

**Beitrag zur Aufklärung der zellulären Rolle des
humanen *neighbour of tid (not)* Gens**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Benedikt Hacker

geboren am 30.12.1980 in Frankfurt/Höchst

Mainz 2016

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2016

Meinen Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS	I
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
III.	TABELLENVERZEICHNIS	XIII
IV.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XIV
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Identifizierung des Tumorgens <i>neighbour of tid (not)</i>	1
1.2	Stand der Forschung zur Funktion des humanen <i>not</i>-Gens	3
2.	ZIEL DER ARBEIT	5
3.	MATERIAL UND METHODEN	6
3.1	Material	6
3.1.1	Firmenverzeichnis	6
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	8
3.1.3	Chemikalien.....	9
3.1.4	Geräte	12
3.1.4.1	Zentrifugen	12
3.1.4.2	Waagen.....	12
3.1.4.3	Photometer.....	12
3.1.4.4	Wasserbäder	12
3.1.4.5	Elektrophorese- und Western Blot Zubehör.....	13
3.1.4.6	Heizblöcke, Magnetrührer	13
3.1.4.7	Schüttler.....	13
3.1.4.8	Pipetten.....	13
3.1.4.9	Thermocycler.....	13
3.1.4.10	Mikroskope.....	14
3.1.4.11	Brutschränke, Sterilbänke	14
3.1.4.12	Sonstige	14

3.1.5	Computerprogramme, Server und Datenbanken	14
3.1.6	Verwendete Kits	15
3.1.7	Größenstandards	16
3.1.8	Enzyme	16
3.1.8.1	Restriktionsendonukleasen	16
3.1.8.2	Modifizierende Enzyme	16
3.1.9	Antibiotika	17
3.1.10	Antikörper	18
3.1.11	Rekombinante Proteine	19
3.1.12	Oligonukleotide	19
3.1.13	cDNA-Klone	22
3.1.14	Genbibliothek	22
3.1.15	Plasmide	23
3.1.16	Plasmidkonstrukte	23
3.1.17	Bakterienstämme	26
3.1.18	Hefestämme	26
3.1.19	Zelllinien	27
3.1.19.1	Humane Zelllinien	27
3.1.19.2	Murine Zelllinien	28
3.1.20	Verwendete Puffer und Lösungen	28
3.1.21	Verwendete Medien	31
3.1.21.1	Medien für die Bakterienkultur	31
3.1.21.2	Medien für die Hefekultur	31
3.1.21.3	Medien für die Zellkultur	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	Mikrobiologische Methoden	33
3.2.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien	33
3.2.1.2	Kultivierung und Stammhaltung von Hefen	33
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	34
3.2.2.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	34
3.2.2.2	Herstellung kompetenter Hefezellen	34
3.2.2.3	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	35
3.2.2.4	Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA	35
3.2.2.4.1	Transformation im kleinen Maßstab	35

3.2.2.4.2	Ko-Transformation der cDNA-Bibliothek im großen Maßstab	35
3.2.2.5	Plasmidpräparation durch alkalische Lyse	36
3.2.2.5.1	Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	36
3.2.2.5.2	Endotoxinfreie Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	36
3.2.2.5.3	Präparation von Plasmid-DNA aus Hefezellen	36
3.2.2.6	Aufreinigung von Plasmid Minipräparationen zur Sequenzierung.....	37
3.2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	37
3.2.2.8	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
3.2.2.9	Aufreinigung von mittels Restriktion bzw. PCR-Amplifikation generierten DNA-Fragmenten	38
3.2.2.10	Restriktion von Plasmid-DNA	38
3.2.2.11	Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment.....	38
3.2.2.12	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	38
3.2.2.13	Ligation von DNA-Fragmenten	38
3.2.2.14	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
3.2.2.15	Polymerase-Kettenreaktion	39
3.2.2.15.1	Kolonie-PCR	40
3.2.2.15.2	Overlap-Extension-PCR.....	40
3.2.2.16	DNA-Sequenzierung	41
3.2.3	Proteinanalytische Methoden	42
3.2.3.1	Kolonie-Blot.....	42
3.2.3.2	Aufreinigung der NOT Antikörper mittels Affinitätschromatographie	42
3.2.3.2.1	Kopplung der NOT Peptide an CNBr-aktivierte Sepharose 4B.....	42
3.2.3.2.2	Kopplung und Aufreinigung der NOT Antikörper.....	43
3.2.3.3	Ko-Immunopräzipitation	43
3.2.3.4	Subzelluläre Fraktionierung von Proteinen.....	44
3.2.3.5	Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen	44
3.2.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
3.2.3.7	Western-Blot und Immunodetektion	45
3.2.3.7.1	Western-Blot	45
3.2.3.7.2	Immunodetektion.....	45
3.2.3.8	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	46
3.2.4	Zellbiologische Methoden.....	46
3.2.4.1	Kultivierung humaner und muriner Zellen.....	46

3.2.4.2	Kryokonservierung von Zellen.....	46
3.2.4.3	Bestimmung der Zellzahl	47
3.2.4.4	Transfektion von HEK-293 Zellen.....	47
3.2.5	Das Hefe Zwei-Hybrid System	48
3.2.6	Vorbereitungen für den Y2H Screen.....	49
3.2.6.1	Tieterbestimmung der cDNA-Bibliothek.....	49
3.2.6.2	Überprüfung der Phänotypen der Hefestämme	49
3.2.6.3	Tests auf unspezifische Aktivierung der Reportergene.....	49
3.2.7	Filter Lift-Assay	50
4.	ERGEBNISSE	51
4.1	Isolierung und Identifizierung von molekularen Partnern des NOT-1 Proteins.....	51
4.1.1	Vorbereitungen für den Y2H <i>Screen</i>	51
4.1.1.1	Tieterbestimmung der für den Y2H <i>Screen</i> eingesetzten cDNA-Bibliothek.....	51
4.1.1.2	Überprüfung der Phänotypen der Hefestämme	51
4.1.1.3	Test auf unspezifische Aktivierung des Reportergens <i>MEL1</i> im Hefestamm AH109	52
4.1.2	Identifizierung der potentiellen NOT-Liganden mittels Sequenzierung.....	52
4.1.3	Bestätigung der Bindung der potentiellen Liganden an NOT durch Ko- Transformation in den AH109-Stamm.....	54
4.2	Kartierung der Interaktionsdomänen von NOT mit den Liganden SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3.....	56
4.2.1	Für die Bindungsstudien hergestellte NOT-Konstrukte.....	56
4.2.2	Test auf NOT-Homodimerbildung.....	58
4.2.3	Herstellung der Plasmidkonstrukte für die Bindungsstudien mit NOT und den Liganden SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3	58
4.2.4	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und SYPL1.....	59
4.2.5	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und LRP1	61
4.2.6	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit VAPA	63
4.2.7	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit FKBP8	66
4.2.8	Kartierung der Bindungsdomänen der Proteine NOT und OSBP	68
4.2.9	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit OSBPL9.....	70
4.2.10	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit CREB3.....	73

4.2.11	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Kartierung der Bindungsdomäne von NOT mit den Proteinen SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3.....	76
4.3	Analyse der Struktur des NOT Proteins	77
4.3.1	Spleißvarianten von <i>NOT</i>	77
4.3.2	Voraussage von Transmembrandomänen im NOT-1 Protein	77
4.3.3	Bioinformatische Analyse der NOT-1 Sequenz	79
4.3.4	Durchsuchung der ELM Datenbank nach konservierten Sequenzmotiven.....	79
4.3.5	2D-Modelle des NOT-1 Proteins zur Darstellung der Sekundärstruktur	83
4.4	Identifizierung der NOT Proteine und Bestätigung der Bindung von NOT mit den Liganden SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3 durch Ko-Immunpräzipitation	84
4.4.1	Expressionsprofil und subzelluläre Lokalisierung der NOT Proteine.....	85
4.4.2	Herstellung stabiler NOT- und CREB3-EGFP Transfektanten	88
4.4.3	Nachweis der EGFP-Fusionsproteine mittels Western-Blot	89
4.4.4	Bestätigung der Bindung von NOT mit den Liganden SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3 durch Ko-Immunopräzipitation.....	92
4.4.4.1	Bestätigung der Bindung von NOT mit VAPA und FKBP8 <i>in vivo</i>	92
4.4.4.2	Bestätigung der Bindung von NOT mit CREB3 mittels Ko-Immunopräzipitation	94
4.4.4.3	Bestätigung der Bindung von NOT mit OSBPL9, OSBP, SYPL1 und LRP1 mittels Ko-Immunopräzipitation	96
5.	DISKUSSION	101
5.1	Isolierung und Identifizierung von molekularen Partnern des NOT-1 Proteins.....	101
5.2	CREB3 als Interaktionspartner von NOT	103
5.3	OSBP und OSBPL9 als Interaktionspartner von NOT.....	105
5.4	VAPA als potentieller Interaktionspartner von NOT.....	109
5.5	SYPL1 als Interaktionspartner von NOT	112

5.6	LRP1 als Interaktionspartner von NOT	114
5.7	FKBP8 als potentieller Interaktionspartner von NOT	118
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	122
7.	LITERATURVERZEICHNIS	124
8.	ANHANG	150
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	157
	LEBENS LAUF	158
	DANKSAGUNG	159

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
A/G	Alanin/Glycin
AK	Antikörper
Akz.	Akzessionsnummer
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure
3-AT	Amitrol
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaare
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>bw</i>	<i>brown</i>
bZIP	<i>Basic-Leucin-Zipper</i>
CaCl ₂ •H ₂ O	Calciumchlorid Hydrat
CaM	Calmodulin
CC	<i>Coiled-coil</i>
CDG-Id	<i>Congenital Disorder of Glycosylation, Type Id</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cfu	koloniebildenden Zellen
C ₂ H ₃ LiO ₂ •2H ₂ O	Lithiumacetat-Dihydrat
C ₃ H ₃ NaO ₃	Natriumpyruvat
CK1	<i>Casein kinase 1</i>
cM	Centimorgan
cm ²	Quadratzentimeter
DB	DNA-Bindungsdomäne
ddNTP	Didesoxy-Nukleotidtriphosphat

<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DO	<i>Dropout</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<i>Dv</i>	<i>Drosophila virilis</i>
EB	<i>Elution Buffer</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELM	<i>eukaryotic linear motif</i>
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
<i>Ep</i>	<i>Ellipse</i>
ER	endoplasmatisches Reticulum
ER-L	ER-Lumen
EX	extrazellulär
FBS	fötales Bovines Serum / fötales Kälberserum
Glu	Glutamin
GSK3	<i>Glykogen Synthase Kinase 3</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
His	Histidin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I	Isoforme(n)
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
<i>l(2)dtl</i>	<i>lethal(2)denticleless</i>
<i>l(2)not</i>	<i>lethal(2)neighbour of tid</i>
<i>l(2)rot</i>	<i>lethal(2)relative of tid</i>
<i>l(2)tid</i>	<i>lethal(2)tumorous imaginal discs</i>
LB	Lysogeny Broth
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
LiCl	Lithiumchlorid
LZ	Leucin-Zipper
M	Mol
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	<i>Multiple Clonig Site</i>
MD	MARVEL-Domäne
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
Met	Methionin
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MgSO ₄ •7H ₂ O	Magnesiumsulfat Heptahydrat
Min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Milli-Mol
mm	Millimeter
MnCl ₂ •4H ₂ O	Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSP	<i>Major Sperm Protein</i>
Mw	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid

NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NLS	Kern-Lokalisierungs-Signal
nm	Nanometer
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
NRD	<i>N-arginine dibasic convertase</i>
ns	nicht-spezifisch
nt	Nukleotide
NT	nicht-transfiziert
OE	<i>Overlap-Extension</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>Open-Reading-Frame</i>
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCSK	<i>Proprotein convertase subtilisin/ kexin</i>
PEG	Polyethyleneglycol
pg	Picogramm
PH	Pleckstrin-Homologie
pH	pondus Hydrogenii
PIKK	<i>Phosphoinositide-3-kinase-related protein kinases</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PIK	<i>Polo-like kinase 1</i>
pmol	Picomol
pNPP	4-Nitrophenylphosphat
PPIase	peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> Isomerase
Ptc	<i>Patched</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid

RbCl	Rubidiumchlorid
rek.	rekombinant
RH	Rohhomogenat
RIP	Regulierte Intramembran Proteolyse
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
S1P	<i>Site-1 Protease</i>
S2P	<i>Site-2 Protease</i>
SB	Sterol Bindedomäne
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>Synthetic Defined</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
sog.	so genannt
SSC	Salz-Natrium-Citrat
Std.	Stunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAR	Transkriptions-Aktivierungsregion
TBP	<i>TATA binding protein</i>
T-CREB3	Transfektante-CREB3
TE	Tris-EDTA
TM	Transmembran
T _M	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
T-NOT	Transfektante-NOT
TPR	<i>Teratricopeptide Repeat</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
T-V	Transfektante-Vektor (EGFP-N3)
U	<i>Unit(s)</i>

UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UTR	untranslatierte Region
ü.N.	über Nacht
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
Ura	Uracil
V	Vesikulär
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Y2H	Hefe Zwei-Hybrid
YPD(A)	<i>Yeast Extract-Peptone-Dextrose</i> (Adenine)
ZD	Zytoplasmatische-Domäne

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über die bisher identifizierten Mutationen im <i>not/ALG3</i> Gen bei CDG Patienten	4
Tab. 2	Antibiotikastammlösungen und Endkonzentration im Medium	17
Tab. 3	Verwendete Antikörper	18
Tab. 4	Für die PCR eingesetzten Oligonukleotide	20
Tab. 5	Eigens hergestellte Plasmidkonstrukte	23
Tab. 6	Zur Verfügung gestellte Plasmidkonstrukte	25
Tab. 7	Überprüfung der Phänotypen der Hefestämme AH109 und Y187	52
Tab. 8	α -Gal Test auf unspezifische Aktivierung des Reportergens <i>MEL1</i> in AH109 Zellen transformiert mit den Plasmiden pAS2-1 und pACT2	52
Tab. 9	Durch Sequenzierung identifizierte potentielle NOT-Liganden	53
Tab. 10	Test auf Homodimerbildung des NOT Proteins	58
Tab. 11	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und SYPL1	61
Tab. 12	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und LRP1	63
Tab. 13	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und VAPA	65
Tab. 14	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und FKBP8	68
Tab. 15	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und OSBP	70
Tab. 16	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und OSBPL9	71
Tab. 17	Alignment der Isoformen CRA_b und CRA_c des OSBPL9 Proteins	72
Tab. 18	Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und der CREB Proteine	75
Tab. 19	Summarische Darstellung der Ergebnisse zur Kartierung der Bindungsdomänen des NOT Proteins mit den Partnern SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3	76
Tab. 20	Vergleich der Membrantopologie des NOT-1 Proteins vorhergesagt mit Hilfe diverser Programme	78
Tab. 21	Identifizierte Sequenzmotive des NOT-1 Proteins	79
Tab. 22	Mit Hilfe des Y2H-Systems isolierte molekulare Partner der humanen NOT Proteine	150

IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der genomischen <i>l(2)tid</i> Region	1
Abb. 2	Exon-Intron Struktur der <i>Drosophila</i> Gene <i>l(2)tid</i> , <i>l(2)not</i> und <i>l(2)rot</i>	2
Abb. 3	Reporterkonstrukte in den Hefestämmen AH109 und Y187	27
Abb. 4	Schematische Darstellung der OE-PCR	41
Abb. 5	Prinzip des Hefe Zwei-Hybrid Systems	48
Abb. 6	Bestätigung der NOT-Liganden Bindung durch Retransformation des pAS2-1- NOT-1 <i>Baits</i> mit den die Liganden kodierenden <i>Prey</i> -Plasmiden in den Hefestamm AH109	55
Abb. 7	Schematische Darstellung des NOT Proteins und der hergestellten Deletionskonstrukte	57
Abb. 8	Strukturelle Merkmale des SYPL1 II Proteins und Übersicht über die hergestellten Konstrukte	60
Abb. 9	Strukturelle Merkmale des LRP1 Proteins und der hergestellten Deletionskonstrukte	62
Abb. 10	Strukturelle Merkmale des VAPA Proteins und Übersicht über die hergestellten Konstrukte	64
Abb. 11	Strukturelle Merkmale des FKBP8 Proteins und der hergestellten Konstrukte	67
Abb. 12	Strukturelle Merkmale des OSBP Proteins und der hergestellten Konstrukte	69
Abb. 13	Strukturelle Merkmale des OSBPL9 Proteins und der hergestellten Konstrukte	71
Abb. 14	Strukturelle Merkmale des CREB3 Proteins und der hergestellten Konstrukte	75
Abb. 15	2D-Modell des NOT-1 Proteins zur Darstellung der Sekundärstruktur	84
Abb. 16	Expressionsprofil und subzelluläre Lokalisierung der NOT Proteine	87
Abb. 17	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der stabilen NOT- und CREB3 Tranfektanten	88
Abb. 18	Analyse der NOT- und CREB3 Transfektanten	92
Abb. 19	Ergebnisse der Ko-IP Experimente zur Bestätigung der Bindung von NOT mit VAPA und FKBP8	94
Abb. 20	Ergebnisse der Ko-IP Experimente zur Bestätigung der Bindung von NOT mit CREB3.	95
Abb. 21	Ergebnisse der Ko-IP Experimente zur Bestätigung der Bindung von NOT mit OSBPL9, OSBP, SYPL1 und LRP1	99

