

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Medizinische Klinik 1
Direktor: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

***Identifikation von Interaktionspartnern des humanen DNA-Reparaturproteins
MLH1 mit einem bakteriellen Zweihybrid-System***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Fabian Nicolas Wolpert
aus Darmstadt

Frankfurt am Main, 2010

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Medizinische Klinik 1
Direktor: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

***Identifikation von Interaktionspartnern des humanen DNA-Reparaturproteins
MLH1 mit einem bakteriellen Zweihybrid-System***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Fabian Nicolas Wolpert
aus Darmstadt

Frankfurt am Main, 2010

Dekan:	Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Jörg Trojan
Korreferent:	P.D. Dr. Stephan Sahm
Tag der mündlichen Prüfung:	04.02.2011

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Das Lynch-Syndrom Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (HNPCC) ..	- 2 -
1.2	Sporadisches kolorektales Karzinom mit MMR Defekt.....	- 4 -
1.3	DNA Mismatch Reparatur	- 5 -
1.3.1	Aufgabe und Bedeutung	- 5 -
1.3.2	Molekularer Mechanismus	- 7 -
1.3.3	Weitere Funktionen von MMR Proteinen	- 11 -
1.4	Nachweisverfahren von Protein-Protein Interaktionen.....	- 11 -
1.4.1	Etablierte Nachweismethoden	- 11 -
1.4.1.1	In vivo fusionsbasierte Protein Purifikation	- 11 -
1.4.1.2	Tandem Affinitäts Purifikation	- 13 -
1.4.1.3	Quantitative Proteomics	- 14 -
1.4.1.4	Chemical Crosslinking	- 15 -
1.4.1.5	Konfokale Laser-Mikroskopie	- 15 -
1.4.1.6	Koimmunopräzipitation.....	- 16 -
1.4.1.7	Zweihybrid-System	- 17 -
2	ZIELE	- 18 -
3	METHODEN	- 19 -
3.1	Zweihybrid-Systeme: Entwicklung und Bestandteile.....	- 19 -
3.1.1	Architektur der RNA Polymerase und Funktion der α -Untereinheit	- 19 -
3.1.2	Hefebasierte Zweihybrid-Systeme.....	- 20 -
3.1.2.1	Weiterentwicklung von Hefe Zweihybrid-Systemen	- 22 -
3.1.2.2	Der λ Repressor	- 23 -
3.1.3	Entwicklung eines bakteriellen Zweihybrid-Systems.....	- 24 -
3.2	Bacteriomatch (I) Two – Hybrid System.....	- 26 -
3.2.1.1	Nähere Beschreibung der Plasmide pBT und pTRG.....	- 27 -

3.2.1.2	Nähere Beschreibung der Bakterien und Nährböden	- 28 -
3.2.2	Bacteriomatch (II) Two – Hybrid System	- 29 -
3.3	Allgemeine Methoden	- 31 -
3.3.1	Sterilisation von Lösungen und Gebrauchsmaterialien	- 31 -
3.4	Herstellung der Nährmedien	- 31 -
3.4.1	Dual-Selektiv-Platten	- 31 -
3.5	Herstellung kompetenter Zellen.....	- 32 -
3.6	Transformationen.....	- 33 -
3.6.1	Transformation	- 33 -
3.6.2	Kotransformation.....	- 34 -
3.7	Protokolle zur DNA Amplifikation	- 35 -
3.7.1	Mini-Präparation.....	- 35 -
3.7.2	Maxi-Präparation	- 36 -
3.8	Methoden zur DNA Quantifizierung	- 37 -
3.8.1	Spektralphotometrie.....	- 37 -
3.8.2	Agarose-Gel Elektrophorese	- 38 -
3.9	Sequenzierung.....	- 39 -
3.9.1	Sequenzierungsreaktion	- 39 -
3.9.2	Aufreinigung der Sequenzreaktion	- 39 -
3.9.3	Elektrophorese und Detektion.....	- 40 -
3.9.4	Suche zur Protein Identifikation	- 40 -
4	ERGEBNISSE.....	- 41 -
4.1	Ergebnisse im Zusammenhang mit den Vorarbeiten	- 41 -
4.2	Auswertung.....	- 42 -
4.2.1	Wachstumskontrolle der Dual-Selektivplatten.....	- 42 -
4.2.2	Sequenzierung und Identifikation der zugehörigen Gene	- 42 -
4.3	Charakterisierung der identifizierten Proteine.....	- 47 -

4.3.1	Proteine des Immunsystems.....	- 47 -
4.3.1.1	Immunglobulin-Ketten	- 47 -
4.3.1.2	Interleukin 20 Rezeptor (IL20RA)	- 47 -
4.3.2	Cysteinproteinasen	- 48 -
4.3.3	Mitochondriale Proteine.....	- 48 -
4.3.4	Enzyme des Nukleinsäuren Metabolismus	- 49 -
4.3.4.1	<i>5'-Nucleotidase, cytosolic III-like</i> (NT5C3L).....	- 49 -
4.3.4.2	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47</i> (DDX47).....	- 49 -
4.3.5	Signalmoleküle und Enzyme	- 50 -
4.3.5.1	<i>N-myc downstream regulated 1</i> (NDRG1).....	- 50 -
4.3.5.2	<i>Chloride intracellular channel 1</i> (CLIC1).....	- 51 -
4.3.5.3	Annexin A6 (ANXA6).....	- 51 -
4.3.5.4	Neutrophil cytosolic factor 4 (NCF4)	- 52 -
4.3.5.5	Lipid-Phosphat-Phosphatase 2 (LPP2).....	- 52 -
4.3.5.6	Phytoceramidase (= <i>alkaline ceramidase 3</i> (ACER3))	- 53 -
4.3.5.7	<i>Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2</i> (PTP4A2).....	- 54 -
4.3.5.8	<i>RAP guanine nucleotide exchange factor (GEF)-like 1</i> (RAPGEFL1)	- 55 -
4.3.5.9	<i>Selenium binding protein 1</i> (SELENBP1)	- 55 -
4.3.5.10	<i>Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2</i> (SPTLC2)	- 55 -
4.3.5.11	Pigment epithelium derived factor (PEDF).....	- 56 -
4.3.5.12	<i>V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1</i> (ARAF1)	- 57 -
4.3.5.13	Non-POU domain containing, octamer- <i>binding</i> (NONO)	- 57 -
4.3.6	Stoffwechsellenzyme	- 58 -
4.3.6.1	<i>Adenine phosphoribosyltransferase</i> (APRT)	- 58 -
4.3.6.2	<i>Argininosuccinate synthetase 1</i> (ASS1).....	- 58 -
4.3.7	Translationsproteine und Ribosomale Proteine	- 58 -
4.3.7.1	<i>Ribosomal protein S2</i> (RPS2) / <i>S5</i> (RPS5) / <i>S16</i> (RPS16)	- 58 -
4.3.7.2	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2A</i> (EIF2A)	- 59 -
4.3.7.3	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2</i> (EEF2).....	- 59 -
4.3.8	Proteasom und Sequestosom assoziierte Proteine	- 60 -
4.3.8.1	<i>UBA domain containing 1</i> (UBAC1)	- 60 -
4.3.8.2	<i>Sequestosome 1</i> (SQSTM1 = p62).....	- 60 -
4.3.9	Proteine des Zytoskeletts.....	- 60 -
4.3.9.1	<i>Actin, gamma 1</i> (ACTG1)	- 60 -
4.3.9.2	CutA divalent cation tolerance homolog (CUTA).....	- 61 -
4.3.9.3	<i>Desmin</i> (DES)	- 62 -
4.3.9.4	<i>Parvin, alpha</i> (PARVA)	- 62 -
4.3.9.5	Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (SPTAN1)	- 62 -

4.3.9.6	<i>Sec61 alpha 1 subunit (SEC61A1)</i>	- 63 -
4.3.9.7	Transgelin (TAGLN = SM22)	- 63 -
4.3.10	Bestandteile der DNA Reparatur	- 63 -
4.3.10.1	<i>Post-meiotic segregation protein 2 (PMS2)</i>	- 63 -
4.3.11	Sonstige Proteine.....	- 64 -
5	DISKUSSION.....	- 65 -
5.1	Methodik	- 65 -
5.1.1	Praktische Erfahrungen mit dem <i>Bacteriomatch (II) Two – Hybrid System</i>	- 65 -
5.1.2	Verwendung eines bakteriellen Zweihybrid-Systems.....	- 65 -
5.2	Interpretation der detektierten Interaktionen.....	- 66 -
5.2.1	Vergleich der Ergebnisse mit anderen Forschungsgruppen	- 66 -
5.2.2	Bekannte Funktionen von hMLH1 und Übereinstimmung mit dem Zweihybrid-Screening	- 68 -
5.2.2.1	hMLH1 und MMR	- 68 -
5.2.2.2	hMLH1 bei der Antikörperbildung.....	- 69 -
5.2.2.3	hMLH1 in der Meiose	- 70 -
5.2.2.4	hMLH1 im Zusammenhang mit Zellzyklus und Apoptose	- 71 -
5.2.3	Ribosomale Proteine.....	- 74 -
5.2.4	Zytoskelettale Proteine.....	- 75 -
5.2.5	Mitochondriale Proteine.....	- 76 -
5.3	Ausblicke.....	- 77 -
6	ZUSAMMENFASSUNG	- 79 -
7	LITERATURVERZEICHNIS	- 82 -
8	ANHANG.....	- 94 -
8.1	: Verwendete Materialien	- 94 -
8.1.1	Geräte und Zubehör.....	- 94 -
8.1.2	Computerprogramme	- 95 -
8.1.3	Feste und flüssige Chemikalien.....	- 95 -
8.1.4	Antibiotika.....	- 96 -

8.1.5	Nährmedien	- 96 -
8.1.6	Kit Systeme.....	- 96 -
8.1.7	Sonstige Labormaterialien	- 97 -
8.2	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	- 98 -
8.3	Abkürzungen	- 101 -

1 Einleitung

Das menschliche Genom besteht aus Nucleinsäuren, die die individuelle Erbinformation darstellen.

Dieses System ist durch äußere Einflüsse ständigen Schädigungen ausgesetzt, die zu einer Funktionsänderung oder zum Funktionsverlust einer Zelle führen können.

Um diese Schäden auszugleichen, besitzt die menschliche Zelle verschiedene DNA-Reparatursysteme. Hierzu zählen beispielsweise die Nucleotid-Exzision-Reparatur (*nucleotid excision repair* = NER), die Basen-Exzision-Reparatur (*base excision repair* = BER) und die DNA-Mismatch-Reparatur (*DNA mismatch repair* = MMR) ¹. Ein Defekt dieser Systeme kann zu verschiedenen onkologischen Erkrankungen führen. Eines der wichtigsten MMR-Proteine ist das humane-MutL-Homologe (hMLH1).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die mit hMLH1 interagieren. Dabei handelt es sich zum einen um Proteine, die direkt in die DNA-Reparatur involviert sind wie z.B. Endonukleasen, Helikasen und DNA-Glykosylasen. Daneben wurden aber auch Interaktionspartner identifiziert, die darauf hinweisen, dass hMLH1 in andere wichtige Zellprozesse wie z.B. Apoptose involviert ist. Die verantwortlichen Mechanismen und Partner, die MMR und Apoptose miteinander verknüpfen, sind jedoch in weiten Teilen unbekannt.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeitsgruppe ein bakterielles Zweihybrid-System etabliert, um so neue hMLH1 Interaktionspartner zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit sollten die ermittelten Zweihybrid-Daten in einer zweiten, verfeinerten Analyse verifiziert, die identifizierten Interaktionsproteine bestimmt und die Ergebnisse mit bereits veröffentlichten verglichen werden.

1.1 Das Lynch-Syndrom

Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)

Das kolorektale Karzinom ist eine der häufigsten malignösen Erkrankungen in den westlichen Industrienationen. Etwa 20% aller kolorektalen Karzinome weisen dabei einen erblichen Hintergrund auf. In den Familien sind zwei oder mehr erst- und zweitgradige Verwandte betroffen. Dabei stellt das Lynch-Syndrom, welches mit 2-5 % aller Fälle in Verbindung gebracht wird, die Erkrankung mit der höchsten Prävalenz dar ².

Erste Beobachtungen eines familiären Krebsyndroms (*Cancer Family Syndrome*) wurden durch Alfred Scott Warthin Ende des 19. Jahrhunderts am Beispiel der „Familie G“ beschrieben. Deren Mitglieder waren gehäuft von malignösen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und des Uterus betroffen ^{3,4}. Aufbauend auf diesen Beobachtungen führten umfangreiche familiäre Studien im Laufe des 20. Jahrhunderts zur präziseren Definition des Syndroms, das nach seinem Erstbeschreiber, H.T. Lynch, benannt wurde ⁵. Synonym wird auch die Bezeichnung hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (*hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC)*) verwendet. Das Lynch-Syndrom unterscheidet zwischen einer gastrointestinal gehäuften (Lynch I) und einer globalen Form (Lynch II) ⁴.

1993/94 folgte die Entdeckung der beiden wichtigsten bei diesem Erkrankungsbild defekten Proteine, hMSH2 und hMLH1, die aus Mechanismen der MMR bekannt waren ⁶⁻⁸.

Nach heutigem Kenntnisstand werden, neben gastrointestinalen und endometrialen Tumoren, auch Karzinome der Ovarien, des Magens sowie der Harn- und Gallenwege den molekulargenetischen Pathomechanismen des Lynch-Syndroms zugeschrieben ⁹. Sonderformen sind das, durch kutane Manifestationen gekennzeichnete, Muir-Torre Syndrom ¹⁰ und das Turcot-Syndrom ¹¹, welches die Assoziation mit neuronalen Tumoren beschreibt.

Das Lynch-Syndrom ist gekennzeichnet durch eine autosomal-dominante Vererbung, eine hohe Genpenetranz und mit im Durchschnitt 45 Jahren durch ein frühes Erkrankungsalter. Die intestinale Manifestation des Lynch-Syndroms ist meist im proximalen Kolon lokalisiert. Sie zeichnet sich histologisch durch auffällige, Morbus Crohn ähnliche, lymphozytäre Tumorzell-Infiltrate und Siegelringzellen aus ². Die Identifikation von potentiellen HNPCC Patienten erfolgt klinisch nach den Amsterdam und den Bethesda Kriterien ¹².

Tabelle 1: Amsterdam-Kriterien zur Diagnose des HNPCC (Punkte 1-5 müssen erfüllt sein)

1.	Mindestens drei Familienmitglieder mit kolorektalem Karzinom und/oder Endometrium-, Dünndarm- oder urotheliales Karzinom von Nierenbecken oder Ureter
2.	Mindestens zwei aufeinander folgende Generationen betroffen
3.	Ein Familienmitglied erstgradig verwandt mit den beiden anderen
4.	Ein Erkrankter zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 50 Jahre
5.	Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP)

Tabelle 2: Bethesda Kriterien (ein Punkt muß erfüllt sein)

1.	Patienten mit Krebserkrankung in Familien, die die Amsterdam-Kriterien erfüllen
2.	Patienten mit zwei HNPCC-assoziierten Karzinomen, einschließlich synchroner und metachroner kolorektaler Karzinome oder assoziierter extrakolonischer Karzinome
3.	Patienten mit kolorektalem Karzinom und einem erstgradigen Verwandten mit kolorektalem oder assoziiertem extrakolonischen Karzinom und/oder einem kolorektalen Adenom; eine der Krebserkrankungen wurde im Alter <45 Jahren diagnostiziert, das Adenom <40 Jahren
4.	Patienten mit kolorektalem Karzinom oder Endometriumkarzinom, diagnostiziert im Alter <45 Jahren
5.	Patienten mit rechtsseitigem Kolonkarzinom mit einem undifferenzierten (solid/cribriformen) Zelltyp in der Histopathologie, diagnostiziert im Alter <45 Jahren
6.	Patienten mit kolorektalem Karzinom vom Siegelringzell-Typ, diagnostiziert im Alter <45 Jahren
7.	Patienten mit Adenomen, diagnostiziert im Alter < 40 Jahren

(Quelle: AWMF-Leitlinien, Kolorektales Karzinom)

1.2 Sporadisches kolorektales Karzinom mit MMR Defekt

Neben dem erblich bedingten Ausfall von hMLH1 im Rahmen des Lynch Syndroms kann dieser auch nachträglich erworben werden. Ein erheblicher Bestandteil von sporadischen Tumoren zeigt ebenfalls eine verminderte Expression von MMR Proteinen, was unter Anderem auf die Methylierung des hMLH1 Promotors zurückgeführt wird¹³. Diese Erkenntnis hat in letzter Zeit an Aktualität gewonnen, da sie beim serratierten Karzinogeneseweg von pathogenetischer Bedeutung ist, der sich in den letzten Jahren neben der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz etabliert hat^{14,15}.

Bei der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz geht man davon aus, dass sich aus einem Adenom über verschiedene Zwischenstufen ein Kolonkarzinom entwickelt, wobei Mutationen zum schrittweisen Verlust von Tumor-Suppressorgenen (z.B. APC oder P⁵³) und zur Entstehung von Onkogenen aus Protoonkogenen (z.B. KRAS) führen.

Beim serratierten Karzinogeneseweg findet die Krebsentstehung ebenfalls über Vorstufen statt, die ein serratiertes Wachstumsmuster zeigen und bisher den hyperplastischen Polypen zugerechnet wurden¹⁵. Die Bezeichnung „serratiert“ leitet sich dabei aus dem histologischen Phänotyp ab, der sich durch gezackte Wachstumsränder auszeichnet. Diese kommen durch eine Störung der physiologischen Apoptose in den Krypten zustande, die zu einer Retention von Darmepithelien und so zu einer „Aufwerfung“ der Wachstumsränder führt¹⁶⁻¹⁸. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit der Methylierung von DNA, die im Bereich von Promotoren zum Ausfall der betroffenen Gene führen kann, u.A. von hMLH1¹⁹. Bei den rechtsseitigen kolorektalen Karzinomen zeigen 17,5% einen serratierten Phänotyp, insgesamt sind es 7,5%²⁰.

Molekulargenetisch wird der serratierte Karzinogeneseweg in zwei Gruppen eingeteilt: den MSI-H serratierten Weg mit hoher Mikrsatelliteninstabilität, und den MSI-L bzw. MSS Weg (*MSI low* bzw. *MSI stable*). Beim MSI-H Weg stellt das sessile serratierte Adenom die präkanzeröse Läsion dar, welche häufig eine Methylierung des hMLH1-Promotors aufweist, eher rechtsseitig lokalisiert ist und eine günstigere Prognose zeigt. Beim MSI-L/MSS Weg stellt das traditionelle serratierte Adenom die präkanzeröse Läsion dar, welche eher distal lokalisiert ist und eine ungünstigere Prognose aufweist²⁰.

Die zunehmende Akzeptanz des serratierten Karzinogeneseweges findet aktuell Berücksichtigung in der klinischen Praxis, da sich hierdurch zusätzliche Konsequenzen für Vorsorge und Therapie des kolorektalen Karzinoms ergeben.

1.3 DNA Mismatch Reparatur

1.3.1 Aufgabe und Bedeutung

Die Hauptaufgabe der DNA-Mismatch-Reparatur ist die Erkennung und Korrektur von Läsionen unmittelbar nach der Replikation. Darüber hinaus spielt das System bei höheren Organismen eine Rolle in der Detektion von DNA-Schäden und Signalisierung dieser Schäden an die Apoptosemaschinerie.

Die MMR korrigiert Einzel-Fehlpaarungen sowie Insertions/Deletions-Schleifen (*insertion/deletion loops*=IDLs)²¹. Einzel-Fehlpaarungen entstehen bei der Replikation durch Einbau nicht homologer Purin- oder Pyrimidinbasen aufgrund von Fehlern der verantwortlichen DNA-Polymerasen²². IDLs sind Basensequenzen eines DNA Stranges, für die es auf dem Gegenstrang keinen passenden Partner zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen gibt. Solche Bereiche hängen als einsträngige Schleifen an der regulär gepaarten Doppelstrang-DNA. Sie können dadurch entstehen, dass der enzymatische Replikationskomplex während der Strangverlängerung kurzzeitig dissoziiert und sich die beiden noch losen Enden des neu synthetisierten Stranges lösen. Bei der erneuten Assoziation der DNA kann es dann zu einer Verschiebung der beiden Strangenden kommen, so dass sich die ursprünglich homologen Basen im reassozierten Strang nicht mehr gegenüber liegen (siehe [Abbildung 1](#)).

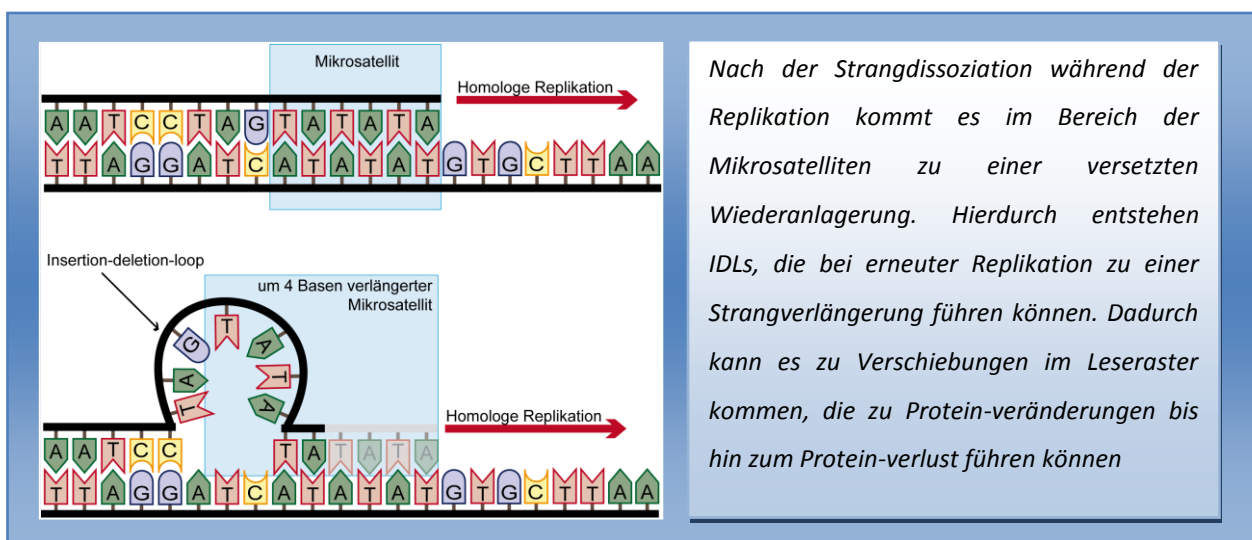
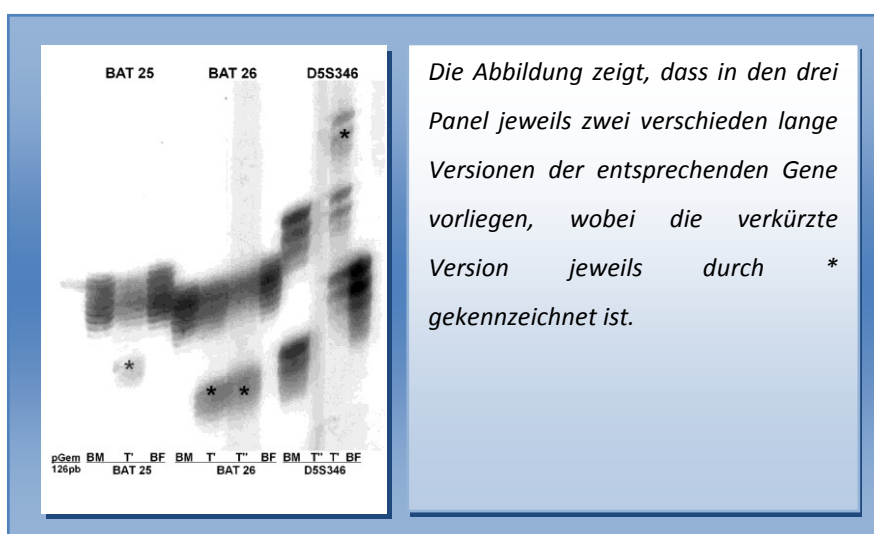


Abbildung 1: Mikrosatelliteninstabilität

Bilden sich ausreichend Wasserstoffbrückenbindungen mit den jetzt gegenüberliegenden Basen aus, so kann der Strang in der neuen Position verbleiben. An den Stellen, an denen sich keine homologen Basen auf dem anderen Strang befinden, bilden sich IDLs aus. Man nennt dieses Phänomen auch *slipped strand mispairing*. Es tritt besonders häufig in Bereichen auf, in denen ein hoher Anteil an repetitiven Sequenzen mit wiederkehrendem Basenmuster vorliegt, so genannten Mikrosatelliten. Diese bestehen aus wiederkehrenden Mustern von bis zu 6 Basen, die sich bis zu 100 mal wiederholen können. Hier ist die Wahrscheinlichkeit am höchsten, dass sich trotz einer Verschiebung Wasserstoffbrücken mit dem gegenüberliegenden Strang ausbilden. Bei einer erneuten Replikation werden die IDLs homolog mitrepliziert, so dass sich die DNA am betroffenen Strang entsprechend verlängert. Die beiden neuen DNA Stränge werden somit in den Bereichen der Mikrosatelliten unterschiedlich lang; deshalb bezeichnet man diese DNA als „Heteroduplex“ DNA und das gesamte Phänomen als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ²³. Diese kann bei entsprechender Lokalisation von Einschränkungen bis zum Verlust der Funktion der entsprechenden Proteine führen.

MSI lässt sich mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachweisen. Vorher ausgewählte Mikrosatelliten-Loci werden gezielt vervielfältigt und die DNA-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt. Es entstehen dabei Fragmente unterschiedlicher Länge, gemäß den unterschiedlich langen Mikrosatelliten, was sich in einem entsprechenden Bandenmuster ausdrückt (siehe [Abbildung 2](#)). Da die MSI durch die MMR korrigiert wird, lassen sich von dem Grad der Instabilität Rückschlüsse auf die Effektivität der Reparatur ziehen ²⁴.



Die Abbildung zeigt, dass in den drei Panel jeweils zwei verschieden lange Versionen der entsprechenden Gene vorliegen, wobei die verkürzte Version jeweils durch * gekennzeichnet ist.

Abbildung 2: MSI-Nachweis

In der Diagnostik des Lynch-Syndroms findet diese Methode eine praktische Anwendung. Dabei werden fünf definierte Genloci untersucht (BAT26, BAT25, D5S346, D2S123, und D17S250) (siehe auch [Abbildung 2](#))²⁵. Wird MSI in mindestens zwei dieser Loci nachgewiesen, so spricht man von hoher Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H). Bei Instabilität in nur einem Locus spricht man von niedriger Instabilität (MSI-L), liegt keine Mikrosatelliteninstabilität vor, so bezeichnet man die Loci als stabil (MSS).

Insgesamt sind ca. 15% aller kolorektalen Tumore mit einer MSI behaftet, diese ist jedoch in vielen Fällen nicht auf eine Mutation der MMR-Gene zurückzuführen. So kann z.B. der Promotor des hMLH1-Gens methyliert werden, was zu einem Ausfall der Expression führen kann. Dies ist vom Lynch-Syndrom abzugrenzen, da es sich hier um einen erworbenen Defekt handelt. Die Spezifität der Risikosatellitenanalyse ist somit eingeschränkt und die Diagnose muß durch weitere molekularbiologische Verfahren gesichert werden¹².

1.3.2 Molekularer Mechanismus

Die an der MMR beteiligten Protagonisten wurden erstmals in Bakterien nachgewiesen. Dabei wurden 3 Enzyme entdeckt, die die essentiell für die bakterielle MMR sind: MutL, MutS und MutH. MutL und MutS liegen dabei als Heterodimere Proteine vor.

Die für die humane DNA Mismatch-Reparatur spezialisierten MutS und MutL homologen Proteine sind Heterodimere, die vorzugsweise in den aufgeführten Kombinationen vorkommen können (siehe [Tabelle 3](#)). MutH fehlt in der humanen MMR²⁶.

Tabelle 3: MMR Proteinkomplexe

Heterodimer	Bestandteile	Funktion
MutSα	hMSH2, hMSH6	Erkennung von Base-Base Fehlpaarungen und kleinen IDLs ²⁷⁻²⁹
MutSβ	hMSH2, hMSH3	Erkennung von IDLs ³⁰
MutLα	hMLH1, hPMS2	Komplex mit fehlgepaarter DNA und MutS α ; erhöht die Diskriminierung zwischen Homo- und Heteroduplex DNA; Beteiligung bei der meiotischen Rekombination ³¹⁻³²
MutLβ	hMLH1, hPMS1	Unbekannt ³³
MutLγ	hMLH1, hMLH3	In erster Linie an meiotischer Rekombination beteiligt; kann MMR Aufgaben von MutL α übernehmen ³⁴⁻³⁶

MLH: MutL homologes Protein; MSH: MutS homologes Protein; PMS: Post-Meiotisches-Segregationsprotein;

Präfix h: human

Der Mechanismus der MMR ist in Pro- und Eukaryoten in weiten Teilen sehr ähnlich. Es existieren jedoch Unterschiede, die den Mechanismus entscheidend beeinflussen können und im Folgenden genauer beschrieben werden.

Die humanen MutS homologen Heterodimere sind für die Erkennung der Basenfehlpaarung verantwortlich. Von den 5 bekannten MutS Homologen sind 3 an der MMR beteiligt: hMSH2, hMSH3, hMSH6 (siehe [Tabelle 3](#)). Dabei hat die Verbindung aus hMSH2/hMSH6 (MutS α) die höchste Bindungsaffinität zu einzelnen Basenfehlpaarungen und IDLs bis zu 2 Basen, hMSH2/hMSH3 (MutS β) ist auf längere IDLs spezialisiert²¹. Strukturell muß man beim humanen MutS zwischen funktionell getrennten Domänen unterscheiden:

Die Erkennung von Defekten geschieht N-terminal über eine spezifische Domäne (Phe-X-Glu), die nur in MSH6 vorkommt³⁷. Dabei ist noch nicht bekannt, wie die Erkennung von IDLs durch MutS β funktioniert³⁸. C-terminal besitzt jedes MutS α zwei zusammenhängende ATP Bindungsstellen, deren genaue Funktion jedoch auch noch nicht vollständig geklärt werden konnte³⁹. Bekannt ist, dass MutS α mit ADP beladen ist, wenn es nicht in DNA gebundener Form vorliegt⁴⁰.

Durch die Bindung an eine Fehlpaarung ist MutS α an der entsprechenden Stelle der DNA fixiert. Der Austausch von ADP zu ATP sowie die Präsenz von Magnesium bewirken eine Konformationsänderung, die einerseits zur Lockerung der Bindung, andererseits zur Umschließung der DNA durch MutS α führt. So kann es auf dem DNA Strang entlangfahren, was man als *sliding clamp* bezeichnet⁴⁰⁻⁴². Es konnte allerdings auch in Versuchsanordnungen mit unterbundenem Gleitvorgang eine DNA Reparatur beobachtet werden^{43,44}. Diese *sliding clamp* interagiert anschließend mit einem MutL-Protein, zumeist MutL α . MutL Proteine besitzen an ihrem N-terminalen Ende eine GHKL (Gyrase/ Hsp90/Histidin-Kinase/MutL) ATPase und an ihrem C-terminalen Ende eine Dimerisierungsdomäne⁴⁵. Sie sind in der Lage, fest an DNA Fragmente mit freien Enden oder an DNA Strangbrüche zu binden⁴⁶⁻⁴⁸.

Es wird angenommen, dass MutL Proteine die Interaktion zwischen dem durch MutS markierten DNA-Defekt und den durch den Strangbruch definierten Startpunkt der Reparatur vermitteln. Es ist noch nicht geklärt, ob der Kontakt zwischen dem Strangbruch und dem DNA Defekt durch Lokomotion des Komplexes oder Annäherung der betroffenen Strangregionen durch Biegung der DNA zustande kommt.

Weitere für die MMR benötigte Faktoren sind im Folgenden aufgeführt (siehe [Tabelle 4](#)):

Tabelle 4: MMR Kofaktoren

<i>proliferating cell nuclear antigen (PCNA)</i>	Es bildet analog dem MutS-MutL Komplex eine <i>sliding clamp</i> aus, die die Polymerase an der DNA verankert. Dies ist bei der Replikation, aber auch bei der MMR von Bedeutung, wo es mit MSH6/MSH3 interagiert ^{49,50}
<i>replication factor C (RFC)</i>	Er unterstützt die Fixierung von PCNA auf der DNA
<i>Exonuklease I (EXO1)</i>	Sie entfernt den fehlerhaften Strang, wobei sie in beide Richtungen arbeiten kann ^{51,52}
<i>single stranded binding factor replication protein A (RPA)</i>	DNA-Bindungsproteine, die den korrekten Strang während des Reparaturvorganges schützen ⁵³⁻⁵⁵
<i>non-histone chromatin component high-mobility group box 1 (HMGB1)</i>	
<i>DNA Polymerase δ</i>	Auffüllen der Nukleotidlücken ⁵⁶
<i>DNA Ligase I</i>	Verbindung der endständigen Basen des neuen Stranges

Die Informationen, die zu den jeweiligen Protagonisten gewonnen werden konnten, sind zu einem möglichen Reparaturmechanismus unter der Beteiligung von MutS α und MutL α verknüpft worden ^{57,58} (siehe [Abbildung 3](#)).

Wie oben beschrieben wird nach der Bindung von MutS α oder MutS β an den DNA-Defekt durch die Rekrutierung von MutL α oder MutL γ der MutS-MutL Komplex gebildet. Dieser löst ATP abhängig die Bindung von MutS α , gleichzeitig bildet er eine Pore um die DNA, so dass er auf ihr entlanggleiten kann. Dies ist in beide Strangrichtungen möglich (5'>3' bzw. 3'>5') und dauert an, bis der Komplex auf einen Strangbruch trifft, welcher die Voraussetzung für die Auftrennung des defekten DNA-Stranges durch Exonukleasen darstellt. Im Leitstrang sind dies die Strangenden oder zufällige Strangbrüche, im Folgestrang kann dies auch an Okazaki-Fragmenten vorkommen. Die Strangbrüche tragen jeweils an ihrem 3'-Ende ein Molekül PCNA und am 5'-Ende ein Molekül RFC. Die folgenden Schritte hängen von der Richtung ab, in der sich der nächste, für den Reparaturbeginn notwendige, Strangbruch befindet:

Trifft ein MutS-MutL Komplex in 5'-Richtung auf einen Strangbruch, so bindet der Komplex an das dort angeheftete RFC, welches EXO1 anlagert. Diese entfernt den Einzelstrang, bis die Fehlpaarung erreicht ist. Nach deren Entfernung dissoziiert die Exonuklease, was durch den MutS-MutL Komplex gesteuert wird. Der freiliegende Einzelstrang wird durch RPA Moleküle stabilisiert. Das am 3'-Ende des initialen Strangbruches lokalisierte PCNA unterstützt die

Bindung der DNA Polymerase δ , welche den entfernten Stranganteil wieder resynthetisiert und die DNA Ligase I füllt die Lücken zwischen den Strangenden auf.

