nature Encyclopedia of Life Sciences. London: Nature Publishing Group.
[http://www.els.net/\[doi:10.1038/npg.els.0000920\]](http://www.els.net/[doi:10.1038/npg.els.0000920])
- Petersen-Mahrt, S.K., Estmer, C., Öhrmalm, C., Matthews, D.A., Russell, W.C. & Akusjärvi, G. (1999): The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibition ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *The EMBO J.* **4**, 1014-1024.
- Pham, C.T., MacIvor, D.M., Hug, B.A., Heusel, J.W. & Ley, T.J. (1996): Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13090-13095.
- Pratt, W.B. & Toft, D.O. (1997): Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**, 306-360.
- Renoir, J.M., Radanyi, C., Faber, L.E. & Baulieu, E.E. (1990): The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contain a hsp90-bound 59-kilodalton protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 10740-10745.
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. & Dingwall, C. (1991): Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-623.
- Romero, F., Ramos-Morales, F., Dominguez, A., Rios, R.M., Schweighoffer, F., Tocque, B., Pintor-Toro, J.A., Fischer, S. & Tortolero, M. (1998): Grb2 and its apoptotic isoform Grb3-3 associate with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C, and these interactions are modulated by poly(U) RNA. *J. Biol. Chem* **273**, 7776-7781.
- Ruoslahti, E. (1996): RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 697.
- Sandvig, K. & van Deurs, B., (2000): Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanism and medical perspectives. *EMBO J.* **19**, 5943-5950.
- Sandvig, K., Grimmer, S., Lauvrak, S.U., Torgersen, M.L., Skretting, G., van Deurs, B. & Iversen, T.G. (2002): Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells. *Histochem. Cell Biol.* **117**, 131-141.
- Sauer, B. (1987): Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2087-2096.
- Sauer, B. & Henderson, N. (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5166-5170.

- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U. & Moarefi, I. (2000): Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* **101**, 199-210.
- Schneiders, A., Thiel, S., Winkler, J., Möller, P. & Koch, N. (2004): Antibodies generated by a novel DNA vaccination identify the MHC class III encoded BAT2 polypeptide. *Vaccine* **23**, 2538-2548.
- Schneikert, J., Hubner, S., Langer, G., Petri, T., Jaattela, M., Reed, J. & Cato, A.C. (2000): Hsp-70-RAP46 interaction in downregulation of DNA binding by glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **19**, 6508-6516.
- Schwartzberg, P.L., Goff, S.P. & Robertson, E. (1989): Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* **246**, 799-803.
- Schwenk, F., Baron, U. & Rajewsky, K. (1995): A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res.* **23**, 5080-5081.
- Schwenk, F., Kühn, R., Angrand, P.O., Rajewsky, K. & Stewart, A.F. (1998): Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1427-1432.
- Sievers, E. (2002): Assoziation von Herpes Simplex Virus Typ 1 Glykoprotein B und MHC Klasse II-Molekülen. *Universität Bonn, Dissertation.*
- Silke, J., Verhagen, A.M., Ekert, P.G. & Vaux, D.L. (2000): Sequence as well as functional similarity for DIABOLO/Smac and Grim, Reaper and Hit? *Cell Death. Differ.* **7**, 1275.
- Silvers, W.K. (1979): The coat colors of mice: A model for mammalian gene action and interaction. *Springer-Verlag, New York, NY.*
- Simos, G. & Georgatos, S.D. (1994): The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett.* **346**, 225-228.
- Sondermann, H., Scheufler, C., Schneider, C., Hohfeld, J., Hartl, F.U. & Moarefi, I. (2001): Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science* **291**, 1553-1557.
- Song, J., Takeda, M. & Morimoto, R.I. (2001): BAG1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat. Cell Biol.* **3**, 276-282.
- Sparks, A.B., Rider, J.E., Hoffmann, N.G., Fowlkes, D.M., Quilliam, L.A. & Kay, B.K. (1996): Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLC γ , Crk, and Grb2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1540-1544.
- Spies, T., Blanck, G., Bresnahan, M., Sands, J. & Strominger, J.L. (1989): A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* **243**, 214-217.
- Stark, W.M., Boocock, M.R., Sherratt, D.J. (1992): Catalysis by site-specific recombinases [published erratum appears in Trends Genet 1993 Feb; 9 (2):45]. *Trends Genet.* **8**, 432-439.

Steinmetz, A.C., Renaud, J.P. & Moras, D. (2001): Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Annu. Rev. Biophys. Biomo. Struct.* **31**, 329-359.

Sternberg, N. & Hamilton, D. (1981): Bacteriophage P1 site specific recombination I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* **150**, 467-486.