Abb. 22	Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und CREB3	105
Abb. 23	Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und OSBP	108
Abb. 24	Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und OSBPL9	108
Abb. 25	Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und VAPA.....	112
Abb. 26	Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und SYPL1.....	113
Abb. 27	Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und LRP1	118
Abb. 28	Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und FKBP8	121

1. Einleitung

1.1 Identifizierung des Tumorgens *neighbour of tid (not)*

Das Gen *not* wurde zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (*Dm*) im Zusammenhang mit der Identifizierung des Tumorsuppressors *lethal(2)tumorous imaginal discs* (*l(2)tid*) isoliert (Kurzik-Dumke *et al.*, 1992; 1995; 1996; 1997a, b). In der Fliege führen Mutationen des *l(2)tid* Gens zur malignen Transformation der Imaginalscheiben, welche die embryonalen Anlagen/Primordien der adulten Strukturen darstellen (Kurzik-Dumke *et al.*, 1992; 1995; 1998; Canamasas *et al.*, 2003). Die Imaginalscheiben von tumorösen *l(2)tid* Mutanten sind unfähig zu differenzieren und entwickeln sich während des larvalen Stadiums zu letalen Tumoren (Kurzik-Dumke *et al.*, 1992). Mittels Rekombinationsanalyse wurde *l(2)tid* zytogenetisch der Position $104 \pm 1\text{cM}$ auf dem rechten Arm des Chromosoms 2 zugeordnet (Kurzik-Dumke *et al.*, 1992; 1995) (Abb. 1). Die Bestimmung des genetischen Locus, 59F5, erfolgte durch Deletions-Kartierung mit den Deletionsstämmen *Df(2R)bw⁵*, *Df(2R(bw)^{s46}*, *Df(2)b23*, *Df(2R)106*, *Df(2R)tid*, *Df(2R)x32* und *Df(2R)OV1* (Kurzik-Dumke *et al.*, 1992) (Abb. 1).

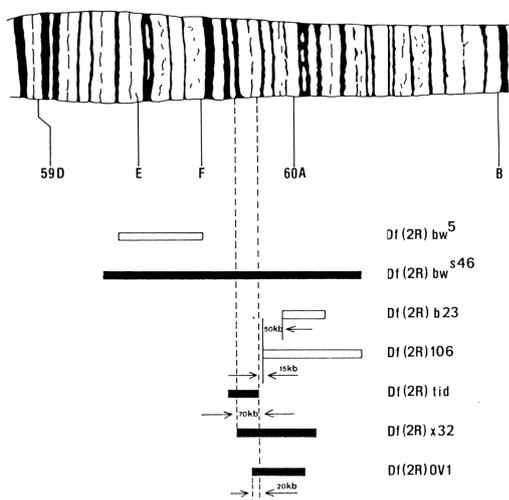


Abb. 1 Schematische Darstellung der genomischen *l(2)tid* Region. Die Abbildung zeigt die Zuordnung der in der Komplementationanalyse verwendeten Deletionsstämme *Df(2R)bw⁵*, *Df(2R(bw)^{s46}*, *Df(2)b23*, *Df(2R)106*, *Df(2R)tid*, *Df(2R)x32* und *Df(2R)OV1* zu der genomischen Region 59F-60A. Die weißen Boxen stellen die Stämme dar, die das *l(2)tid* Gen komplementieren. Durch schwarze Boxen sind die Stämme dargestellt, welche die *l(2)tid*-Region nicht komplementieren. Wie man erkennen kann, liegt das *l(2)tid*-Gen zwischen dem distalen Bruchpunkt der *Df(2R)tid* und dem proximalen Bruchpunkt von *Df(2R)OV*. (Kurzik-Dumke *et al.*, 1992). Die molekulare Analyse der Region zeigte, dass der Bereich 20 kb umfasst (Kurzik-Dumke *et al.*, 1995; Kurzik-Dumke, 1996). (Die Abb. wurde nach Kurzik-Dumke *et al.*, 1992 zitiert.)

Zur Bestimmung der transkribierten Bereiche innerhalb des 20kb-Fragments wurde eine cDNA- und Transkriptanalyse aller Entwicklungsstadien des Wildtyp (Wt) -Stammes *Oregon R* durchgeführt (Kurzik-Dumke *et al.*, 1995). In Folge dieser Analysen wurden drei cDNAs, die unterschiedliche Transkriptmuster kodieren (Kurzik-Dumke *et al.*, 1995) isoliert. Die Transkriptanalyse mittels Northern Blot und anschließende Sequenzierung der cDNAs und

der ganzen genomischen Region zeigten, dass diese vier Gene repräsentieren: *l(2)tid*, *lethal(2)neighbour of tid (l(2)not)*, *lethal(2)relative of tid (l(2)rot)* und *lethal(2)denticleless (l(2)dtl)* (Kurzik-Dumke *et al.*, 1992; 1995; 1996). Die Gene *l(2)tid* und *l(2)not* sind dabei auf den komplementären DNA Strängen, in einem 7 kb genomischen Bereich, als „Gen im Gen“ organisiert (Kurzik-Dumke *et al.*, 1995; Kurzik-Dumke, 1996; Kurzik-Dumke *et al.*, 1996) (Abb. 2). Die proteinkodierende Region des *l(2)tid*-Gens besteht aus zwei Exonen und einem Intron. Das 2645 Nukleotide (nt) große Gen ist im *l(2)not* Intron lokalisiert (Kurzik-Dumke *et al.*, 1995; Kurzik-Dumke, 1996; Kurzik-Dumke *et al.*, 1996) (Abb. 2). Die proteinkodierende Region des *l(2)not*-Gens umfasst 1530nt und besteht ebenfalls aus zwei Exonen (Kurzik-Dumke *et al.*, 1995; Kurzik-Dumke *et al.*, 1996) (Abb. 2). Die Sequenzanalyse der genomischen Region zeigte, dass das *l(2)not*-Intron einen weiteren *Open-Reading-Frame* (ORF), (*l(2)rot*), kodiert (Kurzik-Dumke *et al.*, 1996) (Abb. 2). Interessanterweise wird *l(2)rot* zwar transkribiert, aber nicht translatiert und daher als putative regulatorische RNA postuliert (Kurzik-Dumke *et al.*, 1997a, b).

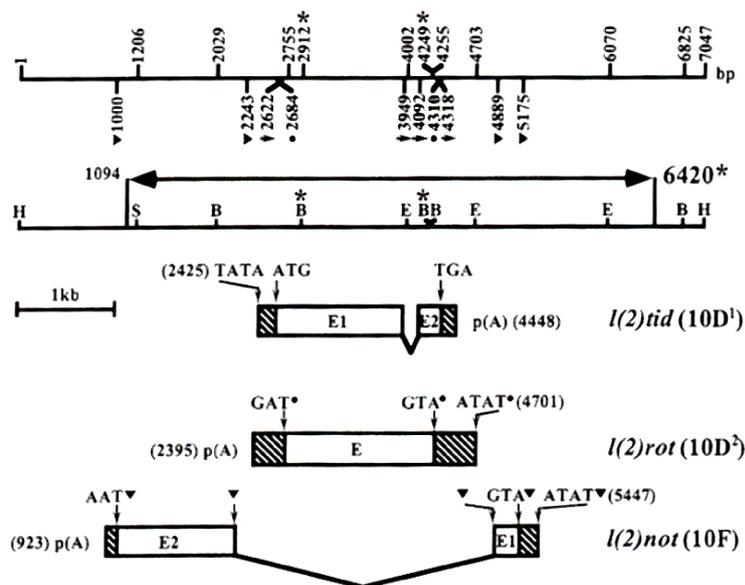


Abb. 2 Exon-Intron Struktur der *Drosophila* Gene *l(2)tid*, *l(2)not* und *l(2)rot*. Die Positionen der Promotoren und transkribierten Bereiche, sowie die Start- und Stoppcodons, sind durch Pfeile (*l(2)tid*), Punkte (*l(2)rot*) und Pfeilköpfe (*l(2)not*) markiert. (Die Abb. wurde nach Kurzik-Dumke *et al.*, 1997b zitiert.)

Die Gen im Gen Struktur der Gene *l(2)tid* und *l(2)not* ist in *Drosophila virilis* (*Dv*) konserviert (Kaymer *et al.*, 1997). Die Sequenzanalyse der beiden Gene *l(2)tid* und *l(2)not* zeigte, dass *l(2)tid* durch eine mitochondriale Leader-Sequenz charakterisiert ist und zu der Familie der DnaJ Chaparone gehört (Kurzik-Dumke *et al.*, 1995; 1998).

Das putative Genprodukt von *l(2)not* besteht aus 510 Aminosäuren (As) mit einem Molekulargewicht von 56kDa. Es enthält einen hohen Leucin- (16.6%) und Alanin-Anteil (8.2%). Das C-terminale KKLQ-Motiv ähnelt dem Konsensusmotiv „KKXX“, welches für

den Transport vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Reticulum (ER) verantwortlich ist (Nilsson *et al.*, 1989; Jackson *et al.*, 1990). Ein weiteres Charakteristikum des Proteins stellt das RGDT-Motiv, As 95-98, das für die Verankerung von Zellen in der extrazellulären Matrix verantwortlich ist (Blumenberg *et al.*, 1988) und das Leucin-Zipper-Motiv „LLFAPALLLFVLANLGLLRTIL“, As 215-236 (Abel und Maniatis, 1989), dar. Nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982) wurden für das potentielle Not56 Protein sieben putative membranassoziierte Regionen bestimmt. Die ER Lokalisierung wurde immunohistochemisch mit Hilfe spezifischer Antikörper (AK) und Elektronenmikroskopie bestätigt (Kurzik-Dumke *et al.*, 1997b).

Eine Abfrage der European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Datenbank nach homologen Proteinsequenzen zu Not56 erbrachte 31% Identität mit dem Hefe ALG3 Protein (Obermaier *et al.*, 1995; Kurzik-Dumke *et al.*, 1997b), welches als Dol-P-Man:Man₅GlcNAc₂-PP-Dol-Mannosyltransferase im Glykosylierungsweg der Hefe wirkt (Robbins, 1994, Aebi *et al.*, 1996).

Das humane Homologe des Fliegen *l(2)not* Gens, *hnot*, wurde ebenfalls in der AG von Frau Kurzik-Dumke identifiziert (Kurzik-Dumke und Kaymer, 1996, NCBI Akz.: Y09022). Das humane NOT Protein zeigt 48.7% As-Sequenzidentität und 68.4% As-Sequenzähnlichkeit zum Not56 der Fliege (Kurzik-Dumke und Kaymer, 1996; Kaymer, 1997).

1.2 Stand der Forschung zur Funktion des humanen *not*-Gens

Die zellulären Funktionen der NOT Proteine sind bisher unbekannt. Inwiefern eine funktionelle Homologie zwischen dem *not*-Gen der Fliege, des Menschen und dem Hefe *ALG3*-Gen besteht, muss untersucht werden. Die wenigen aktuellen Befunde gehen davon aus, dass das humane *not*-Gen das Orthologe des *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) *ALG3*-Gens, einer Dol-P-Man:Man₅GlcNAc₂-PP-Dol-Mannosyltransferase, darstellt und mit der Pathogenese der *Congenital Disorder of Glycosylation, Type-Id* (CDG-Id / ALG3-CDG) assoziiert ist. Bei dem von Stibler *et al.* (1995) beschriebenen CDG Patienten haben Körner *et al.* (1999) im ALG3-Gen eine homozygote *Missense*-Mutation an nt-Position 353 des *not*-Gens identifiziert. Mittels der für das humane *not*-Gen kodierenden cDNA konnten die Forscher den Glykosylierungsdefekt im $\Delta alg3$ Hefestamm zu 7% komplementieren (Körner *et al.*, 1999). Bei einem weiteren Patienten wurde eine homozygote *Silent*-Mutation in Exon 1, nt-Position 165, des *not*-Gens nachgewiesen (Denecke *et al.*, 2004). Nach Denecke *et al.* führt die Sequenzveränderung zur Aktivierung einer verborgenen Spleißstelle. Durch den Spleißvorgang wird ein Stopcodon generiert was zu einem verkürzten Protein führt. Es konnte

gezeigt werden, dass die verkürzten *not*-Transkripte nicht vom *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) abgebaut werden (Denecke *et al.*, 2004; 2005). Bis heute wurde bei sieben weiteren Patienten ALG3-CDG diagnostiziert. Neben zwei weiteren homozygoten Missens-Mutationen des *not*-Gens an nt-Position 512 (Sun *et al.*, 2005) und 796 (Schollen *et al.*, 2005) wurden drei Fälle von *Compound*-Heterozygotie beschrieben (Kranz *et al.*, 2007; Rimella-Le-Huu *et al.*, 2008; Riess *et al.*, 2013). Die bisherigen Befunde zur Mutationen im *not/ALG3*-Gen bei CDG Patienten sind in der Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1 Übersicht über die bisher identifizierten Mutationen im *not/ALG3* Gen bei CDG Patienten

Referenz	Geschlecht	Alter	Art der Mutation	Position <i>not</i> -1	
				nt	As
Stibler <i>et al.</i> , 1995 Körner <i>et al.</i> , 1999	männlich	1 Jahr 5 Jahre	<i>missense</i> / homozygot	G353A	G118D
Denecke <i>et al.</i> , 2004; 2005*	männlich	6 Jahre	<i>silent</i> / homozygot	C165T	G55G
Sun <i>et al.</i> , 2005	weiblich	19 Tage †	<i>missense</i> / homozygot	G512A	R171Q
Schollen <i>et al.</i> , 2005	weiblich	4 Jahre	<i>missense</i> / homozygot	C796T	R266C
Kranz <i>et al.</i> , 2007	männlich	9 Jahre	<i>missense</i> /	T211C	W71R
	weiblich	7 Jahre	komplex heterozygot	T470A	M157K
Rimella-Le-Huu <i>et al.</i> , 2008	männlich	5 Jahre	<i>missense</i> /	C116T	P39L
			komplex heterozygot	G512A	R171Q
Riess <i>et al.</i> , 2013	männlich	21 Jahre	<i>missense</i> /	T206C	I69T
	weiblich	15 Jahre	komplex heterozygot	T626C	M209T

Durch Klonierung der humanen *not*-cDNA in lentivirale Vektoren und Transfektion in Patienten Fibroblasten konnten Sun *et al.* (2005) und Kranz *et al.* (2007) den Glykosylierungsdefekt beheben.

Inwiefern das NOT Protein tatsächlich die Funktion des Hefe ALG3 Proteins ausübt (Körner *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2005; Kranz *et al.*, 2007) und an der Entstehung von CDG beteiligt ist, muss durch fundierte, statistisch abgesicherte klinische Studien und funktionelle Analysen des Proteins bewiesen werden. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu betonen, dass das *Drosophila* Not56 Protein die ALG-3 Funktion in den defizienten Hefe-Mutanten nicht komplementiert (Kurzik-Dumke, persönliche Mitteilung).