In die andere Richtung trifft der MutS-MutL Komplex auf ein am 3'-Ende des Strangbruches assoziiertes PCNA. Ihre Interaktion führt wiederum zu einer Aktivierung der EXO1, so dass der Strang in Richtung der Fehlpaarung entfernt wird. Der freie Einzelstrang wird wie oben beschrieben durch RFC Moleküle stabilisiert. PCNA „begleitet“ zusammen mit dem MutS-MutL Komplex die Exonuclease, so dass es am Ende des Resektionsvorganges am 3'-Ende des Reststranges hängt. Wie bereits beschrieben schließen sich die Resynthetisierungsschritte der DNA Polymerase δ und der DNA Ligase an.

In beiden Fällen verhindert das Molekül, welches nicht mit dem MutS-MutL Komplex interagiert (in 5'-Richtung PCNA und in 3'-Richtung RFC), dass eine Strangresektion in der der Fehlpaarung abgewandten Seite stattfindet.

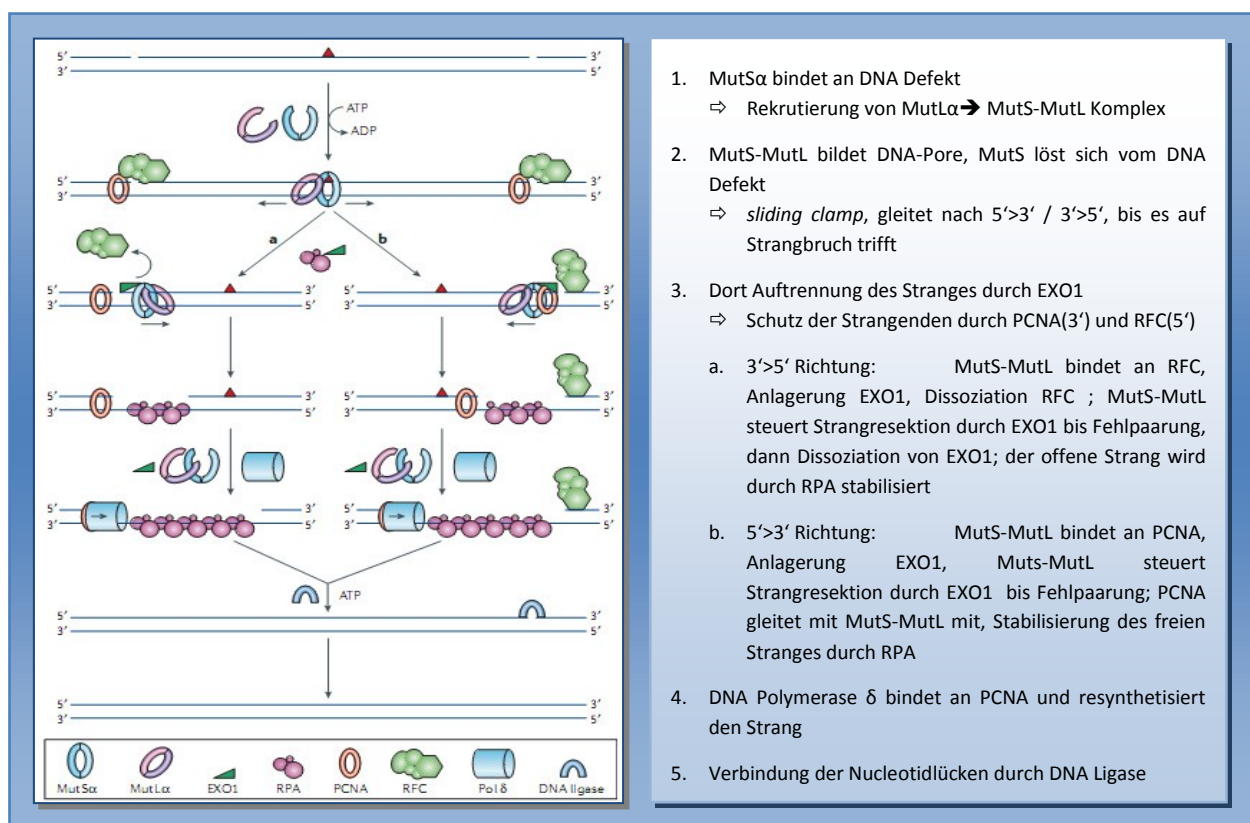


Abbildung 3: Modell des MMR-Mechanismus

In diesem Modell wurde die Frage, wie sich der MutS-MutL Komplex in welche Richtung bewegt, nicht geklärt. Einfache Diffusionsprozesse⁵⁹ und gerichtete ATP-abhängige Mechanismen werden diskutiert⁶⁰.

1.3.3 Weitere Funktionen von MMR Proteinen

Die Proteine hMLH1 und hMSH2 sind multifunktionale Enzyme, denen neben ihrer Beteiligung an der DNA Reparatur weitere davon unabhängige Aufgaben zugeschrieben werden^{61,62}.

Hierzu gehört die Beteiligung von hMLH1 und hMSH2 an Mechanismen des Immunsystems, namentlich der somatischen Hypermutation (SHM) und dem Immunglobulin-Klassenwechsel⁶³. Zudem ist bekannt, dass hMLH1 an Vorgängen während der Meiose beteiligt ist, speziell an genetischen Rekombinationsschritten⁶⁴.

Auch die Regulation von Zellzyklus und Wachstum wird durch MMR-Enzyme beeinflusst; hMLH1 und hMSH2 sind über die Aktivierung von entsprechenden Kinasen (hMSH2: CHK2, hMLH1: ATM) für die Aktivierung des S-Phase-Kontrollpunktes des Zellzyklus verantwortlich. Dieser löst bei der Detektion von DNA Läsionen einen Arrest nach der DNA Synthesephase aus, um die entdeckten Schäden zu beheben⁶⁵.

1.4 Nachweisverfahren von Protein-Protein Interaktionen

1.4.1 Etablierte Nachweismethoden

Verschiedene Methoden haben sich bewährt, um Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachzuweisen:

1.4.1.1 In vivo fusionsbasierte Protein Purifikation

Eine wichtige Methode für den Nachweis von Protein-Protein Interaktionen stellt die *in vivo* fusionsbasierte Protein Purifikation dar.

Bei dieser Methode werden Sequenzen für bestimmte Markerproteine verwendet, die eine hohe Affinität zu vordefinierten Proteinpartnern haben (*affinity tags*). Eine solche Basensequenz wird mit der eines Köderproteins, das untersucht werden soll, fusioniert und in ein Plasmid integriert. Das Plasmid wird in eine Zelle eingebracht und exprimiert dort sein Genprodukt. Durch die Verwendung von eukaryotischen Zellen kommt es zur Ausbildung von Proteinbindungskomplexen mit den physiologischen Bindungspartnern im entsprechenden subzellulären Kompartiment (z.B. Mitochondrien).

Anschließend werden die Zellen lysiert und über einen festen Bindungspartner des Markerproteins vom Rest des Zelllysates getrennt, z.B. durch Säulenchromatographie. Nach Elution werden die Proteinkomplexe elektrophoretisch aufgetrennt und gebundene Proteine über massenspektrometrische Verfahren identifiziert⁶⁶.

Die Expression in eukaryotischen Zellen ermöglicht posttranslationale Modifikationen (PTMs), welche, durch beispielsweise phosphorylitische Vorgänge, die Affinität zu den Bindungspartnern entscheidend beeinflussen können⁶⁷. Dies kann je nach Proteinstruktur und Modifikation die Bindungsstärke positiv oder negativ beeinflussen.

Ein Problem dieser Methode liegt in der möglichen Interaktionen mit Fremdproteinen.

Besonders wenn die Bindungsstärke niedrig oder die Bindungskinetik hoch sind, können bereits gebundene Proteine durch andere Partner mit höherer Affinität verdrängt werden.

Diese Gefahr besteht vor allem beim Schritt der Zellyse, welcher zur Auflösung der Zellkompartimente und somit zur Durchmischung des gesamten Zellproteoms führt. Weitere Probleme können durch die Anwendung chromatographischer Verfahren entstehen, da die Bedingungen in den Pufferlösungen der Teströhrchen stark unterschiedlich zu denen im physiologischen zellulären Milieu sein können. Dies liegt beispielsweise an den unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen der Partnerproteine. Es ist demzufolge möglich, dass Proteine im zellulären Milieu Bindungen eingehen, diese sich aber in den an die Zellyse anschließenden Schritten wieder lösen⁶⁸. Zudem können schwächere Proteinbindungen durch Waschvorgänge gelöst werden.

Liegen die beteiligten Proteine nur in geringen Mengen vor, so können ihre Banden bei der anschließenden Elektrophorese durch andere überdeckt werden, die in höherer Konzentration vorliegen.

Das Köderprotein ist in den entsprechenden Zellen oft überexprimiert, so dass die Konzentration von den physiologischen Bedingungen abweicht. In der Folge kann das Protein unverhältnismässig viele Interaktionen mit unspezifischen Liganden wie Chaperon- oder Hitzeschockproteinen eingehen, die bei der Synthese das noch unfertige Protein schützen sollen. Generell stellen die Interaktionen mit unspezifischen Liganden eine Fehlerquelle für falsch-positive Versuchsergebnisse dar. Neben den oben genannten Chaperonen und Hitzeschockproteinen finden sich hier auch Vertreter der ribosomalen Proteine oder auch der metabolischen Enzyme⁶⁹.

Die Überexpression eines Proteins kann zu zellulären Funktionsänderungen bis hin zum Zelltod führen⁷⁰, eine Modifizierung des Proteins durch Fusion mit einer *tag*-Sequenz kann zudem die Eigenschaften des Proteins verändern. Dies kann die Affinität zu den Bindungspartnern, die Membrangängigkeit oder die Translokation innerhalb der Wirtszelle beeinflussen.

Letztendlich kann auch die *tag*-Fusion dem Köderprotein zytotoxische Eigenschaften verleihen. Aus diesem Grund befindet sich die Markersequenz einerseits am N- als auch am C- Ende ⁷¹.

1.4.1.2 Tandem Affinitäts Purifikation

Eine Weiterentwicklung der beschriebenen Methode stellt die Tandem Affinitäts Purifikation (TAP) dar ⁷². Hier werden anstatt einem zwei, über eine Proteinsequenz verbundene, Markerproteine mit dem Köderprotein fusioniert. Die Verbindungsregion muß unter anderem zwei wichtige Eigenschaften besitzen: einerseits muß sie relativ unabhängig von den Stoffwechselprozessen in der Wirtszelle sein, andererseits sollte sie hochspezifische Schnittstellen für bestimmte Proteasen besitzen. Ein Beispiel hierfür ist ein Protein des *tobacco etch virus* (TEV), das einerseits sehr unterschiedlich vom eukaryotischen Proteom ist, andererseits eine hochspezifische Schnittstelle für die TEV-Protease hat ⁷³.

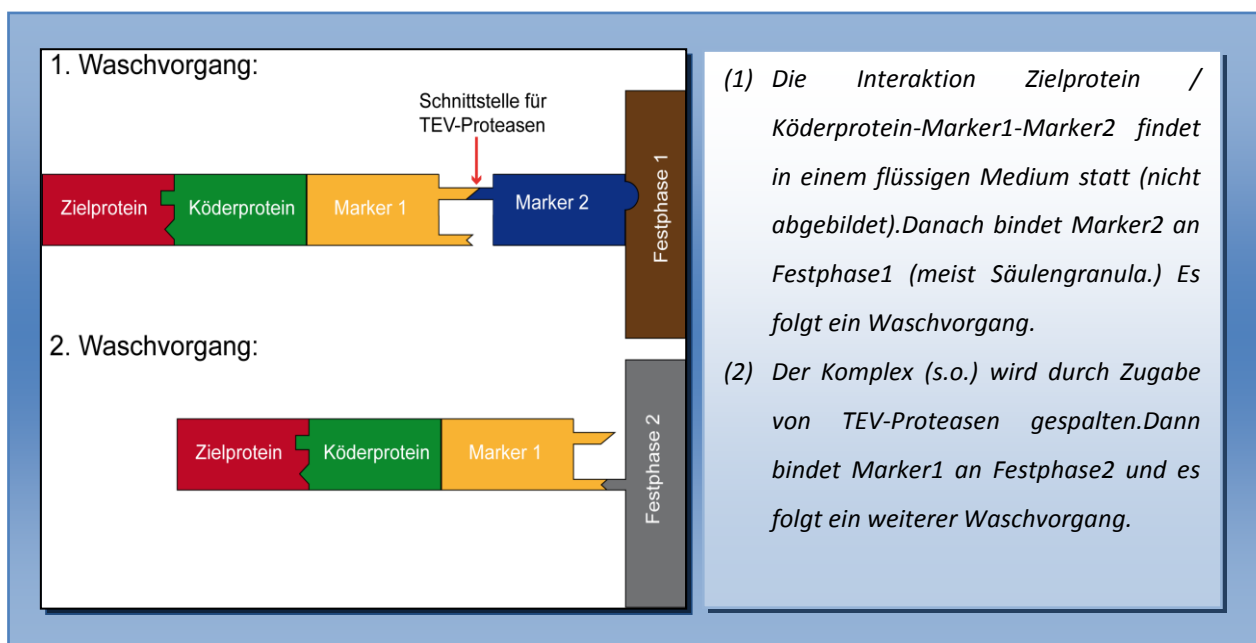


Abbildung 4: Tandem Affinitäts Purifikation

Dies ermöglicht zwei hintereinandergeschaltete Purifikationsschritte: Im ersten Schritt wird eine Bindung des ersten Markerproteins an einen ortsständigen Liganden, beispielsweise in einer Chromatographiesäule, durchgeführt. Nach einem Waschvorgang wird durch Einsatz der TEV Protease die Verbindung zwischen Markerprotein 1 und 2 getrennt, so dass der Komplex aus dem zweiten Marker, dem Köder- und den Ligandenproteinen von der Säule gelöst werden kann. Die anschließende erneute Chromatographie mit Waschschrinen verringert die

Kontamination mit unspezifischen Liganden deutlich (s.o., siehe [Abbildung 7](#)). Die folgenden Schritte sind wie bei der einfachen Purifikation eine chromatographische Auftrennung und eine massenspektrometrische Analyse.

Diese Methode besitzt eine relativ hohe Spezifität, allerdings ist sie weniger dazu geeignet, Proteininteraktionen geringerer Bindungsstärke nachzuweisen, da diese durch die multiplen Waschvorgänge verloren gehen können. Zudem benötigt die Methode eine relativ große Menge an Ausgangsmaterial, was zu Problemen bei der Untersuchung von Proteinkomplexen geringer Konzentration führen kann⁷⁴. Für den erfolgreichen Einsatz in Säugerzellen mußte die TAP noch weiter modifiziert werden⁷⁵.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die *in vitro* Purifikationsmethoden gut geeignet sind, Proteinkomplexe mit mehr als einem Liganden darzustellen. Dabei können die Liganden alle posttranslationalen Modifikationsschritte durchlaufen, so dass sie am Ende der Purifikation in ihrer physiologischen Form vorliegen.

Schwächen zeigen sich beim Nachweis von Liganden geringer Konzentration oder Bindungsstärke, was besonders die Tandem Affinitäts Purifikation betrifft.

1.4.1.3 Quantitative Proteomics

Eine Möglichkeit, Interaktionen mit unspezifischen Liganden und somit falsch-positive Ergebnisse auszuschliessen, stellen quantitative Proteinnachweismethoden dar (*quantitative proteomics*). Es handelt sich dabei um Techniken, mit denen man Proteine durch stabile Isotope unterschiedlich markieren kann. Führt man nun Versuchsreihen mit mehreren Köderproteinen durch und vergleicht ihre Ergebnisse der Elektrophorese, können die Banden unspezifischer Liganden an einem gemischten Isotopenmuster erkannt und ausgeschlossen werden⁷⁶⁻⁷⁸.

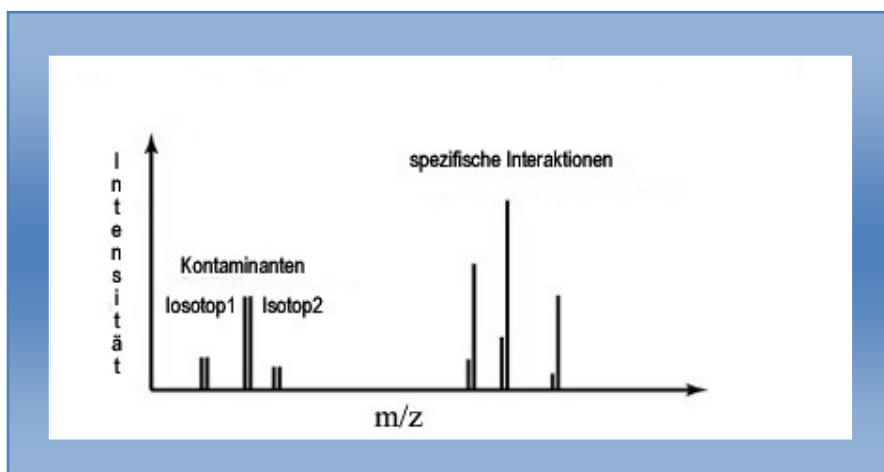


Abbildung 5: Quantitative Proteomics

1.4.1.4 Chemical Crosslinking

Beim *chemical crosslinking* bilden Aminosäuren unter Einsatz entsprechender Substanzen kovalente Bindungen untereinander aus, und vernetzen so Proteine, die miteinander interagieren. Die dabei entstehenden Proteinkomplexe werden im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Für die Quervernetzung wird beispielsweise N-Hydroxysuccinimid zur Veresterung von Lysinresten verwendet. Die Vernetzungsvorgänge können gleichzeitig mit Photoaktiven oder radioaktiven Substanzen ergänzt werden. Durch die Stärke der, durch das Crosslinking erzeugten, Bindungen können auch sehr große Proteinkomplexe mit nur schwachen Bindungskräften nachgewiesen werden. Im Umkehrschluss kann jedoch die Stärke der Interaktion kaum beurteilt werden⁷⁹.

1.4.1.5 Konfokale Laser-Mikroskopie

Voraussetzung des Interaktionsnachweises mittels Konfokaler Laser-Mikroskopie ist, dass interagierende Proteine in räumlicher Nähe zueinander stehen und dies nachgewiesen werden kann. Die Proteine werden hierzu in geeigneten Zellen koexprimiert. Dabei können die potentiellen Partner mit zusätzlichen Markersequenzen fusioniert sein, die mit Antikörpern detektierbar sind, oder es werden proteinspezifische Erstantikörper verwendet.

Nach Bindung des Erstantikörpers erfolgt die Inkubation mit unterschiedlichen sekundären Fluoreszenzantikörpern. Interagieren die Proteine tatsächlich miteinander, kann durch Überlagerung der verschiedenen Fluoreszenzen die Kolo-kalisation nachgewiesen werden (siehe [Abbildung 6](#)). Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, dass subzelluläre Kompartimente, in der die Interaktion stattfindet, auffindig gemacht werden können. Zur genaueren Bestimmung können Strukturen wie Zellorganellen parallel gefärbt werden.



Abbildung 6: Konfokale Laser-Mikroskopie

1.4.1.6 Koimmunopräzipitation

Die Koimmunopräzipitation findet vor allem Anwendung bei der Verifikation von, mit anderen Methoden detektierten, Protein-Protein Interaktionen.

Es werden Komplexe bestehend aus dem Köderprotein und den Bindungsproteinen aus einem Zelllysat ausgefällt. Dies geschieht mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das Köderprotein oder das Bindungsprotein gerichtet sind. Die Zelllysate werden also bei dieser Methode zuerst mit den gewünschten Antikörpern inkubiert. Da der Fc-Anteil von Antikörpern durch spezifische Proteine mit hoher Affinität gebunden werden kann, werden anschließend dem Gemisch derartig beschichtete Sepharose-Partikel zugesetzt. Ein Sepharose-Partikel kann mehrere Antikörper-Köderprotein-Komplexe binden. Nach einigen Aufreinigungsschritten werden die präzipitierten Proteine von der Sepharose getrennt und durch Westernblot oder massenspektrometrische Verfahren abschließend analysiert.

Die Koimmunopräzipitationen können unterschiedlich durchgeführt werden:

So können beispielsweise endogene Proteine und ihre endogenen Interaktionspartner mittels spezifischer Antikörper, die gegen das Köderprotein gerichtet sind, nachgewiesen werden. Hierbei liegen die Proteine in physiologischen Konzentrationen vor, die meist sehr niedrig sind. Dies kann dazu führen, dass entweder gar kein Nachweis möglich ist, oder dass die Antikörper Protein-Protein-Interaktionsstellen von Interesse blockieren.

Eine weitere Variante stellt die Überexpression des Köderproteins in der Zelle dar. Hierfür sind geeignete Zellen und Expressionsplasmide auszuwählen. Durch die höheren Proteinkonzentrationen wird der Nachweis erleichtert, die Konzentrationen weichen jedoch von den physiologischen Bedingungen ab. Deshalb sollte eine Bestätigung der Ergebnisse durch die zuvor beschriebene Methode mit endogenem Köder- und Interaktionsprotein erfolgen. Gleichzeitig kann neben dem Köderprotein auch das Interaktionsprotein in der entsprechenden Art und Weise überexprimiert werden.

Bei Proteinen, für die beispielsweise keine spezifischen Antikörper verfügbar sind, ist es möglich, das Gen des Köderproteins mit einer *tag*-Sequenz auf einem Plasmid zu fusionieren. Eine *tag*-Sequenz kann verschiedene Eigenschaften haben: sie kann z.B. kovalente Bindungen mit Säulenmaterialien eingehen, Bindungsstelle für Antikörper sein oder weitere chemische Eigenschaften wie Fluoreszenz besitzen. Letzteres ist hilfreich bei der Lokalisation des zellulären Subkpartiments, in welchem die Interaktion stattfindet.

Die Aufreinigung erfolgt dann entweder direkt, z.B. durch entsprechende Säulen, oder durch gegen die *tag*-spezifische Antikörper. Ein Vorteil hierbei ist, dass die Antikörper vom Köderprotein unabhängig sind. Die Gefahr der Blockierung der Interaktionsstelle durch Antikörper kann so verringert werden. Allerdings können die Eigenschaften des Köderproteins durch die Fusion mit der *tag*-Sequenz verändert werden⁸⁰.

1.4.1.7 Zweihybrid-System

Eine weitere Methode zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen stellen die Zweihybrid-Systeme dar.

Sie basieren auf der molekularbiologischen Erkenntnis, dass der Transkriptionsvorgang durch Proteine reguliert wird, die mit der DNA, welche abgelesen werden soll, und der RNA Polymerase wechselwirken. Die Gene von RNA Polymerase und Regulatorprotein werden jeweils mit dem eines Kandidatenproteins fusioniert, so dass eine Interaktion dieser beiden Proteine zu einer Aktivierung der Transkription führt. Das Transkriptionsprodukt muß leicht zu detektieren oder zu quantifizieren sein⁸¹.

In dieser Arbeit wurde das *Bacteriomatch Two – Hybrid System* (Firma: Stratagene, La Jolla; California/USA) verwendet, welches im Bereich „Methoden“ ausführlich behandelt wird.

2 Ziele

Mit Hilfe eines bakteriellen Zweihybridsystems sollten bisher unbekannte Interaktionspartner des humanen MMR Proteins hMLH1 identifiziert und bekannte Interaktionspartner bestätigt werden. Die Arbeit umfasst dabei folgende Teilabschnitte:

1. Etablierung eines Zwei-Hybrid-Screens mit dem *Bacteriomatch Two – Hybrid System*
2. Identifikation von Interaktionspartnern von hMLH1 mit dem *Bacteriomatch Two – Hybrid System*
3. Sequenzabgleich der identifizierten Klone und Erstellung eines Profils der zugehörigen Proteine

3 Methoden

3.1 Zweihybrid-Systeme: Entwicklung und Bestandteile

3.1.1 Architektur der RNA Polymerase und Funktion der α -Untereinheit

Grundlage aller Zweihybrid-Systeme ist die Bindung zwischen der RNA Polymerase und verschiedenen Transkriptionsfaktoren⁶⁶.

Eine Stimulation der Transkription durch direkte Wechselwirkung von Faktoren mit der Polymerase wurde schon früh vermutet. Der genaue Mechanismus blieb jedoch lange unbekannt⁸².

Am Beispiel des Lac-Operons wurde 1987 ein Modell entwickelt, bei dem ein Repressorprotein an den Promotorbereich bindet und so eine Transkription verhindert.

Die Gültigkeit des Modells konnte lange nicht eindeutig bewiesen werden^{83,84}.

Die RNA Polymerase (RNAP) besteht aus 4 Untereinheiten: α , β , β' und σ (siehe [Abbildung 7](#)).

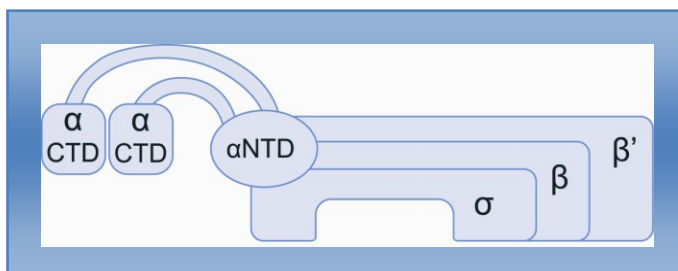


Abbildung 7: Modell der RNA Polymerase

σ ist für die Erkennung der Promotorregion verantwortlich und dissoziiert nach erfolgreicher Bindung an die DNA vom $\alpha\beta\beta'$ -Komplex⁸⁵.

Die Untereinheiten β und β' sollen für die Bildung des eigentlichen Initiations- und Elongationskomplexes verantwortlich sein.

Der α -Untereinheit der RNA Polymerase (RNAP α) wurde lange Zeit lediglich eine stabilisierende Rolle bei der Komplexbildung zugeschrieben⁸⁶. Sie besteht aus einer C-terminalen und einer N-terminalen Domäne, die über eine flexible Verbindung (*linker*-Region) miteinander verbunden sind. Diese ermöglicht eine freie Beweglichkeit der C-terminalen Domäne.

Erste Hinweise, dass ihr noch weitere Aufgaben während der Transkription zukommen, wurden bei Versuchen mit Bakteriophagen vom Typ T4 gefunden⁸⁷.

Es wurde beobachtet, dass bei Bakterien mit T4 Befall ADP-Ribosylierungen an α -Untereinheiten vorlagen, die zu einer veränderten Affinität der Polymerase zum Promotor führten. Andere Untersuchungen ließen vermuten, dass wichtige Transkriptionsfaktoren in der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA Polymerase (α CTD, siehe [Abbildung 7](#)) im RNAP α -Gen lokalisiert sein könnten⁸⁸.

Durch Antikörper gegen Epitope der α -Untereinheit konnte die Transkription beeinflusst werden, dabei fand sich speziell eine verminderte Transkription am cAMP-Rezeptor-Protein (CRP)-abhängigen Lac-Promotor. CRP ist ein für das Lac-Operon spezifischer Transkriptionsfaktor. Diese Ergebnisse wiesen auf eine direkte Protein-Protein Interaktion zwischen RNAP α und CRP hin, die durch die spezifischen Antikörper unterbunden worden war^{89,90}.

Dies lässt auch Rückschlüsse auf die C-terminalen Region der α -Untereinheit zu. Sie ist an einigen Mechanismen der Transkriptionsregulation beteiligt, scheint aber insgesamt von der Kernfunktion der Polymerase relativ unabhängig zu sein⁹¹.

Die Erkenntnis, dass RNAP durch Protein-Protein Interaktion zwischen der α -Untereinheit und Transkriptionsfaktoren reguliert werden kann, ist die Grundlage, auf der alle Zweihybrid-Systeme entwickelt wurden.

3.1.2 Hefebasierte Zweihybrid-Systeme

Erste Zweihybrid-Systeme wurden für Hefen vom Stamm *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt. In einer der ersten Veröffentlichungen, die sich mit diesem Thema beschäftigt⁸¹, wurde das GAL4-Gen des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* verwendet, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert. GAL4 reguliert die Transkription des lacZ-Gens, das für das Enzym β -Galaktosidase kodiert und Organismen die Galaktoseverwertung ermöglicht. Bei Transkription und Expression dieses Gens ist ein Wachstum auf einem Minimalnährboden, der lediglich Galaktose als Kohlenstoffquelle aufweist, möglich.

GAL4 besteht aus zwei getrennten und funktionell essentiellen Domänen. Die eine liegt N-terminal und bindet an bestimmte DNA Sequenzen (UasG-Promotor); die andere liegt C-terminal und enthält Säureanteile, die für die Initiation der Transkription notwendig sind. Das Gen besteht aus insgesamt 881 Basenpaaren, wobei die 147 N-terminalen Aminosäuren die DNA Bindungsregion an den UasG-Promotor darstellen und die 113 C-terminalen Aminosäuren die Region für die Transkriptionsaktivierung kodieren.

Fields *et al.* trennten die beiden Domänen des GAL4-Gens voneinander und verknüpften sie jeweils mit einem anderen Protein: die C-terminale Domäne mit einem Protein X, die N-terminale Domäne mit einem Protein Y. Bei Interaktion von Protein X und Y kommen die C- und die N-terminale Domäne in räumliche Nähe und ermöglichen so die Transkription des lacZ-Gens.

In der Arbeitsgruppe von Fields wurden für die Proteine X und Y die Hefeproteine ausgewählt, die für die Gene SNF1 und SNF4 kodieren. Beim SNF1-Protein handelt es sich um eine Serin-Threonin-Proteinkinase, beim SNF4-Protein um einen essentiellen Cofaktor der Kinase⁹². Es wurden zwei Expressionsvektoren hergestellt. Das erste Plasmid enthielt die DNA-Bindungsdomäne des GAL4 Gens (Basen 1-147), fusioniert mit dem SNF1 Gen. Das zweite Plasmid enthielt eine Fusion aus der Domäne für die Transkriptionsaktivierung und dem SNF4 Gen. Im Versuch wurde ein *Sacharomyces cerevisiae*-Stamm (GHHY1::171) verwendet, der weder das GAL4- noch das GAL80-Gen (negativer Regulator von GAL4) aufweist. Der UasG Promotor und das lacZ-Gen, die für die Wirksamkeit des GAL4 Proteins notwendig sind, waren im Hefegenom integriert. Um die erfolgreiche Einbringung der Hybridplasmide in den Wirt zu verifizieren, wurden die Gene LEU2 und HIS3 in die Plasmide integriert. Sie ermöglichen das Wachstum in histidin- und leucinarmer Umgebung. Da die verwendeten Minimalnährböden histidin- und leucinfrei waren, wirkten LEU2 und HIS3 als Selektionsmarker. Um die Stärke der Interaktion zu quantifizieren wurde die Aktivität der β -Galaktosidase über eine galaktoseassoziierte Farbreaktion bestimmt.

Bei erfolgreicher Kotransformation mit beiden Plasmiden (GAL4 (1-147) - SNF1 ; SNF4-GAL4(768-881)) konnte eine Farbreaktion nachgewiesen werden, die wesentlich stärker war als bei einfacher Transformation mit nur einem Plasmid. Am stärksten war die Farbreaktion jedoch bei einer Kontrolle mit reinem GAL4 (siehe [Abbildung 8](#)).

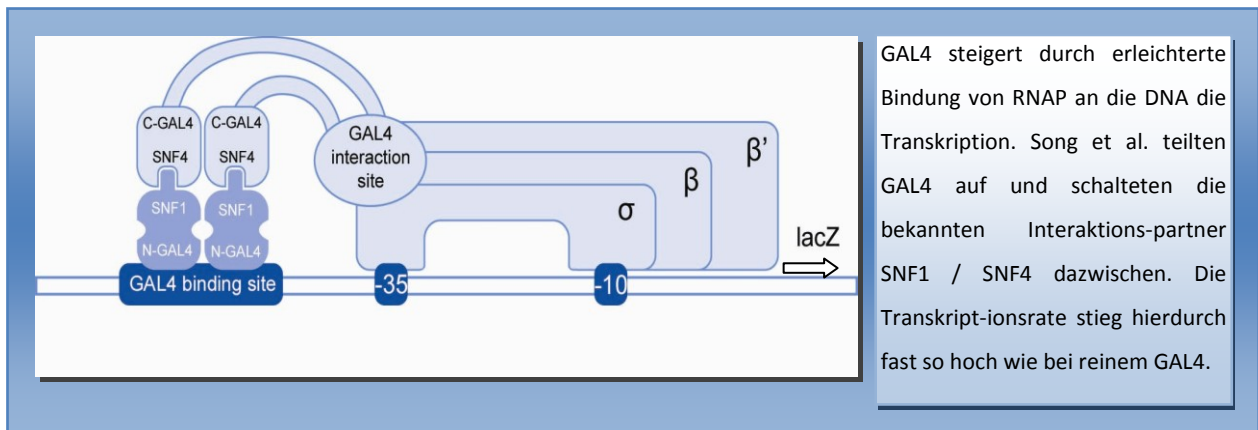


Abbildung 8: Modell des Hefe Zweihybrid-Systems (vereinfachte Darstellung)

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass durch die Interaktion der beiden Proteine (GAL4 (1-147) - SNF1 ; SNF4-GAL4(768-881)) die Transkriptionsrate des lacZ-Gens erhöht worden war.

3.1.2.1 Weiterentwicklung von Hefe Zweihybrid-Systemen

Versuche mit hefebasierten Zweihybrid-Systemen gestalten sich hinsichtlich der niedrigen Wachstumsgeschwindigkeit und Transformationseffektivität relativ aufwendig.

Zudem können die Proteine, die auf den eingebrachten Plasmiden liegen, den Metabolismus der Wirtszelle beeinflussen, wenn sie homolog zu bestimmten wachstumsregulierenden oder apoptotisch wirksamen Hefeproteinen sind⁹³. Aus diesem Grund wurde nach Verbesserungen der Methode gesucht.

Ein Ansatz ist hierbei die Substitution der Hefen durch Bakterienstämme.

Bakterien sind hinsichtlich der Transformationseffektivität und Kultivierbarkeit den Hefen deutlich überlegen. Weiterhin gestaltet sich die Extraktion von Plasmid DNA aus Bakterien leichter als aus eukaryotischen Zellen. Der zytotoxische Effekt durch Plasmidproteine ist zudem verringert.

Da Bakterien keinen Zellkern besitzen, können Interaktionen unabhängig vom zellulären Subkompartiment detektiert werden. Dies ist dann von Vorteil, wenn ein Protein verschiedene Funktionen inner- und außerhalb des Zellkerns hat.

Allerdings müssen die aus den bisherigen Systemen gewonnenen Erkenntnisse an die unterschiedlichen Verhältnisse in Wirtsbakterien angepasst werden.

Als Interaktionspartner mit dem Transkriptionsapparat der Bakterien müssen andere Proteine eingesetzt werden. Verwendung findet beispielsweise das Repressorprotein des Phagen λ (λ CI)

3.1.2.2 Der λ Repressor

Der Operator des Bakteriophagen λ wird in einigen bakteriellen Zweihybrid-Systemen verwendet. Bakteriophagen sind Viren, die ihre eigene DNA in ein Wirtsbakterium einbringen und sich dort vermehren. Dabei gibt es zwei alternative Reproduktionswege: den lytischen, und den lysogenen Zyklus. Beim lytischen Zyklus werden die Phagen im Bakterium vermehrt und anschließend wird die Wirtszelle lysiert.