St-Onge, L., Furth, P.A. & Gruss, P. (1996): Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3875-7.

Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J.A. & Reed, J.C. (1995): Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* **80**, 279284.

Takayama, S., Bimston, D.N., Matsuzawa, S., Freeman, B.C., Aime-Sempe, C., Xie, Z., Morimoto, R.I. & Reed, J.C. (1997): BAG-1 modulates the chaperone activity of HSp70/Hsc70. *Embo J.* **16**, 4887-4896.

Takayama, S., Krajewska, S., Kitada, S., Zapata, J.M., Kochel, D., Scudiero, D., Tudor, G., Miller, G.J., Miyashita, M., Yamada, M. & Reed, J.C. (1998): Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res.* **58**, 3116-3131.

Takayama, S., Xie, Z. & Reed, J.C. (1999): An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J. Biol. Chem.* **274**, 781-786.

Takayama, S. & Reed, J.C. (2001): Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat. Cell. Biol.* **3**, 237-241.

Takemoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A. & Miura, M. (2003): Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J. Cell Biol.* **160**, 235-243.

Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackott, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D. & Wong, W.W. (1997): Substrate specificities of caspase family proteases. *J. Biol. Chem.* **272**, 9677-9682.

Tang, S., Shaheta, N., Chernenko, G., Khalifa, M. & Wang, X. (1999): Expression of BAG-1 in invasive breast carcinomas. *J. Clin. Oncol.* **17**, 1710-1719.

Tange, T.O., Jensen, T.H. & Kjems, J. (1996): In vitro interaction between human immunodeficiency virus type 1 rev protein and splicing factor ASF/SF2-associated protein p32. *J. Biol. Chem.* **271**, 10066-10072.

Thyagarajan, B., Guimaraes, M.J., Groth, A.C. & Calos, M.P. (2000): Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* **244**, 47-54.

The International Human Genome Sequencing Consortium (2001). *Nature* **409**, 860-921.

The MHC Sequencing Consortium, 1999: Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* **401**, 921-923.

- Thomas, K.R. & Capecchi, M.R. (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503-12.
- Thornberry, N., Rano, T., Peterson, E., Rasper, D., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V., Nordstrom, P., Roy, S., Vaillancourt, J., Chapman, K. & Nicholans, D. (1997): A combinatorial approach defines specificities of members of caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 17907-17911.
- Thress, K., Henzel, W., Shillinglaw, W. & Kornbluth, S. (1998): Scythe: a novel reaper-binding apoptotic regulator. *Embo J.* **17**, 6135-6143.
- Thress, K., Song, J., Morimoto, R.I. & Kornbluth, S. (2001): Reversible inhibition of Hsp70 chaperone function by Scythe and Reaper. *Embo J.* **20**, 1033-1041.
- Tobaben, S., Thakur, P., Fernandez-Chacon, R., Sudhof, T.C., Rettig, J. & Stahl, B. (2001): A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron* **31**, 987-999.
- Torres, R.M. & Kühn, R. (1997): Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting. *OXFORD UNIVERSITY PRESS*.
- Townsend, P.A., Dublin, E., Hart, I.R., Kao, R.H., Hanby, A.M., Cutress, R.I., Poulsom, R., Ryder, K., Barnes, D.M. & Packham, G. (2002). BAG-1 expression in human breast cancer: interrelationship between BAG-1 RNA, protein, Hsc70 and clinicopathological data. *J. Pathol.* **197**, 51-59.
- Turner, B.C., Krajewski, S., Krajewska, M., Takayama, S., Gumbs, A.A., Carter, D., Rebbeck, T.R., Haffty, J.C. & Reed, J.C. (2001): BAG-1, a novel biomarker predicting long-term survival in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **19**, 992-1000.
- Unanue, E.R. & Allen, P.M. (1987): The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* **236**, 551-557.
- Utans, U., Quist, W.C., McManus, B.M., Wilson, J.E., Arceci, R.J., Wallace, A.F. & Russell, M.E. (1996): Allograft inflammatory factor-1. A cytokine-responsive macrophage molecule expressed in transplanted human hearts. *Transplantation* **61**, 1387-1392.
- Valancius, V. & Smithies, O. (1991): Testing an "in-out" targeting procedure for making subtle genomic modifications in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **11**, 1402-1408.
- Varshavsky, A. (1997): The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci* **22**, 383-387.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. & Vaux, D.L. (2000): Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.
- Wagner, K.U., Wall, R.J., St-Onge, L., Gruss, P., Wynshaw-Boris, A., Garrett, L., Li, M., Furth, P.A. & Henninghausen, L. (1997): Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4323-30.