2. Ziel der Arbeit

Wie in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei den *not*-Genen der Fliege und des Menschen um Neuentdeckungen der AG Kurzik-Dumke. Zum Zeitpunkt des Beginns meiner Doktorarbeit war die Struktur der *not*-Gene der Fliege und des Menschen etabliert und die durch sie kodierten Transkripte wurden identifiziert. Des Weiteren war bekannt, dass das *Drosophila* NOT Protein am ER lokalisiert ist. Die Sequenzanalysen zeigten, dass es eine 31% ige Homologie zum Hefe *ALG3* Gen aufweist. Das *ALG3* der Hefe war bekannt als eine Dol-P-Man:Man₅GlcNAc₂-PP-Dol-Mannosyltransferase, die in der N-Glykosylierung wirkt. Zur Identifizierung, subzellulären Lokalisierung und biologischen Rolle der NOT Proteine der Fliege und des Menschen gab es keine Hinweise.

Das Ziel meiner Doktorarbeit war es daher zuerst die Proteine, die durch das humane *not*-Gen kodiert werden zu identifizieren und zu lokalisieren. Den Schwerpunkt der Arbeit bildete die Identifizierung der molekularen Liganden der NOT Proteine. Dadurch sollte der erste essentielle Beitrag im Kontext der Aufklärung der zellulären Funktionen des *not*-Gens erbracht werden. Einen weiteren Schwerpunkt meiner Doktorarbeit stellt die Kartierung der Interaktionsdomänen einiger der identifizierten NOT-Bindungspartner - Synaptophysin-Like Protein 1 (SYPL1), Prolow-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1), Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein A (VAPA), Homo Sapiens FK506 Binding Protein 8, 38kDa (FKBP8), Oxysterol Binding Protein 1 (OSBP), Oxysterol Binding Protein-Like 9 (OSBPL9), Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein 3 (CREB3) - und die Bestätigung der Interaktionen *in vivo* mittels Ko-Immunpräzipitation dar. Auf Grund der bekannten Funktionen der *in vivo* als NOT-Interaktionspartner bestätigten Proteinen, werden Hypothesen zur putativen Rolle der NOT Proteine diskutiert.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Firmenverzeichnis

Firma	Stadt	Land
Abcam plc.	Cambridge	England
Abnova Corp.	Taipeh	Taiwan
Active Motif	La Hulpe	Belgien
Adobe Systems GmbH	München	Deutschland
Antikörper-Online GmbH	Aachen	Deutschland
AppliChem GmbH	Darmstadt	Deutschland
ATG:biosynthetics GmbH	Merzhausen	Deutschland
BD Becton Dickinson GmbH	Heidelberg	Deutschland
Binder GmbH	Tuttlingen	Deutschland
Biochrom GmbH	Berlin	Deutschland
Biometra GmbH	Göttingen	Deutschland
Bio-Rad Laboratories GmbH	München	Deutschland
Biostep GmbH	Jahnsdorf	Deutschland
BioTek Germany	Bad Friedrichshall	Deutschland
Biotrend Chemikalien GmbH	Köln	Deutschland
Brand GmbH + Co. KG,	Wertheim	Deutschland
B. Braun Melsungen AG	Melsungen	Deutschland
Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe	Deutschland
Clontech Laboratories GmbH	Heidelberg	Deutschland
CLS Cell Lines Service GmbH	Eppelheim	Deutschland
Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Ernst Leitz GmbH	Wetzlar	Deutschland
Faster GmbH	Ferrara	Italien
Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Buchs	Schweiz
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg	Deutschland
GENTERprise GmbH	Mainz	Deutschland
Geospiza, Inc.	Seattle	USA

Gibco BRL Life Technology, Inc.	Gaithersburg	USA
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach	Deutschland
Heraeus Holding GmbH	Hanau	Deutschland
Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen	Deutschland
Hofer, Inc.	Holliston	USA
IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG	Staufen	Deutschland
INTEGRA Biosciences AG	Zizers	Schweiz
Julabo GmbH	Seelbach	Deutschland
Kern & Sohn GmbH	Balingen	Deutschland
Kontes Glass Co	Vineland	USA
Köttermann GmbH & Co. KG Labortechnik	Uetze	Deutschland
Labotec Labortechnik Vertriebs GmbH	Wiesbaden	Deutschland
LabVelocity, Inc.	Burlingame	USA
Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Braunschweig	Deutschland
LGC Standards GmbH	Wesel	Deutschland
Life Technologies GmbH	Darmstadt	Deutschland
Linde AG	Wiesbaden	Deutschland
LKB Biochrom Ltd.	Cambridge	England
LKB-Produkte AB	Stockholm	Schweden
Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Mettler-Toledo GmbH	Greifensee	Schweiz
Microsoft Deutschland GmbH	Bad Homburg	Deutschland
Millipore GmbH	Schwalbach	Deutschland
Olympus America, Inc.	Center Valley	USA
Panasonic	Hamburg	Deutschland
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda Königshofen	Deutschland
PrimerDigital Ltd.	Helsinki	Finnland
Proteintech Group, Inc.	Chicago	USA
Quanta BioSciences, Inc.	Gaithersburg	USA
Qiagen GmbH	Hilden	Deutschland
Roche Diagnostics	Mannheim	Deutschland

Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg	Deutschland
Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht	Deutschland
Sartorius AG	Göttingen	Deutschland
Schleicher & Schüll GmbH	Dassel	Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen	Deutschland
Sigma-Genosys	Steinheim	Deutschland
Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode	Deutschland
Source BioScience LifeSciences	Nottingham	England
Starlab GmbH	Ahrensburg	Deutschland
Stratagene	La Jolla	USA
Stuart Scientific	Surrey	USA
Systec GmbH	Wettenberg	Deutschland
Thermo Fisher Scientific, Inc.	St. Leon-Roth	Deutschland
TPP Techno Plastic Products AG	Trasadingen	Schweiz
Vetter GmbH	Wiesloch	Deutschland
VWR International GmbH	Darmstadt	Deutschland
VWR International GmbH - PEQLAB	Erlangen	Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma
<i>Combitips Plus</i> 5ml, 10ml	Eppendorf
<i>Dounce Homogenizer</i> (2ml), Pestil B	Kontes Glass
Erlenmeyerkolben	VWR
Einmal-Küvetten	Brand
Einmalspritzen 10ml	B. Braun
Entsorgungsbeutel	Carl Roth
Gefrierbehälter, Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific
Glasperlen, Säure behandelt	Sigma-Aldrich
Kryoröhrchen	TPP
Membranfilter 0.2µm, 0.45µm	Schleicher & Schüll
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld
serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Greiner Bio-One

Platinöse	VWR
Parafilm® M	Carl Roth
Pasteurpipetten	Carl Roth
Petrischalen mit Nocken Ø 90mm, Ø140mm	VWR
Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl	Starlab
Polypropylene Säulen (5 ml)	Qiagen
PP-Röhrchen	Greiner Bio-One
Quarzküvette	VWR
Reaktionsgefäße 0.2ml, 1.5ml, 2ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße 2ml	Greiner Bio-One
Roti®-PVDF	Carl Roth
Untersuchungshandschuhe, Nitril	VWR
UVette	Eppendorf
96 Well Platten (MaxiSorp)	Thermo Fisher Scientific
Whatman™ 3MM Chromatographie Papier	Thermo Fisher Scientific
Whatman Filterpapier 3MM	Labotec Labortechnik
Zellkulturflaschen (75cm ²)	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten (6 Well, 24 Well)	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten (96 Well)	Sarstedt
Zellkulturschalen (143cm ²)	Greiner Bio-One
Zellspachtel	TPP
Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml	Greiner Bio-One

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Agar-Agar	Carl Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth
6-Aminohexansäure	Carl Roth
Amitrol (3-AT)	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
<i>Biofreeze</i> (Einfriermedium)	Biochrom
<i>Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>	Bio-Rad

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Brillant Blau R 250	Carl Roth
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Carl Roth
1-Butanol	Carl Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth
<i>CNBr Activated Sepharose</i> [®] 4B	GE Healthcare
Desoxy-Nukleotidtriphosphat-Mix (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific
Diethanolamin	Sigma-Aldrich
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i> (DMEM F-12)	Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS)	Sigma-Aldrich
Essigsäure 100%	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethanol absolut / vergällt	Carl Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth
fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Harnstoff	Carl Roth
Hefeextrakt	Carl Roth
<i>Herring testes carrier DNA</i>	Clontech
Kaliumacetat	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Lithiumacetat-Dihydrat	AppliChem
Lithiumchlorid (LiCl)	Carl Roth
<i>6x Loading Dye</i>	Thermo Fisher Scientific
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Carl Roth

Magnesiumsulfat Heptahydrat	Carl Roth
MEM (Eagle) Flüssigmedien	Biochrom
MEM Non-essential Amino Acid Solution	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth
MOPS	Carl Roth
Natriumacetat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth
Natriumpyruvat Lösung	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
Ni-NTA Agarose	Qiagen
<i>Nitroblue tetrazolium chloride</i> (NBT)	Sigma-Aldrich
4-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma-Aldrich
Phenol-Chloroform	Fluka
Polyethyleneglycol wt 3.350 (PEG)	Sigma-Aldrich
2-Propanol	Carl Roth
Pufferlösung pH 4,00	Carl Roth
Pufferlösung pH 7,00	Carl Roth
Pufferlösung pH 9,00	Carl Roth
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich
Rubidiumchlorid	Carl Roth
Salzsäure rauchend 37 % (HCl)	Carl Roth
SDS ultra pure (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth
Stickstoff, flüssig	Linde
TEMED p.a.	Carl Roth
Trichloressigsäure	Merck
Trichlormethan / Chloroform	Carl Roth
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth
TRIS	Carl Roth

Triton X100	Merck
Tropix® I-Block™	Life Technologies
Trypan Blue Solution, 0.4%	Life Technologies
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth
Trypsin	Sigma-Aldrich
Tween 20	Carl Roth
<i>Ultra pure water, steril, HPLC geeignet</i>	Biochrom
<i>Yeast Nitrogene Base w/o Amino Acids</i>	BD
5-Brom-4-chlor-3-indolyl α -D-galactopyranosid	Sigma-Aldrich
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid	VWR

3.1.4 Geräte

3.1.4.1 Zentrifugen

Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf
Tischkühlzentrifuge 5702	Eppendorf
Tischkühlzentrifuge 3K20	Sigma Laborzentrifugen
Tischzentrifuge Mikro Rapid/K	Hettich
Universal 30RF	Hettich

3.1.4.2 Waagen

Analytische Waage A120S	Sartorius
Präzisionswaage 510-37	Kern & Sohn

3.1.4.3 Photometer

Bio Photometer	Eppendorf
Novaspec Spectrophotometer 4049	LKB Biochrom

3.1.4.4 Wasserbäder

Julabo Umwälzthermostat P	Julabo
2219 Multitemp II – Thermostatic Circulator	LKB-Produkte AB
Schüttelwasserbad 3047	Köttermann

3.1.4.5 Elektrophorese- und Western Blot Zubehör

Gel-Dokumentationsanlage	Biostep
Hoefler Semiphor Electrophoresis Blotter TE-70	Hoefler
Horizontal Gel Electrophoresis System Horizon 11.14	Gibco BRL Life Technology
SE250 Mighty Small II Mini Vertical Electrophoresis Unit	Hoefler
StarPhoresis Horizontal Gel Systems	Starlab
Stromversorgung PS300B	Hoefler
Stromversorgung Power Pack P25	Biometra
UV-Tisch, Chroma 41	Vetter

3.1.4.6 Heizblöcke, Magnetrührer

Heizblock SHT 100D	Stuart Scientific
Trockenblockthermostat	VWR
Magnetrührer Ikamag RCT	IKA [®] -Werke
Magnetrührer yellowMAG MS7	IKA [®] -Werke

3.1.4.7 Schüttler

Inkubations-Tischschüttler Certomat IS	Sartorius
MaxQ™ 4000 Tischorbitalschüttler	Thermo Fisher Scientific
Reax 2000 Schüttelmaschine	Heidolph Instruments
Tischschüttler HS 501 digital	IKA [®] -Werke
Über-Kopf-Schüttler Reax2	Heidolph Instruments

3.1.4.8 Pipetten

Finnpipette™ F1	Thermo Fisher Scientific
MicroOne® 12 Kanal	Starlab
Multipette® plus	Eppendorf
Research variable	Eppendorf

3.1.4.9 Thermocycler

Mastercycler gradient 5531	Eppendorf
UnoCycler	VWR

3.1.4.10 Mikroskope

BHMJL Wafer Inspektions Mikroskop	Olympus
Olympus IX70 Inverses Mikroskop	Olympus
Leitz Ortholux Mikroskop	Ernst Leitz

3.1.4.11 Brutschränke, Sterilbänke

Brutschrank KBW 720	Binder
CO ₂ Inkubator Heraeus BB15	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank Lamin Air HLP 2472 GS	Heraeus
Antair Laminarflow/Sicherheitswerkbank BSK 6MP	Faster GmbH

3.1.4.12 Sonstige

Autoklav Systec V-150	Systec
Elisa-Reader, µQuant	BioTek
FE20 – FiveEasy™ pH	Mettler-Toledo
Gefrierbehälter Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific
Mikrowelle NN-SD456W	Panasonic
Pharmacia Peristaltic Pump P-3	GE Healthcare
Pipetboy	INTEGRA
Roller Mixer SRT6	VWR
Synergy Ultrapure Water Systems	Millipore
Trockenschrank UT 6420	Heraeus
Vortex Mixer Stirrer IKA VF2	IKA® -Werke

3.1.5 Computerprogramme, Server und Datenbanken

Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems
Compute pi/Mw	http://web.expasy.org/compute_pi/
ELM Datenbank	http://elm.eu.org/
FastPCR	PrimerDigital
FinchTV Version 1.4.0	Geospiza
Gen5™ Datenanalyse-Software	BioTek
HMMTOP	http://www.enzim.hu/hmmtop/html/adv_submit.html

Hum-mPLoc 2.0	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/hum-multi-2/
Jellyfish Version 1.5	LabVelocity
MEMSAT3 MEMSATSVMSVM	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?memsatsvm=1
MemPype	http://mu2py.biocomp.unibo.it/mempype/default/predict
MINNOU	http://minnou.cchmc.org/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Phobius	http://phobius.sbc.su.se/
PolyPhobius	http://phobius.sbc.su.se/poly.html
PrediSi	http://www.predisi.de/
Protter	http://wlab.ethz.ch/protter/start/
SPEPLip	http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/spep/pred_spep.cgi
SignalP 4.1 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Signal-BLAST	http://sigpep.services.came.sbg.ac.at/signalblast.html
SOSUISignal	http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html
SPARKS ^X	http://sparkslab.org/yueyang/server/SPARKS-X/
SPLIT 4.0	http://split4.pmfst.hr/split/4/
SubCellProt	http://www.databases.niper.ac.in/SubCellProt/
TMHMM Server v. 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
TMpred	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
TOPCONS	http://topcons.cbr.su.se/
TOPO2	http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py
Unipep	http://www.unipep.org/
UniProt	http://www.uniprot.org/
Word 2007	Microsoft

3.1.6 Verwendete Kits

Kit	Firma
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Effectene Transfection Reagent Kit	Qiagen
GenElute™ Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich

GenElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich
Immunoprecipitation Kits Protein A and G	Roche Diagnostics
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB
Qproteome Cell Compartment Kit	Qiagen

3.1.7 Größenstandards

Alle Größenstandards wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific, Inc. gekauft.

Größenstandard	Größenbereich
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	100 – 3000 bp
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	250 – 10000 bp
PageRuler Prestained Protein Ladder	10 – 170 kDa

3.1.8 Enzyme

Die folgenden Enzyme wurden alle, wenn nicht extra erwähnt, bei der Firma Thermo Fisher Scientific, Inc. gekauft und ausschließlich im vorgeschriebenen Puffersystem verwendet.