Beim lysogenen Zyklus wird die Phagen DNA in das Zellgenom integriert und dann bei jeder Zellteilung mitrepliziert. Die Zellyse wird jedoch unterdrückt. Ob der lytische oder der lysogene Zyklus aktiviert wird, wird transkriptionell durch λ cl gesteuert^{95,96}.

λ cl weist zwei unterschiedliche Domänen auf⁹⁷: Die N-terminale Domäne besteht aus 92 Aminosäuren und vermittelt die Bindung an die DNA. Die C-terminale Region ist über eine Verbindung von 40 Aminosäuren angehängt und umfasst 104 Aminosäuren. Sie ist sowohl für die Dimerbildung als auch für die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich⁹⁸. λ cl hat nicht nur eine transkriptionshemmende Funktion, sondern kann auch als Transkriptionsaktivator wirken.

Auf dem λ -Chromosom kann λ cl an 6 Operatoren binden. Diese sind in zwei Gruppen eingeteilt: die rechte Operator-Region und die linke Region (OR und OL). Diese beiden Gruppen sind etwa 2500 Basenpaare voneinander entfernt und bestehen aus jeweils 3 Operatorbindungsstellen (OR 1-3 und OL 1-3). Diese umfassen jeweils 17 Basenpaare und sind durch Sequenzen von drei bis sieben Basenpaaren verbunden.

λ cl bindet jeweils als Dimer an jede dieser Bindungsstellen. Da sie in ihrer Sequenz variieren, ist auch die Stabilität der Bindung unterschiedlich. Für OR/L 1 ist sie jeweils am stärksten.

Die oben beschriebene Fähigkeit der Dimerisierungsdomäne, weitere Proteinbindungen einzugehen, ermöglicht es weitere Repressordimere zu binden und ihre Interaktion mit einer angrenzenden Bindungsstelle zu erleichtern. Eine Bindung an die andere Operatorregion (OR bzw. OL) ist auch möglich, wenn sich die beiden Regionen in einer DNA Schleife gegenüberliegen, so dass insgesamt Repressortetramere oder Octamere entstehen können.

λ cl kann allerdings nicht nur die Transkription der Lysegene inhibieren, sondern erfüllt auch noch weitere Funktionen: Eine Bindung an OR2 kann die Transkription der Gene für den Lysogenen Zyklus an dem entsprechenden Promotor (*promotor for repressor maintenance*=PRM) stimulieren⁹⁹⁻¹⁰⁴.

Bei der Entwicklung von bakteriellen Zweihybrid-Systemen wurde nach Proteinen gesucht, die eine Bindung der zu untersuchenden eukaryotischen Proteine an die bakterielle DNA ermöglichen. Beim *Bacteriomatch Two – Hybrid System* wurden die Erkenntnisse über die Bindung von λ cl an seinen Operator verwendet.

Hierzu wurde das Gen für λ cl auf einem Plasmid integriert, wobei an das C-terminale Ende die DNA-Sequenz eines zu untersuchenden Proteins einkloniert wurde. In das Bakteriengenom wurde ein einzelner λ -Operator vom Typ OR2 integriert, der wie oben beschrieben eine hohe Bindungsaffinität und eine transkriptionsaktivierende Funktion besitzt.

3.1.3 Entwicklung eines bakteriellen Zweihybrid-Systems

Erste Ansätze für die Entwicklung eines bakteriellen Zweihybrid-Systems stammen von einer Forschungsgruppe aus Harvard ¹⁰⁵.

Ein Problem in der Entwicklung bestand in den Unterschieden im Genom von Pro- und Eukaryoten. Die bisherigen Interaktionspartner aus dem Hefe-Zweihybrid-System mußten gegen Proteine ausgetauscht werden, die in der Lage sind an das Bakteriengenom zu binden.

Hier machte man sich die genauen Kenntnisse über λ cl und RNAP zunutze.

λ cl besteht aus einer DNA bindenden Domäne und einer Domäne, die Protein Interaktionen eingehen kann. Die C-terminale Domäne von RNAP α (α CTD) ist für die Bindung von Transkriptionsfaktoren zuständig oder kann direkt an DNA binden und so die Transkription einleiten. Die N-terminale Domäne von RNAP α (α NTD) ist für die Komplexbildung mit den anderen Enzymuntereinheiten verantwortlich.

α CTD wurde mit der C-terminale Domäne eines λ cl (λ CTD) fusioniert. Dieser Anteil von λ cl ist normalerweise zuständig für die Dimerisierung von zwei Repressorproteinen. Das entstandene Fusionsprotein (RNAP α - λ cl) kann nun mit dem C-terminalen Ende anderer λ -Repressorproteine interagieren.

Zusätzlich wurde ein einzelner λ -Operator (Typ OR2) in das Genom eines *E.coli* (MC1000 F' λ clq) integriert. Dieser wurde 62 Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt eines Lac-Promotors lokalisiert und bildet die Bindungsstelle für λ -Repressorproteine. Diese können einerseits direkt die Transkription aktivieren (siehe [3.1.2.2](#)) oder weitere λ -Repressorproteine binden. Anstatt eines weiteren λ -Repressorproteins kann hier auch RNAP α - λ cl binden. Dieser Zusammenhang ist auch graphisch dargestellt (siehe [Abbildung 9](#)). Die Bindung eines λ -Repressorproteins an

den Operator und die gleichzeitige Interaktion der C-terminalen Domäne (CTD) mit RNAP α - λ cl ermöglicht eine Adhäsion von RNAP an die DNA.

Die Domäne zwischen α NTD und α CTD ist eine *linker*-Region, die eine freie Beweglichkeit von α CTD ermöglicht (siehe 3.1.2.2.) So kann RNAP an Promotoren mit unterschiedlichen Abständen zum λ -Operator binden.

Hiervon versprachen sich Dove *et al.* eine Erhöhung der Transkriptionsrate für das nachgeschaltete lacZ-Gen. Es codiert für die β -Galaktosidase, welche für die Galaktoseverwertung benötigt wird. Die Expression wurde über die Messung des Galaktoseumsatzes quantifiziert.

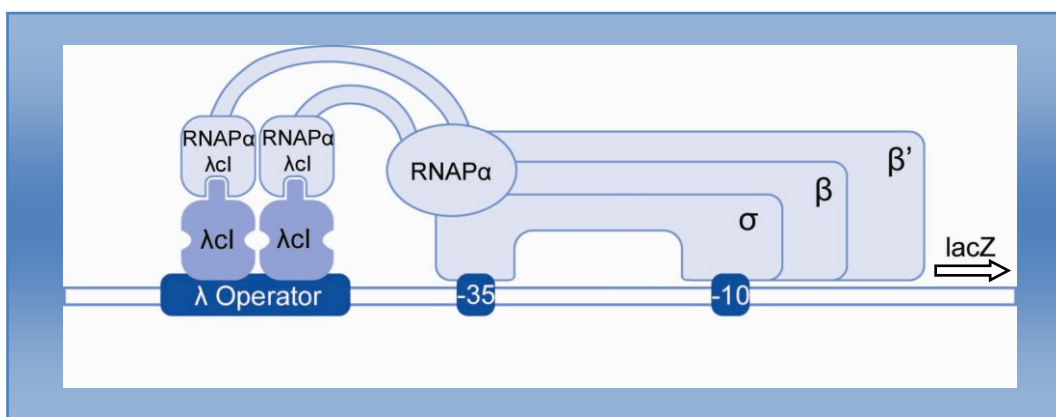


Abbildung 9: Modell des bakteriellen Zweihybrid-Systems

Tatsächlich bedingte die Interaktion vom Fusionsprotein des λ -Repressorproteins und RNAP α eine zehnfache Erhöhung der Genexpression.

Fehlten der λ -Repressorprotein-Anteil oder RNAP α , so war die Transkription auf die Hintergrundrate reduziert.

Versuche mit Mutanten von Repressorproteinen, die keine Protein-Protein Bindungen mehr eingehen konnten, hatten keine Auswirkung auf die Expressionrate der β -Galaktosidase, während Mutanten mit erhöhter Fähigkeit zur Interaktion die Transkription steigern konnten.

Gleichzeitig wurde die transkriptionsaktivierende Funktion des Operators OR2 untersucht.

Wird ein λ -Repressorprotein an OR2 gebunden, so kann dieses über seine N-terminale Domäne direkt die σ -Untereinheit der RNA Polymerase binden und so die Transkription aktivieren. Hierdurch konnte die Transkriptionsrate bereits signifikant erhöht werden. Sie war mit dem Fusionsprotein RNAP α - λ cl um mehr als das Zehnfache erhöht.

Die Transkription konnte demzufolge durch die Interaktion des λ -Repressorproteins mit RNAP α - λ cl und die Transkriptionsaktivierung durch OR2 gefördert werden, am stärksten jedoch durch die Kombination beider.

3.2 Bacteriomatch (I) Two – Hybrid System

Beim *Bacteriomatch (I) Two – Hybrid System* wird die Interaktion zwischen einem Köderprotein (*bait*) und einem zugehörigen Zielprotein (*target*) durch die Erhöhung der Expressionrate der Galaktosidase (*lacZ* Gen) (siehe 3.1.3) und die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin (*amp^r* Gen) nachgewiesen.

Das Wirtsbakterium erwirbt die Resistenz gegen Ampicillin und die Aktivierung des *lacZ* Gens durch die Kotransformation mit zwei Plasmiden. Auf dem einen Plasmid ist λ cl, auf dem anderen RNAP α codiert. Die jeweiligen Protein-Protein Interaktionsdomänen werden mit *bait* und *target* fusioniert (λ CTD mit *bait* und α CTD mit *target*) und dadurch verändert. Die Interaktion von λ cl und RNAP α und damit eine Aktivierung der Transkription der Zielgene (*lacZ* und *amp^r*) ist jetzt nur noch durch eine Interaktion von *bait* und *target* möglich. Auf molekularer Eben geschieht dies, indem ein λ -Operator in das Bakteriengenom integriert wird, dem die Gene von *amp^r* und *lacZ* nachgeschaltet werden. Die verwendeten Nährböden sind laktosefrei und mit Ampicillin angereichert, so dass ein Bakterienwachstum nur bei einer Expression von *lacZ* und *amp^r* möglich ist. Das Gen des Köderproteins wird mit dem von λ cl auf einem Plasmid (*bait*-Plasmid = pBT) fusioniert, das des Zielproteins mit RNAP α auf einem anderen Plasmid (*target*-Plasmid = pTRG). Das Bakterium wird dann mit beiden Plasmiden kotransformiert. Kommt es dabei zu einer Interaktion der beiden exprimierten Fusionsproteine, so führt dies, vermittelt über λ cl, zu einer Anheftung von RNAP an die DNA, was wiederum zu einer Transkription von *amp^r* und *lacZ* führt. Dies ist am Wachstum der Bakterienkolonien erkennbar und kann zusätzlich anhand einer galaktoseassoziierten Farbreaktion mit spektralphotometrischen Verfahren quantifiziert werden. Dabei ist die Quantität der Reaktion von der Interaktionsstärke abhängig. Parallel wird eine Kontroll-Kotransformation mit Plasmiden mit den Genen GAL11P und LGF2 durchgeführt, für die bereits eine Interaktion nachgewiesen wurde¹⁰⁶.

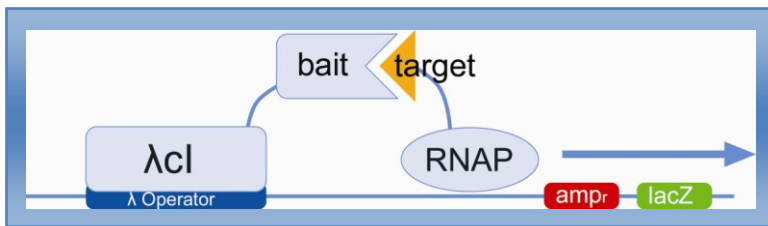


Abbildung 10: Reporter-Kassette des *Bacteriomatch (I) Two – Hybrid System*

Ein negatives Ergebnis kann neben einer fehlenden Interaktion von Köder- und Zielprotein auch durch Fehler bei der Kotransformation zustande kommen.

Aus diesem Grund ist auf jedem Plasmid jeweils eine weitere Antibiotikaresistenz lokalisiert: auf pBT für Chloramphenicol und auf pTRG für Tetrazyklin. Da beide Antibiotika ebenfalls in den verwendeten Nährböden enthalten sind, ist ein Wachstum nur bei korrekter Kotransformation beider Plasmide möglich. Ist dies nicht der Fall, so fällt auch die Kontrolle negativ aus.

3.2.1.1 Nähere Beschreibung der Plasmide pBT und pTRG

Das Plasmid pBT umfasst insgesamt 3200 Basenpaare. Es besteht einerseits aus einem p15A Replikations-Origin, einem Resistenzgen für Chloramphenicol, einem lacUV5 Promotor und einem λcl Gen, an dessen Ende eine Multiple Klonierungsdomäne (multiple Cloning Site = MCS) gesetzt wurde.

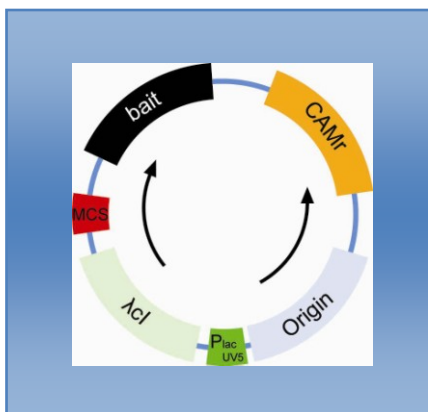


Abbildung 11: *bait*-Plasmid (pBT) des *Bacteriomatch (I) Two – Hybrid System*

Der p15A Origin ist dafür verantwortlich, dass die Plasmide in der Wirtszelle nur in relativ geringer Anzahl kopiert werden (so genannte *low copy* Plasmide). Der lacUV5 Promotor ist in Abwesenheit von IPTG blockiert, so dass die nachgeschalteten Gene nur in IPTG haltigen Nährmedien exprimiert werden können. Dies ist der Fall bei den zu verwendenden Dual Selektivplatten (siehe 3.3.2.1). Wie bereits beschrieben stellt das Resistenzgen für

Chloramphenicol sicher, dass das Plasmid korrekt in den Wirt aufgenommen wurde und abgelesen wird, da die verwendeten Selektivnährböden mit Chloramphenicol angereichert sind. Das λ cl Gen ist bei der späteren Transkription für die Bindung von RNAP an den λ cl Operator notwendig. Die Klonierungsdomäne beinhaltet die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NotI*, *EcoRI*, *SmaI*, *BamHI*, *XhoI* und *BglII*. Hier wird das Gen des Köderproteins einkloniert.

Der pTRG-Vektor umfasst 4400 Basenpaare. Er trägt den Replikations-Ursprungspunkt ColEI, einen *lpp/lac-UV5* promotor, genetische Information für eine Tetracyclinresistenz und die Information für das N-terminale Ende von RNAP α .

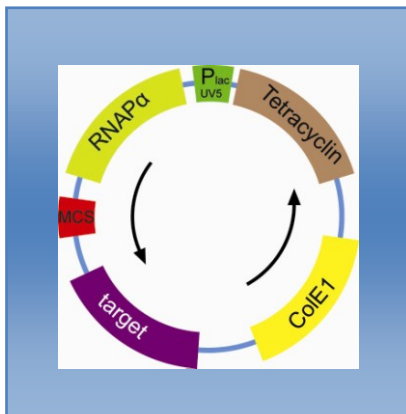


Abbildung 12: *target*-Plasmid (pTRG) des *Bacteriomatch (I) Two – Hybrid System*

ColEI ist wie p15A ein Ursprung für eine niedrige Plasmidreplikationsrate (low-copy-Plasmid). Der *lpp/lac-UV5* Promotor weist im Vergleich zum pBT Plasmid eine höhere Aktivität auf. Eine Tetrazyclinresistenz verifiziert wie oben beschrieben die korrekte Transformation. RNAP ist für die spätere Transkription der Reportergene verantwortlich. Die α -Untereinheit ist dabei der Bestandteil, der für die Einleitung der Transkription verantwortlich ist.

Die am 3' Ende des Plasmids eingefügte Klonierungsdomäne grenzt an α CTD und umfasst die Schnittstellen *BamHI*, *NotI*, *EcoRI*, *XhoI* und *SpeI*. Hier wird das *target*-Gen einkloniert, so dass es mit RNAP α (CTD α) fusioniert wird.

3.2.1.2 Nähere Beschreibung der Bakterien und Nährböden

Die verwendeten Bakterien sind modifizierte *XL-1 Blue MRF' E.coli*. Sie tragen auf ihrem F' Episom das *lacIq* Gen, das die Synthese der pBT und pTRG Proteine nur in Anwesenheit von IPTG ermöglichen soll. IPTG ist nur in den für die Kotransformation verwendeten

Minimalnährböden enthalten. Allerdings ist stets eine geringe Hintergrundaktivität der Transkription zu beobachten.

Zusätzlich tragen die *XL-1 Blue MRF'*-Zellen ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin.

Die verwendeten Minimalnährböden enthalten neben LB-Agar die Antibiotika Ampicillin, Tetracyclin, Chloramphenicol und Kanamycin. Nur Bakterien, die Resistenz gegen alle vier Antibiotika besitzen, können auf diesen Minimalnährböden wachsen. Wie bereits beschrieben erfolgt dies bei den Resistenzen für Tetracyclin und Chloramphenicol durch erfolgreiche Kotransformation von pBT und pTRG. Bei Interaktion der Expressionsprodukte von pBT und pTRG werden die Bakterien noch zusätzlich gegen Ampicillin resistent.

3.2.2 Bacteriomatch (II) Two – Hybrid System

Das *Bacteriomatch (I) Two – Hybrid System* bewährte sich aufgrund einer erhöhten falsch-positiv-Rate nicht. Dies wurde in erster Linie auf eine große Hintergrundrate der Transkription des lacZ-Gens zurückgeführt⁹⁴.

Aus diesem Grund wurde das System zum *Bacteriomatch (II) Two Hybrid System* weiterentwickelt.

Die Veränderungen betreffen in erster Linie die Struktur der Reporter-kassette des Wirtes und die Zusammenstellung der Minimalnährböden. Die Plasmide bleiben unverändert. Die verwendeten *Bacteriomatch (II) Validation Reporter Competent Cells* (Nr. 200192) sind modifizierte *XL1-Blue MRF'* Zellen.

XL1-Blue MRF' Zellen wurden verändert, indem das lacZ-Gen durch das Hefeprotein HIS3 ersetzt wurde, welches Enzyme für die Synthese von Histidin kodiert. Bei dem verwendeten Promotor handelt es sich um einen modifizierten LacZ Promotor. Bei Expression von HIS3 können *E.coli* Bakterien, die einen Funktionsverlust des HisB-Gens durch Mutation aufweisen (Δ hisB Zellen), auf einem Histidin-Minimalnährboden wachsen¹⁰⁷. Beim *Bacteriomatch (II) Two Hybrid System* werden keine Δ hisB Zellen sondern histidinfreie Nährböden verwendet.

Zusätzlich kann 3-AT, ein kompetitiver Inhibitor von HIS3, zugesetzt werden¹⁰⁸. Ziel hierbei ist die Elimination der Hintergrundrate der HIS3 Expression. Laut Herstellerangaben ist bei einer Konzentration von 5mM 3-AT die Hintergrundrate so weit reduziert, dass ein Wachstum auf Histidinfreien Nährböden nicht mehr möglich ist. Durch Änderungen der 3-AT-Konzentration

kann die Empfindlichkeit der Methode angepasst werden ¹⁰⁷. Zusätzlich wurde dem HIS3-Gen das aadA-Gen nachgeschaltet, das für die Antibiotikaresistenz gegen Streptomycin kodiert.

Die Dual-Selektiv-Agarplatten für ein Screening mit dem *Bacteriomatch (II) Two Hybrid System* enthalten zur Selektion die Antibiotika Chloramphenicol, Tetracyclin und Streptomycin sowie 3AT, den beschriebenen Antagonisten von HIS3.

Zusätzlich wird den Platten eine Lösung *M9 Media Additives* hinzugesetzt, die *10x His Dropout amino acid Supplement* enthält, welches zur Eliminierung von Histidin benötigt wird. Wie beim Vorgänger *Bacteriomatch (I) Two Hybrid System* wird den Platten ebenfalls IPTG zugesetzt. Da der Plac-UV5 Promotor der pBT/pTRG Plasmide IPTG abhängig ist, wird gesichert, dass die Expressierung der Plasmidproteine erst auf den Selektivnährplatten startet.

Die Gesamtinteraktion ist graphisch dargestellt (siehe [Abbildung 13](#)).

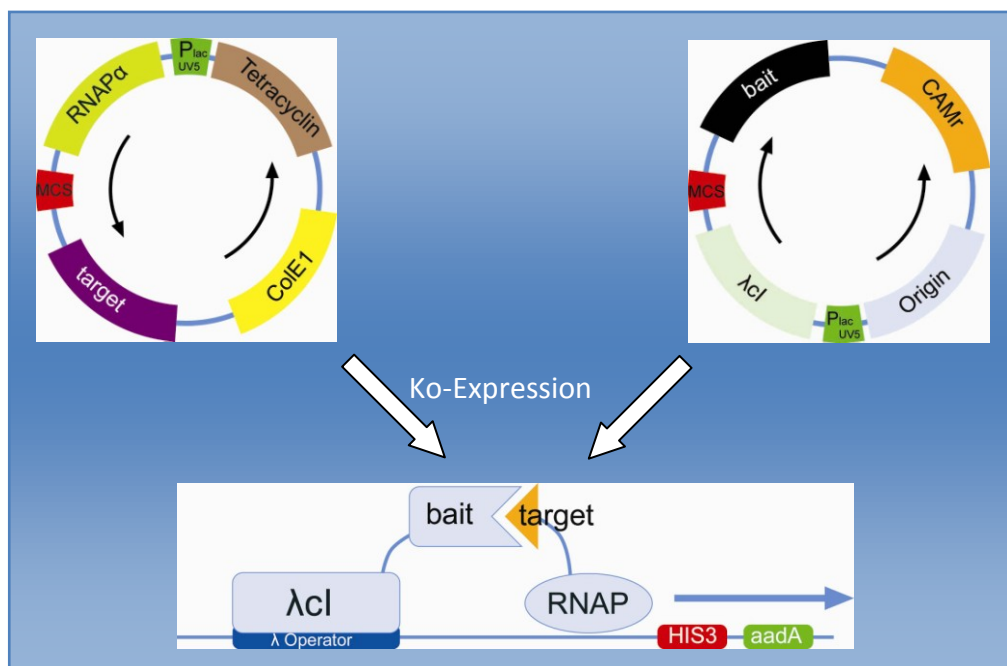


Abbildung 13: Zusammenfassung *Bacteriomatch II Two Hybrid System*

3.3 Allgemeine Methoden

3.3.1 Sterilisation von Lösungen und Gebrauchsmaterialien

Lösungen, Puffer und Nährmedien, sowie unsterile Gebrauchsmaterialien wurden in feuchter Hitze bei 1-2bar/120°C autoklaviert. Thermolabile Lösungen wurden durch Sterilfiltration (0,45µm Filter) entkeimt. Die Sterilisation von Glasgeräten erfolgte in trockener Hitze für mindestens 3h bei 180-200°C.

3.3.2 Herstellung der Nährmedien

3.3.2.1 Dual-Selektiv-Platten

Die zur Inkubation von *Bacteriomatch II Validation Reporter Competent Cells* notwendigen Dual-Selektivplatten sind histidindefiziente Minimalnährböden. Sie wurden nach dem Protokoll der Firma Stratagene *Bacteriomatch II Two – Hybrid System Vector Kit* hergestellt.

Hierfür wurden jeweils 2 Nährstofflösungen angesetzt:

Solution I: 10ml Glucose, 5ml Adenin-HCl, 50ml *His Dropout-Amino-Acid*

Solution II: 0,5ml 1M MgSO₄, 0,5ml 1M Thiamin-HCl (VitaminB1), 0,5ml 10mM ZnSO₄, 0,5ml 100mM CaCl₂, 0,5ml 50mM IPTG.

His-Dropout-Amino-Acid ist hierbei für die Entfernung des Histidins notwendig. Fehler bei der Herstellung oder bei der Dosierung beeinflussen entscheidend die Validität.

50ml *10xM9 Minimal Salt* wurden auf 37°C erwärmt. In einer 1Liter-Blaudeckelflasche wurden weiterhin 7,5g Bacto Agar, 380ml H₂O und ein Rührkern bei 120° für 20 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 70°C wurden das *10xM9 Minimal Salt* und die Nährlösungen (*Solution I + II*) ergänzt.

Um die Selektivität der Platten zu gewährleisten, mußten abschließend Antibiotika hinzugefügt werden. Dabei war darauf zu achten, dass der Agar auf unter 50°C abgekühlt war, um Beeinträchtigungen der pharmakologischen Wirksamkeit durch Denaturierung zu vermeiden.

Es wurden folgende Antibiotika zugesetzt:

0,5ml Chloramphenicol (25mg/ml in Ethanol gelöst), 0,5ml Tetracyclin (12,5mg/ml in H₂O gelöst), 2,5ml 3-AT (1M, in DMSO gelöst), 0,5ml Streptomycin (12,5mg/ml in Ethanol gelöst).

Der Agar wurde anschließend in 100mm Petrischalen gegossen und lichtgeschützt bei Raumtemperatur abgekühlt. Die nun fertigen Platten waren bei Lagerung im Kühlschrank bei 4°C etwa einen Monat haltbar.

3.3.3 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung von super-kompetenten Bakterienzellen wurde zu Anfang die für eine langfristige Lagerung notwendige FSB-Pufferlösung (FSB=*frozen storage buffer*) angesetzt. Hierfür wurde eine 1M Kaliumazetatlösung (9,82mg in 90ml destilliertem Wasser) mit 2M Azetylsäure auf einen pH von 7,5 titriert und mit destilliertem H₂O auf 100ml aufgefüllt. Anschließend wurden die unten aufgeführten Substanzen (siehe [Tabelle 5](#)) in 500ml Wasser gelöst. Wenn alle Bestandteile gelöst waren, wurde die Lösung mit 0,1M HCl auf pH=6,4 eingestellt. Schließlich wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1l aufgefüllt. Die Lösung wurde sterilfiltriert (Filter mit 45µm Durchmesser) und in 50ml Kunststoff Zentrifugationsgefäße überführt. Diese wurden bei 4°C gelagert.

Tabelle 5: Bestandteile des FSB-Puffers

Substanz	Menge	Finale Konzentration
MnCl ₂ x 4H ₂ O	8,91g	45mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,47g	10mM
KCl	7,46g	10mM
Hexamin-Kobaltchlorid	0,8g	100mM
Glycerin	100ml	10%
Kaliumazetat	10ml	10mM

XL1-Blue MRF oder *Bacteriomatch II Validation-Reporter Cells* wurden aus Glycerinkulturen auf LB-Platten (+ 34µg/ml Kanamycin) ausgestrichen.

Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde jeweils eine Bakterienkolonie in LB-Medium (2ml + 34µg/ml Kanamycin) angeimpft und bei 37°C bebrütet.

Mit 1ml Übernachtskultur wurden am nächsten Tag 250ml SOB Medium (+2,5mM MgSO₄) angeimpft und bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Der Wachstumsprozess wurde beständig photometrisch bei 600nm überprüft. Hierbei diente frisches SOB Medium als Referenz. Die erste Messung erfolgte nach 2-3 Stunden und dann alle 30 Minuten. Bei OD₆₀₀=0,4, hier ist die Wachstumsdichte für die Transformationseffektivität am günstigsten, wurden die Zellen in eisgekühlte Zentrifugationsröhrchen überführt und 10 Minuten auf Eis gelagert. Es folgte eine Zentrifugation bei 2700g (4000rpm) und 4°C für 10 Minuten. Der

Überstand wurde verworfen. Die Röhrchen wurden anschließend für 2 Minuten umgekehrt aufgestellt, um verbleibende Flüssigkeit zu entfernen.

Danach wurden die Zellen in FSB-Medium gewaschen. Hierzu wurden alle Pellets in insgesamt 40ml FSB homogenisiert, auf 2 Zentrifugationsröhrchen verteilt und erneut bei 2700g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden in 4ml FSB aufgenommen, mit 140µl DMSO versetzt, vorsichtig gemischt (kein Vortexen) und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Jeweils 100 µl Zellhomogenisat wurden in eisgekühlte 1,5ml Eppendorfgefäße aliquotiert und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -70°C.

3.3.4 Transformationen

3.3.4.1 Transformation

Die Transformation ist eine Möglichkeit des Gentransfers bei Prokaryoten und dient hier der Vermehrung von Plasmid DNA.

100µl superkompetente Zellen (*XL1-Blue MRF'*) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1,7µl Mercaptoethanol (1:10 Verdünnung einer 14,2M Stocklösung) versetzt und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, die Membranporosität zu erhöhen und den DNA-Transfer in die Zelle zu erleichtern.

Nach erfolgter Inkubation wurden 0,5µl des Plasmids zugesetzt und die Zellen für weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Ein kritischer Schritt im Anschluss ist die Hitzeschockbehandlung. Dafür wurden die Zellen für 35 Sekunden bei 42°C und anschließend für 2 Minuten bei 4°C inkubiert. Durch diese Behandlung wird die Membranpermeabilität kurzzeitig stark erhöht. Da sich die Temperatur allerdings nur knapp unter der Denaturierungsschwelle befindet, darf der Vorgang die vorgegebene Zeit nicht überschreiten und die Einhaltung der Temperaturvorgaben ist essentiell. Die anschließende Kühlung senkt die Membranpermeabilität wieder ab.

Anschließend wurden 900µl SOC Medium, die vorher auf 42°C vortemperiert worden waren, zugesetzt und die Eppendorf Gefäße mit Filterdeckeln verschlossen. Die Zellen wurden bei 30°C für 90 Minuten im Thermoblock unter Schütteln inkubiert.

Die Inkubationstemperatur dieser Zellen liegt bei 30°C, da die Plasmide eine toxische Wirkung auf das Wirtsbakterium ausüben können. Durch die Temperatursenkung wird die Replikationsrate begrenzt.

100µl der Bakterienlösung wurden anschließend auf entsprechenden Minimalnährböden ausplattiert und im Brutschrank bei 30°C inkubiert.

Eine erste Wachstumskontrolle erfolgte bereits am Folgetag, die Bebrütung wurde maximal für 3 Tage fortgesetzt.

3.3.4.2 Kotransformation

Die hier beschriebene Kotransformation dient dem Nachweis von potentiellen Protein-Protein Interaktionen. Parallel dazu wurde eine Kontrolle mit bereits bekannten Interaktionspartnern durchgeführt.

100µl der *Bacteriomatch II Validation Reporter Competent Cells* (Nr.200192) wurden auf Eis aufgetaut und dann mit 1,7µl Mercaptoethanol (1:10 Verdünnung einer 14,2M Stocklösung) versetzt. Die Zellen wurden für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Schritt diente wie bei der Transformation der Zellen dazu, die Membrandurchlässigkeit zu erhöhen und den DNA Transfer in die Zelle zu erleichtern. Für alle Kontroll-Kotransformationen wurden dann jeweils 50ng des pBT Plasmids und 50ng des pTRG Plasmids zu den kompetenten Zellen gegeben. Für die zu untersuchenden Proben wurden dagegen 100ng des pBT Konstruktes und 100ng des jeweiligen pTRG Plasmids zugefügt. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis weiter inkubiert. Es erfolgte nun ein Hitzeschock auf 42°C für 35 Sekunden und danach eine zweiminütige Inkubation auf Eis.

Nun wurden jeweils 900µl (auf 42°C vorgeheiztes) SOC Medium hinzugefügt.

Die Cups mit den Zellen wurden mit einem luftdurchlässigen Deckelchen verschlossen und dann im Thermoblock bei 30°C unter Schütteln für 90 Minuten bebrütet.

Die Zellen wurden anschließend bei 2000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml *His-Dropout-Broth* resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin wieder bei 2000g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 1ml *His-Dropout-Broth* gelöst. Die Cups wurden nun mit einem luftdurchlässigen Deckelchen verschlossen und im Thermoblock bei 37°C und unter Schütteln für zwei Stunden bebrütet.

Nach erneuter Zentrifugation bei 2000g wurden 900µl Überstand verworfen und das Pellet in dem verbleibenden Medium aufgelöst.

Die Zellen wurden auf die vorbereiteten Dual-Selektiv Nährböden ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

Das Wachstum wurde nach 48 bzw. 72 Stunden kontrolliert. Eine anschließende Inkubation wurde teilweise noch bis zu 2 Tage lichtgeschützt bei Raumtemperatur fortgesetzt.

3.3.5 Protokolle zur DNA Amplifikation

3.3.5.1 Mini-Präparation

Zu 2ml LB-Medium wurden entsprechend den Vorgaben der Maxi-Präparation 2µl Antibiotikum (für pBT Plasmide Chloramphenicol (25mg/ml); für pTRG Plasmide Tetracyclin (12,5mg/ml)) mit einer Zellkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienlösung für 15 Minuten bei 14.000g zentrifugiert, der Überstand und verbleibendes LB-Medium entfernt, indem das Gefäß auf einem Papierhandtuch abgetupft wurde.

Die nachfolgende Plasmid Mini-Präparation wurde mit dem PeqGold Plasmid Miniprep Kit (Firma PeqLab) durchgeführt. Das Pellet wurde in 250µl Puffer P1 suspendiert (dieser Puffer enthält RNase und wird im Kühlschrank gelagert).

Im nächsten Schritt wurden 250µl Puffer P2 zur Zelllyse hinzugefügt. Danach wurden die Cups 5 mal vorsichtig hin- und her geschwenkt. Bei erfolgreicher Lyse kommt es zur Blaufärbung. Die Lyse wurde maximal 5 Minuten durchgeführt und durch Zugabe von 350µl Puffer N3 beendet. Dabei entfärbt sich die Lösung und Zelldetritus fällt aus, der sich durch anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 14.000g als weißes Pellet absetzt.

Der Überstand wurde auf die Säulen aus dem Miniprep-Kit gegeben. Durch einminütiges Zentrifugieren bei 14.000g wurde die DNA an die Säulen gebunden.

Die Säulen wurden daraufhin mit 500µl PB Puffer und dann mit 750µl PE Puffer gewaschen. Durch eine abschließende Zentrifugation von 3 Minuten bei 14.000g wurden die Säulen trocken zentrifugiert.

Die Elution der DNA erfolgt dann entweder mit 30µl H₂O oder mit 30µl des im Kit erhaltenen Elutionspuffers. Hierzu wurden die Säulen in sterile 1,5ml Eppendorf Cups eingeführt, die Elutionslösung wurde direkt auf die Säulenmatrix pipettiert und nach zweiminütigem Einwirken erfolgte eine einminütige Zentrifugation bei 14.000g. Die Plasmid DNA wurde bei -20°C gelagert.

Die Verwendung des Elutionspuffers erhöht die Haltbarkeit der DNA erheblich!

3.3.5.2 Maxi-Präparation

Für die Maxi-Präparation wurden 2ml LB-Medium und 2µl Antibiotikum (für pBT Plasmide Chloramphenicol (25mg/ml); für pTRG Plasmide Tetracyclin (12,5mg/ml)) in einen 2ml Eppendorf Cup gegeben. Zu dieser Lösung wurde eine Bakterienkolonie gegeben, die entsprechend dem Transformationsprotokoll zuvor mit dem zu amplifizierenden Plasmid transformiert worden war. Die Übernachtskultur wurde bei 30°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die 2ml Bakterienkultur und 250µl Antibiotikum (Chloramphenicol oder Tetracyclin) in 250ml LB-Medium gegeben.