-
- Wang, H.G., Takayama, S., Rapp, U.R. & Reed, J.C. (1996): Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7063-7068.
- Wang, R. & Liew, C.C. (1994): The human BAT3 ortholog in rodents is predominantly and developmentally expressed in testis. *Mol. Cell Biochem.* **136**, 49-57.
- Wang, Y.L., Finan, J.E., Middeldorn, J.M. & Hayward, S.D. (1997): p32/TAP, a cellular protein that interacts with EBNA-1 of Epstein-Barr virus. *Virology* **236**, 18-29.
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K. & Steller, H. (1994): Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677-683.
- White, K., Tahaoglu, E. & Steller, H. (1996): Cell killing by the *Drosophila* gene reaper. *Science* **271**, 805-807.
- Williamson, M.P. (1994): The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **227**, 249-260.
- Winand, N.J., Panzer, J.A. & Kolodner, R.D. (1998): Cloning and characterization of the human and *Caenorhabditis elegans* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. *Genomics* **53**, 69-80.
- Winkler, J. (2003): Charakterisierung und Expression der MHC-kodierten BAT2- und BAT3-Gene. *Universität Bonn, Dissertation.*
- Witcher, M., Yang, X., Pater, A. & Tang, S.C. (2001): BAG-1L p50 isoform interacts with the vitamin D receptor and its cellular overexpression inhibits the vitamin D pathway. *Exp. Cell Res.* **265**, 167-173.
- Wu, Y.H., Shih, S.F. & Lin, J.Y. (2004): Ricin Triggers Apoptotic Morphological Changes through Caspase-3 Cleavage of BAT3. *The Journal of Biol. Chem.* **18**, 19264-19275.
- Xie, T., Aguado, B., Ahearn, M.E., Madan, A., Qin, S., Campbell, R.D., Hood, L. & Rowen, L. (2002): Crossspecies comparisons between the human and mouse MHC class III regions. *Tissue Antigens* **59**, 7.
- Yewdell, J.W. & Bennink, J.R. (1990): The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* **62**, 203-206.
- Zeiner, M. & Gehring, U. (1995): A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **92**, 11465-11469.
- Zeiner, M., Gebauer, M. & Gehring, U. (1997): Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins. *EMBO J.* **16**, 5483-5490.
- Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C. (1974): Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* **248**, 701-702.

Zuo, Y.R. & Gu, H., Rajewsky, K. (1993): Generation of a mouse strain that produces immunoglobulin kappa chains with human constant regions. *Science* **262**, 1271-4.

Zuo, P. & Maniatis, T. (1996): The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing. *Genes Dev.* **10**, 1356-1368.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2000 bis Dezember 2004 unter Anleitung von Prof. Dr. Norbert Koch am Institut für molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Abteilung Immunbiologie angefertigt. Sie wurde vom Graduiertenkolleg Funktionelle Proteindomänen und über den Sonderforschungsbereich 284 gefördert.

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Freunden, Bekannten und Kollegen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Insbesondere gilt mein Dank:

- Prof. Dr. N. Koch für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit in seinem Institut durchführen zu können, die engagierte Betreuung dieser Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft.
- Prof. Dr. K.-H. Scheidtmann für die Übernahme der Koreferenz der vorliegenden Arbeit.
- Prof. Dr. J. Höhfeld und Mitarbeitern für die Beantwortung aller Fragen und die Versorgung mit CHIP-Antiserum.
- Prof. Dr. T. Magin für die Bereitstellung der ES-Zellen und die Einführung in die ES-Zellkultur.
- Prof. Dr. A. Waisman für die Bereitstellung der TK-Kassette.
- Den Mitarbeitern des Instituts für Genetik für die wertvollen Ratschläge bezüglich der Konstruktion eines Geninaktivierungsvektors.
- Karolj Borsos für die Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.
- Alexander Theodoridis und Sebastian Temme für die hilfreichen Gespräche im Labor.
- Angelika König für Ihre stetige Hilfsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge.

Ein ganz besonderer Dank geht an Johannes Winkler für die kritische Durchsicht dieser Arbeit, Beantwortung aller Computerfragen und für alle anderen Sachen, die hier keinen Platz mehr finden.

Ein sehr großer Dank gilt meinen Eltern, die gerade in schlechten Zeiten für mich da waren und mich unterstützt haben.

Meiner Frau Rong möchte ich mich ganz herzlich für Ihre Geduld, Hilfsbereitschaft und vieles mehr während meiner Arbeit und der Zeit des Zusammenschreibens danken.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder im Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass die Dissertation noch an keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegt wurde, und dass sie nicht veröffentlicht worden ist. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt.

Andreas Hentsch