3.1.8.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz	Reaktions-Puffer	Inkubations-temperatur	thermale Inaktivierung
BamHI	5'-G [^] GATCC-3'	BamHI	37°C	20 min, 80°C
EcoRI	5'-G [^] AATTC-3'	EcoRI	37°C	20 min, 65°C
Cfr9I (XmaI)	5'-C [^] CCGGG-3'	Cfr9I	37°C	20 min, 65°C
NcoI	5'-C [^] CATGG-3'	Tango™	37°C	20 min, 65°C
SacI	5'-GAGCT [^] C-3'	SacI	37°C	20 min, 65°C
SmaI	5'-CCC [^] GGG-3'	Tango™	30°C	20 min, 65°C
XhoI	5'-C [^] TCGAG-3'	Red	37°C	20 min, 80°C

3.1.8.2 Modifizierende Enzyme

Enzym	Anwendung
AccuStart™ II PCR SuperMix (Quanta BioSciences)	Amplifizierung von DNA Fragmenten (Hot Start Polymerase)

Klenow Fragment	- auffüllen von überstehenden, einzelsträngigen DNA-Sequenzen / 5'→3' Polymerase - Abbau von überstehenden, einzelsträngigen DNA-Sequenzen / 3'→5' Exonuklease
RNase A/T1 Mix	Spaltung von RNA Einzelsträngen
T4 DNA Ligase	Verknüpfung von DNA Strängen
Tag-DNA Polymerase	Amplifizierung von DNA Fragmenten
Thermosensitive Alkaline Phosphatase (FastAP)	Dephosphorylierung von DNA, RNA, Nukleotiden und Proteinen
TripleMaster® PCR System (Eppendorf)	Amplifizierung von DNA Fragmenten

3.1.9 Antibiotika

Zur Herstellung der Ampicillin- und Kanamycin Stammlösung wurden die Antibiotika in zweifach destilliertem H₂O gelöst und steril filtriert (0.22µm Filter). Die Lagerung der Stammlösung erfolgte bei -20°C. Die Stammlösungen der Antibiotika G 418-BC und des Penicillin-Streptomycin Mixes wurden gebrauchsfertig gekauft und bei +4°C gelagert. In der Tab. 2 sind die Konzentrationen der Stammlösungen und die Endkonzentration im Medium aufgeführt.

Tab. 2 Antibiotikastammlösungen und Endkonzentration im Medium

Antibiotika	Stammlösung	Enkonzentration im Medium	Firma
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	Carl Roth
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	Carl Roth
G 418-BC	50 mg/ml	800 µg/ml	Biochrom
Penicillin-Streptomycin	100x	1%	Sigma-Aldrich

3.1.10 Antikörper

In der Tab. 3 sind die für die Analysen eingesetzten Antikörper aufgeführt.

Tab. 3 **Verwendete Antikörper**

Antikörper	Verdünnung / Einsatz	Herkunft (Artikel-Nr.)
primäre Antikörper		
anti-Actin ¹	1:200	Sigma-Aldrich (A5060)
anti-ALG3 ¹	1:500	Abnova (PAB24386)
anti-CREB3 ¹	1:1200	Abnova (H00010488-D01P)
anti-CREB3 ²	2µg/ml	Abnova (H00010488-M01)
anti-FKBP8 (C-10) ²	1:100	Santa Cruz (sc-166607)
anti-FKBP8 ³	5µg/ml	Sigma-Aldrich (SAB1407248)
anti-GAL4-AD ¹	0,4µg/ml	Sigma-Aldrich (G9293)
anti-GAL4 DNA-BD ¹	1µg/ml	Sigma-Aldrich (G3042)
anti-GFP ²	1:1000	Roche Diagnostics (11814460001)
anti-GST ¹	1:2000	Sigma (G7781)
anti-NOT 1 ^{b1}	1µg/ml	⁶ Kurzik-Dumke, U.
anti-NOT 1/4 ¹	1µg/ml	⁶ Kurzik-Dumke, U.
anti-NOT 4 ¹	1µg/ml	⁶ Kurzik-Dumke, U.
anti-Human IgG ¹	1µg/ml	Sigma-Aldrich (I8635)
Human IgG		Sigma-Aldrich (I2511)
anti-LRP1 ⁴	1/20000	Abcam (ab92544)
anti-ORP-9 (H-18) ¹	1:200	Santa Cruz (sc-102050)
anti-OSBPL9 ¹	1:500	Antikörper-Online (ABIN1013879)
anti-OSBP (A-5) ²	1:100	Santa Cruz (sc-365771)
anti-OSBP ¹	1:800	Proteintech (11096-1-AP)
anti-SYPL1 ¹	2µg/ml	Sigma-Aldrich (SAB3500080)
anti-TBP ²	1µg/ml	Abcam (ab51841)
anti-VAPA ¹	1:1000	Abnova (H00009218-D01)
anti-VAPA ³	0,5µg/ml	Sigma-Aldrich (SAB1406797)
sekundäre Antikörper		
anti-Human IgG,	1:5000	Sigma-Aldrich (A9544)

(Fc spezifisch), AP ⁵		
anti-Kaninchen-IgG, AP ⁵	1:5000	Sigma-Aldrich (A3687)
anti-Maus-IgG, AP ⁵	1:5000	Sigma-Aldrich (A3562)

¹: Kaninchen, polyklonal; ²: Maus, monoklonal; ³: Maus, polyklonal; ⁴: Kaninchen, monoklonal; ⁵: Ziege, polyklonal; ⁶: Die NOT spezifischen AKs wurden gegen diverse, durch Frau Ursula Kurzik-Dumke designte NOT-Polypeptide, generiert und zur Verfügung gestellt.

Die Immunisierung der Kaninchen wurde durch die Firma Biotrend Chemikalien GmbH durchgeführt. Die Aufreinigung der NOT AKs erfolgte mittels in der AG Kurzik-Dumke etablierten affinitätschromatographischen Verfahren (s. Punkt 3.2.3.2).

3.1.11 Rekombinante Proteine

Die unten aufgeführten rekombinanten Proteine wurden ausschließlich von der Firma Abnova bezogen.

Protein	Beschreibung	Katalog-Nr.
ALG3 (Human)	<i>Full-Length</i> ORF (NP_005778.1, As 1-438), GST-Tag am N-Terminus	H00010195-P01
CREB3 (Human)	<i>Full-Length</i> ORF (AAH09402.1, As 1-371), GST-Tag am N-Terminus	H00010488-P01

3.1.12 Oligonukleotide

Die in der Tab. 4 aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys synthetisiert, in sterilem, zweifach destilliertem H₂O gelöst und auf eine Endkonzentration von 10pmol/μl eingestellt. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind fett und Stopcodons kursiv dargestellt. Die in den Sequenzen unterstrichenen Nukleotide wurden zwecks Erhöhung der Reskriktionseffizienz angefügt. Die hochgestellten Zahlen geben die Position in der kodierenden Gensequenz in Bezug auf die angegebene Referenz/Akzessionsnummer (Akz.) an. Änderungen innerhalb der originalen Gensequenz zur Modifizierung der Primereigenschaften sind in Klammern dargestellt.

Tab. 4 Für die PCR eingesetzten Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5' → 3') / Position in der Gensequenz (nt)	Akz.
Amplifizierung und Sequenzierung der <i>Not</i> Fragmente/Konstrukte		
C0FI	<u>TCGAATTC</u> ⁻¹⁵ GGCACGAGGGTTAAGATG ³	Y09022
C0FIII	<u>TCGAATTC</u> ⁻¹¹ CGAGGGTTAAGATGGCGG ⁷	Y09022
C5FI	<u>TCGAATTC</u> ³²⁵ ATGGGGTTGTACTATGCCA ³⁴³	Y09022
C6FI	<u>TCGAATTC</u> ⁹⁷⁰ TCCAAAAGGAAGGTTCCAC ⁹⁸⁸	Y09022
C7FI	<u>TCGAATTC</u> ¹¹⁴¹ ACACACCTGCTCAGGTTG ¹¹⁵⁸	Y09022
C3RI	<u>TAGGATCC</u> ⁸⁴⁰ TGGGAGGAAGCGCCAGTT ⁸²³	Y09022
C4RI	<u>TAGGATCC</u> ⁷²³ AAGGCCAGCACAGATTCC ⁷⁰⁶	Y09022
C5RII	<u>TAGGATCC</u> ⁵⁹⁹ AAGCAGCAGCCCCAGCC ⁵⁸³	Y09022
C6RII	<u>TAGGATCC</u> ⁴⁴⁷ TACCTTGCAGGTCTGGTG ⁴³⁰	Y09022
C7RI	<u>TAGGATCC</u> ³²² AGATGTACACGAAACCAGC ³⁰⁴	Y09022
C8RI	<u>TAGGATCC</u> ⁵³³ GCCACTGGGTCATTGAAG ⁵¹⁶	Y09022
C9RI	<u>TAGGATCC</u> ⁺³⁶ AGGGTAGACTCAGGTCCT ⁺¹⁹	Y09022
C10RI	<u>TAGGATCC</u> ²²³ TGTAGGCCTTCCAGTCAAT ²⁰⁵	Y09022
C13RI	<u>TCACTCGAG</u> ¹³¹⁷ <i>TCAGTGGGCTTTCTTGCTG</i> ¹²⁹⁹	Y09022
hnots-2	⁹⁹⁰ CCAGCCCCTTACACCCAAC ¹⁰⁰⁸	Y09022
DGhsnot1fp1	⁴⁷ AGGCAGAGGGACTCTGCAAG ⁶⁶	Y09022
DGHSNOTfp6	²⁰⁰ CAGAGATTGACTGGAAGGCCTAC ²²²	Y09022
DGHSNOTfp7	⁷⁴² CCCTTCCTGCTGGAGAACC ⁷⁶⁰	Y09022
DGhsnot1rp2	⁵⁵⁸ GATACTGAGGAAGAGCAGCACC ⁵³⁷	Y09022
DGhsnotrp3	¹³¹⁷ <i>TCAGTGGGCTTTCTTGCTGTGTTG</i> ¹²⁹⁴	Y09022
DGHsnotRP4	³⁹¹ GCACAGCAAAGATGTTCTG ³⁷³	Y09022
DGhsnotRP7	⁸⁹⁴ GAGGTGGGCAGTCAACAGGG ⁸⁷⁵	Y09022
Amplifizierung und Sequenzierung der <i>CREB3</i> Fragmente/Konstrukte		
CREB3FI	<u>TCGAATTC</u> ⁻² AAATGGAGCTGGAATTGG ¹⁶	BC009402
CREB3FII	<u>TCGAATTC</u> ⁴⁶¹ TGCGGAGGAAGATTCGAA ⁴⁷⁸	BC009402
CREB3FIII	<u>TCGAATTC</u> ⁷⁴⁰ ACTCCTCTGACACAAGG ⁷⁵⁶	BC009402
CREB3FIV	<u>TCGAATTC</u> ⁹⁴⁴ TGCCTCA(A)GCTCCCAGT ⁹⁶⁰	BC009402
CREB3FVI	<u>TCGAATTC</u> ²⁷⁵ TAGAGAGTGAGAGCTGTA ²⁹²	BC009402
CREB3RI	<u>TCACTCGAG</u> ⁺² ATCTAGCCTGAGTATCTG ¹¹⁰¹	BC009402
CREB3RII	<u>TCACTCGAG</u> ⁶⁹² ATGCAGGTGCTGCTGCT ⁶⁷⁶	BC009402
CREB3RIII	<u>TCACTCGAG</u> ⁴⁶² CACACGTTTCAGAATTTGT ⁴⁴⁴	BC009402
CREB3RIV	<u>TCACTCGAG</u> ⁹⁴⁵ CATGTAATGCAGCAGGCA ⁹²⁸	BC009402

Amplifizierung und Sequenzierung der <i>FKBP8</i> Fragmente/Konstrukte		
FK506bP8FI	<u>TTGGATCC</u> ⁻² TAATGGCATCGTGTGCTGAACCC ²¹	NM_012181
FK506bP8FII	⁶¹⁰ GCTGTGGACGGGCTGACCT ⁶²⁹	NM_012181
FK506bP8RI	<u>CCGAATTC</u> ¹²⁴² TCAGTTCCTGGCAGCGATGAC ¹²²²	NM_012181
FK506bP8RII	⁶³³ CTCCAGGTCAGGCCCGTCCA ⁶¹⁴	NM_012181
Amplifizierung und Sequenzierung der <i>LRP1</i> Fragmente/Konstrukte		
LRP1 HFI	<u>ATGAATTC</u> ¹³²⁵⁶ GACATATAGCCTCCATCCTA ¹³²⁷⁵	NM_002332
LRP1 HFII	<u>ATGAATTC</u> ¹³³³¹ ATAAGCGGCGAGTCCAAG ¹³³⁴⁸	NM_002332
LRP1HRI	<u>TCACTCGAG</u> ¹³³³² ATACCAGAATACCACTCCGG ¹³³¹³	NM_002332
LRP1HRIII	<u>TCACTCGAG</u> ¹³⁵⁰³ GTTGGTGGGCTTGTGAG ¹³⁴⁸⁶	NM_002332
Amplifizierung und Sequenzierung der <i>OSBP</i> Fragmente/Konstrukte		
OSBPF1	<u>TGATCCATGGGGATCC</u> ⁻² TCATGGCGGCGACGGAG ¹⁵	NM_002556
OSBPF2	<u>TGATCCATGG</u> ¹⁴²² TCCCGGGTTATGTTGCAGCTTTCACCGT ¹⁴⁴²	NM_002556
OSBPFII	<u>TGGCCATGG</u> ⁻² TCATGGCGGCGACGGAG ¹⁵	NM_002556
OSBPR1	<u>ATAGAGCTCGAATTC</u> ⁵⁸⁵ ATCTCCTGATTCATCTGACTC ⁵⁶⁵	NM_002556
OSBPR2	<u>TGATCTCGAGGGATCC</u> ⁺⁷ TGCCGTTTCAGAAAATGTCC ²⁴¹²	NM_002556
OSBPRIV	<u>TCGGATCCTCA</u> ⁹⁷⁸ CGTGGCTCCTCGGAAGG ⁹⁶²	NM_002556
Amplifizierung und Sequenzierung der <i>OSBPL9</i> Fragmente/Konstrukte		
OSBPL9F1	<u>TGATCCCGGGTAGAATTC</u> ¹⁰³⁴ GAAATAGTCTAAAACGCCCA ¹⁰⁵³	EAX06812
OSBPL9RI	<u>TCACTCGAG</u> ²²⁶⁵ CTAATGCTTGGCAGCACC ²²⁴⁸	EAX06812
Amplifizierung und Sequenzierung der <i>SYPL1</i> Fragmente/Konstrukte		
SYPL1FI	<u>ATACCCGGG</u> ⁻¹ TATGGCGCCCAACATCTAC ¹⁸	NM_006754
SYPL1FII	<u>ATACCCGGG</u> ⁹⁹ CGGCTTCATCAAGGTCCTC ¹¹⁷	NM_006754
SYPL1FIII	<u>ATACCCGGG</u> ¹⁶² TAAGGGCCAAACAGAAATTCA ¹⁸²	NM_006754
SYPL1FIV	<u>ATACCCGGG</u> ³⁴⁸ ATTCTATGTTACCTTTGCAGTC ³⁶⁹	NM_006754
SYPL1FV	<u>ATACCCGGG</u> ⁴¹¹ TGGCTACACGAGTCTGTAT ⁴²⁹	NM_006754
SYPL1FVI	<u>ATACCCGGG</u> ⁴⁵⁰ TATGATAGACTTTGTTGTTACAC ⁴⁷²	NM_006754
SYPL1FVII	<u>ATACCCGGG</u> ⁵¹³ GGCTAAAGCTCTGACAGATA ⁵³²	NM_006754
SYPL1FVIII	<u>ATACCCGGG</u> ⁶³⁶ TGTATCTGTGATATTTGGCTTT ⁶⁵⁷	NM_006754
SYPL1FIX	<u>ATACCCGGG</u> ⁶⁹⁹ CAAGGAGACCAGCCTACAC ⁷¹⁷	NM_006754
SYPL1RI	<u>ATGAGCTC</u> ⁷⁸⁰ TTATATTCCGGTAGGAGGTG ⁷⁶¹	NM_006754
SYPL1RII	<u>ATGAGCTC</u> ¹⁶² AAAACCTCCACAGGTGGC ¹⁴⁵	NM_006754
SYPL1RIII	<u>ATGAGCTC</u> ³⁴⁸ TTGTGCAGAAGAAGAGTAATC ³²⁸	NM_006754
SYPL1RIV	<u>ATGAGCTC</u> ⁵¹³ CCAGGCTGAAGTGCTCAC ⁴⁹⁶	NM_006754
SYPL1RV	<u>ATGAGCTC</u> ⁶³⁶ ATTTAGGGATCCCATACTGG ⁶¹⁷	NM_006754
SYPL1RVI	<u>ATGAGCTC</u> ⁶⁹⁹ GTACACAAACCAAGCATTTC ⁶⁷⁹	NM_006754

Amplifizierung/Sequenzierung der isolierten cDNAs		
5'AD-LD-Insert	⁵¹²² CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC ⁵⁰⁹¹	U29899
3'AD-LD-Insert	⁴⁹⁴⁵ GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT ⁴⁹⁷⁶	U29899
Sequenzierung		
GAL-BD	⁵⁸⁹⁷ TCGGAAGAGAGTAGTAA ⁵⁹¹³	U30497
GAL-AD	⁵¹⁵³ TACCACTACAATGGAT ⁵¹³⁷	U29899
M13For	³⁰⁶ GTAAAACGACGGCCAGT ²⁹⁰	M77789
M13Rev	²⁰⁴ CAGGAAACAGCTATGAC ²²⁰	M77789

3.1.13 cDNA-Klone

Die unten aufgeführten cDNA-Klone wurden ausschließlich von der Firma Source BioScience LifeSciences gekauft.