Es erfolgte die Inkubation im Bakterienrührer bei 30°C für weitere 24 Stunden bei 150rpm.

Dann wurden die Zellen pelletiert (14.000g für 15 Minuten bei Raumtemperatur). Die anschließende Plasmid-Maxi-Präparation erfolgte mit Hilfe des Jetstar Maxi –Plasmid – Kits (Genomed). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 10ml Lösung E1 resuspendiert und in 50ml Zentrifugationsröhrchen überführt.

Durch Zugabe von 10ml Lösung E2 wurde die Zelllyse eingeleitet und erfolgte für 1 Minute unter vorsichtigem Schwenken.

Die Lösung wurde durch Zugabe von 10ml Lösung E3 neutralisiert. Die Röhrchen wurden 5 mal geschwenkt und zentrifugiert (20°C, 14.000g, 10 Minuten).

Für die weitere Präparation der DNA mußten die Säulen aus dem Kit equilibriert werden. Sie wurden dazu mit 30ml der Lösung E4 aus dem Kit befüllt. Die Säulen entleerten sich nur durch Schwerkraft. Nun wurde die Säule mit dem Überstand aus dem letzten Zentrifugationsschritt beladen. Die Plasmid DNA bindet an das Säulenmaterial.

Anschließend wurde die Säule mit Lösung E5 gewaschen.

Die Elution der DNA in 50ml Falcon Tubes erfolgte durch die Zugabe von 15ml Lösung E6 auf die Säulen. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5ml Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation bei 4°C und 14.000g für 30 Minuten pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol gewaschen, in einen 1,5ml Eppendorf Cup überführt und erneut zentrifugiert (5 Minuten/ RT/ 14.000g). Das Pellet wurde für 10 Minuten luftgetrocknet und anschließend in 300 µl H₂O aufgelöst.

3.3.6 Methoden zur DNA Quantifizierung

3.3.6.1 Spektralphotometrie

Die Spektralphotometrie wurde einerseits durchgeführt um den DNA Gehalt von Lösungen festzustellen, andererseits um den Wachstumsfortschritt von Bakterienkulturen abzuschätzen.

Die Bestimmung des DNA Gehaltes erfolgte bei OD₂₆₀ (400 µl Quarzküvette λ=260nm, Option „D2-Lampe: ein“). Nach der Eichung mit destilliertem H₂O wurde DNA im Verhältnis 1:80 zugesetzt und gemessen. Der abgelesene Messwert wurde dann umgerechnet. Dies erfolgte nach dem Lambert-Beer-Gesetz:

$$E = -\lg(I/I_0) = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E: Extinktion oder optische Dichte

I: Intensität des transmittierten Lichtes

*I*₀: Intensität des einfallenden (eingestrahnten) Lichtes

c: Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit (typische Einheiten: [mol·dm⁻³] oder [mol·l⁻¹])

*ε*_λ: dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ. Dieser ist eine für die absorbierende Substanz spezifische Größe und kann zusätzlich auch z.B. vom pH-Wert oder vom Lösungsmittel abhängen [l·mol⁻¹·cm⁻¹].

d: Schichtdicke in cm

(Quelle: www.wikipedia.de)

Da in der vorliegenden Versuchsanordnung die Werte für ε und d bekannt sind, wird die Formel vereinfacht:

$$c = OD \times V \times F$$

c: DNA Konzentration

OD: optische Dichte = Extinktion *E*

V: Verdünnungsfaktor

F: Multiplikationsfaktor

(Quelle: <http://www.biotech-europe.de/rubric/methoden/methoden/v37.html>)

Im Multiplikationsfaktor *F* sind die Schichtdicke von 1cm, die festgelegte Wellenlänge von 260nm und die Absorptionscharakteristika des untersuchten Materials zusammengefasst. Bei der hier vorliegenden Untersuchung von Doppelstrang-DNA liegt er bei 50.

Die Spektralphotometrie wurde ebenfalls verwendet, um das Wachstum von Bakterienkulturen zu messen. Dies war bei der Herstellung kompetenter Zellen notwendig, da die Ausbeute vitaler Zellen zum Zeitpunkt der maximalen Teilungsrate am höchsten ist (siehe 3.3.3). Für die *XL1-Blue MRF* Zellen wurde empirisch ermittelt, dass bei einem OD₆₀₀=0,4 (Kunststoffküvette, λ=600nm, Option „D2-Lampe:ein“) die Teilungsrate am höchsten ist.

3.3.6.2 Agarose-Gel Elektrophorese

Mittels Agarose-Gel Elektrophorese kann eine Abschätzung von sehr geringen DNA Konzentrationen (unter $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$), beispielsweise von Minipräparationen aus Low-Copy Plasmiden erfolgen. Hierbei macht man sich die Tatsache zunutze, dass Moleküle gleicher Größe und Polarität in einem elektrischen Feld die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen. Das Medium, in dem in diesem Fall die DNA Moleküle wandern, ist ein Agarose Gel, das mit dem Farbstoff Ethidiumbromid versetzt wurde. Die relative DNA Konzentration der jeweiligen Minipreparationen lässt sich anhand der Bandenstärke im Vergleich zu einer Kontroll-DNA quantifizieren.

Das Agarose-Gel wurde hergestellt, indem 100ml 0,5 x TBE Puffer und 1g Agarose in einem 250ml Erlenmeyerkolben aufgekocht wurden.

In die Gelflüssigkeit wurden $2\mu\text{l}$ Ethidiumbromidlösung ($10\text{mg}/\text{ml}$) gegeben. Diese wurde dann in einen Elektrophorese-Schlitten gegossen, der vorher mit zwei Kämmen ausgestattet worden war, um zwei Reihen Geltaschen für die Proben freizuhalten. Anschliessend kühlte das Gel ab und wurde fest.

In der Zwischenzeit wurden die Proben vorbereitet, mit denen die Geltaschen beladen wurden. Zuerst wurde der *loading buffer* (6x, Firma Invitrogen) im Verhältnis 2:10 mit H_2O verdünnt. Dann wurden jeweils $5\mu\text{l}$ Miniprep-DNA-Lösung mit $10\mu\text{l}$ der verdünnten *loading buffer*-Lösung in einen 1,5ml Eppendorfcup gemischt.

Für die Kontroll-DNA-Reihe wurde eine Verdünnung von $100\text{ng}/\mu\text{l}$ hergestellt. Es wurden Ansätze von 100ng / 200ng / 300ng / 400ng / 500ng und 600ng vorbereitet und mit der *loading buffer*-Lösung auf jeweils $15\mu\text{l}$ aufgefüllt.

Der vorbereitete Gelschlitten wurde in die Elektrophoresekammern eingesetzt. Die unteren Geltaschen wurden mit den 6 Kontroll-DNA-Lösungen beladen. Die obere Reihe und freie Geltaschen der unteren Reihe wurden mit den zu untersuchenden Proben beladen.

Die Elektrophorese wurde bei 120V für eine Stunde durchgeführt. Danach wurde das Gel aus dem Schlitten genommen und auf den UV-Durchleuchtungstisch gelegt. Dort wurde eine erste optische Begutachtung des Ergebnisses durchgeführt (siehe [Abbildung 14](#)).

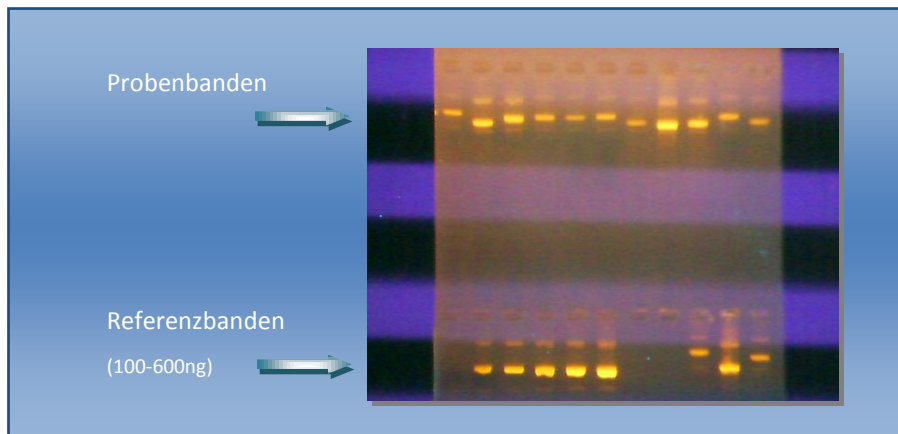


Abbildung 14: Agarose-Gel Elektrophorese unter UV-Durchleuchtung

Anschließend wurde ein Polaroidfoto angefertigt. Durch den Vergleich der Bandenstärke der Proben mit denen der Kontrolle lässt sich die DNA Konzentration in den Proben relativ genau abschätzen.

3.3.7 Sequenzierung

3.3.7.1 Sequenzierungsreaktion

Die Basenabfolgen der durch das bakterielle Zweibyrid-System identifizierten Interaktionspartner wurden mit Hilfe des „AbiPrism BigDye Systems“ sequenziert.

Die Sequenzierungsreaktion beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Hierbei werden zusätzlich zu den Desoxy-Nukleotid-Triphosphaten fluoreszenzmarkierte 2'3'-Dideoxy-Nukleotid-5'-Triphosphate (ddNTPs) in die Sequenzreaktion eingesetzt. Der Einbau der markierten ddNTPs in den Zweitstrang bewirkt den Abbruch der Synthese. Man erhält so an jeder Base farbmarkierte Abbrüche. Für die Sequenzierungs-PCR wurden zu 8µl Sequenziermix, 6,5µl H₂O, 0,5µl pTRG-Sense-Primer und 5µl Miniprep-Plasmid-DNA (ca. 1µg) gegeben. Anschließend wurde die Sequenzierungs-PCR wie folgt durchgeführt: Ein Zyklus 2 Minuten 95°C; dann 35 Zyklen 10 Sekunden 95°C (Denaturierung), 5 Sekunden 55°C (Annealing) und 4 Minuten 60°C (Elongation); anschließend Abkühlen auf 4°C.

3.3.7.2 Aufreinigung der Sequenzreaktion

Die Aufreinigung erfolgte über Säulenchromatographie mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Firma Qiagen). Das Säulenmaterial wurde zuerst durch Vortexen gut durchmischt, die Verschlusskappe am unteren Ende der Säule entfernt und in 1,5ml Eppendorf Cups eingesetzt. Dann wurde die Flüssigkeit bei 2700rpm für 3 Minuten abzentrifugiert. Danach wurde die Probe

aus der Sequenz-PCR auf die Säulenmatrix pipettiert. Dabei war darauf zu achten, dass die Probe nicht am Säulengranulat vorbeifließt. Nach 2 Minuten Inkubation wurde die Säule erneut bei 2700rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Die resultierende DNA-Lösung wurde in ABI-Sequencing-Tubes überführt und mit einem Gummistopfen verschlossen.

3.3.7.3 Elektrophorese und Detektion

Die gereinigten Proben wurden auf dem Sequenziergerät ABI 310 analysiert. Aufgrund der jeweils unterschiedlichen Markierung der vier Didesoxynukleotide kann die Basenabfolge in einem einzigen Elektrophoreselauf detektiert werden. Hierbei werden die Markierungen durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt und diese von einem Detektionsgerät empfangen. Anschließend werden die so erhaltenen Daten verrechnet und analysiert (siehe [Abbildung 15](#)).

3.3.7.4 Suche zur Protein Identifikation

Die Sequenzen wurden mit Hilfe der BLAST Funktion auf der PubMed Homepage einzelnen Proteinen zugeordnet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen>). Dabei wurden Sequenzen von ca. 100 Basen in die Suchmaschine eingegeben. Die Ergebnissequenzen wurden dann mit denen aus der Sequenzierung verglichen.

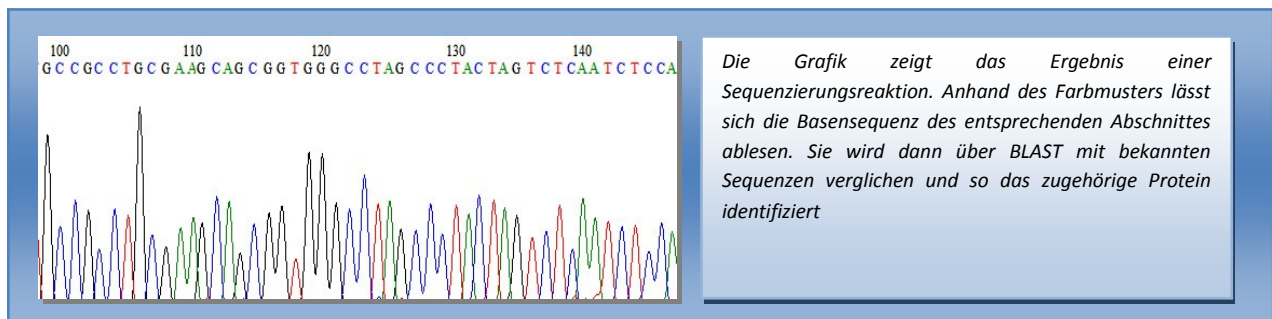


Abbildung 15: Basen-Sequenzierung

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse im Zusammenhang mit den Vorarbeiten

Ein erstes Two-Hybrid Screening wurde für die Detektion von hMLH1-Interaktionspartnern von Frau Dr. Angela Brieger mittels des *Bacteriomatch (I) Two-Hybrid System* durchgeführt. Die dabei verwendete pTRG-cDNA-Bank stammt von der Firma Stratagene (La Jolla; California/USA). Stratagene klonierte hierfür mRNA (einseitig gerichtet), die aus Kolongewebe einer gesunden 59-jährigen Frau isoliert wurde, in den pTRG Vektor. Die Kotransformation dieser cDNA-Bank und des pBT-hMLH1-Plasmids wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Die transformierten Bakterien wurden auf große Platten ausplattiert und positive Kolonien durch eine galaktoseassoziierte Farbreaktion identifiziert und isoliert. Im Anschluss wurden die pTRG Plasmide durch selektive Mini-Präparation aus den Bakterienkolonien aufgereinigt. Insgesamt wurden so 142 Plasmide isoliert, die eine positive Interaktionsreaktion aufwiesen.

Da für das *Bacteriomatch (I) Two-Hybrid System* in der Literatur eine erhöhte falsch-positiv-Rate beschrieben wurde, sollten die Interaktionen mit dem Nachfolge-Kit *Bacteriomatch (II) Two-Hybrid System* verifiziert werden. Im Anschluss sollten die auf den Plasmiden kodierten Gene identifiziert und charakterisiert werden.

Die durch das Vorscreening ausgewählten pTRG Plasmide wurden entsprechend dem beschriebenen Protokoll (siehe 3.3.4.2) erneut mit dem pBT-MLH1-Plasmid kotransformiert. Von den 142 Plasmiden konnten 108 Klone mit dem überarbeiteten *Bacteriomatch (II) Two-Hybrid System* als positiv bestätigt werden.

Im Anschluss daran wurden die entsprechenden cDNA-Fragmente sequenziert und die Gene mittels PubMed-Online Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ermittelt.

4.2 Auswertung

4.2.1 Wachstumskontrolle der Dual-Selektivplatten

Die Auswertung der Daten begann bei jeder Versuchsreihe mit der Zählung der gewachsenen Kolonien auf den Dual Selektivplatten nach 72 Stunden. Es wurden nur Versuche gewertet, bei denen die Positivkontrolle eindeutig war.

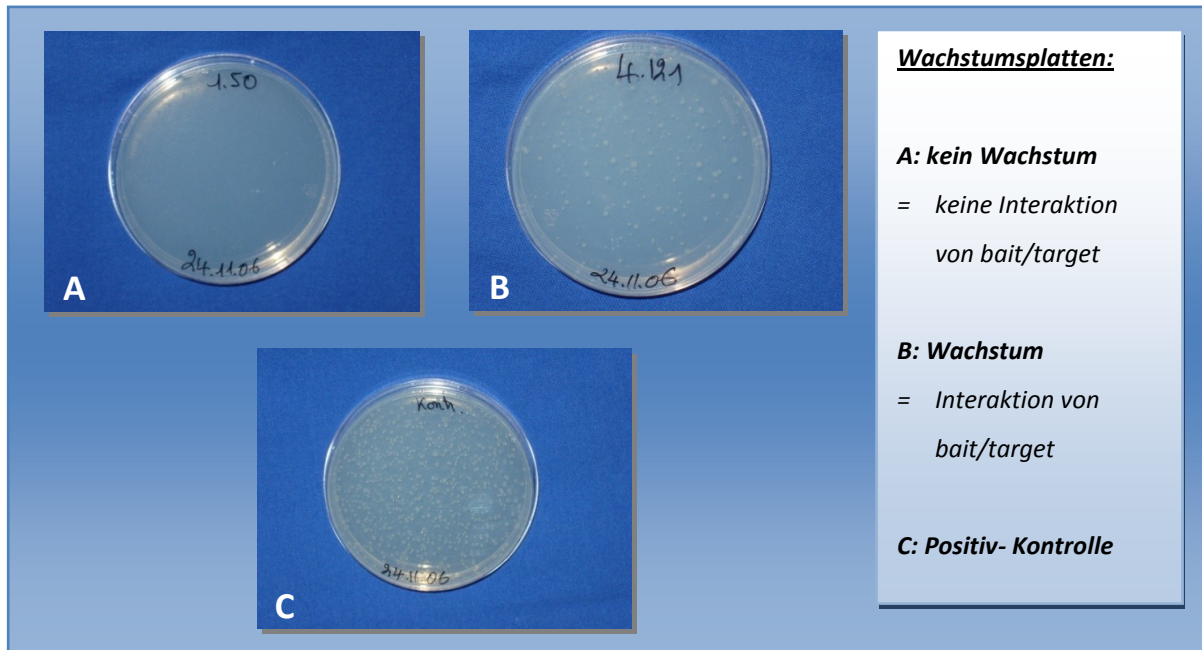


Abbildung 16: Wachstumskontrollplatten

Ein Probenergebnis wurde als positiv bewertet, wenn ein Wachstum von mindestens einer Kolonie beobachtet werden konnte. Insgesamt wurde die Interaktion von hMLH1 mit 108 der 142 untersuchten Klone durch das *Bacteriomatch (II) Two-Hybrid System* verifiziert.

4.2.2 Sequenzierung und Identifikation der zugehörigen Gene

Die 108 verifizierten Klone wurden sequenziert (siehe 3.3.7). Die daraus resultierenden Sequenzen wurden über die „BLAST“- Funktion der PubMed Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) abgeglichen und so die zu den Probensequenzen passenden Gene ermittelt. Die Ergebnisse sind im Folgenden zusammengefasst (siehe [Tabelle 6](#)). Neben der Gen-Bezeichnung, der zugehörigen Sequenz Zugangsnummer (*associated sequence accession number* (ACCN)) und dem Genlocus ist eine kurze Beschreibung des Proteins aufgeführt.

Tabelle 6: Identifizierte potentielle Interaktionspartner von hMLH1

Anzahl detektierter Klone	Protein	ACCN	Lokus	Funktion
Proteine des Immunsystems				
1x	<i>Immunoglobulin kappa constant (IGKC)</i>	BC110394	2p12	Bestandteile von Immunoglobulin-Ketten
2x	<i>similar to immunoglobulin M chain</i>	AF471510	Chromosom 14	
1x	<i>Homo sapiens mRNA for immunoglobulin lambda-3 surrogate light chain</i>	DQ840953	331bp mRNA	
1x	<i>Interleukin 20 receptor, alpha (IL20RA)</i>	AL135902	6q22.33-q23.1	Rezeptor für Interleukin 20
1x	<i>similar to HLA class I histocompatibility antigen, B-18 alpha chain precursor</i>	XM_001131713/ LOC730410	Chromosom 6	HLA-Klasse verwandtes Protein
Cysteinproteinasen				
1x	Calpain 5 (CAPN5)	NM_004055	11q14	Cysteinproteinasen, die u.a. an Apoptose beteiligt sind
2x	Cathepsin B (CTSB)	NM_147780	8p22	
Mitochondriale Proteine				
21x	Enzyme der Atmungskette	DQ523681 DQ372886 DQ372887 DQ404447 DQ523681 EF093558.1 HUMMTCG	Mitochondriales Genom	In der Literatur nicht näher definierte Enzyme der Atmungskette
10x	Mitochondriale t-RNA	NC_001807		Nicht näher beschrieben
1x	<i>solute carrier family 25, member 23 (SLC25A23)</i>	NM_024103	19p13.3	Phosphat-Carrier der inneren Mitochondrienmembran
1x	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8 (NDUFS8)</i>	NM_002496	11q13	Bestandteil der Atmungskette
Enzyme des Nukleinsäuren Metabolismus				
1x	<i>5'-Nucleotidase, cytosolic III-like (NT5C3L)</i>	BC016971	17q21.2	Abbau spezifischer Nukleotide
1x	<i>DEAD box polypeptide 47 (DDX47)</i>	NM_201224	12p13.1	SF2 RNA Helikase
Signalmoleküle und Enzyme				
1x	<i>N-myc downstream regulated 1 (NDRG1)</i>	NM_006096	8q24.3	Hydrolase, Einfluss auf Differenzierung, Wachstum, Zellzyklus und Reaktion auf DNA-Schäden/Hypoxie
1x	<i>Chloride intracellular channel 1 (CLIC1)</i>	NM_001288	6p22.1-p21.2	Intrazellulärer Chloridkanal, membrangebunden/zytosolisch
1x	Annexin A6 (ANXA6)	NM_001155	5q32-q34	Bindet Phospholipide pH+Ca ²⁺ abhängig, Inhibition der Ras/Raf/Map Kinase
1x	<i>Neutrophil cytosolic factor 4 (NCF4)</i>	BT007346	22q13.1	Regulative Untereinheit der NADPH-Oxidase
1x	Lipid-Phosphat-Phosphatase 2 (LPP2)	NM_177526	19p13	Spaltung von Phospholipiden in Phosphat und Diacylglycerin
1x	Phytoceramidase (= <i>alkaline ceramidase 3 (ACER3)</i>)	NM_018367	11q13.5	Enzym des Sphingolipidstoffwechsels im RER, Regulation des Proteinhaushaltes
1x	<i>Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2 (PTP4A2)</i>	NM_080392	1p35	Tyrosinkinase - Antagonisten, direkte und indirekte Wirkungen auf den Zellmetabolismus
1x	<i>Protein tyrosine phosphatase,</i>	NM_002842	19q13.4	

	<i>receptor type H (PTPRH)</i>			
1x	<i>RAP guanine nucleotide exchange factor (GEF)-like 1 (RAPGEFL1)</i>	BC115375	17q21.1-q21.2	Guanin Austauschfaktor der Ras-GTPasen
1x	<i>Selenium binding protein 1 (SELENBP1)</i>	NM_003944	1q21-q22	Wachstums- und Detoxifikationsfunktion wird vermutet
1x	<i>Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2 (SPTLC2)</i>	AF111168	14q24.3-q31	Zentrale Rolle im Sphingosin-Stoffwechsel
1x	<i>Pigment epithelium derived factor (PEDF) = serpin peptidase inhibitor cl. F (SERPINF1)</i>	NM_002615	17p13.1	Angiogenese Inhibitor
1x	<i>V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog (ARAF)</i>	NM_001654	Xp11.4-p11.2	MapKKKinase, Mutationen häufig bei kolorektalem CA
1x	<i>Non-POU domain containing, octamer-binding (NONO)</i>	NM_007363	Xq13.1	Wirkt als Transkriptionsfaktor, z.B bei der Ig-Synthese
Stoffwechselenzyme				
1x	<i>Adenine phosphoribosyltransferase (APRT)</i>	BC106894	16q24	Synthese von Adenosinphosphaten
1x	<i>Argininosuccinate synthetase 1 (ASS1)</i>	NM_054012	9q34.1	Arginin-Synthese
Translationsproteine und Ribosomale Proteine				
12x	<i>Ribosomal protein S16 (RPS16)</i>	AB061841 CR619874 NM_001020	19q13.1	Proteine der 40S Ribosomenuntereinheit Teilweise Interaktionen mit Proteinen des Zellzyklus
1x	<i>Ribosomal protein S2 (RPS2)</i>	BC071923	16p13.3	
1x	<i>Ribosomal protein S5 (RPS5)</i>	NM_001009	19q13.4	
3x	<i>Similar to 40S ribosomal protein S16</i>	XM_001133484	19p12	
1x	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2A (EIF2A)</i>	NM_032025	3q25.1	Initiation durch AUG-Transport zum 40S Ribosom
1x	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)</i>	HSEF2MR	19pter-q12	Ribosomale Translokation der Proteinkette von A- in P-Stelle
Ubiquitin, Proteasom und Sequestosom assoziierte Proteine				
1x	<i>UBA domain containing 1 (UBAC1)</i>	NM_016172	9q34.3	UBA Domäne für Ubiquitin
1x	<i>Sequestosome 1 (SQSTM1 = p62)</i>	NM_003900	5q35	Kofaktor der Ubiquitinierung von Proteinen für das Proteasom
Proteine des Zytoskeletts				
1x	<i>Actin, gamma 1 (ACTG1)</i>	NM_001614	17q25	Hauptbestandteil des Zytoskeletts, globuläre Form
2x	<i>cutA divalent cation tolerance homolog (CUTA)</i>	NM_015921	6pter-p21.31	Membranöser Protein-Anker z.B. der Acetylcholinesterase
1x	<i>Desmin (DES)</i>	NM_001927	2q35	Intermediärfilament, Fixierung von Myofibrillen an Z-Scheiben in Muskelzellen
1x	<i>Parvin, alpha (PARVA)</i>	NM_018222	11p15.3	<i>Integrin-linked-kinase (ILK)</i> Fokalkontakt Protein zur Interaktion von Zytoskelett-Proteinen
3x	<i>Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (SPTAN1)</i>	NM_003127 + BC053521	9q33-q34	Tetramerbildendes Protein, dient der Aktin-Quervernetzung
1x	<i>Transgelin (TAGLN = SM22)</i>	NM_001001522	11q23.2	Vernetzung von Aktin, wirkt regulativ in der Genexpression
1x	<i>Sec61 alpha 1 subunit (SEC61A1)</i>	NM_013336	3q21.3	Integration neusynthetisierter Proteine in die Zellmembran
Sonstige Proteine				
1x	Family with sequence similarity 79 A	NM_182752	1p36.32	Keine Funktionen in der

Ergebnisse

1x	Homo sapiens CpG DNA	HS124B4R		Literatur beschrieben
1x	similar to uncharacterized protein family UPF0227 member RGD1359682	XM_001133101	1q21.1	
2x	Transmembrane protein 103	DQ787088	3p21.31	
12x	Open Reading Frames			Kein Ergebnis bei BLAST-Suche

Die gefundenen Gene wurden Kategorien zugeordnet, die sich aus der jeweiligen Proteinklasse und Funktion ableiten. Entsprechend der Anzahl der Klone wurde der prozentuale Anteil ermittelt jeder Kategorie an der Gesamtheit ermittelt. Es ergibt sich dabei folgende Verteilung:

- Proteine des Immunsystems (7%)
- Cysteinproteinasen / Lysosomale Proteine (2%)
- Mitochondriale Proteine (35%)
- Enzyme des Nukleinsäuren- Metabolismus (2%)
- Signalmoleküle und Enzyme (10%)
- Stoffwechsellenzyme (2%)
- Translations und Ribosomale Enzyme (19%)
- Ubiquitin, Proteasom und Sequestosom (2%)
- Proteine des Zytoskeletts (11%)
- Sonstige Proteine (5%)

Der Anteil der entsprechenden Proteinkategorie an der Gesamtzahl der gefundenen Gene ist graphisch dargestellt (siehe [Abbildung 17](#)).

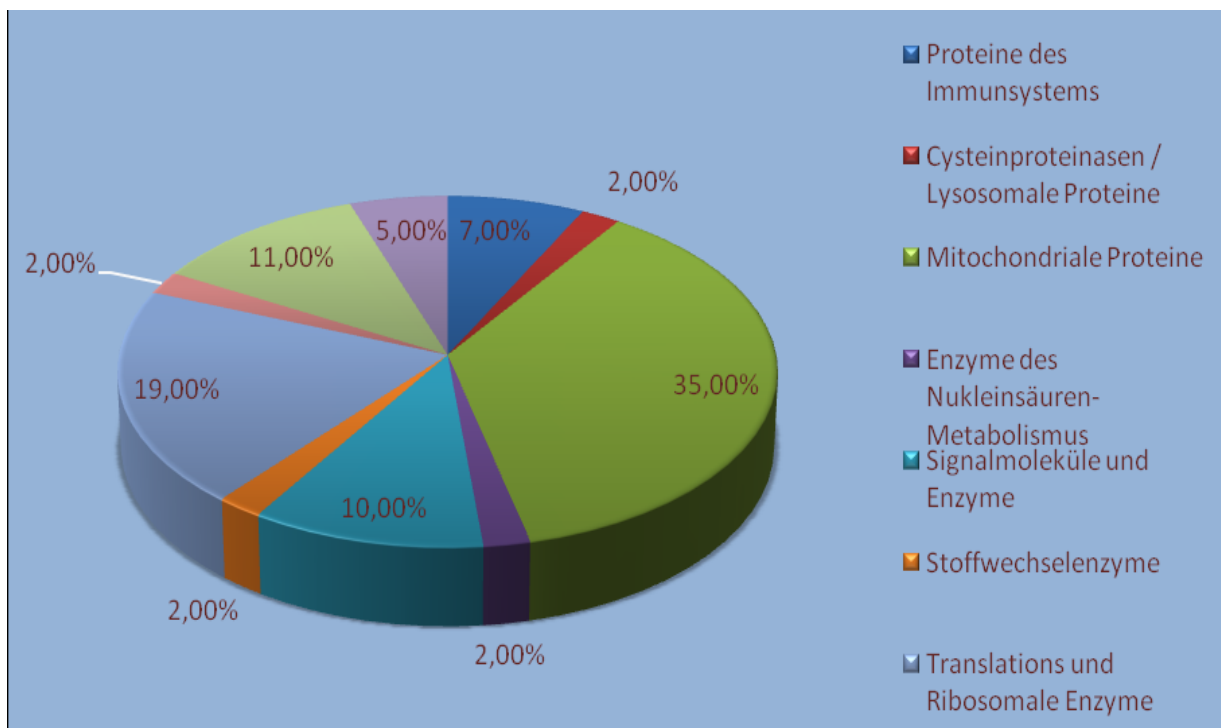


Abbildung 17: Proteinkategorien und Verteilung der hMLH1 Interaktionspartner

4.3 Charakterisierung der identifizierten Proteine

4.3.1 Proteine des Immunsystems

Bei den detektierten Proteinen des Immunsystems handelt es sich einerseits um Ketten, welche Bestandteile der humanen Immunglobuline sind, andererseits um den Rezeptor des Zytokins Interleukin 20.

4.3.1.1 Immunglobulin-Ketten

Insgesamt sind 4 Proteine, für die eine Interaktion mit hMLH1 detektiert wurde, Bestandteile von Immunglobulinen:

- Immunoglobulin kappa constant (IGKC), Locus: 2p12
- 2x similar to HLA class I histocompatibility antigen, B-18 alpha chain precursor, Locus: Chromosom 6
- *similar to immunoglobulin M chain*, Locus: Chromosom 14
- *Homo sapiens mRNA for immunoglobulin lambda-3 surrogate light chain*

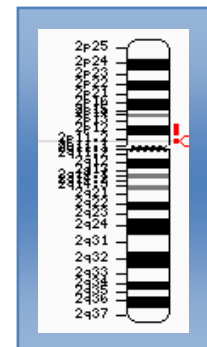


Abbildung 18:
IGKC

Immunglobuline bestehen jeweils aus zwei schweren und zwei leichten Proteinketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es existieren 5 Subtypen von schweren Ketten: α , γ , δ , μ , und ϵ . Sie kennzeichnen die Zugehörigkeit zu den einzelnen Antkörperklassen (IgA, IgG, IgE, IgD und IgM) ¹⁰⁹.

4.3.1.2 Interleukin 20 Rezeptor (IL20RA)

IL20RA (Locus: 6q22.33-q23.1) ist ein Bestandteil des Interleukin-20 Rezeptors. Interleukin 20 (IL-20) ist ein Zytokin, welches an der Vermittlung von Immunreaktionen beteiligt ist.

Es gehört neben den Interleukinen IL-19, IL-22, IL-24 und IL-26 zu der Familie der Interleukin-10 (IL-10) Zytokine. Diese sollen die zellvermittelte Immunität hemmen und die humorale Immunität fördern, wobei den einzelnen Vertretern unterschiedliche Wirkungen zugesprochen werden. Während die meisten IL-10 Proteine strukturell vermutlich als Dimere vorliegen, soll es sich bei IL-20 um ein Monomer handeln ¹¹⁰.

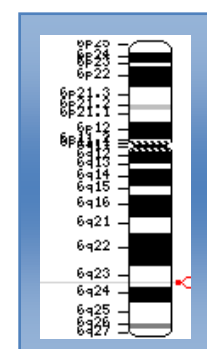


Abbildung 19:
IL20RA

Der IL-20 Rezeptor ist aus den Proteinen IL-20 RA und IL-20 RB aufgebaut, die zusammen ein Heterodimer bilden. Der Rezeptor ist auch in der Lage andere IL-10 Zytokine zu binden (z.B. IL-

19 und IL-24). Die Bindung erfolgt dabei anders als bei anderen IL-10 Zytokinen nur an den Komplex aus IL-20 RA und IL-20 RB, nicht aber an eine einzelne Untereinheit. Die Signaltransduktion scheint dabei wie bei anderen IL-10 Zytokinen über den JAK/STAT Signalweg zu erfolgen. Die intrazelluläre Domäne von IL-20RA scheint dabei Bindungsdomänen für STAT und Jak1 aufzuweisen ¹¹¹.

4.3.2 Cysteinproteinasen

Für die Proteine Cathepsin B (CTSB, Locus: 8p22) (2x) und Calpain 5 (CAPN5, Locus: 11q14) wurden Interaktionen mit hMLH1 festgestellt. Cathepsine und Calpaine gehören zur Klasse der Cysteinproteinasen.

Cathepsin B (CTSB) ist eine C1 Peptidase, die aus einem durch Disulfidbrücken verbundenen Dimer besteht. Die Dimerisierung findet jeweils zwischen einer schweren und einer leichten Proteinkette statt ¹¹².

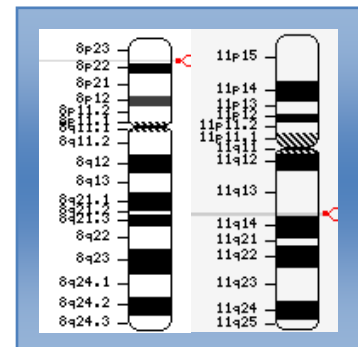


Abbildung 20: CTSB und CAPN6

Die genaue Funktion von CAPN5 ist noch nicht bekannt. Es wird in vielen menschlichen Geweben exprimiert. In Uterus und Plazenta scheint es an der Regulation des Endometriums während des Menstruationszyklus beteiligt zu sein ¹¹³.