Name / Akz.:	Gen	Klonierungsvektor
IRAUp969D0822D / BC002839	ALG3	pOTB7
IRAUp969E0760D / BC009402	CREB3	pOTB7
IRAUp969D0560D / BC009966	FKBP8	pOTB7
IRAUp969H0566D / BC011581	OSBP	pOTB7
IRAUp969D0778D / BC025978	OSBPL9	pOTB7
IRATp970G1182D / BC061887	SYPL1	pCMV-SPORT6
IRAMp995K015Q / BC103955	TMC1	pCR-BluntII-TOPO
IRAUp969F0821D / BC002737	VAMP2	pOTB7

3.1.14 Genbibliothek

Für den Hefe Zwei-Hybrid (Y2H) *Screen* wurde die *Human Mammary Gland Matchmaker cDNA Library* (Clontech) verwendet.

Kat.-Nr.	Lot-Nr.	Titer	Klonierungsvektor	Klonierungsstelle
HL4036AH	3011042	$\geq 10^8$ cfu	pACT2	XhoI/EcoRI

3.1.15 Plasmide

Die Plasmide wurden alle von der Firma Clontech bezogen.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pAS2-1	Expressionsvektor: GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ -BD 5' der MCS, <i>TRP1</i> , Amp ^r , <i>CYH</i> ^{S2}	Harper <i>et al.</i> , 1993
pACT2	Expressionsvektor: GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD 5' der MCS, <i>LEU2</i> , Amp ^r , HA Epitop-Tag	Durfee <i>et al.</i> , 1993
pCL1	Wild-Typ <i>Full-Length</i> GAL4 Gen in einem YCp50 Derivat, <i>LEU2</i> , Amp ^r	Fields and Song, 1989
pEGFP-N3	Expressionsvektor: EGFP 3' der MCS, Kan ^r , Neo ^r	Cormack <i>et al.</i> , 1996

3.1.16 Plasmidkonstrukte

In den Tab. 5 und 6 sind die für die Bindungsstudien eingesetzten Plasmidkonstrukte aufgeführt.

Tab. 5 Eigens hergestellte Plasmidkonstrukte

Konstrukt	Proteinbereich (As)	Primer ¹	Klonierungsstelle (5'/3')	Akz.
pACT2-NOT-1	1-438	C0FIII/C13RI	EcoRI/BamHI	Y09022
pAS2-1-NOT-1	1-438	²	EcoRI/SmaI	Y09022
pAS2-1-NOT-2	1-323	³	BamHI-Religant	Y09022
pAS2-1-NOT-3	1-280	C0FI/C3RI	EcoRI/BamHI	Y09022
pAS2-1-NOT-4	1-241	C0FI/C4RI	EcoRI/BamHI	Y09022
pAS2-1-NOT-5	1-199	C0FI/C5RII	EcoRI/BamHI	Y09022
pAS2-1-NOT-6	1-149	C0FI/C6RII	EcoRI/BamHI	Y09022
pAS2-1-NOT-7	1-109	C0FI/C7RI	EcoRI/BamHI	Y09022
pAS2-1-NOT-8	109-177	C5FI/C8RI	EcoRI/BamHI	Y09022
pAS2-1-NOT-9	1-74	C0FI/C10RI	EcoRI/BamHI	Y09022
pAS2-1-NOT-10	178-438	³	NcoI-Religant	Y09022
pAS2-1-NOT-11	324-438	C6FI/C9RI	EcoRI/BamHI	Y09022
pAS2-1-NOT-12	381-438	C7FI/C9RI	EcoRI/BamHI	Y09022
pACT2-CREB3-1	93-117	⁴	EcoRI/XhoI	U88528

pACT2-CREB3-2	1-371	FI/RI	EcoRI/XhoI	BC009402
pACT2-CREB3-3	1-231	FI/RII	EcoRI/XhoI	BC009402
pACT2-CREB3-4	248-371	FIII/RI	EcoRI/XhoI	BC009402
pACT2-CREB3-5	1-154	FI/RIII	EcoRI/XhoI	BC009402
pACT2-CREB3-6	248-315	FIII/RIV	EcoRI/XhoI	BC009402
pACT2-CREB3-7	155-231	FII/RII	EcoRI/XhoI	BC009402
pACT2-CREB3-8	316-371	FIV/RI	EcoRI/XhoI	BC009402
pACT2-CREB3-9	155-315	FII/RIV	EcoRI/XhoI	BC009402
pACT2-CREB3-10	92-154	FVI/RIII	EcoRI/XhoI	BC009402
pACT2-FKBP8-1	1-413	FI/RI	BamHI/EcoRI	NM_012181
pACT2-FKBP8-6	93-340	FIII/6RI	BamHI/EcoRI	NM_012181
pATC2-LRP1-1	4420-4444	HFI/HRI	EcoRI/XhoI	NM_002332
pATC2-LRP1-2	4445-4501	HFII/HRIII	EcoRI/XhoI	NM_002332
pATC2-LRP1-3	4445-4544	⁴	EcoRI/XhoI	NM_002332
pATC2-OSBP-1	1-326	FII/RIV	NcoI/BamHI	NM_002556
pATC2-OSBP-2	475-807	F2/R2	NcoI/BamHI	NM_002556
pATC2-OSBP-3	1-195	F1/R1	BamHI/EcoRI	NM_002556
pATC2-OSBPL9-1	1-97	⁴	EcoRI/XhoI	EAX06812
pATC2-OSBPL9-2	346-754	F1/RI	EcoRI/XhoI	EAX06812
pACT2-SYPL1-1	1-259	FI/RI	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-2	34-259	FII/RI	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-3	55-259	FIII/RI	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-4	138-259	FV/RI	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-5	151-259	FVI/RI	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-6	172-259	FVII/RI	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-7	213-259	FVIII/RI	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-8	234-259	FIX/RI	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-9	1-54	FI/RII	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-10	55-116	FIII/RIII	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-11	117-171	FIV/RIV	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-12	172-212	FVII/RV	Cfr9I/SacI	NM_006754
pACT2-SYPL1-13	172-233	FVII/RVI	Cfr9I/SacI	NM_006754

¹: Die Sequenzen der Primer zur Amplifizierung der korrespondierenden cDNA-Fragmente aus den entsprechenden cDNA-Klonen (s. Punkt 3.1.13) sind in Punkt 3.1.12 dargestellt. ²: Zur Herstellung

des Konstruktes pAS2-1-NOT-1 wurde das cDNA-Fragment aus dem not56L_IRALp962-Klon (s. Punkt 3.1.13) mittels der Enzyme 5'-EcoRI und 3'-XhoI herausgeschnitten und nach Behandlung mit Klenow-Fragment in den Hefvektor pAS2-1 über die Schnittstellen 5'-EcoRI und 3'-SmaI inkloniert. ³: Die Deletionskonstrukte pAS2-1-NOT-2 und pAS2-1-NOT-10 wurden durch Restriktion und Religation des Konstruktes pAS2-1-NOT-1 hergestellt. ⁴: Die korrespondierenden Genabschnitte zur Herstellung der Konstrukte pACT2-CREB3-1, pATC2-LRP1-3 und pATC2-OSBPL9-1 wurden synthetisiert. Die Synthesen wurden bei der Firma ATG:biosynthetics GmbH in Auftrag gegeben.

Tab. 6 Zur Verfügung gestellte Plasmidkonstrukte

Konstrukt	Proteinbereich (As)	Referenz ¹
pACT2-FKBP8-2	1-92	Diplomarbeit, Niels van de Roemer, 2010
pACT2-FKBP8-3	1-255	Diplomarbeit, Niels van de Roemer, 2010
pACT2-FKBP8-4	341-413	Diplomarbeit, Niels van de Roemer, 2010
pACT2-FKBP8-5	1-306	Diplomarbeit, Niels van de Roemer, 2010
pACT2-VAPA-1	140-184	Bachelorarbeit, Hendrik Messal, 2010
pACT2-VAPA-2	1-249	Bachelorarbeit, Hendrik Messal, 2010
pACT2-VAPA-3	1-227	Bachelorarbeit, Hendrik Messal, 2010
pACT2-VAPA-4	1-131	Bachelorarbeit, Hendrik Messal, 2010
pACT2-VAPA-5	169-205	Bachelorarbeit, Hendrik Messal, 2010
pACT2-VAPA-6	227-249	Bachelorarbeit, Hendrik Messal, 2010
pACT2-VAPA-7	131-168	Bachelorarbeit, Hendrik Messal, 2010
pACT2-VAPA-8	204-249	Bachelorarbeit, Hendrik Messal, 2010
pACT2-CREB1	1-341	Doktorarbeit, Maciej Szydowski, 2011
pACT2-CREBL1	1-703	Doktorarbeit, Maciej Szydowski, 2011
pEGFP-N3-NOT-1	1-438	Diplomarbeit, Michael Döring, 2012
pEGFP-N3-CREB3	1-371	Diplomarbeit, Michael Döring, 2012
pACT2-p53	1-393	Clontech
pAS2-1-Ptc	1143-1286	Canamasas <i>et al.</i> , 2003
pACT-Tid	206-318	Canamasas <i>et al.</i> , 2003

¹: Alle Bachelor-, Diplom- und Doktorarbeiten wurden in der AG Kurzik-Dumke durchgeführt.

3.1.17 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme sind Derivate des *Escherichia coli* (*E. coli*) Stammes K12.

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ^-	Clontech
XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F ⁻ <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Z Δ M15Tn10(Tet ^r)]	Stratagene

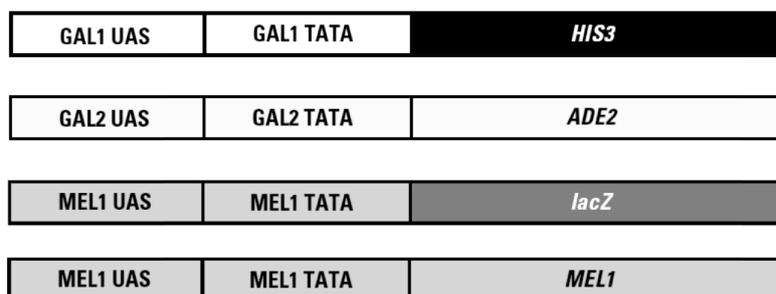
3.1.18 Hefestämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme gehören alle zur Spezies der Backhefe (*S. cerevisiae*).

Hefestamm	Genotyp	Herkunft
AH109	<i>MATα</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-</i> <i>GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	Clontech
Y187	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>met-</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Clontech

Für den Y2H *Screen* wurde der speziell hierfür entwickelte AH109-Stamm eingesetzt. Die vier Reportergene *HIS3*, *ADE2*, *MEL1* und *lacZ* stehen unter der Kontrolle von drei verschiedenen GAL4 UAS (*upstream activating sequences*) und TATA-Boxen (Abb. 3). Die Reportergene *ADE2* und *HIS3* ermöglichen eine Nährselektion mit mittlerer- und hoher Stringenz zur Reduzierung der falsch positiven Klone (James *et al.*, 1996). Die Gene *MEL1* und *lacZ* stehen unter der Kontrolle des gleichen GAL4 Promoters, wobei *MEL1* für eine α - und *lacZ* für eine β -Galaktosidase kodiert. Für die späteren Bindungsstudien wurde der Y187-Stamm verwendet. Der Y187-Stamm verfügt lediglich über das Reportergen *lacZ* (Abb. 3).

AH109 Constructs



Y187 Constructs



Abb. 3 Reporterkonstrukte in den Hefestämmen AH109 und Y187. Der Hefestamm AH109 ist ein Derivat des Stammes PJ69-2A der die Reportergene *ADE2* und *HIS3* enthält. Während das *MEL1* Gen endogen exprimiert ist, wurde das *lacZ* Reportergen zusätzlich eingefügt. Die vier Reportergene stehen unter der Kontrolle dreier verschiedener GAL4 UAS und TATA-Boxen. Der Hefestamm Y187 enthält das Reportergen *lacZ*, welches unter der Kontrolle des GAL1 AUS Promotors steht (Quelle: *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual* [Clontech]).

3.1.19 Zelllinien

3.1.19.1 Humane Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe/Eigenschaften	Herkunft	Kulturmedium
HaCaT	Keratinocyten	CLS	DMEM/ F-12
HEK-293	embryonale Nierenzellen, Transformiert mit Adenovirus Typ 5	CLS	DMEM/ F-12
HeLa	Zervix Adenokarzinom	DSMZ	MEM (Eagle)
HT-29	Kolon Adenokarzinom	DSMZ	RPMI-1640
J16/RAPO	T-Zell-Leukämie, Fas-negativ	DSMZ	RPMI-1640
Jurkat	T-Zell-Leukämie	DSMZ	RPMI-1640
MCF-7	Brust Adenokarzinom	DSMZ	DMEM/ F-12
MDA-MB-468	Brust Adenokarzinom	CLS	DMEM/ F-12
SK-BR-3	Brust Adenokarzinom	CLS	DMEM/ F-12
T98G	Glioblastom	LGC	MEM (Eagle)

Bei den T-Lymphozyten handelt es sich um Suspensionszellen, alle anderen Zellen sind adhärenent.

3.1.19.2 Murine Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe/Eigenschaften	Herkunft	Kulturmedium
MOCHA	Fibroblasten, Null-Mutation in der δ -Untereinheit des AP-3 Komplexes	LGC	DMEM/ F-12
3T3	embryonale Fibroblasten, etabliert aus einer Schweizer Albino-Maus	DSMZ	DMEM/ F-12

3.1.20 Verwendete Puffer und Lösungen

Für den Ansatz der Puffer und Lösungen wurde Reinstwasser (H_2O) des Typs 1 (18,2 $M\Omega \cdot cm$ bei 25°C) verwendet. Zur Übersicht sind die Puffer und Lösungen nach Anwendungsbereichen sortiert.

Allgemein genutzte Puffer und Lösungen

EB-Puffer	10mM Tris/HCl (pH 8.5)
TE-Puffer	10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA
PBS-Puffer	137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 2mM KH_2PO_4 , pH 7.4
PBS-Tween-Puffer	PBS-Puffer, 0.05% Tween 20

Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen

RF1-Puffer	100mM RbCl, 50mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 15% Glycerin (w/v), 30mM KAc, 10mM $CaCl_2 \cdot H_2O$, pH 5.8
RF2-Puffer	10mM RbCl, 10mM MOPS, 75mM $CaCl_2 \cdot H_2O$, 15% Glycerin (w/v), pH 6.8

Die Puffer wurden steril filtriert (0.22 μm Filter) und bei -20°C gelagert.

Puffer zur Herstellung kompetenter Hefezellen

10x TE-Puffer	0.1M Tris-HCl (pH 7.5), 10mM EDTA
10x LiAc-Puffer	1M LiAc ($C_2H_3LiO_2 \cdot 2H_2O$), pH 7.5
TE/LiAc-Lösung	1x TE-Puffer (10x), 1x LiAc-Puffer (10x)

Puffer zur Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA

PEG/LiAc-Lösung	1x TE-Puffer (10x), 1x LiAc-Puffer (10x), 40% PEG 3350
------------------------	--

Puffer zur Präparation von Plasmid DNA

P1-Lösung	50mM Tris/HCl (pH 8.0), 10mM EDTA, 50mM Glukose
P2-Lösung	0.2 M NaOH, 1% SDS (w/v)
P3-Lösung	3M KAc, pH 5.5

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer	2M Tris, 2M Eisessig, 50mM EDTA (pH 8.0)
-----------------------	--

Puffer zur Durchführung von Kolonie-Blots

Denaturierungs-Lösung	0.5M NaOH, 1.5M NaCl
Neutralisierungs-Lösung	0.5M Tris/HCl (pH 7.4), 1.5M NaCl
20x SSC	3M NaCl, 0.3M Natriumcitrat, pH 7.0

Puffer zur Reinigung von Antikörpern mittels Affinitätschromatographie

Kopplungs-Puffer	0.1M NaHCO ₃ , 0.5M NaCl, pH 8.3
Blockierungs-Puffer	0.1M Tris/HCl (pH 8.0)
Natriumacetat-Puffer	0.1M NaAc, 0.5M NaCl, pH 4.0
Wasch-Puffer I	0.1M Tris/HCl (pH 8.0), 0.5M NaCl
Wasch-Puffer II	0.1M Tris/HCl (pH 8.5), 0.5M NaCl
Startpuffer	PBS-Puffer, 0.5M NaCl, pH 7.0
Glycinpuffer	0.2M Glycin, pH 2.2
BSA-Lösung	PBS-Puffer, 3% BSA

Puffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und zur Durchführung von Western-Blots

4x Lower Tris-Puffer	1.5M Tris/HCl (pH 8.8), 0.4% SDS (w/v)
4x Upper Tris-Puffer	0.5M Tris/HCl (pH 6.8), 0.4% SDS (w/v)
SDS-Laufpuffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 0.1% SDS (w/v)
SDS-Sammelgel (10%)	2.5ml 4x Lower Tris-Puffer 3.3ml Rotiphorese® Gel 30

	4.1ml H ₂ O 50µl 10%APS 10µl TEMED
SDS-Trenngel (5%)	1.25ml 4x Upper Tris-Puffer 0.83ml Rotiphorese [®] Gel 30 2.90ml H ₂ O 50µl 10%APS 10µl TEMED
5x Laemmli-Puffer	0.2M Tris/HCl (pH 6.8), 10mM 2-Mercaptoethanol, 20% Glycerin, 0.05% Bromphenolblau, 10% SDS (w/v)
Anodenpuffer I	25mM Tris, 20% Methanol, pH 10.4
Anodenpuffer II	300mM Tris, 20% Methanol, pH 10.4
Kathodenpuffer	25mM Tris, 40mM 6-Aminohexansäure, 20% Methanol, pH 9.4

Puffer für die Immundetektion

I-Block-Lösung	PBS-Puffer, 0.2% I-Block, 0.1% Tween 20
Entwicklungs-Puffer	100mM Tris/HCl (pH 9.5), 100mM NaCl, 5mM MgCl ₂
NBT-Stock-Lösung	50mg/ml NBT, 70% Dimethylformamid, -20°C
BCIP-Stock-Lösung	50mg/ml BCIP, 100% Dimethylformamid, -20°C
Färbe-Lösung	66µl NBT-Stock, 33µl BCIP-Stock, 10ml Entwicklungs-Puffer

Puffer zur Bestimmung der Antikörper Konzentration mittels ELISA

Carbonat-Puffer	0.1M NaHCO ₃ , pH 8.2
Blockierungs-Puffer I	PBS-Tween-Puffer, 1% BSA
Blockierungs-Puffer II	PBS-Tween-Puffer, 1% FBS
Diethanolamin-Puffer	10mM Diethanolamin, 0.5mM MgCl ₂ , pH 9.5
pNPP-Substrat	1mg pNPP / 1ml Diethanolamin-Puffer

Puffer für β -Galaktosidase-Filter-Assays

Z-Puffer	16.1g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.5g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.75 g/L KCL, 0.246g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0
X-Gal-Stock-Lösung	20mg/ml X-Gal in DMF
Z-Puffer/X-Gal-Lösung	100ml Z-Puffer, 1.67ml X-Gal-Stock-Lösung, 0.72ml 2-Mercaptoethanol

3.1.21 Verwendete Medien

Alle Bakterien- und Hefemedien wurden mit Reinstwasser des Typs 1 (18,2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ bei 25°C) angesetzt und autoklaviert. Antibiotika und andere hitzeinstabile Medienzusätze wurden mit Hilfe von Membranfilter (0.2 / 0.45 μm , Schleicher & Schüll) filtriert. Zur Einstellung der pH-Werte wurde konz. Salzsäure oder eine 10mM Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) verwendet.

3.1.21.1 Medien für die Bakterienkultur

LB Broth-Medium	10g/L Trypton/Pepton aus Casein, 5g/L Hefeextrakt, 5g/L NaCl
LB-Medium	10g/L Trypton/Pepton aus Casein, 5g/L Hefeextrakt, 10g/L NaCl
LB-Agar	LB-Medium, 15g/L Agar
SOB-Medium	20g/L Trypton/Pepton aus Casein, 5g/L Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2.5mM KCL, 10mM MgCl_2 , 10mM MgSO_4
SOC-Medium	SOB-Medium, 20mM Glukose

Der pH-Wert wurde für alle Bakterienmedien auf 7.5 eingestellt.

3.1.21.2 Medien für die Hefekultur

YPD(A)-Medium	20g/L Difco Peptone, 10g/L Hefeextrakt, 2% Glukose, (0.003% Adenin-Hemisulfat), pH 6.5
YPD(A)-Agar	YPD Medium, 20g/L Agar, (0.003% Adenin-Hemisulfat), pH 6.5
10x Dropout (DO)-Lösung*	200mg/L L-Adenin-Hemisulfat 200mg/L L-Arginin HCl 200mg/L L-Histidin HCl Monohydrat

	300mg/L L-Isoleucin 1000mg/L L-Leucin 300mg/L L-Lysin HCl 200mg/L L-Methionin 500mg/L L-Phenylalanin 2000mg/L L-Threonin 200mg/L L-Tryptophan 300mg/L L-Tyrosin 200mg/L L-Uracil 1500mg/L L-Valin
10x BU-Salz-Lösung	70g/L Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O, 30g/L NaH ₂ PO ₄ , pH 7.0
SD-Medium	6.7g/L Yeast nitrogen base w/o Amino Acids, 10% 10x DO-Lösung, 2% Glukose, pH 5.8 [optional: 5-50mM 3-AT, 0.003% Adenin-Hemisulfat]
SD-Agar	SD-Medium, 20g/L Agar, pH 5.8 [optional: 5-50mM 3-AT, 0.003% Adenin-Hemisulfat]
SD/X-α-Gal-Agar	SD-Agar (kein pH-Wert einstellen), 1x 10x BU-Salz-Lösung, 2% Glukose, 80mg/L X-Gal

*: Die aufgeführten Aminosäuren wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen. Zur Herstellung einer 10x *Dropout* (DO)-Lösung wurde(n) die entsprechende(n) Aminosäure(n) aus dem Ansatz entfernt (z.B. 10x -Leu/-Trp DO).

3.1.21.3 Medien für die Zellkultur

Alle Medien und Zusätze für die Zellkultur wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH und Biochrom GmbH bezogen. Das FBS wurde vor der Benutzung für 30 Min. bei 55°C Hitze inaktiviert.

Medium	Zusatz (Finale Konzentration)
DMEM F-12	10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin-Mix
MEM (Eagle)	10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin-Mix, 1% C ₃ H ₃ NaO ₃ , 1% 100mM MEM Non-essential Amino Acid Solution
RPMI-1640	10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin-Mix

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

Zur Reaktivierung von Bakterienstämmen aus Glycerinstocks wurden die auf Eis angetauten *E. coli* Zellen mit einer Platinöse auf LB-Agar Platten (s. Punkt 3.1.21.1) ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank ü.N. inkubiert. Für die Anzucht und Kultivierung von Submerskulturen wurde standardmäßig LB-Medium (s. Punkt 3.1.21.1) verwendet. Die Kultivierung erfolgte in sterilen Zentrifugenröhrchen oder Erlenmeyerkolben im Inkubationsschüttler bei 37°C, 180rpm. Für die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation wurde ausschließlich SOB- und SOC-Medium (s. Punkt 3.1.21.1) verwendet (Hanahan, 1983). Zur Präparation von Plasmid-DNA wurde zuerst eine Tageskultur angesetzt. Hierfür wurden 5ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und kultiviert. Die Tageskultur für die Plasmid-Maxipräparation wurde in 400ml frisches LB-Medium überführt und für 16 Std. ü.N. inkubiert. Für den Selektionsdruck wurde den Medien die entsprechenden Antibiotika (s. Punkt 3.1.9) zugesetzt. Die Lagerung von Submerskulturen und Agar Platten (mit Parafilm abgedichtet) erfolgte im Kühlschrank bei 4°C bis zu 4 Wochen.

Zur Herstellung von Glycerinstocks wurden 400µl einer Tages- oder Übernachtskultur mit 400µl einer 50%igen Glycerin-Lösung (steril) versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1.2 Kultivierung und Stammhaltung von Hefen

Zur Reaktivierung von Hefestämmen aus Glycerinstocks wurden die noch gefrorenen Hefezellen mit einer Platinöse auf YPD(A)- oder SD-Agar Platten (s. Punkt 3.1.21.2) ausgestrichen und bei 30°C im Brutschrank inkubiert, bis die Zellkolonien einen Durchmesser von ca. 2mm erreichten (3-5 Tage). Die Kultivierung nicht-transformierter Hefestämme erfolgte in YPD(A)-Medium (s. Punkt 3.1.21.2) und die transformierter Stämme in SD-Medium (Minimalmedium) (s. Punkt 3.1.21.2) bei 30°C und 250rpm im Inkubationsschüttler. Für die Transformation wurden 50ml Medium mit 2-3 Hefeklonen von einer Agar-Platte inokuliert und ü.N. für 16-18 Std. inkubiert. Die Lagerung der mit Parafilm abgedichteten Agra-Platten erfolgte im Kühlschrank bei 4°C für 1-2 Monate.

Zur Herstellung von Glycerinstocks wurden einzelne Kolonien gepickt und in 400µl Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 400µl einer 50%igen Glycerin-Lösung (steril) versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der RbCl (Rubidiumchlorid)-Methode (Hanahan, 1983). 5ml einer Übernachtskultur wurden in 100ml SOB-Medium überführt und im Inkubationsschüttler bis zu einer optischen Dichte bei 600nm (OD_{600}) von 0.6-0.8 (ca. 3 Std.) inkubiert. Danach wurden die Bakterien in 50ml Falcons aliquotiert, für 15 Min. auf Eis inkubiert und anschließend bei 2000rpm und 4°C für 15 Min. zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets durch Zugabe von Lösung RF1 (1/3 Volumen der Ausgangskultur) (s. Punkt 3.1.20.2) durch vorsichtiges Vortexen resuspendiert. Nach 1 Std. Inkubation auf Eis wurde die Suspension erneut bei 2000rpm und 4°C für 15Min. zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Pellets wurden in der Lösung RF2 (1/12.5 Volumen der Ausgangskultur) (s. Punkt 3.1.20.2) durch vorsichtiges Vortexen resuspendiert und für 15 Min. auf Eis inkubiert. Aliquots à 100µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert.

3.2.2.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

Die Herstellung kompetenter Hefe-Zellen erfolgte nach der LiAc (Lithiumacetat)-Methode von Gietz *et al.* (1992). Von einer ü.N.-Kultur wurden 150ml Medium auf eine Zelldichte von $OD_{600} = 0.2-0.3$ eingestellt. Die Zellsuspension wurde für ca. 4 Std. inkubiert, bis eine OD_{600} von ~0.5 erreicht wurde. Anschließend wurde die Kultur auf 50ml Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 1000 x g für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 30ml sterilem H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 x g für 5 Min. wurden die Zellen in 1.5ml frisch angesetzter 1x TE/LiAc-Lösung (s. Punkt 3.1.20.3) resuspendiert, auf 1.5ml Reaktionsgefäße verteilt und bei 13000rpm für 30 Sek. zentrifugiert. Die Zellen wurden wiederholt in 1x TE/LiAc-Lösung (600µl) resuspendiert und direkt für die Transformation eingesetzt.

3.2.2.3 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Die DNA-Transformation in *E. coli*-Zellen wurde nach der Hitzeschock-Methode von Hanahan (1983) durchgeführt. Zum Einbringen von DNA wurden die kompetenten Zellen (s. Punkt 3.2.2.1) auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA versetzt und 25 Min. auf Eis inkubiert. Die Menge der zu transformierenden DNA variierte bei Plasmid-DNA zwischen 10pg und 10ng und bei Ligationen zwischen 5µl und 20µl des entsprechenden Ligationsansatzes. Dem anschließenden Hitzeschock für 90 Sek. bei 42°C folgte eine sofortige Abkühlung auf Eis. Die Zellen wurden mit 400µl SOC-Medium versetzt und 45 Min. im Inkubationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C ü.N. inkubiert.

3.2.2.4 Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA

Die Transformation von Plasmid-DNA in Hefe-Zellen erfolgte nach der Methode von Gietz *et al.* (1992). Für die Analysen wurden Ko- und sequentielle-Transformationen im kleinen und großen Maßstab durchgeführt.

3.2.2.4.1 Transformation im kleinen Maßstab

Für die Transformation im kleinen Maßstab wurden jeweils 500ng Plasmid-DNA, 5µl *Herring testes carrier* DNA und 50µl kompetente Zellen (s. Punkt 3.2.2.2) in ein 1.5ml Reaktionsgefäß pipettiert und durch vortexen gemischt. Anschließend wurden dem Ansatz 500µl PEG/LiAc-Lösung (s. Punkt 3.1.20) hinzugegeben und dieser für 30 Min. bei 30°C inkubiert (leichtes Vortexen alle 10 Min.). Nach Zugabe von 40µl DMSO wurde ein Hitzeschock für 15 Min. bei 42°C durchgeführt. Während des Hitzeschocks wurden die Zellen alle 5 Min. auf dem Vortexer erneut gemischt. Anschließend wurden die Zellen bei 13000rpm für 15 Sek. abzentrifugiert, in 1ml YPD(A)-Medium resuspendiert und für 90 Min. im Inkubationsschüttler kultiviert. Danach wurden die Zellen bei 13000rpm für 15 Sek. abzentrifugiert, in 1ml 0.9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und auf entsprechenden SD-Agar Platten (Ø 150mm) ausgestrichen.

3.2.2.4.2 Ko-Transformation der cDNA-Bibliothek im großen Maßstab

Für den Y2H Screen wurde die *Human Mammary Gland Matchmaker cDNA Library* (Clontech) (s. Punkt 3.1.14) mit dem pAS2-1-NOT-1 *Bait*-Konstrukt (s. Punkt 3.1.16, Tab. 5) in den *S. cerevisiae*-Hefestamm AH109 (s. Punkt 3.1.18) ko-transformiert. Für die

Transformation wurden 10µg *Bait*-Plasmid, 20µg *Prey*-Plasmid (cDNA-Bibliothek), 20µl *Herring testes carrier* DNA und 600µl kompetente Zellen eingesetzt.

Der Ablauf der Transformation im großen Maßstab entspricht generell dem im kleinen Maßstab. Lediglich die folgenden Lösungsvolumina und Inkubationszeiten wurden erhöht: 2,5ml PEG/LiAc-Lösung, 320µl DMSO, Hitzeschock 20 Min. und Resuspension der Zellen in 3ml YPD(A)-Medium. Nach der Erholungsphase wurden die Zellen in 15ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung resuspendiert und auf entsprechenden SD-Agar Platten (Ø 150mm) ausgestrichen.

3.2.2.5 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

3.2.2.5.1 *Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien*

Die Mini- und Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte standardmäßig nach der Methode von Sambrook and Russell (*Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS*). Die Lösungen, welche für die Lyse und Neutralisierung der Zellen angesetzt wurden, sind in Punkt 3.1.20 aufgeführt.

3.2.2.5.2 *Endotoxinfreie Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien*

Für die Transfektionen in HEK-293 Zellen wurde endotoxinfreie Plasmid-DNA eingesetzt. Zur Isolierung wurde das *EndoFree Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen entsprechend den Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte mit 100µl EB-Puffer (s. Punkt 3.1.20).

3.2.2.5.3 *Präparation von Plasmid-DNA aus Hefezellen*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe wurde das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* (PEQLAB) nach einem abgewandelten Protokoll verwendet. 5ml Selektivmedium wurden mit einer frischen Einzelkolonie inokuliert und die Zellen für 30 Std. auf dem Inkubationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 x g, für 5 Min. abzentrifugiert, in 250µl Lösung I, komplementiert mit RNase A, resuspendiert und in ein 1.5ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Aufbrechen der Zellwände wurde der Ansatz mit 50-100µl Glasperlen (säurebehandelt, Ø 0.5mm, Sigma-Aldrich) versetzt, 5 Min. gevortext und anschließend für einige Minuten stehen gelassen. Nach dem Absetzen der Glasperlen wurde der Überstand in ein neues 1.5ml Reaktionsgefäß überführt.