Während CTSB in Lysosomen und im Zytoplasma vorkommen kann, ist CAPN5 ein rein zytosolisches Protein. Cathepsine und Calpaine sind im Allgemeinen am Apoptosevorgang beteiligt, speziell an der Zersetzung des Zytoskeletts ¹¹⁴. Dabei stellt CTSB ein Endstreckenenzym der Apoptose dar, welches den Caspasen in seiner Funktion nachgeschaltet ist ¹¹⁵.

4.3.3 Mitochondriale Proteine

Unter den potentiellen Interaktionspartnern wurden verschiedene Proteine ermittelt, die von funktioneller Bedeutung für das Mitochondrium sind.

Hierzu gehören einerseits verschiedene Enzyme der Atmungskette (z.B. *NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8, 23kDa* (NDUFS8), Locus: 11q13), andererseits auch das mitochondriale Transporterprotein *solute carrier family 25 (mitochondrial carrier;*

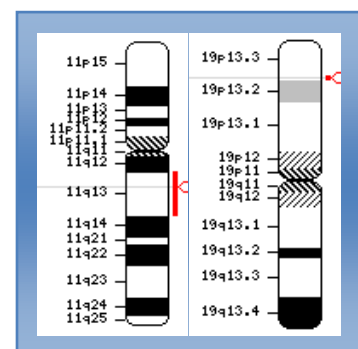


Abbildung 21: NDUFS8 und SLC25A23

phosphate carrier), *member 23* (SLC25A23, Locus: 19p13.3). SLC25A23 dient dem transmembranen Transport von Adennukleotidderivaten (beispielsweise ATP) durch die innere Mitochondrienmembran. Dabei ist seine Aktivität calciumabhängig, welches an die Zinkfingerdomäne des Proteins bindet ¹¹⁶. Ein direkter Zusammenhang zwischen hMLH1 und SLC25A23 konnte zwar nicht festgestellt werden, allerdings wurden bei Patienten mit Lynch Syndrom vermehrt Mutationen des SLC25A23-Gens festgestellt ¹¹⁷.

Die Enzyme der Atmungskette sind bei normalem Zellzyklus durch ihre Funktion bei der oxidativen Phosphorylierung essentiell für den Energiestoffwechsel. Eine weitere wichtige Rolle spielt vor allem Cytochrom C bei der Einleitung der Apoptose. Ein wichtiger Schritt hierbei ist der Verlust der mitochondrialen Membranintegrität und die Ablösung von Cytochrom C. Dieses ist im Anschluss an der Aktivierung der Caspase-Kaskade beteiligt, die letztendlich für den Vollzug des programmierten Zelltod verantwortlich ist ¹⁰⁹.

4.3.4 Enzyme des Nucleinsäuren Metabolismus

4.3.4.1 5'-Nucleotidase, cytosolic III-like (NT5C3L)

Die Nucleotidase NT5C3L (Locus: 17q21.2) hydrolysiert alle 5'-Ribo- und 5'-Desoxyribonucleotide bis hin zu 5'-Nucleosidylpolyphosphate sowie die synthetischen Substrate bis- und para- Nitrophenylphosphat. NT5C3L ist somit in der Lage, DNA- und RNA-Stränge in 5' Richtung aufzuspalten.

Dabei können die Substrate sowohl in der Größe, als auch in der Form der chemischen Bindung sehr stark variieren. Diese hohe Substratvielfalt ermöglicht den kompletten Abbau bis hin zu den entsprechenden Nucleosiden und phosphorylierten Zuckern. Trotz dieser theoretisch sehr großen Substratbreite ist das Enzym äußerst spezifisch, denn viele substratähnliche Nucleotide werden nicht abgebaut oder wirken sogar inhibitorisch ¹¹⁸.

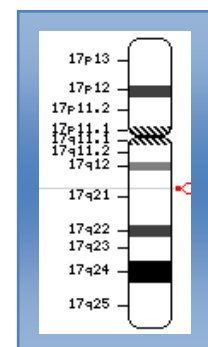


Abbildung 22:
NT5C3L

4.3.4.2 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47 (DDX47)

DDX47 (Locus: 12p13.1) gehört zu den DEAD Box Proteinen. Für DDX47 wird eine Beteiligung bei der Spermatogenese, Embryogenese und der Regulation von zellulärem Wachstum vermutet. Ein Mitwirken bei apoptotischen Mechanismen ist bereits nachgewiesen worden ¹¹⁹.

DEAD Box Proteinen sind im Allgemeinen SF2 - RNA – Helikasen, denen eine zentrale Rolle im RNA Metabolismus zugeschrieben wird, unter anderem bei der Translationsinitiation, dem Spleißen und bei der Ausbildung von Spleißosom und Ribosom. Sie zeichnen sich durch spezifische Sequenzen von 8 Basen aus. Sie sind in der Lage, zwischen Nukleus und Zytoplasma zu wandern und weisen eine eigene ATPase Aktivität auf. Zusätzlich besitzen sie eine ausgeprägte Nucleosid-Triphosphatase-Aktivität, die durch RNA/DNA stimuliert wird¹²⁰.

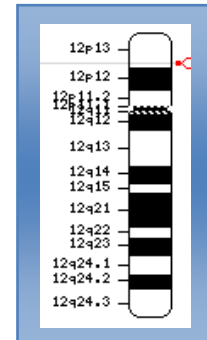


Abbildung 23: DDX47

4.3.5 Signalmoleküle und Enzyme

4.3.5.1 *N-myc downstream regulated 1* (NDRG1)

NDRG1 (Locus: 8q24.3) ist ein Mitglied der *N-myc downstream regulated* Familie, die zu den α/β Hydrolasen gehört. Es ist ein vorwiegend zytoplasmatisches Protein und wichtiger Regulator grundsätzlicher Zellfunktionen wie Differenzierung, Zellzyklus- und Wachstumsregulation, Reaktion auf DNA-Schäden und Stress durch Schwermetalle oder Hypoxie. Eine Störung dieser Funktionen kann zu Entdifferenzierung und Tumorerkrankungen führen¹²¹. Die Transkriptionsrate von NDRG1 ist bei Zellwachstum erniedrigt und bei Differenzierung sowie unter Stress erhöht.

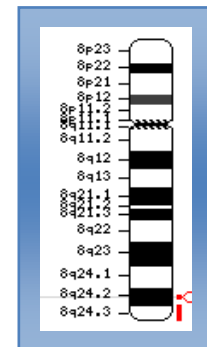


Abbildung 24:
NDRG1

Die Regulation verläuft dabei über weitere Mediatoren, so z.B. bei Hypoxie durch *hypoxia inducing factor* (HIF1 α) und bei DNA-Schäden durch das Hitzeschockprotein P53^{122,123}. Bei letztgenanntem Schritt soll NDRG1 ein essentieller Kofaktor von P53 für die Einleitung der Apoptose sein¹²⁴. Eine Hemmung von NDRG1 soll durch Mitglieder der *Myelocytomatosis* (Myc)-Familie (C-Myc und N-Myc) erfolgen¹²⁵. Neben den genannten Funktionen wurde bei der autosomal-rezessiv vererbten neuronalen demyelinisierenden Erkrankung *hereditary motor and sensory neuropathy-Lom* (HMSN L) ein erhöhter Spiegel von NDRG1 in betroffenem Nervengewebe (Schwann-Zellen) beobachtet¹²⁶.

4.3.5.2 Chloride intracellular channel 1 (CLIC1)

CLIC1 (Locus: 6p22.1-p21.2) ist ein intrazellulärer Chloridkanal, der unter anderem in Säulenepithelien des Kolons vorkommt.

Der Unterschied zu anderen Ionenkanälen besteht darin, dass CLIC1 in zwei Formen vorliegen kann: membrangebunden als transmembraner Ionenkanal, oder als im Zytosol gelöstes Protein. Die intrazelluläre Lokalisation wurde durch Markierung mit Fluoreszenz Antikörpern ermittelt. Sie ist für jedes Gewebe spezifisch, zum Beispiel sind sie in Epithelien eher im apikalen Zellbereich in Vesikeln gespeichert.

Die genaue Funktion dieser Chloridkanäle ist noch nicht näher bekannt ¹²⁷.

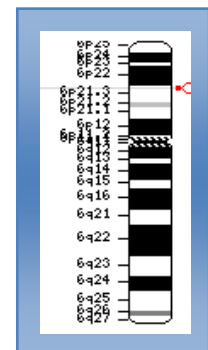


Abbildung 25: CLIC1

4.3.5.3 Annexin A6 (ANXA6)

Annexine sind Proteine, die aus Segmenten mit jeweils 70-80 Aminosäuren bestehen, wobei ANXA6 (Locus: 5q32-q34) aus 8 und die restlichen Annexine aus 4 Segmenten bestehen.

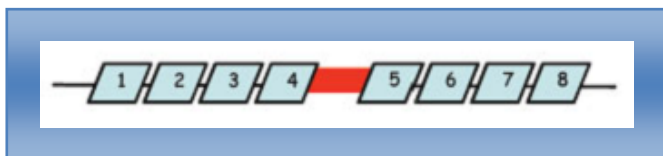


Abbildung 27: Aufbau von Annexin A6

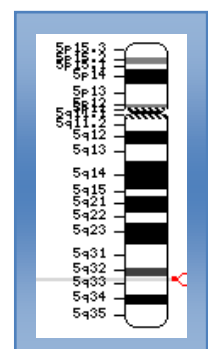


Abbildung 26: ANXA6

Sie besitzen zwei Domänen: die C-terminale Region ist die so genannte *core*-Domäne, die für die Ausbildung der Proteinstruktur verantwortlich ist. Die N-terminale Domäne ist für die spezifische Diversität, bzw. die Interaktion mit anderen Proteinen, verantwortlich ¹²⁸.

Annexine können pH- und kalziumabhängig Phospholipide binden. Dabei bildet jede einzelne Unterdomäne der Proteine fünf α -Helices aus, die eine zentrale hydrophile Pore bilden. Die Bindungsstellen für Kalzium sind bei allen Annexinen in der N-terminalen Domäne lokalisiert, variieren dort aber in der Anzahl und der genauen Position ¹²⁹.

So wurde für die meisten Annexine (u.a. auch für ANXA6) eine Ionenkanalaktivität nachgewiesen, neben Kalziumionen auch für Barium-, Lithium- und Cäsiumionen. Zudem können Annexine an Elemente des Zytoskeletts wie F-Aktin oder Spectrin oder Saurem-Gliafibrillärem-Protein assoziiert sein ¹³⁰.

Funktionell wird Annexinen unter anderem eine Beteiligung bei exozytotischen bzw. sekretorischen Mechanismen zugeschrieben. So soll es bei hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen zur Aggregation und Fusion sekretorischer Vesikel kommen¹³¹. Daneben haben die meisten Unterformen der Annexine für sie charakteristische Funktionen. ANXA6 ist ein Bindungspartner von p120GAP, einem Protein der Ras/Raf Kaskade, für dessen Translokation und Komplexbildung es notwendig ist. Der Komplex aus p120GAP und ANXA6 scheint als Tumorsuppressor zu funktionieren, indem es die Ras / Raf / MAPK Kaskade inaktiviert.

Dabei bindet ANXA6 über seine Verbindungsdomäne Ca^{2+} -unabhängig an die CALB/C2 Domäne von p120GAP und ermöglicht so eine Ca^{2+} -Bindung an den Komplex. Gleichzeitig scheint ANXA6 an Mitglieder der Proteinkinase C Familie zu binden, welche gleichfalls an der Regulation der Ras / Raf / MAPK Kaskade beteiligt sind. In Ovarialtumorzellen konnte durch ektope Expression von Annexin A6 eine verminderte Aktivität der Kaskade beobachtet werden.

In Kolonzellen und in vielen anderen Tumorgeweben wurde ein relativ geringer Spiegel von ANXA6 nachgewiesen¹³².

4.3.5.4 Neutrophil cytosolic factor 4 (NCF4)

Das NCF4 - Gen (Locus: 22q13.1) kodiert für eine Untereinheit der NADPH-Oxidase, P40^{phox} . Die NADPH-Oxidase ist speziell in myeloischen Immunzellen für die Ausbildung von Superoxid Radikalen verantwortlich, welche zusammen mit speziellen Enzymen für Immunfunktionen notwendig sind.

P40^{phox} hat hierbei eine regulierende Funktion, die über die Bindung von Phospholipiden (zum Beispiel Phosphatidylinositol 3 Phosphat) in ihrem Funktionszustand beeinflusst werden kann. Die Phosphorylierung von P40^{phox} führt zu einer negativen Regulation der NADPH Oxidase¹³³.

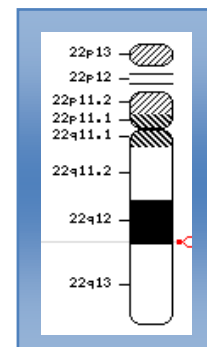


Abbildung 28: NCF4

4.3.5.5 Lipid-Phosphat-Phosphatase 2 (LPP2)

Bei LPP2 (Locus: 19p13) handelt es sich um eine intramembrane Phosphatase, die Phospholipide zu Phosphat und Diacylglycerin umwandelt, in der *de novo* Synthese von Glycerolipiden mitwirkt und an rezeptoraktivierter Signaltransduktion über die Proteinkinase D mitwirkt. Das Enzym ist aus 6 Transmembrandomänen aufgebaut und besitzt eine N-Glykosylierungsdomäne.

Lipidphosphate, wie Lysophosphat und Sphingosin 1 Phosphat (S1P), sind Botenstoffe, die über ihre Bindung an G-Proteine an intrazellulären Signalprozessen teilnehmen. Intrazellulär können sie an lösliche Rezeptoren wie z.B. PPAR γ binden. Die meisten Signale, die über die Wirkung von Phospholipiden vermittelt werden, betreffen die Regulation von Wachstum und Differenzierung. So wirkt S1P als antiapoptotischer Faktor, und schützt hierdurch die Zelle. Lipid-Phosphatasen dephosphorylieren Phospholipide und deaktivieren so die durch sie vermittelte Signaltransduktion.

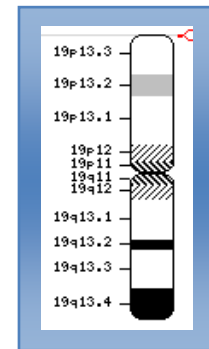


Abbildung 29: LPP2

Es existieren drei grundsätzliche Unterformen von Lipid-Phosphat-Phosphatasen (LPP1, LPP2, LPP3), die eine ähnliche Architektur aufweisen. Sie bestehen wie bereits erwähnt aus 6 Transmembrandomänen, mit denen das Enzym in der Membran verankert ist, weisen zudem eine N-Glykosylierungsdomäne und 3 Domänen für Phosphataseaktivität auf. Diese können intra- oder extrazellulär liegen, dementsprechend werden auch intra- oder extrazelluläre Signalwege durch die Phosphatasen beeinflusst. Die LPP2 ist nicht in allen Geweben gleich stark exprimiert: so finden sich erhöhte Spiegel zum Beispiel in Pankreas- oder Kolongewebe.

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte LPP2 Expression in Fibroblasten zu einem verfrühten Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus führte. Dies zeigte sich einerseits morphologisch, andererseits auch durch einen erhöhten Cyclin A Spiegel. Zudem konnte bei Zellen mit erhöhter LPP2 Expression nach zirka 20 Zellzyklen ein Arrest in der G₂/M-Phase und typische morphologische Merkmale einer Zellalterung gezeigt werden¹³⁴.

4.3.5.6 Phytoceramidase (= alkaline ceramidase 3 (ACER3))

Das Enzym ACER3 (Locus: 11q13.5) ist eine Ceramidase. Dies sind Enzyme, die im Phospholipidstoffwechsel Ceramid spalten, so dass Sphingosin sowie freie Fettsäuren entstehen. Es wird aufgrund des jeweiligen-pH Optimums zwischen sauren, neutralen und alkalischen Ceramidasen unterschieden, die jeweils in der Zelle auch unterschiedlich lokalisiert sind.

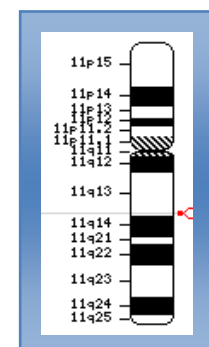


Abbildung 30: ACER3

Die sauren Ceramidasen sind oftmals in den Lysosomen lokalisiert, die neutralen im Mitochondrium. Alkalische Ceramidasen wie ACER3 befinden sich bevorzugt im Endoplasmatischen Retikulum (E.R.) und im Golgi Apparat, wo die Sphingolipidsynthese stattfindet. ACER3 hydrolisiert im E.R. bevorzugt Phytoceramid und ist durch Ca²⁺ induzierbar. Dem Substrat entsprechend heißt das Enzym deshalb auch Phytoceramidase. Es kommt in vielen Geweben vor, unter anderem in der Leber.

Derivate des Sphingosinstoffwechsels sind an der Regulation von Wachstum und Apoptose beteiligt sind, was auch für Phytoceramid vermutet wird. Neben der Regulationsmöglichkeit durch Ca^{2+} wurden auch Bindungstellen für Proteinkinase C, Caseinkinase II, eine Tyrosinphosphorylierungsdomäne, sowie eine N-Glykosylierungsdomäne identifiziert. Phytoceramid und Dihydroceramid werden zudem für die Sekretion von mit Glykosylphosphatidylinositol (GPI) markierten Proteinen aus dem E.R. benötigt. Diese Funktion ist für das Wachstum der Zelle absolut notwendig. Ceramid Synthase und Phytoceramidase sind beide im E.R. lokalisiert, so dass davon auszugehen ist, dass beide dort als Antagonisten der GPI Markierung wirken ¹³⁵.

4.3.5.7 Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2 (PTP4A2)

Das Enzym PTP4A (Locus: 1p35) ist eine Tyrosinphosphatase. Diese Enzyme beeinflussen die Aktivität bestimmter Wachstumsfaktoren, indem sie den Phosphorylierungszustand von Tyrosinresten verändern. Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) sind so in der Lage, durch Aktivierung/Inaktivierung mitogener Signale, Zellwachstum und Differenzierung zu beeinflussen. Strukturell unterscheiden sich PTPs von anderen beschriebenen Tyrosin-Phosphatasen durch eine *caax-box* am carboxyterminalen Ende, an der posttranslational Farnesylreste konjugiert werden können.

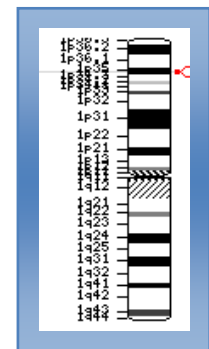


Abbildung 31:
PTP4A2

Bei der Untersuchung des Einflusses erhöhter PTP4A (Locus: 1p35) Spiegel konnte beobachtet werden, dass betroffene Zellen ein erhöhtes Wachstum zeigten. Dabei fiel besonders auf, dass der Anteil von Zellen gestiegen war, die sich in der Synthesephase des Zellzyklus befanden. Anscheinend führt der Einfluss von PTP4A zu einer verfrühten Reifung von Zellen. Aufgrund weiterer Ergebnisse wird dies auf die Inaktivierung von Hemmstoffen der cyclinabhängigen Kinasen zurückgeführt. Diese Enzyme fördern das Zellwachstum und steigern durch den beschriebenen Mechanismus ihre Aktivität ¹³⁶.

4.3.5.8 *RAP guanine nucleotide exchange factor (GEF)-like 1 (RAPGEFL1)*

RAPGEFL1 (Locus: 17q21.1-q21.2) ist ein Protein, das mit GTPasen der Ras-Familie interagiert, speziell mit Rap1 und Rap2. Diese GTPasen sind an multiplen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Lymphozytenaggregation, T-Zell Reaktion sowie der Plättchenaktivierung beteiligt. Hierbei ist RAPGEFL1 für den Austausch von Guanin-Nukleotiden aus der Bindungsstelle der GTPasen verantwortlich.

Proteine, die mit Ras-GTPasen interagieren, weisen spezifische Domänen auf. So ist zum Beispiel die RA-Domäne für die Translokation von RAPGEFL1 in den Golgi Apparat verantwortlich¹³⁷.

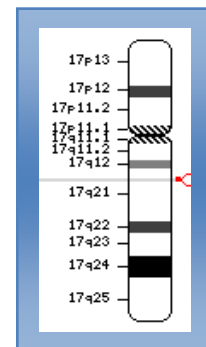


Abbildung 32:
RAPGEFL1

4.3.5.9 *Selenium binding protein 1 (SELENBP1)*

SELENBP1 (Locus: 1q21-q22) ist ein zytosolisches Protein, welches in Geweben von Pflanzen und Säugern vorkommt und in der Lage ist Selenium zu binden. Seine physiologische Funktion ist noch weitgehend unbekannt.

Es soll an der Regulation von Wachstum, Reduktion/Oxidation und Detoxikation beteiligt sein. Auffällig ist die hohe Homologie zwischen der Pflanzen- und Säugetierform des Proteins¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Ein verminderter Spiegel von SELENBP1 wurde in Kolonkarzinomzellen nachgewiesen. Dabei wurden höhere Konzentrationen von SELENBP1 in Adenomen im Vergleich zu Kolonkarzinomzellen höherer Malignität nachgewiesen. Dies weist darauf hin, dass der Spiegel möglicherweise mit zunehmender Malignität sinkt¹⁴¹.

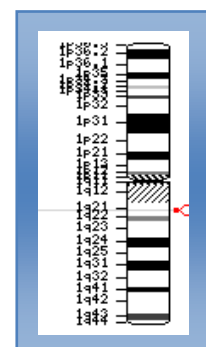


Abbildung 33:
SELENBP1

4.3.5.10 *Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2 (SPTLC2)*

SPTLC2 (Locus: 14q24.3-q31) ist ein Bestandteil der Serin-Palmitoyltransferase (SPTLC), welche für den initialen Schritt im Sphingosinstoffwechsel verantwortlich ist. Nach heutigem Kenntnisstand ist es aus den zwei Untereinheiten SPT1 und SPT2 aufgebaut. SPTLC vermittelt die Kondensation von Palmitoyl CoA und Serin zu 3-Ketosphingamin, welches eine Vorstufe für die weiteren Vertreter der Sphingosinfamilie ist.

Sphingosine sind im Allgemeinen Botenstoffe, die intra- (vor allem im Zytosol) und interzellulär verschiedenste Signale vermitteln können. So sind die

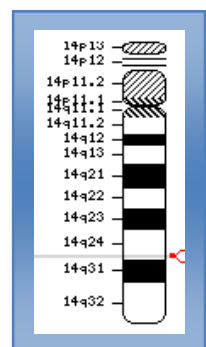


Abbildung 34:
SPTLC2

Sphingolipide, Ceramid und Sphingalin beispielsweise, Signale für die Apoptose, während Sphingosin-1-Phosphat ein Proliferationsstimulator ist ¹⁴².

Dass Veränderungen im Lipidstoffwechsel zu den ersten Anzeichen einer zellulären Entdifferenzierung gehören, ist schon seit längerem bekannt ¹⁴³.

So sind die Spiegel von Sphingolipiden in Leberkarzinomzellen deutlich höher als in normalem Lebergewebe ¹⁴⁴.

In verschiedenen weiteren Tumorgeweben wurde eine erhöhte Expression von Bestandteilen der SPTLC nachgewiesen. Zu diesen Tumoren gehörte auch das Kolonkarzinom.

Zudem konnte gezeigt werden, dass sich nicht nur die quantitative Expression geändert hat, sondern auch die intrazelluläre Verteilung ¹⁴⁵.

Eine Translokation des Enzyms in den Nucleus, was auf eine Beteiligung in der Steuerung von Wachstum und Differenzierung hinweisen könnte, ist bereits beobachtet worden ¹⁴⁶.

Bei genauerer Untersuchung konnte festgestellt werden, dass die Untereinheiten innerhalb der Zelle unterschiedlich stark exprimiert waren. So war SPT1 eher diffus im Zytoplasma verteilt, während SPT2 eher im Nucleus lokalisiert war ¹⁴⁵.

4.3.5.11 Pigment epithelium derived factor (PEDF)

PEDF (Locus: 17p13.1) ist ein Wachstumsfaktor. Eine beschriebene Funktion von PEDF ist die Inhibition der Angiogenese. Zur Familie der Angiogenese-Inhibitoren gehören unter anderem auch Angiostatin und Thrombospondin. Angiogenese-Inhibitoren sind oft Antagonisten von angiogenesefördernden Faktoren (z.B. *vascular endothelial growth factor* VEGF) ¹⁴⁷. Maligne Gewebe haben zumeist einen erhöhten Nähr- und Sauerstoffbedarf, so dass es hier leicht zu einer Hypoxie kommt. Aus diesem Grund besteht hier ein erhöhter Wachstumsreiz, der zu einer erhöhten Ausschüttung von Angiogenesefaktoren führt. So sind viele Tumore hypervaskularisiert.

Eine weitere Funktion von PEDF soll in der Protektion neuronaler Zellen bestehen ¹⁴⁷. Zudem wird für PEDF eine Beteiligung bei der Zellalterung vermutet. In alternden Zellen konnte ein deutlich verminderter Spiegel von PEDF nachgewiesen werden ¹⁴⁸.

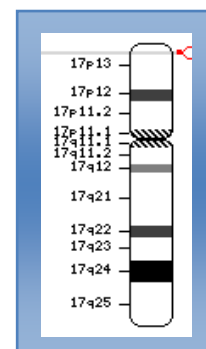


Abbildung 35: PEDF

4.3.5.12 *V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1 (ARAF1)*

ARAF1 (Locus: Xp11.4-p11.2) ist ein Vertreter der Proteine der RAF-Familie, die zu den MAP-KKK (Mitogen activated Protein-Kinase Kinase Kinase) gerechnet werden, da sie in der Lage sind die MAP-Kinase-Kinasen MEK1 und MEK2 zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren. Diese aktivieren wiederum die MAP-Kinasen, *extracellular regulated kinases* (ERKs), ERK1 und ERK2, die das ursprüngliche Signal in den Nukleus transportieren und dort an verschiedene Transkriptionsfaktoren binden ¹⁴⁹. Mutationen in dieser Enzymkaskade sind häufig in kolorektalen Karzinomen zu finden ¹⁵⁰.

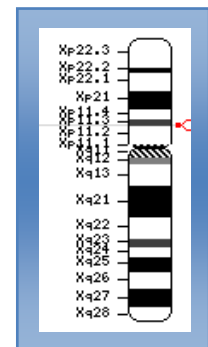


Abbildung 36: ARAF1

4.3.5.13 *Non-POU domain containing, octamer-binding (NONO)*

NONO (Locus: Xq13.1) gehört zu der Klasse der oktamerbindenden Proteine. Diese erkennen bestimmte DNA Sequenzen, die aus acht Basen bestehen. Einige Proteine aus dieser Familie enthalten eine bestimmte Proteindomäne, die POU Domäne. Sie fungiert beispielsweise in lymphatischen Geweben als positiver / negativer Transkriptionsfaktor zur Regulation der Synthese von Immunglobulinen. Neben den POU - Proteinen gibt es auch solche die keine entsprechende POU Domäne enthalten. NONO ist ein Vertreter dieser Klasse, welches in zwei Formen vorliegt. Die längere Form (2700 Basenpaare) ist ein ubiquitäres Protein, das in praktisch allen Geweben vorkommt. Die verkürzte Form (1600 Basenpaare) ist vor allem in lymphatischen Geweben zu finden. Eine erste Extraktion dieses Proteins erfolgte aus einem B-Zell Leukämie Stamm. Bei Betrachtung der Basensequenz finden sich Bereiche, die für die Bindung von DNA und Protein-Protein Interaktionen kodieren können. Diese Abschnitte zeichnen sich durch eine große Anzahl an Prolin- und Glutaminsequenzen aus ¹⁵¹.

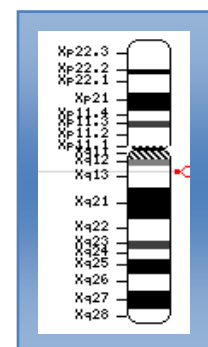


Abbildung 37: NONO

4.3.6 Stoffwechsellenzyme

4.3.6.1 Adenine phosphoribosyltransferase (APRT)

Das Enzym APRT (Locus: 16q24) katalysiert die Synthese von Adeninmonophosphat aus Adenin und Phosphoribosyl-Pyrophosphat unter der Bildung eines Pyrophosphations. Die enzymatische Aktivität kann durch die Endprodukte gehemmt werden. APRT kommt vor allem in der Leber vor und spielt eine wichtige Rolle im Nukleinsäurenmetabolismus: es ist Bestandteil der Purinbasen-Wiederverwendungsmechanismen (*salvage pathway*)¹⁵².

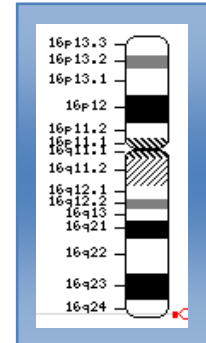


Abbildung 38: APRT

4.3.6.2 Argininosuccinate synthetase 1 (ASS1)

Das Enzym ASS1 (Locus: 9q34.1) katalysiert die Synthesereaktion von Argininosuccinat aus Citrullin und Aspartat. Arginin ist eine nicht-essentielle Aminosäure, für welche ASS in Mangelzuständen einen alternativen Stoffwechselweg darstellt. Für bestimmte Tumore ist Arginin eine essentielle Aminosäure. Trotzdem ist *in vitro* teilweise ein Wachstum in argininfreien Nährmedien möglich, was auf die Aktivität von ASS1 zurückgeführt wird¹⁵³.

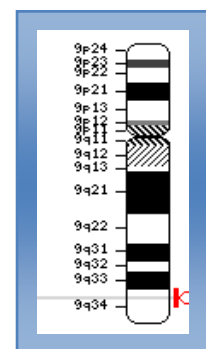


Abbildung 39: ASS1

4.3.7 Translationsproteine und Ribosomale Proteine

4.3.7.1 Ribosomal protein S2 (RPS2) / S5 (RPS5) / S16 (RPS16)

RPS2 (Locus: 16p13.3), RPS5 (Locus: 19q13.4) und RPS16 (Locus: 19q13.1) gehören jeweils zur 40S Untereinheit des Ribosoms. Untersuchungen zu den einzelnen Proteinen weisen auf eine Beteiligung bei der Regulation des Zellwachstums hin.

Dies gilt speziell für RPS5, für das eine regulatorische Wirkung auf den Zellzyklus beschrieben wird¹⁵⁴. Für RPS2 wurde eine Interaktion mit dem *fibroblast growth*

factor 3 beobachtet, welcher in seiner zellkernständigen Form einen Inhibitor der Zellproliferation darstellt¹⁵⁵. Zudem codiert RPS2 für ein Antigen, welches von zytotoxischen T-Lymphozyten mit dem Oberflächenantigen HLA26 erkannt wird¹⁵⁶.

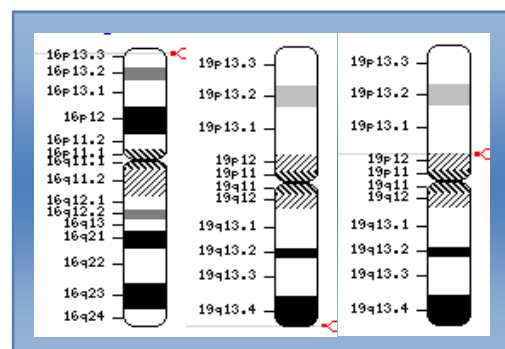


Abbildung 40: RPS2, RPS5, RPS16

4.3.7.2 Eukaryotic translation initiation factor 2A (EIF2A)

EIF2A (Locus: 3q25.1) ist ein Protein, welches während der Proteinbiosynthese den Transport der AUG(Methionin) – tRNA zur 40S Ribosomen Untereinheit katalysiert.

Die Bindung der AUG-tRNA stellt den initialen Schritt der Translation dar.

An Ser51 der α -Untereinheit befindet sich eine Phosphorylierungs-domäne, an der EIF2A durch Phosphorylierung inaktiviert werden kann. Für die Phosphorylierung sind nach aktuellem Kenntnisstand hauptsächlich vier

Enzyme verantwortlich: die dsRNA aktivierte Proteinkinase PKR. Sie ist ein Bestandteil der interferonvermittelten Immunabwehr; die generell den Nitrogenmetabolismus kontrollierende Kinase, die auf Aminosäuren-Mangelzustände reagiert, die Hämregulierte-Inhibitor-Kinase, die die Globinsynthese mit dem Angebot an Häm synchronisiert und die PKR assoziierte endoplasmatische Kinase PERK, die auf große Mengen ungefalteter Proteine im E.R. reagiert.

Die Inhibierung der Translation durch die PKR abhängige Phosphorylierung von EIF2A gehört zu den essentiellen Schritten der Apoptose. Eine Inaktivierung der Proteinbiosynthese verringert die Konzentration an antiapoptotischen Faktoren ¹⁵⁷.



Abbildung 41: EIF2A

4.3.7.3 Eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)

EEF2 (Locus: 19pter-q12) ist ein GTP bindendes Protein, welches einen wichtigen Kofaktor bei der Proteinsynthese darstellt. Es ist für die Translokation der entstehenden Proteinkette von der A- in die P-Stelle des Ribosoms notwendig ¹⁵⁸. EEF2 ist hierdurch eine wichtige Regulationsmöglichkeit für die Proteinbiosynthese. In hypoxischen Zellen, wie zum Beispiel in Tumoren, wird die Expression von EEF2 vermindert, EEF2 kann aber auch direkt durch Phosphorylierung inaktiviert werden ¹⁵⁹. Die Interaktion mit P53 ist für die Zellzyklus- und Wachstumsregulierende Funktion von EEF2 verantwortlich ¹⁶⁰.

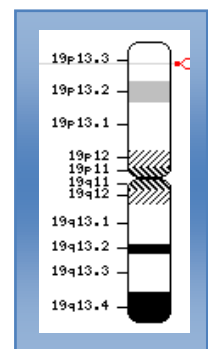


Abbildung 42: EEF2

4.3.8 Proteasom und Sequestosom assoziierte Proteine

4.3.8.1 UBA domain containing 1 (UBAC1)

UBAC1 (Locus: 9q34.3) ist Bestandteil des Ubiquitin-Proteasom-Systems, welches für den selektiven Abbau von Proteinen verantwortlich ist. Es spielt eine zentrale Rolle in einer Vielzahl von lebenswichtigen zellulären Prozessen wie Zellzyklus, Qualitätskontrolle der Proteinfaltung, Signaltransduktion, Genexpression und Apoptose. Substratproteine werden durch Ubiquitin kovalent modifiziert und so für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert. Dabei ist die UBA Domäne die erste in der Literatur beschriebene Bindungsstelle für die Ubiquitinierung von Proteinen, über welche die Degradierung im Proteasom stattfinden kann¹⁶¹.

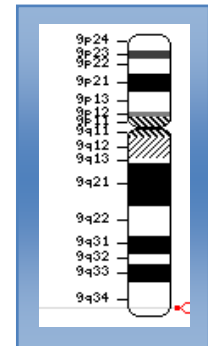


Abbildung 43: UBAC1

4.3.8.2 Sequestosome 1 (SQSTM1 = p62)

SQSTM1 (Locus: 5q35) gehört zu den Proteinen der Ubl/UBA-Familie, die an der Regulation der Degradierung von Proteinen im Proteasom beteiligt sind. Dies geschieht über ihre UBA Domäne, die Verbindungen mit Polyubiquitin eingehen kann. SQSTM1 wirkt hier dann als Proteintransporter. Zudem enthält SQSTM1 Domänen für die Interaktion mit weiteren Proteinen, zum Beispiel die PB1-Domäne (z.B. mit der ^{Phox}Untereinheit siehe 4.3.5.4), welche der Heterodimerbildung dient und auch in anderen Proteinen vorkommt¹⁶².