Alle weiteren Schritte wurden nach dem Protokoll des Kit-Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 30µl EB-Puffer. Für die Transformation in *E. coli* Zellen wurde 4µl der isolierten Plasmid-DNA eingesetzt.

3.2.2.6 Aufreinigung von Plasmid Minipräparationen zur Sequenzierung

Das Volumen der entsprechenden Probe wurde mit TE-Puffer auf 200µl erhöht und für 5 Min. bei 65°C inkubiert. Danach erfolgte ein RNase-Verdau für 15 Min. bei 37°C durch Zugabe von 4µl RNase A/T1 Mix (Thermo Fisher Scientific). Zur Proteinextraktion wurde der Ansatz mit 1 Volumen Phenol/Chloroform versetzt, gemischt (vortexen) und bei 6000rpm für 5 Min. zentrifugiert. Nach zwei weiteren Chloroform-Extraktionen wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Kaliumacetat-Lösung pH 5.5 und 3 Volumen Ethanol für 30 Min. bei -20°C gefällt. Anschließend wurde bei 12000rpm und 4°C für 20 Min. zentrifugiert, das Pellet mit 400µl 70%igem Ethanol gewaschen und die DNA mit 10µl EB-Puffer eluiert.

3.2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Analyse und Auftrennung von Nukleinsäuren. Zur Herstellung der Agarosegele wurde die Agarose in 1xTAE-Puffer (s. Punkt 3.1.20) gegeben und in der Mikrowelle durch aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf 50°C wurde die Lösung mit 5µl Ethidiumbromid (10mg/ml) versetzt und in die Gelkammer gegossen. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff der zwischen die Nukleinsäuren interkaliert. Das Laufverhalten linearer Moleküle ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Je nach Größe der DNA-Fragmente betrug die Agarosekonzentration in den Gelen 0.8%-2%. Die Proben wurden mit 6x Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 100 Volt (Feldstärke: 5 V/cm) aufgetrennt. Die Auswertung der Gele erfolgte mit Hilfe der Gel-Dokumentationsanlage.

3.2.2.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma-Aldrich) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Kit erlaubt die Aufreinigung von DNA-Fragmenten zwischen 50bp und 10kb. Die DNA wird durch hohe Salzkonzentrationen an eine Silica-Gelmembran gebunden und durch mehrere Waschschrte gereinigt. Die Elution erfolgte mit 30-50µl EB-Puffer.

3.2.2.9 Aufreinigung von mittels Restriktion bzw. PCR-Amplifikation generierten DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von durch Restriktion bzw. PCR-Amplifikation generierten DNA-Fragmenten wurde mit dem *GenElute™ PCR Clean-Up Kit* (Sigma-Aldrich) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Kit erlaubt die Aufreinigung von DNA-Fragmenten zwischen 100bp und 10kb. Die Elution erfolgte mit 30-50µl EB-Puffer.

3.2.2.10 Restriktion von Plasmid-DNA

Für die Restriktion doppelsträngiger DNA wurden 4 Units (U)/µg DNA des geeigneten Enzyms und 1/10 Volumen des entsprechenden 10x Restriktionspuffer eingesetzt. Die Plasmid-Konzentration betrug 0.1µg/µl. Die Restriktionsansätze wurden für 1½ Std. bei Enzym-spezifischer Temperatur inkubiert.

3.2.2.11 Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment

Als Klenow-Fragment bezeichnet man die größere der beiden Untereinheiten der DNA-Polymerase I von *E. coli*. Neben der 5'-3'-Polymerase-Funktion verfügt das Enzym über eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität und wird daher zur Generierung von glatten DNA-Enden benutzt. Die Auffüllreaktion erfolgte nach dem *DNA Blunting by fill-in of 5'-overhangs or removal of 3'-overhangs*-Protokoll der Firma Thermo Fisher Scientific.

3.2.2.12 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Verhinderung der Rezirkularisierung linearisierter Vektoren während der Ligation, wurden diese dephosphoryliert. Dazu wurden die Vektoren nach der Restriktion mit 1U FastAP (Thermo Fisher Scientific) für 10 Min. bei 37°C inkubiert.

3.2.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von Insert- und Vektor-DNA erfolgte durch das Enzym T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific). Für die Ligation wurden 50-300ng Vektor-DNA und Insert-DNA im 1-3 fachen molaren Überschuss eingesetzt. Zur Berechnung der molekularen Verhältnisse wurde folgende Formel verwendet (Mühlhardt, 2003):

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}}[\text{ng}] = X \times \text{Masse}_{\text{Vektor}}[\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}}[\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}}[\text{bp}]$$

Nach Zugabe von 2µl 10x Ligationspuffer und 2U T4 DNA Ligase wurde der Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20µl für 1 Std. bei 22°C inkubiert. Für die Transformation in *E. coli*-Zellen wurden 5-20µl des Ligationsansatzes verwendet.

3.2.2.14 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über die Messung der OD bei einer Wellenlänge von 260nm in einer Quarzküvette. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von ca. 50µg/ml doppelsträngiger DNA, 33µg/ml einzelsträngiger DNA und 40µg/ml RNA. Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet (Mühlhardt, 2003):

$$\text{DNA-Konzentration: OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Multiplikationsfaktor (50}\mu\text{g/ml)}$$

Die Reinheit der Proben wurde anhand des Verhältnisses OD₂₆₀/OD₂₈₀ überprüft. Für eine proteinfreie Nukleinsäurelösung sollte der Wert zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

3.2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Die Verdopplung der DNA erfolgt durch mehrere sich wiederholende Zyklen, die aus drei Schritten bestehen: Denaturierung der DNA, Primerhybridisierung (*Annealing*) und Synthese des zweiten Stranges (Elongation).

Für die standardmäßige Amplifizierung wurde die thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (*Taq*) der Firma Thermo Fisher Scientific, Inc. verwendet. Die *Taq*-Polymerase erlaubt die Amplifikation von DNA-Fragmenten von bis zu 5kb. In einigen Fällen wurde der AccuStart™ II PCR SuperMix der Firma Quanta BioSciences oder das TripleMaster® PCR System der Firma Eppendorf verwendet. Die AccuStart *Taq*-DNA-Polymerase ist durch monoklonale Antikörper inaktiviert. Dadurch werden vorzeitig Synthesen durch unspezifische Primerhybridisierungen verhindert. Das TripleMaster® PCR System eignet sich besonders für die Amplifizierung GC-reicher und längerer DNA-Fragmente von 100bp - >20kb. Ein Standardansatz sah wie folgt aus:

	<i>Taq</i> Polymerase	AccuStart ¹	TripleMaster ²
Komponente	Endkonzentration		
Matritzen-DNA	50-100ng	50-100ng	50-100ng
Primer I	10pmol	10pmol	10pmol
Primer II	10pmol	10pmol	10pmol
Puffer	1x	1x	1x
MgCl ₂ (25mM)	2mM	-	-
dNTPs (10mM)	0.2mM	0.2mM	0.2mM
DMSO (optional)	5-10%	-	-
Polymerase	0.03U/μl	0.05U/μl	1x

¹: AccuStart™ II PCR SuperMix (Quanta BioSciences), ²: TripleMaster® PCR System (Eppendorf)

Für die Amplifikationen wurde das folgende Standard-Programm verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initial-Denaturierung	94°C	3 Min.	1x
Denaturierung	94°C	15 Sek.	35x
Primer Annealing	47-63°C*	30 Sek.	
Elongation	72°C	1-3 Min.	
Finale Elongation	72°C	15 Min	1x

* Die Annealingtemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur (T_M) des verwendeten Primerpaares und wurde 5°C niedriger angesetzt. Zur Berechnung der T_M der in Punkt 3.1.12, Tab. 4 aufgeführten Primer wurde die allgemeingültige Formel: $4(G+T)+2(A+C)$ verwendet. Angefügte Nukleotide zwecks Generierung von Schnittstellen oder Stopcodons wurden bei der Berechnung der T_M nicht berücksichtigt. Die Elongationszeit wurde entsprechend der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes angepasst.

3.2.2.15.1 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur Amplifizierung der Insert-DNA von Hefeklonen durchgeführt. Hierzu wurde ein Teil einer Kolonie in 50μl EB-Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut. Der Zyklus zum Zellaufschluss bestehend aus Schockfrieren und Auftauen wurde 4x wiederholt. Für die PCR wurden 5-10μl der Zellsuspension eingesetzt.

3.2.2.15.2 Overlap-Extension-PCR

Zur Fusion zweier DNA-Fragmente wurde die Methode der *Overlap-Extension-PCR* (OE-PCR) eingesetzt (Ho *et al.*, 1989). Das Prinzip dieser Methode ist in Abb. 4 dargestellt:

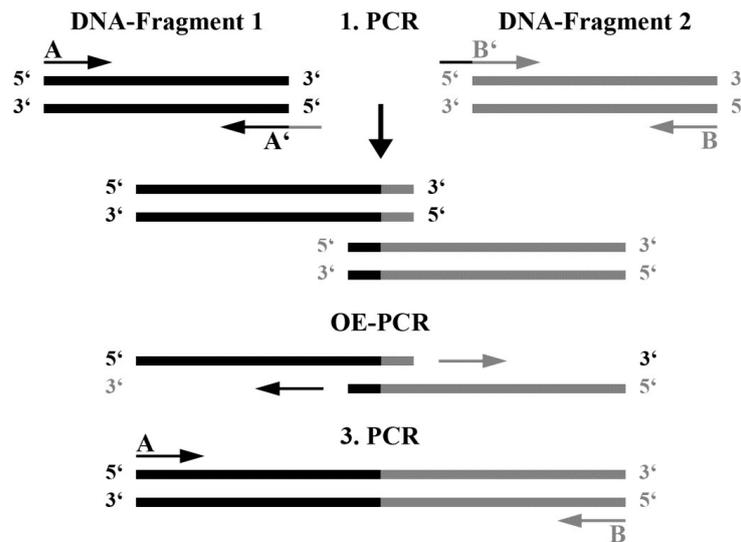


Abb. 4 Schematische Darstellung der OE-PCR

Im ersten Schritt wurden durch zwei getrennte PCR-Ansätze die gewünschten überlappenden DNA-Fragmente mittels der Primerkombinationen A/A' bzw. B'/B amplifiziert. Die Amplifikate wurden, wie im Punkt 3.2.2.8 beschrieben, gereinigt und im zweiten Schritt, der OE-PCR, durch Hybridisierung der überlappenden Sequenzbereiche fusioniert. Die erfolgreiche Hybridisierung wurde zur Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. Punkt 3.2.2.7) überprüft. Im dritten Schritt wurde das Hybrid als Template für PCR-Amplifikation des Fusionsproduktes mittels der Primerkombination A/B eingesetzt (Abb. 4).

3.2.2.16 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) entwickelten Didesoxymethode (Kettenabbruch-Synthese) unter Verwendung des *BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies). Für einen 10µl Reaktionsansatz wurden 300-500ng DNA, 10pmol Primer, 2µl 5x Sequenzierungspuffer und 2µl BigDye V3.1 eingesetzt. Der BigDye-Mix enthält neben Desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) zusätzlich mit einem auf Rhodamin basierenden Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxy-Nukleotidtriphosphate (ddNTPs). Die ddNTPs sorgen durch die fehlende Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom der Pentose für einen Kettenabbruch. Auf diese Weise entstehen DNA-Ketten jeder Länge, die am Ende mit dem Farbstoff der entsprechenden Base gekennzeichnet sind. Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initial-Denaturierung	98°C	30 Sek.	1x
Denaturierung	96°C	10 Sek.	30x
Primer Annealing	50°C	5 Sek.	
Elongation	60°C	4 Min.	

Die Aufreinigung sowie die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Abbruch-Stränge wurden von der Firma GENterprise durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit den Computerprogrammen FinchTV (Version 1.4.0) und Jellyfish (Version 1.5) sowie dem Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ausgewertet.

3.2.3 Proteinanalytische Methoden

3.2.3.1 Kolonie-Blot

Zur Überprüfung der Expression der rekombinanten Proteine in der Hefe wurde ein Kolonie-Blot durchgeführt. Hierzu wurden frische Einzelkolonien auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membran (Carl Roth) transferiert und nach dem Protokoll *Colony-blot procedure* (The QIAexpressionist™, 2003) Punkt Nr.9 lysiert. Der Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte durch spezifische Antikörper wie im Punkt 3.2.3.7.2 beschrieben.

3.2.3.2 Aufreinigung der NOT Antikörper mittels Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der generierten polyklonalen NOT-Seren erfolgte mittels Affinitätschromatographie über CNBr-aktivierte Sepharose 4B (GE Healthcare).

3.2.3.2.1 Kopplung der NOT Peptide an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Die Kopplung der für die Immunisierung eingesetzten NOT-Peptide an die CNBr-aktivierte Sepharose 4B erfolgte nach dem *CNBr-activated Sepharose™ 4B*-Protokoll der Firma GE Healthcare. Hierzu wurden 1g CNBr-aktivierte Sepharose 4B in 10ml 1mM HCl bei RT aufgequollen und in eine Polypropylene Säule (Qiagen) transferiert. Im Anschluss wurde die Sepharose mit 200ml kalter (4°C) 1mM HCl und mit 10ml Kopplungs-Puffer gewaschen (s. Punkt 3.1.20). Für die anschließende Peptidkopplung wurden 3mg Peptid in 5ml Kopplungs-Puffer (s. Punkt 3.1.20) gelöst. Die Peptidkopplung erfolgte ü.N. bei 4°C im Über-

Kopf-Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Sepharose erneut mit 10ml Kopplungs-Puffer gewaschen und mit 10ml Blockierungs-Puffer (s. Punkt 3.1.20) für 2 Std. bei RT im Über-Kopf-Schüttler geblockt. Nach dem Blocken wurde die Säule 3x abwechselnd mit 20ml Natriumacetat-Puffer (s. Punkt 3.1.20) und 20ml Wasch-Puffer I (s. Punkt 3.1.20) gewaschen. Abschließend wurde die Säule mit Startpuffer (s. Punkt 3.1.20) auf einen pH-Wert von 7 äquilibriert und bei 4°C gelagert.

3.2.3.2.2 *Kopplung und Aufreinigung der NOT Antikörper*

Für die Kopplung der Sepharose mit dem spezifischen AK wurden 2ml filtriertes Kaninchenserum und 3ml Startpuffer auf die Säule gegeben und ü.N. bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Zum Entfernen des Serumüberschusses wurde die Säule anschließend mit 4x 10ml Startpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte schrittweise durch Zugabe von 20x 1ml Glycinpuffer (s. Punkt 3.1.20). Sofort wurde der pH-Wert der Eluate mit 1M Tris/HCl (pH 9) auf pH 7 eingestellt und BSA-Lösung (Endkonzentration 0.3%) (s. Punkt 3.1.20) hinzugegeben. Die Lagerung der aufgereinigten AK erfolgte bei -20°C. Nach der Elution wurde die Sepharose 3x abwechselnd mit 20ml Wasch-Puffer II (s. Punkt 3.1.20) und 20ml Natriumacetat-Puffer gewaschen. Abschließend wurde die Säule wie in Punkt Nr. 3.2.3.2.1 mit Startpuffer auf einen pH-Wert von 7 äquilibriert und bei 4°C gelagert.

3.2.3.3 **Ko-Immunopräzipitation**

Die Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro*. Mittels spezifischer AK wird das gewünschte Protein samt Interaktionspartner aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert.

Die Ko-IP-Experimente wurden mit dem *Immunoprecipitation Kit (Protein A) / (Protein G)* (Roche Diagnostics) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Entsprechend ihrer Affinitäten zu den Immunglobulinen (IgG) aus diversen Spezies wurde Protein A für Kaninchen-IgGs und Protein G für Maus-IgGs eingesetzt. Für die Ko-IP wurden Zelllysate aus 1×10^7 Zellen verwendet. Adhärente Zellen wurden trypsiniert und bei 600g und 4°C für 3 Min. zentrifugiert. Zum Entfernen des restlichen Trypsins wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut bei 600g und 4°C für 3 Min. zentrifugiert. Alle weiteren Schritte, Lyse der Zellen, *Preclearing* und Immunoprezipitation, erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Inkubationszeit für das *Preclearing* betrug 3 Std. Für den IP wurden 5µg AK eingesetzt, die Immunoprezipitation erfolgte ü.N. Anschließend wurden die Proben für 3 Min. in 1x

Laemmli-Puffer (s. Punkt 3.1.20) bei 95°C aufgekocht. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Punkt 3.2.3.6) wurden 15µl IP aufgetragen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Western-Blot (s. Punkt 3.2.3.7).