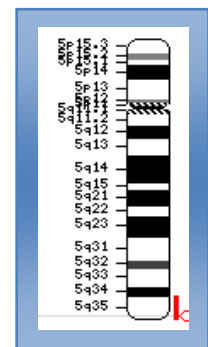


Abbildung 44: SQSTM1

4.3.9 Proteine des Zytoskeletts

4.3.9.1 Actin, gamma 1 (ACTG1)

ACTG1 (Locus: 17q25) ist eine Unterform des Aktins, welches das numerisch häufigste zytoskelettale Protein darstellt.

Aktin liegt in zwei möglichen Formen vor: einerseits als das so genannte globuläre Aktin (G-Aktin), welches zellulär gelöst ist und andererseits als das filamentöse Aktin (F-Aktin), welches ein die Zelle durchspannendes Polymer des G-Aktins darstellt.

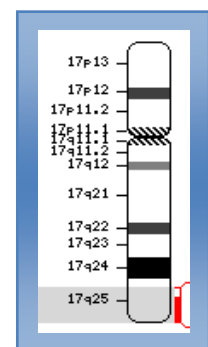


Abbildung 45: ACTG1

Es existieren verschiedene Unterformen des Aktins: α -Aktin vom Herztyp und vom Gefäßtyp, β -Aktin in verschiedenen Isoformen und γ -Aktin vom enterischen und vom zytoplasmatischen Typ. Zusätzlich zu der Fähigkeit zur Polymerisation kann Aktin über seine N-terminale Domäne weitere Protein-Protein Interaktionen eingehen.

Neben seiner Funktion als zellulärer „Baustoff“ ist Aktin auch für weitere zelluläre Vorgänge bekannt. So wird eine Rolle als Kofaktor der Polymerase II bei der Transkription diskutiert^{163,164}. Dabei soll Aktin als allosterischer Regulator der Gentranskription wirken¹⁶⁵ (siehe [Abbildung 46](#)).

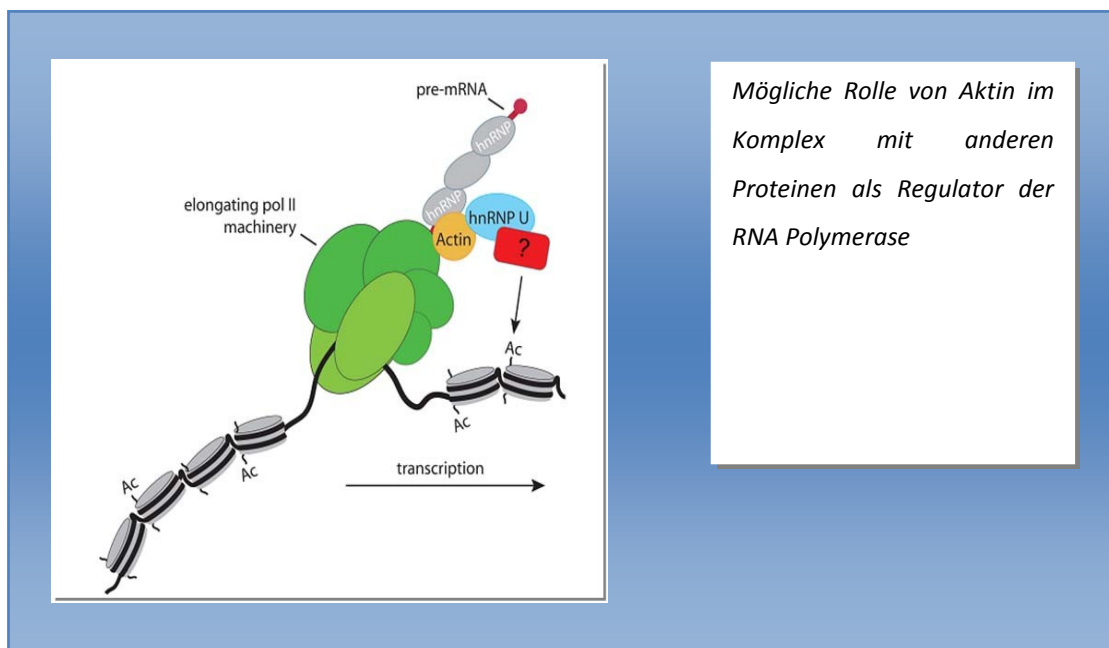


Abbildung 46: Mögliche Rolle von Aktin bei der Translation

4.3.9.2 CutA divalent cation tolerance homolog (CUTA)

CUTA (Locus: 6pter-p21.31) wurde bei der Suche nach Ankerproteinen für die Acetylcholinesterase entdeckt¹⁶⁶.

Es soll vor allem an der Verankerung von neuronalen Zellen (speziell im Nucleus Caudatus und in der Substantia Nigra) beteiligt sein. Durch seine starke Lipophilie kann es sehr gut in die Membran integriert werden.

Die Architektur mit verschiedenen Aminosäure- und Fettsäureresten weist darauf hin, dass dieses Protein über Protein-Protein Interaktionen in der Lage ist, auch andere Proteine in der Membran zu verankern¹⁶⁷.

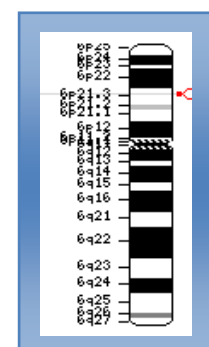


Abbildung 47: CUTA

4.3.9.3 *Desmin (DES)*

DES (Locus: 2q35) ist ein Intermediärfilament und kommt vor allem in Muskelgeweben vor. In den Zielzellen polymerisiert es zu filamentösen Netzwerken. Diese reichen einerseits von der Kernhülle bis hin zum Sarkolemm, andererseits sind sie für die Fixierung von Myofibrillen an den Z-Scheiben in Muskelzellen verantwortlich. Neben einigen anderen Intermediärfilamenten hat Desmin eine Bindungsstelle für Caspase 6. Die Caspase-Enzymkaskade spielt beim Mechanismus der Apoptose eine zentrale Rolle¹⁶⁸.

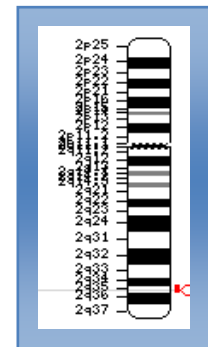


Abbildung 48: DES

4.3.9.4 *Parvin, alpha (PARVA)*

PARVA (Locus: 11p15.3) ist ein Protein des Zytoskeletts, das zur Familie der *Integrin-linked-Kinase* (ILK) bindenden Fokalkontakt-Proteine gehört. Diese Proteine dienen der Interaktion verschiedener Bestandteile des Zytoskeletts, zum Beispiel mit Aktin oder mit Integrinen¹⁶⁹. Es existieren α - und β -Parvine, die jeweils als Antagonisten zueinander wirken. Der Komplex ILK - α -Parvin soll Zellen vor Apoptose schützen, ILK - β -Parvin hingegen die Apoptose fördern. Dies wurde anhand einer Quantifizierung der Caspase 3 Aktivität ermittelt¹⁷⁰.

4.3.9.5 *Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (SPTAN1)*

SPTAN1 (Locus: 9q33-q34) zählt zu den Spectrinen, tetramerbildende Proteine die aus 2 α - β Dimeren bestehen. Spectrine sind Intermediärproteine und erhöhen die Quervernetzung und Verankerung von Anteilen des Zytoskeletts, speziell von Aktin. Es liegt in zwei Formen vor. Die erythrozytengebundenen Form (*erythroic-spectrin*) ist am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt und maßgeblich für die physikalische Stabilität sowie die hohe Lebenserwartung der Erythrozyten verantwortlich. Eine Mutation in diesem Spectrin-Gen führt zur elliptoiden hämolytischen Anämie. Die, hier vorliegende, extraerythrozytäre Form (*non-erythroic-spectrin*) ist in Geweben für die Zellverankerung und die Aufrechterhaltung von Zell-Zell Kontakten verantwortlich¹⁷¹.

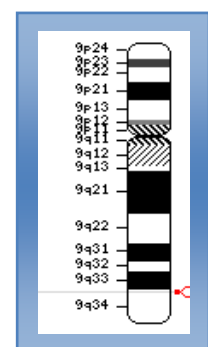


Abbildung 49: SPTAN1

4.3.9.6 Sec61 alpha 1 subunit (SEC61A1)

SEC61A1 (Locus: 3q21.3) ist ein Bestandteil von Sec61, einem Transmembranprotein, welches an der Translokation neu synthetisierter Proteine in die Zellmembran oder außerzytosolische Kompartimente beteiligt ist. Es ist aus den Untereinheiten α und β zusammengesetzt.

Der gesamte Proteinkomplex wird „Translocon“ genannt. An ihm sind neben den beiden Untereinheiten von Sec61 auch noch das Signalerkennungsprotein SRP (*signal-recognition-particle*) und sein Rezeptor beteiligt¹⁷². Weitere mögliche Interaktionspartner können an der Ausbildung des Translocons

beteiligt sein. Studien mit Antikörpern gegen die carboxyterminale Domäne von Sec61 zeigten, dass es vornehmlich in Mikrosomen im rauen E.R. lokalisiert ist^{173,174}.

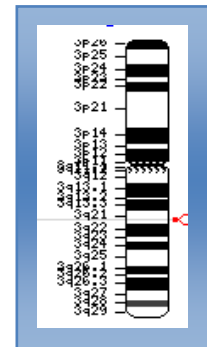


Abbildung 50:
SEC61A1

4.3.9.7 Transgelin (TAGLN = SM22)

TAGLN (Locus: 11q23.2) ist ein vor allem in glatter Muskulatur vorkommendes zytoskelettales Protein, welches im Verhältnis 1:6 an Aktin bindet. Es ist für die Quervernetzung und Organisation von Aktinfilamenten zuständig. Zudem kann es an Aktin-Stressfasern binden, die bei Zellen unter nichtphysiologischen Bedingungen wie Hypoxie entstehen¹⁷⁵. Die Aktinbindungsfähigkeit hängt dabei vom jeweiligen Phosphorylierungszustand ab, der zum Beispiel durch die Interaktion mit Proteinkinase C beeinflusst werden kann¹⁷⁶.

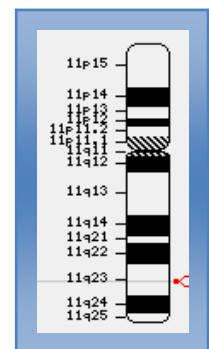


Abbildung 51:
TAGLN

4.3.10 Bestandteile der DNA Reparatur

4.3.10.1 Post-meiotic segregation protein 2 (PMS2)

Die Funktion von PMS2 als Interaktionspartner von hMLH1 bei der Bildung des Heterodimers MutL α bei der MMR wurde bereits eingehend beschrieben (siehe 1.3.2).

4.3.11 Sonstige Proteine

Neben den bereits aufgeführten Proteinen wurden noch einige identifiziert, zu denen in der Literatur bisher keine Information bezüglich Struktur und Funktion zu finden waren:

- *family with sequence similarity 79*
- *member A Homo sapiens CpG DNA*
- *similar to uncharacterized protein family UPF0227 member RGD1359682*
- *transmembrane protein 103*

Zusätzlich wurden 12 DNA Sequenzen identifiziert, denen nur ein offenes Leseraster, ohne Bezug zu einem bekannten Protein, zu Grunde lag.

5 Diskussion

5.1 Methodik

5.1.1 Praktische Erfahrungen mit dem *Bacteriomatch (II) Two – Hybrid System*

Das Ziel bei der Entwicklung von bakteriellen Zweihybrid-Systemen war es, schnelle und effektive Methoden zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen zu entwickeln, die gleichzeitig günstig in der praktischen Handhabung sind.

Das *Bacteriomatch (II) Two – Hybrid System* stellte sich in dieser Versuchsreihe als eine, in der Praxis gut durchführbare, Methode dar. Potentielle Fehlerquellen waren dabei lediglich die Einhaltung der exakten Versuchszeiten (siehe 3.3.4.2) und die kurze Haltbarkeit der Plasmid-DNA in H₂O (siehe 3.3.5.1). Nach entsprechender Korrektur konnte in wenigen Wochen eine große Anzahl von Proben erfolgreich kotransformiert werden.

5.1.2 Verwendung eines bakteriellen Zweihybrid-Systems

Der Hauptanteil der MMR-Proteine liegt im Zellkern vor, jedoch sind auch kleine Mengen im Zytoplasma nachweisbar^{177,178}.

Durch äußere Einflüsse kann die intrazelluläre Lokalisation der MMR Proteine verändert werden. So konnte gezeigt werden, dass alkylierende Substanzen zu einem verstärkten Transport von hMutSα in den Zellkern führen¹⁷⁹. Mit zunehmenden DNA-Schäden steigt der Bedarf an MMR Proteinen, die dann im Zytoplasma verstärkt gebildet und in den Kern transportiert werden^{179,180}.

Der aktive Transport von Proteinen in den Zellkern verläuft über sogenannte *nuclear localization sequences (NLS)*¹⁸¹. hMLH1 verfügt, ebenso wie sein Heterodimer hPMS2, über eine funktionelle NLS-Sequenz¹⁸¹ und kann dabei durch Kotransport weitere Proteine in den Zellkern transportieren. Dies wurde am Beispiel des aktinbindenden Proteins Thymosin beta 4 gezeigt¹⁸².

Die MMR-Funktion von hMLH1 im Nukleus wurde bereits eingehend untersucht. Es ist jedoch wenig über die Funktionen von hMLH1 im Zytoplasma bekannt, im Speziellen welche

Interaktionen es dort eingeht ¹⁸³. Da vermutet wird, dass hMLH1 über eine funktionelle Exportsequenz verfügt, ist eine Funktion im Zytoplasma wahrscheinlich.

Zur genaueren Untersuchung dieser zytoplasmatischen Funktion von hMLH1 wurde in dieser Arbeitsgruppe ein bakterielles Zweihybrid-System etabliert. Da prokaryotische Zellen keinen Zellkern besitzen unterbleibt ein gezielter Transport in Kompartimente und die Interaktionen mit zytoplasmatischen Proteinen werden nicht beeinflusst. Es sollten somit Erkenntnisse über neue Interaktionspartner von hMLH1, unabhängig vom zellulären Subkompartiment, gewonnen werden.

Allerdings wurde nicht nur in der kompartiment-unabhängigen Interaktionsmöglichkeit ein Vorteil gegenüber anderen Methoden gesehen. Nachteilig am Hefe-Zweihybrid-System ist beispielsweise zudem, dass sowohl das überexprimierte eukaryotische Köder- als auch das Zielprotein mit endogenen Hefeproteinen interagieren können. Dies kann zur Unterdrückung der Interaktion von Köder- und Zielprotein führen, was wiederum in falsch-negativen Ergebnissen resultiert ¹⁸⁴. In bestimmten Fällen können Ziel- oder Köderprotein sogar selbst das Wachstum der Wirtszelle beeinflussen. Dies ist besonders dann der Fall, wenn sie eine direkte Wirkung auf den Zellzyklus haben ¹⁸⁵. Theoretisch können die überexprimierten Proteine sogar proapoptotisch wirken.

Da aber gerade der Einfluss von MMR Proteinen auf Zellzyklus und Apoptose eine der aktuellsten Fragestellungen zum Thema DNA Reparatur darstellt, kam für unsere Untersuchungen ein Hefe-System nicht in Frage.

Durch Verwendung des bakteriellen Zweihybrid-Systems konnte insgesamt eine Vielzahl von bisher nicht bekannten Interaktionspartnern von hMLH1 mit Proteinen aus dem Bereich Zellmetabolismus/Apoptose (siehe [5.2.2.4](#)) detektiert werden.

5.2 Interpretation der detektierten Interaktionen

5.2.1 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Forschungsgruppen

Cannavo *et al.* haben sich etwa zeitgleich mit unserer Arbeitsgruppe mit der Suche nach neuen Interaktionspartnern von hMLH1 befasst ¹⁸⁶, wobei sie die TAP verwendeten ⁷². Diese Methode wird als besonders valide angesehen, da hier zwei Waschvorgänge hintereinander geschaltet sind (siehe [1.4.1.2](#)). Da bei der TAP eukaryotische Zellen eingesetzt werden,

finden die Interaktionen, im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Zweihybrid-System, in dem jeweiligen physiologischen subzellulären Kompartiment statt.

Unter den, durch das TAP-Screening neu identifizierten, Interaktionspartnern wurden MMR-Proteine, Enzyme des DNA-Stoffwechsels, Proteine des Import/Export, Ubiquitin assoziierte Proteine und Zellzyklusenzyme identifiziert.

Die Ergebnisse unseres bakteriellen Zweihybrid-Screenings wurden mit denen der TAP abgeglichen. 20 Proteine wurden mit Hilfe von beiden Systemen als hMLH1 Interaktionspartner identifiziert. Dabei handelt sich im Einzelnen um mitochondriale Carrier- und Atmungskettenproteine, ribosomale Proteine und Kofaktoren, Signalmoleküle sowie zytoskelettale Proteine, die im Folgenden aufgeführt sind:

Table 7: Durch sowohl TAP- als auch Zweihybrid-Screening detektierte Interaktionspartner von hMLH1

Protein	Funktion	Anzahl identischer Klone
Mitochondriale Proteine	Cytochrom C, Ubiquinon, NADH Dehydrogenase	7
<i>solute carrier family 25 (SLC25A23)</i>	Carrier der inneren Mitochondrienmembran	3
Annexin A6 (ANXA6)	Bindet Phospholipide pH+Ca ²⁺ abhängig, wirkt als Kofaktor der Ras/Raf/MapK Inhibition	1
<i>non-POU domain containing, octamer-binding Protein (NONO)</i>	Wirkt als Transkriptionsfaktor , z.B bei der Ig-Synthese in lymphatischen Geben	1
Ribosomales Protein S16 (RPS16)	Proteine der 40S ribosomalen Untereinheit, mögliche Interaktionen mit anderen Proteinen, z.B: EIF2A	1
Ribosomales Protein S5 (RPS5)		1
Ribosomales Protein S2 (RPS2)		1
<i>Eukaryotic translation initiation factor 2A (EIF2A)</i>	Initiation durch AUG Transport zum 40S Ribosom, Inaktivierung durch Phosphorylierung	2
Desmin (DES)	Intermediärfilament, Fixierung von Myofibrillen an den Z-Scheiben / Interaktion mit Caspase Enzymen	1
Filamin C, gamma (FLNC)	Verbindung von Membranproteinen mit Aktin, Mediatoren der zytoskelettalen Dynamik	1
<i>spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (SPTAN1)</i>	Oligomerbildendes Protein, welches der Quervernetzung von Aktinfilamenten dient	1

112 der durch die TAP detektierten Interaktionspartner waren zwar nicht mit Proteinen des bakteriellen Zweihybrid-Systems identisch, konnten aber ähnlichen Proteinklassen zugeordnet werden.

Die Validität dieser, durch beide Systeme detektierten, potentiellen hMLH1 Interaktionspartner muss allerdings noch durch weitere Untersuchungen geprüft werden, nicht zuletzt da sich die Fehlerquellen von falsch-positiven Ergebnissen von beiden Systemen überschneiden. So wird in beiden Fällen der intrazelluläre Spiegel an Köderprotein künstlich erhöht, so dass es zur Interaktion mit unspezifischen Liganden kommen kann (siehe 1.4.1.2). In der Tat wurden auch mit beiden Methoden Proteine detektiert, die in der Literatur als unspezifische Liganden genannt werden: ribosomale Proteine und metabolische Enzyme⁶⁹. Gleichzeitig wären diese Ergebnisse allerdings mit der der Regulationsfunktion von hMLH1 bei Zellzyklus und Metabolismus vereinbar (siehe 1.3.3), was im Verlauf noch genauer diskutiert wird (siehe 5.2.2.4).

5.2.2 Bekannte Funktionen von hMLH1 und Übereinstimmung mit dem Zweihybrid-Screening

Es sind derzeit mindestens vier zelluläre Mechanismen bekannt, an denen hMLH1 beteiligt ist^{62,187}:

- MMR
- Immunglobulinbildung im Immunsystem
- Genetische Rekombination während der Meiose
- Zellzyklus Regulation

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich jeder der vier Kernfunktionen von hMLH1 Interaktionspartner zuordnen lassen, die durch das bakterielle Zweihybrid-System detektiert wurden. Wie bereits erwähnt, konnten viele Kandidatenproteine durch ein zeitgleiches TAP-Screening einer unabhängigen Forschungsgruppe bestätigt werden¹⁸⁶.

5.2.2.1 hMLH1 und MMR

Wie schon eingehend beschrieben, ist hMLH1 ein zentrales MMR Protein. Mit Hilfe des bakteriellen Zweihybrid-Systems konnte die Interaktion mit dem Mismatch Reparaturprotein

hPMS2 bestätigt werden, welches zusammen mit hMLH1 den heterodimeren Komplex MutL α bildet (siehe 1.3.2).

5.2.2.2 hMLH1 bei der Antikörperbildung

Insgesamt sind 7% der detektierten potentiellen hMLH1-Interaktionspartner den Immunglobulin-Proteinketten zuzuordnen (siehe 4.3.1). Ein Zusammenspiel von hMLH1 mit Proteinen des Immunsystems scheint nicht unwahrscheinlich, da bereits beschrieben wurde, dass hMLH1 und hMSH2 an der somatischen Hypermutation (SHM) beteiligt sind⁶³, die für die Aufrechterhaltung der Antikörpervielfalt verantwortlich ist (siehe 1.3.3).

Bei den Immunketten vom leichten Typ existieren zwei Unterformen : κ und λ .

Sie besitzen jeweils eine konstante (C) und eine variable (V) Domäne. Die variable Domäne ermöglicht die Bildung spezifischer Antikörper, die gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet sind. Die Variabilität wird durch SHM und somatische Genumlagerung (*rearrangement*) ermöglicht. Bei diesem Mechanismus werden V(*variable*)-Gene und C(*constant*)-Gene über J(*junction*)-Gene miteinander verknüpft und teilweise genetische Information aus dieser Kombination entfernt. Für die schweren Ketten existiert ein ähnlicher Mechanismus. An diesen Vorgängen scheinen MMR Proteine beteiligt zu sein, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig geklärt werden konnte⁶³. Aktuelle Modelle¹⁸⁸ gehen davon aus, dass bestimmte Enzyme wie z.B. die *activation-induced cytidine deaminase* gezielte DNA Läsionen in den variablen Regionen herbeiführen^{189,190}, die dann von verschiedenen DNA Reparatursystemen, u.a. der MMR, korrigiert werden¹⁹¹⁻¹⁹³. Im Gegensatz zur eigentlichen MMR werden die resezierten Strangabschnitte hier jedoch durch sogenannte *translesion DNA synthesis polymerases* aufgefüllt, die eine deutlich erhöhte Fehlerrate im Vergleich zu der, bei der eigentlichen MMR aktiven, DNA Polymerase δ aufweisen^{194,195}.

So entsteht nach diesem Modell in der variablen Domäne ein „hypermutierter“ Bereich, der bei Translation zu einer Vielzahl von Mutanten führt und so die notwendige Antikörpervielfalt gewährleistet. Für eine effektive SHM ist hMLH1 erforderlich^{192,196}, wobei seine genaue Funktion in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt werden konnte.

Hinsichtlich der in dieser Arbeit detektierten Interaktionspartner des Immunsystems bleibt zu diskutieren, wie eine Interaktion zwischen Immunglobulinketten und hMLH1 zu interpretieren wäre. Die bisher bekannten Interaktionen von hMLH1 mit Bestandteilen des Immunsystems beziehen sich auf die Immunketten-DNA und die Proteine der SHM (s.o.),

nicht jedoch auf die Immunketten-Proteine selbst. Durch nachfolgende Untersuchungen müßten die Interaktionen mit hMLH1 verifiziert werden und die genauen Interaktionsbereiche sollten eingegrenzt werden. Die Untersuchung der Lokalisation der interagierenden Proteine mittels konfokaler Laser- Mikroskopie könnte in diesem Zusammenhang sehr hilfreich sein.

Von den Ergebnissen des bakteriellen Zweihybrid-Screenings ausgehend könnte hMLH1 nicht nur an der SHM selbst, sondern auch an nachfolgenden Schritten bis hin zur Immunglobulinsynthese beteiligt sein.

5.2.2.3 hMLH1 in der Meiose

hMLH1 ist bei der Meiose an verschiedenen Vorgängen beteiligt ⁶⁴. So wurde beschrieben, dass es während der Meiose zur Bildung von Hetero-Duplex DNA kommen kann, welche zur Aktivierung der MMR führt (siehe 1.3.2). Dies kann beispielsweise auftreten, wenn Fehlpaarungen während der prämeiotischen Replikation entstehen. Der Korrektur-Mechanismus ist hierbei analog der bisher beschriebenen postreplikativen MMR ^{197,198}.

Zudem ist hMLH1 während der Meiose an der homologen Rekombination beteiligt.

Hierbei werden Teile von DNA-Strängen enzymatisch entfernt. Die entstandenen Einzelstrangabschnitte verbinden sich mit Strängen des homologen Chromosoms, so dass Heteroduplex-DNA Abschnitte entstehen. Sind die beiden heteroduplex-Stränge genetisch identisch, so bleiben sie unverändert. Gibt es jedoch genetische Abweichungen zwischen den beiden Chromatiden, z.B. durch Punktmutationen, so kommt es zu Fehlpaarungen, die dann durch die MMR korrigiert werden. Ob im Einzelfall die Mutation oder das Wildtyp-Gen übernommen wird, hängt nun davon ab, welchen Strang die MMR als Vorlage verwendet. So kann es zum Austausch von genetischer Information zwischen zwei homologen Chromatiden kommen, da kurzzeitig ein Strang des homologen Chromosoms als Vorlage bei der Resynthese einzelner Abschnitte verwendet wird. Die MMR hat hier eine Kontrollfunktion ^{197,198}.

Hinsichtlich des Prozesses der homologen Rekombination könnten DDX47 und NT5C3L eine Rolle spielen.

Da die oben beschriebene Einzelstrangbildung durch eine 5'-Resektion stattfindet, könnte NT5C3L hieran beteiligt sein, da es sich hierbei um eine 5'-Nukleotidase handelt. DDX47

könnte wiederum in seiner Funktion als Helikase an der Entwindung der DNA beteiligt sein, was für die Heteroduplex-Bildung zwischen homologen Strängen notwendig ist.

Auch in diesem Zusammenhang würde sich eine konfokale Laser-Mikroskopie im Anschluss an diese Arbeit anbieten. Hierdurch könnte man versuchen, die Kolokalisation von hMLH1 und DDX47 bzw. NT5C3L, in meiotischen Zellen bei gleichzeitiger Färbung der DNA, nachzuweisen.

Unter den, als hMLH1-Interaktionspartner detektierten Proteinen, sind in diesem Zusammenhang auch Proteine des Zytoskeletts zu erwähnen. Zytoskelettale Proteine, wie z.B. Aktin, sind für die Ausbildung des Spindelapparates notwendig^{199,200} und daher essentiell für die Meiose.

5.2.2.4 hMLH1 im Zusammenhang mit Zellzyklus und Apoptose

Eine Kernfunktion von MMR Enzymen neben der Reparatur von DNA Fehlern ist die Regulation von Zellzyklus und Wachstum. Über die Aktivierung von entsprechenden Kinasen können hMLH1 und hMSH2 (hMSH2: CHK2, hMLH1: ATM) den S-Phase Kontrollpunkt des Zellzyklus aktivieren. Dieser löst bei der Detektion von DNA Läsionen im Anschluss an die S-Phase einen Arrest während der G₂-Phase aus, der dazu dient, Schäden zu beheben^{65,201,202}.

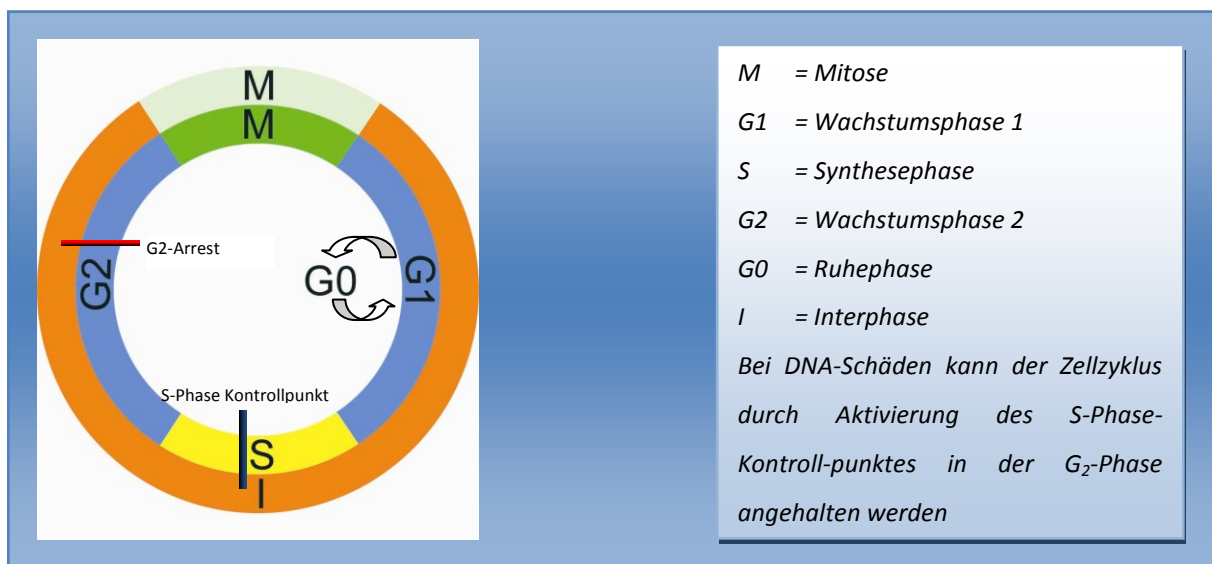


Abbildung 52: MMR und Zellzyklus Regulation

Ein Zusammenhang zwischen hMLH1 und der Apoptose^{21,62} wurde u.a. dadurch nachgewiesen, dass in Zellen, die in der Apoptose begriffen waren, die Expressionsrate von hMLH1 erhöht war²⁰³. Weitere Untersuchungen zeigten, dass hMLH1 defiziente Zellen eine

höhere Resistenz gegenüber DNA-Schäden aufweisen, die normalerweise zur Apoptose führen würden. So ist die Apoptoserate in diesen Zellen unter Anwendung von UVB Strahlung oder von alkylierenden Substanzen vermindert ²⁰⁴.

In MMR defizienten Zellen scheint eine erhöhte MSI in bestimmten proapoptotischen Zielgenen vorzuliegen, was zu einer gestörten Apoptose führen kann. Zu den für MSI anfälligen Genen gehört beispielsweise das BAX-Gen, welches eine Aktivatorrolle im Kaskadensystem der Caspasen einnimmt ²⁰⁵. Die Vernetzung der MMR mit dem Tumorsuppressor P53, der auch als Wächter des Genoms bezeichnet wird, besteht in der MutL α abhängigen Phosphorylierung von P53 an den Serinresten 15 und 392. Im Falle einer exzessiven DNA Schädigung wird bei MMR profizienten Zellen P53 aktiviert und leitet über die Interaktion mit BAX-Proteinen und Mitochondrien die Apoptose ein. Diese Aktivierung unterbleibt in MMR defizienten Zellen ²⁰⁶. Obwohl auch P53 unabhängige Apoptose-Stimulationsmechanismen beobachtet werden konnten, wurde bis jetzt keine direkte Interaktion von hMLH1 mit Protagonisten des apoptotischen Systems in der Literatur beschrieben ²⁰⁷.

Durch das in dieser Arbeit eingesetzte bakterielle Zweihybrid-System konnte eine Vielfalt von Proteinen nachgewiesen werden, die den Zusammenhang zwischen hMLH1 und Zellzyklus sowie Apoptose näher eingrenzen könnten. Insgesamt machen diese Proteine einen Anteil von 10% an der Gesamtzahl der identifizierten Interaktionspartner aus und sind im Folgenden aufgelistet (siehe [Tabelle 8](#)):

Tabelle 8: Detektierte Interaktionspartner aus den Bereichen Wachstumsregulation / Apoptose

Apoptose	Wachstumsregulation
Atmungskettenproteine	Annexin A6 (ANXA6)
Calpain 5 (CAPN5)	<i>Eukaryotic translation initiation/elongation factor 2A</i> (EIF2A/EEF2)
Cathepsin B (CTSB)	Lipid-Phosphat-Phosphatase 2 (LPP2)
<i>DEAD box polypeptide 47</i> (DDX47)	<i>N-myc downstream regulated</i> (NDRG1)
Desmin (DES)	<i>Protein tyrosine phosphatase IVA / receptor type H</i> (PTP4A2/PTPRH)
	<i>Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF-)-like 1</i> (RAPGEFL1)
	Ribosomale Proteine (RPS2,RPS5, RPS16)
	<i>Selenium binding protein 1</i> (SBP1)
	<i>Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit</i> (SPTLC2)
	<i>V-raf oncogene homolog</i> (ARAF1)

Unter den aufgeführten Proteinen sind SPTLC2, ARAF, RAPGEFL1, ANXA6, PTP4A, PTPRH, NDRG1 und LPP2 direkt oder indirekt an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt, die Wachstum und Differenzierung beeinflussen.

Im Einzelnen wirkt SPTLC2 im Haushalt der Sphingo- und Phospholipide regulatorisch und beeinflusst so indirekt deren Signalwege, die u.a. Funktion, Wachstum und Differenzierung der Zelle steuern (siehe 4.3.5.10).

ARAF ist ein Vertreter der Raf/Ras GTPase Familie, die eine zentrale Enzymklasse zur Regulation des Zellwachstums darstellt (siehe 4.3.5.12). RAPGEFL1 steuert die Hydrolyse von GDP aus dem allosterischen Zentrum von inaktiven GTPasen und ermöglicht so deren Aktivierung mit GTP (siehe 4.3.5.8). Auch ANXA6, das zusammen im Komplex mit p120GAP als Inhibitor der Raf/Ras GTPase Familie wirkt (siehe 4.3.5.3), beeinflusst das Wachstum einer Zelle.

PTP4A und PTPRH sind Tyrosinphosphatasen und deaktivieren durch Dephosphorylierung Enzyme der Tyrosinkinasefamilie. Letztere sind an der Signaltransduktion von extrazellulären Wachstumssignalen beteiligt.

NDRG1 wird, wie bereits beschrieben (siehe 4.3.5), eine zentrale regulatorische Funktion im Bezug auf Zellzyklus und Differenzierung zugeschrieben. Die Expression von NDRG1 ist in sich differenzierenden Zellen erhöht, während in der Wachstumsphase befindliche Zellen eine verminderte Expression aufweisen. Unter hypoxischen Bedingungen, in Tumorzellen und bei DNA-Schäden ist ebenfalls die Expressionsrate von NDRG1 erhöht. Bei Hypoxie geschieht dies unter anderem über *hypoxia inducible factor 1* (HIF α), bei DNA-Schäden über P53¹²¹. hMLH1 wird im Gegensatz zu NDRG1 bei Hypoxie vermindert exprimiert, was aber ebenfalls über HIF α vermittelt wird²⁰⁸. Diese gemeinsame Regulation über HIF α könnte bereits ein Hinweis auf eine funktionelle Verknüpfung von hMLH1 und NDRG1 sein. NDRG1 wird zusätzlich durch c-Myc und n-Myc inhibiert, die ihrerseits zellzyklusregulierend wirken¹²¹ und für die ebenfalls eine Interaktion mit hMLH1 nachgewiesen wurde²⁰⁹.

Auch für LPP2 konnte eine Beteiligung am Zellzyklus gezeigt werden, da eine erhöhte LPP2 Expression nach einigen Zellzyklen zu einem G₂-Arrest führt¹³⁴.

Neue Zusammenhänge zwischen hMLH1 und der Apoptose scheinen die lysosomalen Cysteinproteinasen CAPN5 und CTSB, die in ihrer Struktur und Funktion den Caspasen verwandt und gleichfalls den Endstreckenenzymen der Apoptose zuzuordnen sind,

darzustellen ¹⁰⁹. In Versuchen mit Cathepsin B Inhibitoren, bei denen keine externe Apoptose mehr ausgelöst werden konnte, wurde gezeigt, dass Cathepsine den Caspasen der apoptotischen Enzymkaskade nachgeschaltet sind ¹¹⁵. Eine Verifizierung der Zweihybrid-Ergebnisse wäre hierbei von großem Interesse, da in der Literatur bisher keine direkte Interaktion von hMLH1 und Apoptose-Endstreckenenzymen dokumentiert ist.

Auch die Interaktion mit Atmungskettenmolekülen könnte eine Verknüpfung von hMLH1 und Apoptose darstellen. Atmungskettenmoleküle sind maßgeblich an der Ausführung des programmierten Zelltodes beteiligt. Vor allem die Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran ist ein entscheidender Schritt in der Einleitung der Apoptose ²¹⁰.

Interessanterweise wurde auch für die bereits beschriebene ATP abhängige RNA Helikase DDX47 (siehe 5.2.2.3) eine mögliche Initiatorfunktion der Apoptose diskutiert, da mit DDX47 transformierte Zellen *in vitro* eine erhöhte Apoptoserate zeigten ¹¹⁹. Diese Tatsache macht die potentielle Interaktion von hMLH1 mit diesem Protein noch spannender, da hier eine direkte Verbindung zwischen Zellzyklus und Apoptose aufgezeigt werden könnte.

Zusammenfassend verdeutlichen die mittels Zweihybrid-System in dieser Arbeit neu detektierten Interaktionspartner von hMLH1, wie eng MMR, Zellzyklus und Apoptose miteinander verknüpft zu sein scheinen. Noch ist nicht bekannt, ob und welche Auswirkungen die Interaktionen dieser Proteine mit hMLH1 auf den Zellzyklus haben. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass sie bei der beschriebenen Einleitung des G₂-Arrests im Zellzyklus (siehe 1.3.3) eine essentielle Rolle spielen und diesen Prozess bei der Reparatur von DNA-Schäden regulieren.

5.2.3 Ribosomale Proteine

Die bereits angesprochenen Interaktionen mit Proteinen aus dem ribosomalen System könnten eine weitere Verknüpfung von hMLH1 mit dem Zellmetabolismus darstellen. Hierzu gehören z.B. RSP2, RSP5 und RSP16, die zur 40S Untereinheit gehören, sowie die Translationsfaktoren EEF2 und EIF2A. Letzterer ist einer der wichtigsten Initiatoren der Translation (siehe 4.3.7.2), RPS16 ist dabei an der Bindung von EIF2A an den Ribosomen beteiligt. Bei der Translationseinleitung wird die erste tRNA mit der Aminosäure Methionin zur 40S Untereinheit des Ribosoms transportiert und bindet dort RPS16. Erst dann ist eine Fusion von großer und kleiner Ribosomenuntereinheit möglich. Die Regulation dieses

Schrittes erfolgt durch Änderung des Phosphorylierungsstatus von EIF2A ¹⁰⁹. hMLH1 könnte hierbei, beispielsweise über die Steuerung der Aktivität von EIF2A, an der Regulation des Translationsapparates beteiligt sein. Da die Translation für die Zelle sehr energieaufwendig ist ²¹¹, besteht eine enge Verknüpfung zwischen Zellzyklus Regulation und ribosomaler Aktivität ²¹². Eine direkte Phosphorylaseaktivität von hMLH1 ist in der Literatur nicht beschrieben. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Phosphorylierung anderer Proteine wie z.B. der Zellzyklus Enzyme CHK1 und CHK2, von hMLH1 abhängig ist ²¹³.

Dennoch bleibt die Frage zu klären, ob tatsächlich physiologische Interaktionen von ribosomalen Proteinen mit hMLH1 bestehen, da ribosomale Proteine, wie bereits beschrieben, zu den *chaperones* zählen und somit häufig Interaktionen mit unspezifische Liganden eingehen (siehe 5.2.1). Im Zusammenhang mit den beschriebenen Einflüssen von hMLH1 auf den Zellzyklus erscheint eine solche physiologische Interaktion jedoch plausibel.

Da neben EIF2A noch weitere Proteine detektiert wurden, die Bestandteile des Ribosoms sind, stellt sich die Frage, welche genaue Funktion hMLH1 im ribosomalen Komplex einnimmt. Auch in diesem Zusammenhang könnte eine konfokale Laser-Mikroskopie Aufschluss geben, da man so auch einen Komplex bei paralleler Markierung der einzelnen Komponenten darstellen könnte.

5.2.4 Zytoskelettale Proteine

Die durch das *Bacteriomatch (II) Two – Hybrid System* neu detektierten Interaktionen mit Proteinen des Zytoskeletts sind mit den bekannten Kernfunktionen von hMLH1 (siehe 5.2.2) nicht direkt erklärbar.

Es wäre jedoch denkbar, dass sie an der Fixation und Lokomotion von hMLH1 innerhalb der Zelle verantwortlich sind. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden bisher jedoch nicht geklärt. Auch die Fragen, wie und warum hMLH1 vom Nukleus ins Zytoplasma wandert, bleiben weiterhin offen ^{179,183}. Wie bereits ausgeführt wurde, ist bisher nur bekannt, dass hMLH1 eine NLS für den Transport in den Kern besitzt, und sogar als Kofaktor für den Transport von anderen Proteinen fungiert ¹⁸². Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass MMR Proteine unter dem Einfluss von alkylierenden Substanzen verstärkt in den Zellkern transportiert werden ¹⁷⁹ (siehe 5.1.2). Der Export von hMLH1 ist bisher nicht untersucht.

Der potentielle hMLH1-Interaktionspartner ACTG1 scheint im Hinblick auf die postulierte Regulation der Lokalisation von besonderem Interesse. ACTG1 ist Bestandteil von Aktinfilamenten, die ein die Zelle durchspannendes Netzwerk erzeugen ²¹⁴. Durch die Interaktion von hMLH1 mit ACTG1 könnte hMLH1 bei intrazellulärer Bewegung an den Aktinfilamenten „entlangwandern“ (siehe 4.3.9.1). Auch die Interaktionen von hMLH1 mit den weiteren zytoskelettalen Proteinen (CUTA, DES, PARVA, SPTAN1 und SEC61A1) könnten durch diese Überlegungen erklärt werden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Interaktion von hMLH1 mit zytoskelettalen Proteinen könnte in der zusätzlichen Funktion von Proteinen des Zytoskeletts, auch an Wachstumsregulation und Apoptose beteiligt zu sein, liegen ²¹⁵. Beispielsweise wurde für ACTG1 und weitere Aktin-Proteine beschrieben, dass sie die Regulation der Genexpression durch Interaktion mit verantwortlichen Enzymen, wie z.B. der RNA Polymerase, beeinflussen (siehe 4.3.9.1). Auch DES, das an der Aktivierung der Caspase-Enzymkaskade beteiligt ist und somit so an der Einleitung der Apoptose mitwirkt ²¹⁶, kann in diesem Zusammenhang genannt werden.

Die Interaktionen dieser Proteine mit hMLH1 könnten im Zusammenhang mit der bereits beschriebenen Verknüpfung von MMR und Zellzyklus Regulation/Apoptose stehen.

5.2.5 Mitochondriale Proteine

Mitochondriale Proteine stellen mit 35% die größte Gruppe unter den, in dieser Arbeit durch das bakterielle Zweihybrid-System detektierten, Interaktionspartnern dar. Hierunter befinden sich einerseits Atmungskettenmoleküle, aber auch mitochondriale Proteine mit unbekannter Funktion. Eine Reparaturfunktion von hMLH1 innerhalb von Mitochondrien wäre in diesem Zusammenhang vorstellbar.

Diese These wird von der Beobachtung gestützt, dass Mitochondrien eine MMR Funktion besitzen ¹⁷⁸.

Nähere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die mitochondriale MMR unabhängig von den im Zellkern essentiellen MMR Proteinen, hMSH2 und hMLH1, unabhängig ist. Beide Proteine konnten nicht in humanen Mitochondrien nachgewiesen werden ²¹⁷.

Dementsprechend gibt es bislang wenige Anhaltspunkte, wie man die detektierten Interaktionen mit mitochondrialen Proteinen erklären könnte.

Denkbar wäre eine Interaktion von Atmungskettenmolekülen und hMLH1 im Hinblick auf die Beteiligung von hMLH1 an der Apoptose (siehe 5.2.2.4) innerhalb des Zytoplasmas und nicht in den Mitochondrien selbst.

Auch die Interaktion mit dem mitochondrialen Transportprotein SLC25A23 ließe sich hierdurch erklären. Dieser Transporter ist essentiell für die mitochondriale Funktion, und wird, wie die meisten mitochondrialen Proteine, im Zytoplasma gebildet¹¹⁶. Prinzipiell wäre es denkbar, dass die MMR im Zuge der beschriebenen Zellzyklus Regulation (siehe 1.3.3), z.B. unter zellulärem Stress, Einfluss auf Mitochondrienproteine im Zytoplasma nimmt und so den zellulären Energieumsatz reguliert. So könnte die Zelle, z.B. bei einem MMR-induzierten Zellzyklus-Stop, Energie sparen.

Um zu klären, ob die Interaktion von hMLH1 und SLC25A23 abhängig von zellulärem Stress ist, sollte eine Verifizierung der Zweihybrid-Daten deshalb, im Gegensatz zu den Versuchsanordnungen von de Souza-Pinto *et al.*, auch unter zellulärem Stress stattfinden.

Nach dem Nachweis der Kolo-kalisation von hMLH1 und SLC25A23, z.B. mittels konfokaler Laser-Mikroskopie, könnten Untersuchungen parallel mit hMLH1 profizienten und hMLH1 defizienten Zellen folgen, bei denen der Energiehaushalt, d.h. ATP Verbrauch der Zellen, verglichen wird.

5.3 Ausblicke

Wie bereits ausgeführt (siehe 5.2.1) müssen alle gewonnenen Daten des bakteriellen Zweihybrid-Screenings im Anschluss an diese Arbeit verifiziert werden. Hierfür kommen in erster Linie die Methodik der Koimmunopräzipitation (siehe 1.4.1.6) und die konfokale Laser-Mikroskopie (siehe 1.4.1.5) in Betracht.

Die Koimmunopräzipitation ermöglicht die Identifizierung größerer Proteinkomplexe, indem nach einer Präzipitation mehrere Proteine sichtbar gemacht werden können. Durch die konfokale Laser-Mikroskopie kann neben der eigentlichen Interaktion die subzelluläre Lokalisation der Proteine dargestellt werden.

Um das Zusammenspiel von hMLH1 mit Proteinen, die an Zellzyklus bzw. Apoptose beteiligt sind, näher zu untersuchen bietet sich außerdem eine FACS-Analyse an. Hiermit können anteilig apoptotische, nekrotische und proliferierende Zellen quantifiziert werden. Denkbar wäre es, die Expression einzelner, durch das Zweihybrid-Screening eingegrenzter Proteine durch RNA-Interferenz zu unterdrücken und den Einfluss von Chemotherapeutika auf diese

Diskussion

Zellen parallel zu unbehandelten Zellen zu untersuchen. Erkenntnisse auf dem Gebiet von MMR und Zellzyklus bzw. Apoptose könnten wegweisend für die weitere Entwicklung von Therapieansätzen für Patienten mit Lynch-Syndrom sein.

6 Zusammenfassung

Ein erblich bedingter Funktionsverlust der DNA Mismatch Reparatur (MMR) Proteine hMSH2 und hMLH1 führt zu genetischer Instabilität und frühzeitiger Ausbildung von Krebserkrankungen, insbesondere des Kolons und des Endometriums. Diese Erkrankung wird nach ihrem Erstbeschreiber als Lynch Syndrom oder im Falle eines kolorektalen Karzinoms auch als erbliches nichtpolypöses kolorektales Karzinom (*hereditary non polyposis colorectal cancer*, HNPCC) bezeichnet. Neben der DNA Reparatur sind MMR Proteine auch an weiteren regulatorischen Prozessen wie genetischer Rekombination, Antikörperbildung sowie Zellzyklus Regulation und Apoptose beteiligt. Aus onkologischer Sicht ist besonders der letzte Punkt von Interesse, da man davon ausgeht, dass MMR Proteine bei exzessiven DNA-Schäden den Zellzyklus anhalten und entweder die DNA reparieren oder die Apoptose einleiten. Dies ist von klinischer Bedeutung, da viele Chemotherapeutika künstliche DNA-Läsionen hervorrufen, die in MMR defizienten Zellen weder zu einem Zellzyklus Stop noch zur Apoptose führen, so dass die Wirksamkeit bestimmter Substanzen vermindert ist.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorgelegten Dissertation ein Screening zur Identifikation von Interaktionspartnern von hMLH1 durchgeführt. hMLH1 ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, über Interaktionspartner im Zytoplasma ist bisher wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues bakterielles Zweihybrid-System etabliert. In diesem System besitzen die Wirtszellen keinen Zellkern, so dass die detektierten Interaktionen unabhängig von der intrazellulären Lokalisation stattfinden. Die Klone einer cDNA-Datenbank wurden mit hMLH1 in Bakterienzellen koexprimiert und die Interaktionen durch positives Zellwachstum auf Minimalnährböden angezeigt. Die positiven Klone wurden anschließend sequenziert und die Sequenz mit Hilfe der BLAST-Funktion mit der PubMed Online-Datenbank abgeglichen. Insgesamt wurden 108 bisher unbekannte Interaktionspartner von hMLH1 detektiert. Von diesen konnten zahlreiche Proteine den bekannten Funktionen der MMR zugeordnet werden. Von besonderem Interesse sind einige Interaktionspartner aus den Bereichen Zellzyklus Regulation (ANXA6, LPP2, NDRG1, PTP4A2/RH, RAPGEFL1, SPTLC2 und ARAF1), Apoptose (CTSB, CAPN5, DDX47, DES und Atmungskettenproteine) und ribosomale Proteine (EIF2A, EEF2, RPS2, RPS5 und RPS16).

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche dieser Interaktionspartner sich möglicherweise als prognostische bzw. prädiktive Biomarker nutzen lassen. Weiterhin könnten sich durch fundierte Kenntnis der Interaktion von MMR und Zellzyklus Regulation bzw. Apoptose neue Ansatzpunkte bei der Entwicklung zukünftiger therapeutischer Substanzen ergeben.

Summary

Hereditary functional impairment of the DNA Mismatch Repair (MMR) proteins hMSH2 and hMLH1 lead to genetic instability and early onset of various malignancies, especially of colon and endometrium. This hereditary cancer syndrome has been firstly described by H.T. Lynch and is thereby called "Lynch Syndrome" or in case of colon carcinoma "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)". Additionally to DNA repair, MMR proteins have been shown to be involved in other critical cellular processes such as genetic recombination, antibody generation, cell-cycle regulation and apoptosis. Especially those last two functions are of vital interest in the field of oncology, as MMR proteins are supposed to be key players in the recognition of DNA lesions and the initiation of cell-cycle arrest and/or apoptosis in case of excessive DNA damage. As many chemotherapeutic agents are causing artificial DNA lesions, which cannot initiate cell-cycle arrest in MMR deficient cells, this is of vital clinical importance.

As hMLH1 is mostly located in the cellular nucleus, lots of information has been gathered about nuclear functions and interaction partners, though there is little known about functions of hMLH1 in the cytoplasm. Therefore, this screening for undiscovered interaction partners of hMLH1 has been performed by a new established bacterial two-hybrid-system. Here, host cells are prokaryotes and potential interaction partners can thereby interact quite independent of their original cellular compartment. The clones of a normal-colon tissue databank were coexpressed with hMLH1 in bacterial host cells and their interaction has been visualized by growth on minimal plates with different selection markers. Positive clones were sequenced and the encoded proteins identified by the PubMed BLAST online tool.

108 clones have been identified as new interaction partners of hMLH1 and most of them could be attributed two known functions of hMLH1.

Zusammenfassung

Here, proteins involved in cell-cycle control (ANXA6, LPP2, NDRG1, PTP4A2/RH, RAPGEFL1, SPTLC2 and ARAF1), apoptosis (CTSB, CAPN5, DDX47, DES and mitochondrial proteins) and ribosomal proteins (EIF2A, EEF2, RPS2, RPS5 und RPS16) are of special interest.

Further experiments must show, which of these newly identified interaction partners of hMLH1 can possibly be used as future prognostical or predictive biomarkers.

Additionally, new insights into the interaction mechanisms of MMR and cell-cycle/apoptosis could lead to new pharmacological approaches in the future.

7 Literaturverzeichnis

1. Friedberg, E.C. DNA damage and repair. *Nature* **421**, 436-440 (2003).
2. Jass, J.R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* **50**, 113-130 (2007).
3. Warthin, A.S. Heredity with reference to carcinoma: as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Archives of Internal Medicine* **XII**, 546-555 (1913).
4. Lynch, H.T., *et al.* Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). I. Clinical description of resource. *Cancer* **56**, 934-938 (1985).
5. Lynch, H.T. Familial cancer prevalence spanning eight years. Family N. *Arch Intern Med* **134**, 931-938 (1974).
6. Peltomaki, P., *et al.* Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* **260**, 810-812 (1993).
7. Lindblom, A., Tannergard, P., Werelius, B. & Nordenskjold, M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* **5**, 279-282 (1993).
8. Leach, F.S., *et al.* Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **75**, 1215-1225 (1993).
9. Watson, P. & Lynch, H.T. The tumor spectrum in HNPCC. *Anticancer Res* **14**, 1635-1639 (1994).
10. Lynch, H.T., Lynch, P.M., Pester, J. & Fusaro, R.M. The cancer family syndrome. Rare cutaneous phenotypic linkage of Torre's syndrome. *Arch Intern Med* **141**, 607-611 (1981).
11. Peltomaki, P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer* **4**, 227-232 (2005).
12. Rustgi, A.K. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev* **21**, 2525-2538 (2007).
13. Peltomaki, P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* **21**, 1174-1179 (2003).
14. Vogelstein, B., *et al.* Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* **244**, 207-211 (1989).
15. Jass, J.R. & Smith, M. Sialic acid and epithelial differentiation in colorectal polyps and cancer--a morphological, mucin and lectin histochemical study. *Pathology* **24**, 233-242 (1992).
16. Tateyama, H., *et al.* Apoptosis index and apoptosis-related antigen expression in serrated adenoma of the colorectum: the saw-toothed structure may be related to inhibition of apoptosis. *The American journal of surgical pathology* **26**, 249-256 (2002).
17. Jass, J.R., Whitehall, V.L., Young, J. & Leggett, B.A. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* **123**, 862-876 (2002).
18. Kambara, T., *et al.* BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* **53**, 1137-1144 (2004).
19. Toyota, M., *et al.* CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8681-8686 (1999).
20. Makinen, M.J. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology* **50**, 131-150 (2007).

21. Kunkel, T.A. & Erie, D.A. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* **74**, 681-710 (2005).
22. Kaufmann, W.K. Pathways of human cell post-replication repair. *Carcinogenesis* **10**, 1-11 (1989).
23. Levinson, G. & Gutman, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* **4**, 203-221 (1987).
24. Lynch, H.T. & de la Chapelle, A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* **348**, 919-932 (2003).
25. Boland, C.R., *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**, 5248-5257 (1998).
26. Glickman, B.W. & Radman, M. Escherichia coli mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1063-1067 (1980).
27. Palombo, F., *et al.* GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* **268**, 1912-1914 (1995).
28. Drummond, J.T., Li, G.M., Longley, M.J. & Modrich, P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* **268**, 1909-1912 (1995).
29. Acharya, S., *et al.* hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13629-13634 (1996).
30. Palombo, F., *et al.* hMutSbeta, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol* **6**, 1181-1184 (1996).
31. Prolla, T.A., *et al.* Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. *Nat Genet* **18**, 276-279 (1998).
32. Genschel, J. & Modrich, P. Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Mol Cell* **12**, 1077-1086 (2003).
33. Raschle, M., Marra, G., Nystrom-Lahti, M., Schar, P. & Jiricny, J. Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J Biol Chem* **274**, 32368-32375 (1999).
34. Chen, P.C., *et al.* Contributions by MutL homologues Mlh3 and Pms2 to DNA mismatch repair and tumor suppression in the mouse. *Cancer Res* **65**, 8662-8670 (2005).
35. Cannavo, E., *et al.* Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Res* **65**, 10759-10766 (2005).
36. Lipkin, S.M., *et al.* Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet* **31**, 385-390 (2002).
37. Malkov, V.A., Sastry, L. & Camerini-Otero, R.D. RecA protein assisted selection reveals a low fidelity of recognition of homology in a duplex DNA by an oligonucleotide. *J Mol Biol* **271**, 168-177 (1997).
38. Dufner, P., Marra, G., Raschle, M. & Jiricny, J. Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutSalpha is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit. *J Biol Chem* **275**, 36550-36555 (2000).
39. Sixma, T.K. DNA mismatch repair: MutS structures bound to mismatches. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 47-52 (2001).
40. Blackwell, L.J., Bjornson, K.P. & Modrich, P. DNA-dependent activation of the hMutSalpha ATPase. *J Biol Chem* **273**, 32049-32054 (1998).

41. Gradia, S., Acharya, S. & Fishel, R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* **91**, 995-1005 (1997).
42. Mendillo, M.L., Mazur, D.J. & Kolodner, R.D. Analysis of the interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 complexes with DNA using a reversible DNA end-blocking system. *J Biol Chem* **280**, 22245-22257 (2005).
43. Wang, H. & Hays, J.B. Mismatch repair in human nuclear extracts: effects of internal DNA-hairpin structures between mismatches and excision-initiation nicks on mismatch correction and mismatch-provoked excision. *J Biol Chem* **278**, 28686-28693 (2003).
44. Wang, H. & Hays, J.B. Signaling from DNA mispairs to mismatch-repair excision sites despite intervening blockades. *EMBO J* **23**, 2126-2133 (2004).
45. Dutta, R. & Inouye, M. GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem Sci* **25**, 24-28 (2000).
46. Blackwell, L.J., Bjornson, K.P., Allen, D.J. & Modrich, P. Distinct MutS DNA-binding modes that are differentially modulated by ATP binding and hydrolysis. *J Biol Chem* **276**, 34339-34347 (2001).
47. Raschle, M., Dufner, P., Marra, G. & Jiricny, J. Mutations within the hMLH1 and hPMS2 subunits of the human MutLalpha mismatch repair factor affect its ATPase activity, but not its ability to interact with hMutSalpha. *J Biol Chem* **277**, 21810-21820 (2002).
48. Plotz, G., Raedle, J., Brieger, A., Trojan, J. & Zeuzem, S. hMutSalpha forms an ATP-dependent complex with hMutLalpha and hMutLbeta on DNA. *Nucleic Acids Res* **30**, 711-718 (2002).
49. Umar, A., *et al.* Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* **87**, 65-73 (1996).
50. Kleczkowska, H.E., Marra, G., Lettieri, T. & Jiricny, J. hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. *Genes Dev* **15**, 724-736 (2001).
51. Genschel, J., Bazemore, L.R. & Modrich, P. Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. *J Biol Chem* **277**, 13302-13311 (2002).
52. Tran, P.T., Erdeniz, N., Symington, L.S. & Liskay, R.M. EXO1-A multi-tasking eukaryotic nuclease. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1549-1559 (2004).
53. Lin, Y.L., *et al.* The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. *J Biol Chem* **273**, 1453-1461 (1998).
54. Ramilo, C., *et al.* Partial reconstitution of human DNA mismatch repair in vitro: characterization of the role of human replication protein A. *Mol Cell Biol* **22**, 2037-2046 (2002).
55. Yuan, F., Gu, L., Guo, S., Wang, C. & Li, G.M. Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair. *J Biol Chem* **279**, 20935-20940 (2004).
56. Longley, M.J., Pierce, A.J. & Modrich, P. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem* **272**, 10917-10921 (1997).
57. Zhang, Y., *et al.* Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. *Cell* **122**, 693-705 (2005).

58. Constantin, N., Dzantiev, L., Kadyrov, F.A. & Modrich, P. Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction. *J Biol Chem* **280**, 39752-39761 (2005).
59. Gradia, S., *et al.* hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol Cell* **3**, 255-261 (1999).
60. Martik, D., Baitinger, C. & Modrich, P. Differential specificities and simultaneous occupancy of human MutS α nucleotide binding sites. *J Biol Chem* **279**, 28402-28410 (2004).
61. Plotz, G., Piiper, A., Wormek, M., Zeuzem, S. & Raedle, J. Analysis of the human MutL α .MutS α complex. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 852-859 (2006).
62. Jiricny, J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 335-346 (2006).
63. Schrader, C.E., Edelman, W., Kucherlapati, R. & Stavnezer, J. Reduced isotype switching in splenic B cells from mice deficient in mismatch repair enzymes. *J Exp Med* **190**, 323-330 (1999).
64. Baker, S.M., *et al.* Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet* **13**, 336-342 (1996).
65. Brown, K.D., *et al.* The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. *Nat Genet* **33**, 80-84 (2003).
66. Berggard, T., Linse, S. & James, P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* **7**, 2833-2842 (2007).
67. Lee, J.W. & Lee, S.K. Mammalian two-hybrid assay for detecting protein-protein interactions in vivo. *Methods Mol Biol* **261**, 327-336 (2004).
68. Bray, D. & Lay, S. Computer-based analysis of the binding steps in protein complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13493-13498 (1997).
69. Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. & Cottrell, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567 (1999).
70. Gingras, A.C., Aebersold, R. & Raught, B. Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. *J Physiol* **563**, 11-21 (2005).
71. Farazi, T.A., Waksman, G. & Gordon, J.I. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* **276**, 39501-39504 (2001).
72. Puig, O., *et al.* The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218-229 (2001).
73. Rigaut, G., *et al.* A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-1032 (1999).
74. Bauch, A. & Superti-Furga, G. Charting protein complexes, signaling pathways, and networks in the immune system. *Immunol Rev* **210**, 187-207 (2006).
75. Burckstummer, T., *et al.* An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat Methods* **3**, 1013-1019 (2006).
76. Ong, S.E., *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**, 376-386 (2002).
77. Blagoev, B. & Mann, M. Quantitative proteomics to study mitogen-activated protein kinases. *Methods* **40**, 243-250 (2006).
78. Mann, M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 952-958 (2006).

79. Melcher, K. New chemical crosslinking methods for the identification of transient protein-protein interactions with multiprotein complexes. *Curr Protein Pept Sci* **5**, 287-296 (2004).
80. Masters, S.C. Co-immunoprecipitation from transfected cells. *Methods Mol Biol* **261**, 337-350 (2004).
81. Fields, S. & Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246 (1989).
82. Adhya, S. & Garges, S. Positive control. *J Biol Chem* **265**, 10797-10800 (1990).
83. Straney, S.B. & Crothers, D.M. Lac repressor is a transient gene-activating protein. *Cell* **51**, 699-707 (1987).
84. Lee, J. & Goldfarb, A. lac repressor acts by modifying the initial transcribing complex so that it cannot leave the promoter. *Cell* **66**, 793-798 (1991).
85. Helmann, J.D. & Chamberlin, M.J. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**, 839-872 (1988).
86. Ishihama, A. Subunit of assembly of Escherichia coli RNA polymerase. *Adv Biophys* **14**, 1-35 (1981).
87. Geiduschek, E.P. & Tocchini-Valentini, G.P. Transcription by RNA polymerase III. *Annu Rev Biochem* **57**, 873-914 (1988).
88. Rowland, G.C., Giffard, P.M. & Booth, I.R. phs Locus of Escherichia coli, a mutation causing pleiotropic lesions in metabolism, is an rpoA allele. *J Bacteriol* **164**, 972-975 (1985).
89. Riftina, F., DeFalco, E. & Krakow, J.S. Effects of an anti-alpha monoclonal antibody on interaction of Escherichia coli RNA polymerase with lac promoters. *Biochemistry* **29**, 4440-4446 (1990).
90. Venezia, N.D. & Krakow, J.S. Effects of anti-alpha monoclonal antibodies on initiation and elongation by the Escherichia coli RNA polymerase. *J Biol Chem* **265**, 8122-8126 (1990).
91. Igarashi, K., *et al.* Functional map of the alpha subunit of Escherichia coli RNA polymerase: two modes of transcription activation by positive factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8958-8962 (1991).
92. Celenza, J.L. & Carlson, M. Mutational analysis of the Saccharomyces cerevisiae SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol Cell Biol* **9**, 5034-5044 (1989).
93. Fashena, S.J., Serebriiskii, I. & Golemis, E.A. The continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: how to outwit different preys with different baits. *Gene* **250**, 1-14 (2000).
94. Hu, J.C., Kornacker, M.G. & Hochschild, A. Escherichia coli one- and two-hybrid systems for the analysis and identification of protein-protein interactions. *Methods* **20**, 80-94 (2000).
95. Maniatis, T. & Ptashne, M. Structure of the lambda operators. *Nature* **246**, 133-136 (1973).
96. Ptashne, M., Johnson, A.D. & Pabo, C.O. A genetic switch in a bacterial virus. *Sci Am* **247**, 128-130, 132, 134-140 (1982).
97. Pabo, C.O., Sauer, R.T., Sturtevant, J.M. & Ptashne, M. The lambda repressor contains two domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1608-1612 (1979).
98. Johnson, A.D., Meyer, B.J. & Ptashne, M. Interactions between DNA-bound repressors govern regulation by the lambda phage repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5061-5065 (1979).

99. Meyer, B.J., Maurer, R. & Ptashne, M. Gene regulation at the right operator (OR) of bacteriophage lambda. II. OR1, OR2, and OR3: their roles in mediating the effects of repressor and cro. *J Mol Biol* **139**, 163-194 (1980).
100. Li, M., Moyle, H. & Susskind, M.M. Target of the transcriptional activation function of phage lambda cl protein. *Science* **263**, 75-77 (1994).
101. Kuldell, N. & Hochschild, A. Amino acid substitutions in the -35 recognition motif of sigma 70 that result in defects in phage lambda repressor-stimulated transcription. *J Bacteriol* **176**, 2991-2998 (1994).
102. Hochschild, A., Irwin, N. & Ptashne, M. Repressor structure and the mechanism of positive control. *Cell* **32**, 319-325 (1983).
103. Guarente, L., Nye, J.S., Hochschild, A. & Ptashne, M. Mutant lambda phage repressor with a specific defect in its positive control function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2236-2239 (1982).
104. Bushman, F.D., Shang, C. & Ptashne, M. A single glutamic acid residue plays a key role in the transcriptional activation function of lambda repressor. *Cell* **58**, 1163-1171 (1989).
105. Dove, S.L., Joung, J.K. & Hochschild, A. Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* **386**, 627-630 (1997).
106. Dove, S.L. & Hochschild, A. Conversion of the omega subunit of Escherichia coli RNA polymerase into a transcriptional activator or an activation target. *Genes Dev* **12**, 745-754 (1998).
107. Joung, J.K., Ramm, E.I. & Pabo, C.O. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7382-7387 (2000).
108. Brennan, M.B. & Struhl, K. Mechanisms of increasing expression of a yeast gene in Escherichia coli. *J Mol Biol* **136**, 333-338 (1980).
109. Löffler & Petrides. *Lehrbuch: Biochemie und Pathobiochemie*, (Springer Verlag, 2007).
110. Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**, 683-765 (2001).
111. Blumberg, H., et al. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* **104**, 9-19 (2001).
112. Tagawa, K., Maruyama, K. & Ishiura, S. Amyloid beta/A4 precursor protein (APP) processing in lysosomes. *Ann N Y Acad Sci* **674**, 129-137 (1992).
113. Penna, I., Du, H., Ferriani, R. & Taylor, H.S. Calpain5 expression is decreased in endometriosis and regulated by HOXA10 in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* **14**, 613-618 (2008).
114. Johnson, D.E. Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* **14**, 1695-1703 (2000).
115. Foghsgaard, L., et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* **153**, 999-1010 (2001).
116. Bassi, M.T., et al. Cellular expression and alternative splicing of SLC25A23, a member of the mitochondrial Ca²⁺-dependent solute carrier gene family. *Gene* **345**, 173-182 (2005).
117. Boland, C.R., Koi, M., Chang, D.K. & Carethers, J.M. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* **7**, 41-52 (2008).

118. Ruiz, A., Hurtado, C., Meireles Ribeiro, J., Sillero, A. & Gunther Sillero, M.A. Hydrolysis of bis(5'-nucleosidyl) polyphosphates by *Escherichia coli* 5'-nucleotidase. *J Bacteriol* **171**, 6703-6709 (1989).
119. Lee, J.H., Rho, S.B. & Chun, T. GABAA receptor-associated protein (GABARAP) induces apoptosis by interacting with DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 47 (DDX 47). *Biotechnol Lett* **27**, 623-628 (2005).
120. Jankowsky, E. & Jankowsky, A. The DExH/D protein family database. *Nucleic Acids Res* **28**, 333-334 (2000).
121. Ellen, T.P., Ke, Q., Zhang, P. & Costa, M. NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis* **29**, 2-8 (2008).
122. Kurdistani, S.K., *et al.* Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage. *Cancer Res* **58**, 4439-4444 (1998).
123. Salnikow, K., *et al.* The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia. *Mol Cell Biol* **22**, 1734-1741 (2002).
124. Stein, S., *et al.* NDRG1 is necessary for p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 48930-48940 (2004).
125. Shimono, A., Okuda, T. & Kondoh, H. N-myc-dependent repression of *ndr1*, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. *Mech Dev* **83**, 39-52 (1999).
126. Kalaydjieva, L., *et al.* N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am J Hum Genet* **67**, 47-58 (2000).
127. Ulmasov, B., Bruno, J., Woost, P.G. & Edwards, J.C. Tissue and subcellular distribution of CLIC1. *BMC Cell Biol* **8**, 8 (2007).
128. Gerke, V. & Moss, S.E. Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1357**, 129-154 (1997).
129. Gerke, V. & Moss, S.E. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* **82**, 331-371 (2002).
130. Golczak, M., Kirilenko, A., Bandorowicz-Pikula, J., Desbat, B. & Pikula, S. Structure of human annexin a6 at the air-water interface and in a membrane-bound state. *Biophys J* **87**, 1215-1226 (2004).
131. Ali, S.M., Geisow, M.J. & Burgoyne, R.D. A role for calpactin in calcium-dependent exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Nature* **340**, 313-315 (1989).
132. Grewal, T., *et al.* Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120GAP to modulate Ras and Raf-1 activity. *Oncogene* **24**, 5809-5820 (2005).
133. Matute, J.D., Arias, A.A., Dinauer, M.C. & Patino, P.J. p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells Mol Dis* **35**, 291-302 (2005).
134. Morris, K.E., Schang, L.M. & Brindley, D.N. Lipid phosphate phosphatase-2 activity regulates S-phase entry of the cell cycle in Rat2 fibroblasts. *J Biol Chem* **281**, 9297-9306 (2006).
135. Mao, C., *et al.* Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J Biol Chem* **276**, 26577-26588 (2001).
136. Werner, S.R., *et al.* Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21(Cip1/Waf1) by PRL tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* **202**, 201-211 (2003).

137. Gao, X., *et al.* Identification and characterization of RA-GEF-2, a Rap guanine nucleotide exchange factor that serves as a downstream target of M-Ras. *J Biol Chem* **276**, 42219-42225 (2001).
138. Yang, M. & Sytkowski, A.J. Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells. *Cancer Res* **58**, 3150-3153 (1998).
139. Jamba, L., Nehru, B. & Bansal, M.P. Redox modulation of selenium binding proteins by cadmium exposures in mice. *Mol Cell Biochem* **177**, 169-175 (1997).
140. Ishii, Y., Hatsumura, M., Ishida, T., Ariyoshi, N. & Oguri, K. Significant induction of a 54-kDa protein in rat liver with homologous alignment to mouse selenium binding protein by a coplanar polychlorinated biphenyl, 3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl and 3-methylcholanthrene. *Toxicol Lett* **87**, 1-9 (1996).
141. Kim, H., *et al.* Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival. *Proteomics* **6**, 3466-3476 (2006).
142. Cuvillier, O. Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim Biophys Acta* **1585**, 153-162 (2002).
143. Sabine, J.R. Defective control of lipid biosynthesis in cancerous and precancerous liver. *Prog Biochem Pharmacol* **10**, 269-307 (1975).
144. Williams, R.D., Nixon, D.W. & Merrill, A.H., Jr. Comparison of serine palmitoyltransferase in Morris hepatoma 7777 and rat liver. *Cancer Res* **44**, 1918-1923 (1984).
145. Carton, J.M., *et al.* Enhanced serine palmitoyltransferase expression in proliferating fibroblasts, transformed cell lines, and human tumors. *J Histochem Cytochem* **51**, 715-726 (2003).
146. Albi, E. & Magni, M.P. Chromatin neutral sphingomyelinase and its role in hepatic regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 29-33 (1997).
147. Gettins, P.G., Simonovic, M. & Volz, K. Pigment epithelium-derived factor (PEDF), a serpin with potent anti-angiogenic and neurite outgrowth-promoting properties. *Biol Chem* **383**, 1677-1682 (2002).
148. Kojima, T., Nakahama, K., Yamamoto, K., Uematsu, H. & Morita, I. Age- and cell cycle-dependent changes in EPC-1/PEDF promoter activity in human diploid fibroblast-like (HDF) cells. *Mol Cell Biochem* **293**, 63-69 (2006).
149. Hagemann, C. & Rapp, U.R. Isozyme-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* **253**, 34-46 (1999).
150. Fransen, K., *et al.* Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* **25**, 527-533 (2004).
151. Yang, Y.S., *et al.* NonO, a non-POU-domain-containing, octamer-binding protein, is the mammalian homolog of Drosophila nonAdiss. *Mol Cell Biol* **13**, 5593-5603 (1993).
152. Allison, A.C., Hovi, T., Watts, R.W. & Webster, A.D. The role of de novo purine synthesis in lymphocyte transformation. *Ciba Found Symp*, 207-224 (1977).
153. Yoon, C.Y., *et al.* Renal cell carcinoma does not express argininosuccinate synthetase and is highly sensitive to arginine deprivation via arginine deiminase. *Int J Cancer* **120**, 897-905 (2007).
154. Matragkou, C.N., *et al.* The potential role of ribosomal protein S5 on cell cycle arrest and initiation of murine erythroleukemia cell differentiation. *J Cell Biochem* **104**, 1477-1490 (2008).

155. Antoine, M., *et al.* Fibroblast growth factor 3, a protein with a dual subcellular fate, is interacting with human ribosomal protein S2. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1248-1255 (2005).
156. Koga, M., *et al.* Identification of ribosomal proteins S2 and L10a as tumor antigens recognized by HLA-A26-restricted CTL. *Tissue Antigens* **61**, 136-145 (2003).
157. Scheuner, D., *et al.* Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **281**, 21458-21468 (2006).
158. Sarre, T.F. The phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2: a principle of translational control in mammalian cells. *Biosystems* **22**, 311-325 (1989).
159. Elo, M.A., *et al.* High hydrostatic pressure inhibits the biosynthesis of eukaryotic elongation factor-2. *J Cell Biochem* **94**, 497-507 (2005).
160. Yin, X., Fontoura, B.M., Morimoto, T. & Carroll, R.B. Cytoplasmic complex of p53 and eEF2. *J Cell Physiol* **196**, 474-482 (2003).
161. Hurley, J.H., Lee, S. & Prag, G. Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* **399**, 361-372 (2006).
162. Seibenhener, M.L., Geetha, T. & Wooten, M.W. Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett* **581**, 175-179 (2007).
163. Scheer, U., Hinssen, H., Franke, W.W. & Jockusch, B.M. Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. *Cell* **39**, 111-122 (1984).
164. Egly, J.M., Miyamoto, N.G., Moncollin, V. & Chambon, P. Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? *Embo J* **3**, 2363-2371 (1984).
165. Obrdlik, A., Kukalev, A. & Percipalle, P. The function of actin in gene transcription. *Histol Histopathol* **22**, 1051-1055 (2007).
166. Perrier, A.L., *et al.* Two distinct proteins are associated with tetrameric acetylcholinesterase on the cell surface. *J Biol Chem* **275**, 34260-34265 (2000).
167. Navaratnam, D.S., *et al.* Hydrophobic protein that copurifies with human brain acetylcholinesterase: amino acid sequence, genomic organization, and chromosomal localization. *J Neurochem* **74**, 2146-2153 (2000).
168. Capetanaki, Y. & Milner, D.J. Desmin cytoskeleton in muscle integrity and function. *Subcell Biochem* **31**, 463-495 (1998).
169. Nikolopoulos, S.N. & Turner, C.E. Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J Cell Biol* **151**, 1435-1448 (2000).
170. Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y. & Wu, C. Distinct roles of two structurally closely related focal adhesion proteins, alpha-parvins and beta-parvins, in regulation of cell morphology and survival. *J Biol Chem* **279**, 41695-41705 (2004).
171. Bignone, P.A. & Baines, A.J. Spectrin alpha II and beta II isoforms interact with high affinity at the tetramerization site. *Biochem J* **374**, 613-624 (2003).
172. Gorlich, D. & Rapoport, T.A. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **75**, 615-630 (1993).
173. Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E. & Rapoport, T.A. Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein

- transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**, 25-35 (1996).
174. Stockton, J.D., Merkert, M.C. & Kellaris, K.V. A complex of chaperones and disulfide isomerases occludes the cytosolic face of the translocation protein Sec61p and affects translocation of the prion protein. *Biochemistry* **42**, 12821-12834 (2003).
 175. Shapland, C., Hsuan, J.J., Totty, N.F. & Lawson, D. Purification and properties of transgelin: a transformation and shape change sensitive actin-gelling protein. *J Cell Biol* **121**, 1065-1073 (1993).
 176. Fu, Y., *et al.* Mutagenesis analysis of human SM22: characterization of actin binding. *J Appl Physiol* **89**, 1985-1990 (2000).
 177. Christmann, M., Tomicic, M.T. & Kaina, B. Phosphorylation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 affecting MutSalpha mismatch-binding activity. *Nucleic Acids Res* **30**, 1959-1966 (2002).
 178. Mason, P.A., Matheson, E.C., Hall, A.G. & Lightowlers, R.N. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res* **31**, 1052-1058 (2003).
 179. Christmann, M. & Kaina, B. Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents. *J Biol Chem* **275**, 36256-36262 (2000).
 180. Belloni, M., *et al.* Distribution and kainate-mediated induction of the DNA mismatch repair protein MSH2 in rat brain. *Neuroscience* **94**, 1323-1331 (1999).
 181. Brieger, A., *et al.* Characterization of the nuclear import of human MutLalpha. *Mol Carcinog* **43**, 51-58 (2005).
 182. Brieger, A., Plotz, G., Zeuzem, S. & Trojan, J. Thymosin beta 4 expression and nuclear transport are regulated by hMLH1. *Biochem Biophys Res Commun* **364**, 731-736 (2007).
 183. Li, L.S., Morales, J.C., Hwang, A., Wagner, M.W. & Boothman, D.A. DNA mismatch repair-dependent activation of c-Abl/p73alpha/GADD45alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **283**, 21394-21403 (2008).
 184. Toby, G.G. & Golemis, E.A. Using the yeast interaction trap and other two-hybrid-based approaches to study protein-protein interactions. *Methods* **24**, 201-217 (2001).
 185. Serebriiskii, I., Estojak, J., Berman, M. & Golemis, E.A. Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *BioTechniques* **28**, 328-330, 332-326 (2000).
 186. Cannavo, E., Gerrits, B., Marra, G., Schlapbach, R. & Jiricny, J. Characterization of the interactome of the human MutL homologues MLH1, PMS1, and PMS2. *J Biol Chem* **282**, 2976-2986 (2007).
 187. Plotz, G., Zeuzem, S. & Raedle, J. DNA mismatch repair and Lynch syndrome. *J Mol Histol* **37**, 271-283 (2006).
 188. Casali, P., Pal, Z., Xu, Z. & Zan, H. DNA repair in antibody somatic hypermutation. *Trends in immunology* **27**, 313-321 (2006).
 189. Muramatsu, M., *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-563 (2000).
 190. Muramatsu, M. & Honjo, T. Complex layers of genetic alteration in the generation of antibody diversity. *Trends in immunology* **22**, 66-68 (2001).

191. Li, Z., Woo, C.J., Iglesias-Ussel, M.D., Ronai, D. & Scharff, M.D. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev* **18**, 1-11 (2004).
192. Martin, A. & Scharff, M.D. AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nature reviews* **2**, 605-614 (2002).
193. Rada, C., Di Noia, J.M. & Neuberger, M.S. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell* **16**, 163-171 (2004).
194. Zan, H., *et al.* The translesion DNA polymerase theta plays a dominant role in immunoglobulin gene somatic hypermutation. *Embo J* **24**, 3757-3769 (2005).
195. Diaz, M. & Lawrence, C. An update on the role of translesion synthesis DNA polymerases in Ig hypermutation. *Trends in immunology* **26**, 215-220 (2005).
196. Wu, X., *et al.* A role for the MutL mismatch repair Mlh3 protein in immunoglobulin class switch DNA recombination and somatic hypermutation. *J Immunol* **176**, 5426-5437 (2006).
197. Weng, Y.S. & Nickoloff, J.A. Evidence for independent mismatch repair processing on opposite sides of a double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **148**, 59-70 (1998).
198. Palmer, S., Schildkraut, E., Lazarin, R., Nguyen, J. & Nickoloff, J.A. Gene conversion tracts in *Saccharomyces cerevisiae* can be extremely short and highly directional. *Nucleic Acids Res* **31**, 1164-1173 (2003).
199. Zernicka-Goetz, M., Kubiak, J.Z., Antony, C. & Maro, B. Cytoskeletal organization of rat oocytes during metaphase II arrest and following abortive activation: a study by confocal laser scanning microscopy. *Mol Reprod Dev* **35**, 165-175 (1993).
200. Alsop, G.B. & Zhang, D. Microtubules continuously dictate distribution of actin filaments and positioning of cell cleavage in grasshopper spermatocytes. *J Cell Sci* **117**, 1591-1602 (2004).
201. Liu, A., Yoshioka, K., Salerno, V. & Hsieh, P. The mismatch repair-mediated cell cycle checkpoint response to fluorodeoxyuridine. *J Cell Biochem* **105**, 245-254 (2008).
202. O'Brien, V. & Brown, R. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis* **27**, 682-692 (2006).
203. Zhang, H., *et al.* Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. *Cancer Res* **59**, 3021-3027 (1999).
204. Young, L.C., Thulien, K.J., Campbell, M.R., Tron, V.A. & Andrew, S.E. DNA mismatch repair proteins promote apoptosis and suppress tumorigenesis in response to UVB irradiation: an in vivo study. *Carcinogenesis* **25**, 1821-1827 (2004).
205. Boland, C.R., Sinicrope, F.A., Brenner, D.E. & Carethers, J.M. Colorectal cancer prevention and treatment. *Gastroenterology* **118**, S115-128 (2000).
206. Hickman, M.J. & Samson, L.D. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10764-10769 (1999).
207. Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C.M. & Garewal, H. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* **511**, 145-178 (2002).
208. Bindra, R.S. & Glazer, P.M. Co-repression of mismatch repair gene expression by hypoxia in cancer cells: role of the Myc/Max network. *Cancer Lett* **252**, 93-103 (2007).

209. Mac Partlin, M., *et al.* Interactions of the DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 with c-MYC and MAX. *Oncogene* **22**, 819-825 (2003).
210. Schafer, Z.T. & Kornbluth, S. The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Developmental cell* **10**, 549-561 (2006).
211. Warner, J.R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* **24**, 437-440 (1999).
212. Dai, M.S. & Lu, H. Crosstalk between c-Myc and ribosome in ribosomal biogenesis and cancer. *J Cell Biochem* **105**, 670-677 (2008).
213. Wu, Q. & Vasquez, K.M. Human MLH1 protein participates in genomic damage checkpoint signaling in response to DNA interstrand crosslinks, while MSH2 functions in DNA repair. *PLoS genetics* **4**, e1000189 (2008).
214. Barkalow, K. & Hartwig, J.H. Actin cytoskeleton. Setting the pace of cell movement. *Curr Biol* **5**, 1000-1002 (1995).
215. Gourlay, C.W. & Ayscough, K.R. The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 583-589 (2005).
216. Chen, F., Chang, R., Trivedi, M., Capetanaki, Y. & Cryns, V.L. Caspase proteolysis of desmin produces a dominant-negative inhibitor of intermediate filaments and promotes apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 6848-6853 (2003).
217. de Souza-Pinto, N.C., *et al.* Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA Repair (Amst)* (2009).

8 Anhang

8.1 Verwendete Materialien

8.1.1 Geräte und Zubehör

Typ	Hersteller	Bezeichnung
Sterilarbeitsbank	Köttermann	
Brutschrank	Heraeus	Kelvitron T
Autoklav	Technomara GmbH	Integra Biosciences
Schüttelinkubator	Braun	Certomat
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg	5437
Homogenisator	Heidolph	Vortex REAX 2000
Heizplatte	IKA	IKAMAG-RCT
Analysenwaage	Sartorius	R 160P-D1
Präzisionswaage	Sartorius	Basic MCBB100
Spektralphotometer	Hitachi, Tokio, Japan	U-2000
Pipettierhilfe	Hirschmann	Pipetus Akku
Pipettierhilfe	Gilson	Pipetman P10/P20/P50/P100/P200/P1000
Thermocycler	Perkin Elmer	Applied Biosystems Gene Amp 2400 / 9700
Sequenzierautomat	Applied Biosystems	ABI 310
Schüttelinkubator	Barloworld Scientific,	Stuart Orbital Shaker Incubator
Tischzentrifuge	Labnet International Inc.	Mini Centrifuge E1200
Kühlzentrifuge	Hettich, Tuttlingen	Micro 22 R
Kühlzentrifuge	Hettich, Tuttlingen	Rotanta TRC
Kühlzentrifuge	DuPont	Sorvall RC 28 S
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg	5415c / 5402
Zentrifugenröhrchen (50ml)	Nalgene	Oak Ridge Centrifuge Tube
Kühltruhe	Bosch	
Kühlschrank	Liebherr	
Kühltruhe	COLORA	E80
Elektrophoresekammer	Life Technologies	Horizon 11.14, mit Plexiglas Gelschlitten und Kämmen

Elektrophorese Spannungsquelle	Consort	E443 / E385
Mikrowelle	Sharp	
UV-Lampe	Biometra, Göttingen	FluoLink
Foto-Apparatur	Polaroid	
Computer	DELL	Optiplex GX60

8.1.2 Computerprogramme

Name	Hersteller/Quelle	Version
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	
Word	Microsoft	Office 2003
Excel	Microsoft	Office 2003

8.1.3 Feste und flüssige Chemikalien

Substanz	Hersteller
Glucose	Roth
Magnesiumsulfat	AppliChem
Thiamin Hydrochlorid (Vitamin B1)	Fluka
Zinksulfat	Merck
Calciumchlorid	Sigma
Kaliumazetat	AppliChem
Azetylsäure	J.T.Baker
HCl	AppliChem
TBE Puffer 10x	Invitrogen
His-Dropout Supplement	BD Biosciences
β-Mercaptoethanol	Sigma
Agarose (Elektrophorese)	Sigma
M9 Minimal Salt 5x / 10x	Sigma
Hanahans's Broth	Sigma
Adenin Hydrochlorid	Sigma
3-Amino 1,2,4-Triazol	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Isopropyl-β-D-galaktopyranosid (IPTG)	AGS, Heidelberg
Bacto Agar	BD

Destilliertes Wasser	Braun
Ethanol (absolut)	Riedel de Häen
Methanol	Riedel de Häen
2-Propanol	Riedel de Häen
Glycerin	Roth
Magnesiumchlorid 25mM	Perkin Elmer
Ethidumbromid	Merck
Isopropanol	Merck
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Reinstwasser	Millipore

8.1.4 Antibiotika

Substanz	Hersteller
Ampicillin	Sigma
Kanamycin	Sigma
Streptomycin	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Tetracyclin	Fluka

8.1.5 Nährmedien

Medium	Hersteller	Zusammensetzung
LB-Medium:	Gibco BRL	Fertigpulver 25g (10g Pepton aus Fleisch, 5g Hefe-extrakt, 10g NaCl) H ₂ O ad 1l
LB-Agar:	Gibco BRL	Fertigpulver 37g (10g Pepton aus Fleisch, 5g Hefe-extrakt, 10g NaCl, 12g Agar) H ₂ O ad 1l
SOC-Medium:	Invitrogen	Fertigmedium (20g Pepton aus Fleisch, 5g Hefe-extrakt, 0,5g NaCl, 0,186g KCl, 2,4g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 20mM End-konzentration Glukose) H ₂ O ad 1l

8.1.6 Kit Systeme

Bezeichnung	Hersteller
Jetstar Maxi-Plasmid-Kit	Genomed
Qiagen DyeEx 2.0 Spin Kit (250)	Qiagen

ABI Prism BigDye Terminator Cycle v.3.1 Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
Peq Gold Plasmid Miniprep Kit	Peq Lab

8.1.7 Sonstige Labormaterialien

Parafilm M	Brand	
Wachstumsplatten	Greiner	Durchmesser 100mm
Luftdurchlässige Deckel	Eppendorf	1,5ml / 2ml Röhrchen
Erlenmeyerkolben	DURAN	250ml
Messzylinder	DURAN	500 ml
Zellkulturflaschen	Falcon / Greiner	CellStar 25cm ² / 75cm ² / 175cm ²
Pipettierhilfe	Eppendorf	"Reference" 100µl
Dispenser	Eppendorf	Multipette
Pipette	Costar	Stripette 5ml/ 10ml/ 25ml
Filter zur Sterilfiltration	Minipore	Millex
Sterilfilter Pipettenspitzen	Starlab	Tip One 10µl/ 20µl/ 200µl/ 1000µl
Latex Handschuhe	Mai Med	
Küvette, Kunststoff	Sarstedt	Ref.67.741
Küvette, Quartz	Hellma	115-QS 100mm
ABI Röhrchen für Sequenzierautomat, mit Gummistopfen	Applied Biosystems	
PCR-Reaktionsgefäß, 0,5 ml	Perkin Elmer	Applied Biosystems Micro Amp Reaction Tube with Cap
Reaktionsgefäße	Falcon / Greiner	14ml / 50ml
Reaktionsgefäße 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg	

8.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<i>Tabelle 1: Amsterdam-Kriterien zur Diagnose des HNPCC</i>	- 3 -
<i>Tabelle 2: Bethesda Kriterien (ein Punkt muß erfüllt sein)</i>	- 3 -
<i>Tabelle 3: MMR Proteinkomplexe</i>	- 7 -
<i>Tabelle 4: MMR Kofaktoren</i>	- 9 -
<i>Tabelle 5: Bestandteile des FSB-Puffers</i>	- 32 -
<i>Tabelle 6: Identifizierte potentielle Interaktionspartner von hMLH1</i>	- 43 -
<i>Tabelle 7: Durch sowohl TAP- als auch Zweihybrid-Screening detektierte Interaktionspartner von hMLH1</i>	- 67 -
<i>Tabelle 8: Detektierte Interaktionspartner aus den Bereichen Wachstumsregulation/Apoptose</i>	- 72 -
<i>Abbildung 1: Mikrosatelliteninstabilität</i>	- 5 -
<i>Abbildung 2: MSI-Nachweis</i>	- 6 -
<i>Abbildung 3: Modell des MMR-Mechanismus</i>	- 10 -
<i>Abbildung 4: Tandem Affinitäts Purifikation</i>	- 13 -
<i>Abbildung 5: Quantitative Proteomics</i>	- 14 -
<i>Abbildung 6: Konfokale Laser-Mikroskopie</i>	- 16 -
<i>Abbildung 7: Modell der RNA Polymerase</i>	- 19 -
<i>Abbildung 8: Modell des Hefe Zweihybrid-Systems (vereinfachte Darstellung)</i>	- 22 -
<i>Abbildung 9: Modell des bakteriellen Zweihybrid-Systems</i>	- 25 -
<i>Abbildung 10: Reporter-Kassette des Bacteriomatch (I) Two – Hybrid System</i>	- 27 -
<i>Abbildung 11: bait-Plasmid (pBT) des Bacteriomatch (I) Two – Hybrid System</i>	- 27 -
<i>Abbildung 12: target-Plasmid (pTRG) des Bacteriomatch (I) Two – Hybrid System</i>	- 28 -
<i>Abbildung 13: Zusammenfassung Bacteriomatch II Two Hybrid System</i>	- 30 -
<i>Abbildung 14: Agarose-Gel Elektrophorese unter UV-Durchleuchtung</i>	- 39 -
<i>Abbildung 15: Basen-Sequenzierung</i>	- 40 -
<i>Abbildung 16: Wachstumsplatten</i>	- 42 -
<i>Abbildung 17: Proteinkategorien und Verteilung der hMLH1 Interaktionspartner</i>	- 46 -

Abbildung 18: - 47 -

Abbildung 19: IL20RA - 47 -

Abbildung 20: CTSB und CAPN6 - 48 -

Abbildung 21: NDUFS8 und SLC25A23 - 48 -

Abbildung 22: NT5C3L - 49 -

Abbildung 23: DDX47 - 50 -

Abbildung 24: NDRG1 - 50 -

Abbildung 25: CLIC1 - 51 -

Abbildung 26: ANXA6 - 51 -

Abbildung 27: Aufbau von Annexin A6 - 51 -

Abbildung 28: NCF4 - 52 -

Abbildung 29: LPP2 - 53 -

Abbildung 30: - 53 -

Abbildung 31: PTP4A2 - 54 -

Abbildung 32: RAPGEFL1 - 55 -

Abbildung 33: SELENBP1 - 55 -

Abbildung 34: SPTLC2 - 55 -

Abbildung 35: PEDF - 56 -

Abbildung 36: ARAF1 - 57 -

Abbildung 37: NONO - 57 -

Abbildung 38: APRT - 58 -

Abbildung 39: ASS1 - 58 -

Abbildung 40: RPS2, RPS5, RPS16 - 58 -

Abbildung 41: EIF2A - 59 -

Abbildung 42: EEF2 - 59 -

Abbildung 43: UBA1C - 60 -

Abbildung 44: SQSTM1 - 60 -

Abbildung 45: ACTG1 - 60 -

Abbildung 46: Mögliche Rolle von Aktin bei der Translation - 61 -

Abbildung 47: CUTA - 61 -

Abbildung 48: DES - 62 -

Abbildung 49: SPTAN1..... - 62 -
Abbildung 50: SEC61A1 - 63 -
Abbildung 51: TAGLN - 63 -
Abbildung 52: MMR und Zellzyklus Regulation - 71 -

8.3 Abkürzungen

ΔhisB Zellen	Zellen, denen hisB-Gen für Histidinverwertung fehlt	<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und Andere)
3-AT	3-Amino 1,2,4-Triazol	F-Aktin	Filamentöses Aktin
40S Untereinheit	Ribosomen-Untereinheit (S=Sedimentationskoeffizient)	F-Aktin	filamentöse Aktin
aadA-Gen	Resistenzgen für Streptomycin	FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
ACCN	<i>associated sequence accession number</i> (siehe <i>pubMed-Homepage</i>)	Fc	<i>Bestandteil von ANtikörpern</i>
ACER3	<i>alkaline ceramidase 3</i>	FSB	<i>frozen storage buffer</i>
ACTG1	Aktin, Gamma 1 Typ	G ₂ -Phase	Wachstumsphase im Zellzyklus
ADP	Adenosindiphosphat	G-Aktin	Globuläres Aktin
AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>	GAL11P	<i>Hefegen, dient als Kontrolle beim Zweihybrid-System (Partner: LGF2)</i>
amp ^r	Resistenzgen für Ampicillin	GAL4	Hefepilz-Gen zur Galaktoseverwertung
ANXA6	Annexin A6	GCN2	Nitrogenmetabolismus kontrollierende Kinase, generell
APRT	<i>Adenine phosphoribosyltransferase</i>	GFAP	Gliafibrilläres saures Protein
ARAF	<i>V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>	GHKL-ATPase	Gyrase/Hsp90/Histidin-Kinase/MutL – ATPase
ASS1	<i>Argininosuccinate synthetase 1</i>	GPI	Glykosylphosphatidylinositol
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	G-Protein h (Präfix)	Guaninnukleotid-bindendes Protein Human
ATP	Adenosintriphosphat	HIS3	Gen, das Wachstum in histidinfreier Umgebung ermöglicht
BER	<i>base excision repair</i>	HLA	Humanes Leukozyten Antigen
BLAST		HMGB1	non-histone chromatin component high-mobility group box 1
CALB	<i>Calcium/lipid-binding domain</i>	HMSNL	<i>hereditary motor and sensory neuropathy-Lom</i>
CAPN5	Calpain 5	HNPCC	<i>Hereditary non Polyposis Colorectal Cancer</i>
cDNA	Komplementäre DNA, entsteht durch reverse Transkription von mRNA	HRI	Hämregulierte-Inhibitor-Kinase
CHK2	Checkpoint Kinase 2	IDLs	insertion/deletion loops
CLIC1	<i>Chloride intracellular channel 1</i>	IGKC	Immunoglobulin kappa constant
CoA	Coenzym A	IL20RA	Interleukin 20 Rezeptor
CRP	cAMP-Rezeptor-Protein	ILK	<i>Integrin-linked-Kinase</i>
CTSB	Cathepsin B	IPTG	Isopropyl-β-D-galaktopyranosid
CUTA	<i>CutA divalent cation tolerance homolog</i>	lacUV5	Unterform des lac-Promotors
ddNTP	2'3'-Dideoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat	lacZ-Gen	Gen des Enzyms β-Galaktosidase
DDX47	<i>DEAD box polypeptide 47</i>	LEU2	Gen, das Wachstum in Leucinfreier Umgebung ermöglicht
DES	<i>Desmin</i>	JAK	Januskinase
DMSO	Dimethylsulfoxid	LGF2	<i>Hefegen, dient als Kontrolle beim Zweihybrid-System (Partner: GAL11P)</i>
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure	LPP2	Lipid-Phosphat-Phosphatase 2
DSB	Doppelstrangbruch	MCS	<i>multiple Cloning Site</i>
DSBR	DSB-Reparatur	MLH	MutL-homologes Protein
E.R.	Endoplasmatisches Retikulum	MMR	<i>DNA mismatch repair</i>
EEF2	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2</i>	MSH	MutS-homologes Protein
EIF2A	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2A</i>	MSI	Mikrosatelliteninstabilität
ERKs	<i>extracellular regulated kinases</i>		
EXO1	<i>Exonuklease I</i>		

MSS	Mikrosatellitenstabilität	RPS2	Ribosomales Protein S2
MutH	Bakterielle MMR-Enzym-Mutante H	RPS5	Ribosomales Protein S5
MutL	Bakterielle MMR-Enzym-Mutante L	S1P	Sphingosin 1 Phosphat
MutS	Bakterielle MMR-Enzym-Mutante S	SEC61A1	<i>Sec61 alpha 1 subunit</i>
Myc (C-/N-)	<i>Myelocytomatosis protein</i>	SELENBP1	<i>Selenium binding protein 1</i>
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-phosphat	Ser	Aminosäure Serin
NDRG1	<i>N-myc downstream regulated 1</i>	SHM	somatische Hypermutation
NDUFS8	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8</i>	SLC25A23	<i>solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 23</i>
NER	<i>nucleotid excision repair</i>	SNF	Sucrose non fermenting (Hefeprotein)
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>	SPT1/SPT2	SPTLC2 Untereinheiten
NONO	Non-POU domain containing, octamer-binding	SPTAN1	<i>Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1</i>
NT5C3L	<i>5'-nucleotidase, cytosolic III-like</i>	SPTLC2	<i>Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2</i>
OD	Optische Dichte	SQSTM1/p62	<i>Sequestosome 1</i>
o.g.	oben genannten	s.o.	siehe oben
OR / OL	linke / rechte Operatorregion von λ cl	SRP	<i>signal-recognition-particle</i>
p120GAP	Protein der Ras/Raf Kaskade	STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
P40 ^{phox}	Untereinheit der NADPH-Oxidase	TAGLN/SM22	Transgelin
P53	Hitzeschockprotein P53	TAP	Tandem Affinitäts Purifikation
PARVA	<i>Parvin, alpha</i>	TEV	<i>tobacco etch virus</i>
pBT	<i>bait</i> -Plasmid	TLS	<i>translesion DNA synthesis polymerases</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	tRNA	Transfer RNA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	UasG-Promotor	<i>upstream activating sequences for galactose Promotor</i>
PEDF	Pigment epithelium derived factor	u.a.	unter anderem
PERK	PKR assoziierte endoplasmatische Kinase	UBAC1	<i>UBA domain containing 1</i>
PKR	RNA aktivierte Proteinkinase	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
PMS	Post-Meiotisches Segregationsprotein	<i>XL-1 Blue MRF'</i>	Spezieller Stamm von <i>E.coli</i> -Bakterien
PPAR	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor	α CTD	C-terminale Domäne von RNAP α
PRM	<i>promotor for repressor maintenance</i>	α NTD	N-terminale Domäne von RNAP α
PTMs	posttranslationale Modifikationen	λ cl	Repressorprotein des Phagen λ
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase	λ CTD	C-terminale Domäne eines λ cl
PTP4A2	<i>Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2</i>	z.B.	zum Beispiel
pTRG	<i>target</i> -Plasmid		
RAPGEFL1	<i>RAP guanine nucleotide exchange factor (GEF)-like 1</i>		
Ras-GTPase	<i>rat sarcoma</i> GTPase (Onkoprotein)		
RFC	<i>replication factor C</i>		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNAP($\alpha, \beta, \beta', \sigma$)	RNA Polymerase (Untereinheiten $\alpha, \beta, \beta', \sigma$)		
RPA	single stranded binding factor replication protein A		
Rpm	Umdrehungen pro Minute		
RPS16	Ribosomales Protein S16		

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Herrn Professor Jörg Trojan danke ich für die Möglichkeit, diese wissenschaftlich äußerst spannende und hochaktuelle Thematik zu bearbeiten, und die Unterstützung während praktischen und theoretischen Durchführung. Vor allem die vielen positiven Erfahrungen während meiner experimentellen Dissertation haben mich in meinem Entschluss bestätigt, auch weiterhin in der onkologischen Grundlagenforschung tätig zu sein.

Frau Dr. Angela Brieger danke ich für die sehr gute technische Einarbeitung, die mir schnell ein selbständiges Arbeiten ermöglicht hat, so dass ich meine Experimente flexibel auch ausserhalb der regulären Laborzeiten durchführen konnte. Zudem möchte ich mich für die Unterstützung und Anregungen bei der schriftlichen Abfassung bedanken.

Den weiteren Kollegen aus dem HNPC Labor, im Besonderen Frau Sandra Passmann und Frau Nicole Weber, möchte ich für die Anleitung im Umgang mit den Geräten und manch hilfreichen Hinweis im Laboralltag danken.

Meiner Mutter und meinen Brüdern Stephan und Roman möchte ich für die Unterstützung und Solidarität während des gesamten Studiums, aber vor allem während der Promotion danken.

Meiner Freundin Christina möchte ich für das aufwendige Korrekturlesen während des Schreibprozesses danken, und dass sie mich auch in Momenten der Frustration immer wieder neu motiviert hat.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Identifikation von Interaktionspartnern des humanen DNA-Reparaturproteins MLH1 mit
einem bakteriellen Zweihybrid-System

in der Medizinischen Klinik 1 des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Trojan mit Unterstützung durch Dr. Angela Brieger ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben. Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit werden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Titel: *Cytoskeletal scaffolding proteins interact with Lynch-Syndrome associated mismatch repair protein hMLH1;*
Zeitschrift: Proteomics (2. Revision)
Autoren: Angela Brieger¹, Boris Adryan^{2,3}, Fabian Wolpert¹, Sandra Passmann¹, Stefan Zeuzem¹ and Jörg Trojan¹

¹Medical Clinic I, Biomedical Research Laboratory, Goethe-University, D-60590 Frankfurt a.M., ²MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, CB2 0QH, UK, ³Present address: Cambridge Systems Biology Centre, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QR, UK;

Frankfurt, 28.06.2010

Fabian Wolpert

Lebenslauf:

Name: Fabian Nicolas Wolpert
Geburtstag: 16.09.1981
Geburtsort: Darmstadt
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch
Eltern: Dr.med Dipl. Psych. Eugen Wolpert, *1938, †2001
Annelise Wolpert-Curchod, *1951
Geschwister: Stephan Matthias, *04.03.1979; Roman Damian, *26.09.1990;

Ausbildung:

1988-1992: Christian-Morgenstern-Schule, Darmstadt
1992-2001: Edith-Stein-Schule, staatlich anerkanntes katholisches Gymnasium, Darmstadt
Mai 2001: Allgemeine Hochschulreife
2001-2002: Zivildienst in der Jugendarbeit beim „Sozialen Friedensdienst Darmstadt“
Okt. 2002: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Sept. 2004: Ärztliche Vorprüfung
Okt. 2008: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, schriftlich
Nov. 2008: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, mündlich
Juli 2009: Beginn der fachärztlichen Weiterbildung in der Klinik für Neurologie, Universitätsspital Zürich, Leitung Prof.Dr. med. M. Weller; derzeit wissenschaftliche Tätigkeit im Bereich neuroonkologische Immunologie

Frankfurt, den 28.06.2010

Fabian Wolpert