3.2.3.4 Subzelluläre Fraktionierung von Proteinen

Die subzelluläre Fraktionierung von Proteinen erfolgte nach dem Protokoll des *Qproteome® Cell Compartment Kit* (Qiagen). Das Kit erlaubt die Auftrennung von Zelllysaten in zytoplasmatische (F1)-, membranassoziierte (F2)-, Kern (F3)- und zytoskeletale (F4) Fraktion.

3.2.3.5 Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit dem Protein-Assay der Firma Bio-Rad gemäß den Herstellerangaben.

3.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) eingesetzt. Hierbei kommen zwei unterschiedliche Gele auf Polyacrylamidbasis zum Einsatz, die sich im pH-Wert, der Ionenstärke und der Porengröße unterscheiden. Im Sammelgel werden die Proteine zunächst unabhängig von ihrer molekularen Größe konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Für die Analysen wurden 5%ige Sammelgele und 10%ige Trenngele (s. Punkt 3.1.20) eingesetzt. Die Proben wurden für 3 Min. in 1x Laemmli-Puffer bei 95°C aufgekocht. Das in dem Puffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergens, welches die Eigenladung der Proteine überlagert. Die Proteine erhalten dadurch eine negative Ladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist und können daher im Gel der Molmasse nach aufgetrennt werden. Durch das Aufkochen werden die Proteine denaturiert und das im Probenpuffer enthaltene 2-Mercaptoethanol bewirkt eine Reduzierung der Disulfidbrücken.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 20mA in der SE250 Mighty Small II-Gelelektrophorese-Kammer (Hoefer). Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde ein

vorgefärbter Größenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) verwendet.

3.2.3.7 Western-Blot und Immunodetektion

Beim Western-Blot werden die durch die SDS-PAGE (s. Punkt 3.2.3.6) nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose-, Nylon- oder PVDF-Membran übertragen (*geblottet*). Während des *Blottens* wird das an die Proteine angelagerte SDS ausgewaschen. Somit können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- oder Tertiärstrukturen wieder einnehmen, jedoch keine Quartärstruktur. Die auf die Membran übertragenen Proteine werden im Anschluss durch spezifische AK nachgewiesen (Immunodetektion).

3.2.3.7.1 *Western-Blot*

Der Transfer der Proteine aus der Gelmatrix auf eine PVDF-Membran erfolgte mit dem Semi-Dry Blot Verfahren nach Kyhse-Anderson (1984). Für den Transfer wurde der SemiPhore TE-70 Elektroblogger (Hoefer) verwendet. Die Transferzeit betrug 60 Min., bei einer konstanten Stromstärke von $1\text{mA}/\text{cm}^2$ Gel.

3.2.3.7.2 *Immunodetektion*

Nach dem *Blotten* wurde die PVDF-Membran 2x für 10 Min. mit PBS-Puffer (s. Punkt 3.1.20) gewaschen und anschließend für 1 Std. bei RT oder ü.N. bei 4°C in I-Block-Lösung (s. Punkt 3.1.20) geblockt. Danach wurde die Membran 2x für 10 Min. in PBS-Tween-Puffer (s. Punkt 3.1.20) und 1x für 10 Min. in PBS-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem in I-Block-Lösung verdünnten primären AK erfolgte für 1 Std. bei RT oder ü.N. bei 4°C . Zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper wurde die Membran 2x für 10 Min. in PBS-Tween-Puffer und 1x für 10 Min. in PBS-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Zugabe eines alkalischen Phosphatase (AP)-gekoppelten sekundären AK für 1 Std. bei RT. Der sekundäre AK wurde 1:5000 in I-Block-Lösung verdünnt eingesetzt. Nach 3x waschen mit TBS-Tween-Puffer wurde die Färbelösung (s. Punkt 3.1.20) auf die Membran gegeben. Das Enzym AP setzt BCIP mit NBT zu einem blauen Farbstoff um. Die Färbung wurde durch Spülen mit Wasser gestoppt.

3.2.3.8 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Der *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist eine Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Substanzen in Flüssigkeiten (Engvall *et al.*, 1971). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen dem direkten und indirekten ELISA. Beim direkten ELISA bindet ein markierter spezifischer AK sein Antigen, während beim indirekten ELISA der spezifische primäre AK an das Antigen bindet und dann von einem markierten sekundären AK erkannt wird.

Die Konzentrationsbestimmung der mittels Affinitätschromatographie aufgereinigten NOT-AK (s. Punkt 3.2.3.2) erfolgte durch einen indirekten ELISA nach einem standard Protokoll der AG Kurzik-Dumke (Kurzik-Dumke *et al.*, 1997c). Die Extinktion wurde mit dem μ Quant Elisa-Reader (BioTek) bei 410nm (Referenzwellenlänge 490nm) gemessen. Zur Berechnung der Probenkonzentrationen wurde eine Standardkurve mit humanem IgG (Sigma-Aldrich) erstellt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels der Gen5™ Datenanalyse-Software der Firma BioTek.

3.2.4 Zellbiologische Methoden

3.2.4.1 Kultivierung humaner und muriner Zellen

Die Kultivierung der humanen und murinen Zellen (s. Punkt 3.1.19) erfolgte im entsprechenden Zellkulturmedium (s. Punkt 3.1.21.3) bei 37°C, 20% O₂ und 5% CO₂ im CO₂ Inkubator Heraeus BB15 (Thermo Fisher Scientific). Nach erreichter Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Zur Ablösung der Zellen von der Unterlage wurden sie zuerst mit PBS gewaschen und danach kurz im 1x Trypsin/PBS-Puffer bei RT inkubiert. Nach dem Ablösen wurden die Zellen mindestens 3 x mit PBS gewaschen und anschließend im Kulturmedium aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in der gewünschten Dichte passagiert. Bei Suspensionskulturen entfällt der Schritt der Trypsinierung.

3.2.4.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden 1×10^6 - 5×10^6 Zellen in 1ml Biofreeze Einfriermedium (Biochrom) resuspendiert und in Kryoröhrchen (TPP) überführt. Mittels des Gefrierbehälters (Mr. Frosty™, Thermo Fisher Scientific) wurden die Zellen in der Kühltruhe mit einer Abkühlungsgeschwindigkeit von -1°C/Min. auf -80°C abgekühlt. Danach wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in einen Stickstofftank überführt.

3.2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Lichtmikroskop (Leitz Ortholux, Ernst Leitz). Zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden 10µl einer Zellsuspension mit 90µl einer Trypanblau-Lösung (Life Technologies) vermischt. Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff, der an Zellproteine bindet. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus und erscheinen unter dem Mikroskop weiß. Tote Zellen werden dunkelblau gefärbt.

3.2.4.4 Transfektion von HEK-293 Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA oder RNA in eukaryontische Zellen. Hierbei unterscheidet man zwischen transienter oder stabiler Transfektion. Bei einer transienten Transfektion verbleibt die Fremd-DNA nur vorübergehend in den Zellen, während bei der stabilen Transfektion die Fremd-DNA in das Genom der Zielzelle integriert wird.

Die für die durchgeführten Transfektionen eingesetzte DNA wurde in den Vektor pEGFP-N3 (s. Punkt 3.1.15) kloniert. Der Vektor pEGFP-N3 erlaubt die ektopische Expression des durch die DNA kodierten Proteins als EGFP-Fusionsprotein in Säugerzellen. Die Fusion des EGFP erfolgt dabei am C-Terminus des gewählten Proteins. Zur Selektion in Prokaryonten besitzt der Vektor pEGFP-N3 eine Kanamycin-Resistenz und zur Selektion in Säugerzellen eine Geneticin-Resistenz. Die Transfektionen wurden mit Hilfe des *Effectene Transfection Reagent Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ein Tag vor der Transfektion wurden die Zellen, wie in Punkt 3.2.4.1, passagiert und 3×10^5 Zellen/*Well* in 6-*Well* Kulturplatten (Greiner Bio-One) ausgesät. Die Zellen wurden ü.N. im CO₂ Inkubator inkubiert. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von 70-80%. 0.5-1µg Plasmid-DNA wurden eingesetzt. Nach 18 Std. Inkubation in dem DNA-enthaltenden Medium wurde die Transfektion gestoppt und die Zellen für weitere 24 Std. in frischem Medium inkubiert. Zur Selektion und Generierung einzelner stabil transfizierter Zellen wurden dem Medium das Antibiotikum Geneticin (G418, Biochrom) in einer Konzentration von 800µg/ml zugesetzt. Zur Isolierung stabiler Transfektanten wurden die Zellen nach 3-wöchiger Selektion passagiert und einzeln auf 96-*Well* Kulturplatten (Sarstedt) (1 Zelle/pro *Well*) kultiviert. Die Zellklone mit der stärksten GFP-Expression wurden vermehrt und kryokonserviert. Zum Erhalt des Selektionsdruckes wurde die G418 Konzentration im Medium auf 400µg/ml reduziert. Die Expression der EGFP-Fusionsproteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie

(Olympus IX70 Inverted Microscope, Olympus) und spezifischer AK im Western-Blot (s. Punkt 3.2.3.7) überprüft.

3.2.5 Das Hefe Zwei-Hybrid System

Das Y2H System ist eine *in vivo* Methode zur Identifizierung und Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen in der Hefe (Bartel *et al.*, 1993; Fields und Song, 1989). Die Grundlage des Y2H Systems bildet der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4, der an der positiven Regulation der Gene des Galaktose-Stoffwechsels beteiligt ist. Wie andere Transkriptionsfaktoren, besteht das GAL4-Protein aus zwei funktionellen Einheiten: der aminoterminalen DNA-Bindungsdomäne (BD) und der carboxyterminalen DNA-Aktivierungsdomäne (AD) (Keegan *et al.*, 1986). Basierend auf dieser Eigenschaft des GAL4 wird beim Y2H System das Prinzip von Köder- (*Bait*) und Beute (*Prey*)-Protein verwendet. Hierfür wird das *Bait* in ein Plasmid, ausgestattet mit der BD-Domäne, und das *Prey* in ein Plasmid, ausgestattet mit der AD-Domäne des GAL4 Faktors, kloniert. Zur Identifizierung von Bindungspartnern in Form eines *Screens* werden cDNA-Banken als *Prey* eingesetzt, jedoch kann es sich bei dem *Prey* auch um ein definiertes Protein oder um einen potentiellen Liganden handeln. Für die Bindungsstudien mittels des Y2H Systems wurden in dieser Arbeit die beiden Hefeexpressionsvektoren pAS2-1 und pACT2 (s. Punkt 3.1.15) verwendet.

Kommt es zur Bindung zwischen dem *Bait*- und *Prey*-Protein, bilden BD und AD aufgrund ihrer räumlichen Nähe einen funktionellen Transkriptionsfaktor, der die Aktivierung der Reportergene der Plasmide bewirkt (Abb. 5).

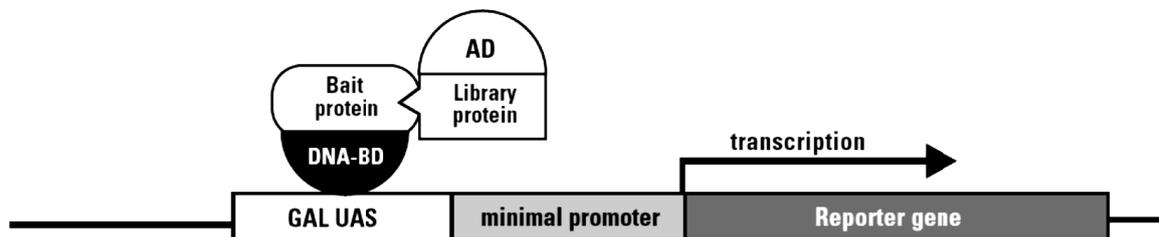


Abb. 5 Prinzip des Hefe Zwei-Hybrid Systems. Das *Bait*-GAL4-BD-Fusionsprotein bindet sequenzspezifisch an die UAS eines Reporter gens. Durch Bindung zwischen dem *Bait*- und dem *Prey*-Protein, wird in Folge der Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors das Reportergen aktiviert (Quelle: *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual* [Clontech]).

3.2.6 Vorbereitungen für den Y2H Screen

3.2.6.1 Titerbestimmung der cDNA-Bibliothek

Zur Überprüfung der Qualität der *Human Mammary Gland Matchmaker cDNA Library* (Clontech) wurde eine Titerbestimmung nach dem Protokoll des *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual* (Clontech) durchgeführt. Die Berechnung der Dichte der koloniebildenden Zellen (cfu) erfolgte nach folgender Formel:

Verdünnung A:	$\# \text{ Kolonien} \times 10^3 \times 10^3$	= cfu/ml
Verdünnung B:	$(\# \text{ Kolonien} / \text{Volumen Ausstrich}) \times 10^3 \times 10^3 \times 10^3$	= cfu/ml

3.2.6.2 Überprüfung der Phänotypen der Hefestämme

Die Überprüfung und die Bestätigung der Phänotypen der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme (s. Punkt 3.1.18) erfolgte nach Protokoll des *Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual* (Clontech). Hierzu wurden Glycerinstocks der Stämme AH109 und Y187 auf YPDA-Platten (s. Punkt 3.2.1.2) ausgestrichen und für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden einzelne Kolonien gepickt und auf die entsprechenden SD/DO-Platten ausgestrichen und für 4-6 Tage bei 30°C inkubiert. Zur Auswertung und Lagerung wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet und bei 4°C eingelagert.

3.2.6.3 Tests auf unspezifische Aktivierung der Reportergene

Um sicherzustellen, dass die eingesetzten Vektoren pAS2-1 und pACT-2 nicht unspezifisch die Reportergene aktivieren, wurden die leeren Vektoren einzeln in den Hefestamm AH109 transformiert (s. Punkt 3.2.2.4.1) und auf SD/-Trp/X- α -Gal- bzw. SD/-Leu/X- α -Gal-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert und nach 3 Tagen auf *MEL1* Aktivierung überprüft. *MEL1* kodiert für das Enzym α -Galaktosidase, welche das Substrat X- α -Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl α -D-galactopyranosid) zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Ein blaues Wachstum deutet auf eine unspezifische Aktivierung der Reportergene hin. Als Positivkontrolle wurde der Vektor pCL1 (s. Punkt 3.1.15) in den Stamm AH109 transformiert und auf SD/-Leu/X- α -Gal-Platten ausgestrichen. Der Vektor pCL1 kodiert für das vollständige wildtypische GAL4-Protein.

3.2.7 Filter Lift-Assay

Durch die Protein-Protein-Interaktion in der Hefe kommt es zur Aktivierung des Reportergens *lacZ*, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Zum Nachweis der β -Galactosidase wurde ein Filter *Lift-Assay* durchgeführt. Der *Assay* beruht auf der enzymatischen Umsetzung von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) in den blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chlor-Indigo durch die β -Galaktosidase. Für den *Assay* wurden frische Kolonien auf Whatman Filterpapier (Labotec Labortechnik) gesetzt und für 15-20 Sek. in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach dem Zellaufschluss wurden die Kolonien bei RT aufgetaut und das Filterpapier mit den Kolonien nach oben auf mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung (s. Punkt 3.1.20) getränktes Whatman Filterpapier (Thermo Fisher Scientific) gelegt. Die Kolonien wurden bei 30°C inkubiert und in regelmäßigen Abständen auf Blaufärbung kontrolliert.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung und Identifizierung von molekularen Partnern des NOT-1 Proteins

Zur Isolierung der Bindungspartner des NOT-1 Proteins wurde die Technik des Y2H Systems eingesetzt. Für den *Screen* wurden das pAS2-1-NOT-1 *Bait*-Konstrukt (s. Punkt 3.1.16, Tab. 5) und die *Human Mammary Gland Matchmaker cDNA Library* (Clontech) (s. Punkt 3.1.14) in den *S. cerevisiae*-Hefestamm AH109 (s. Punkt 3.1.18) ko-transformiert (s. Punkt 3.2.2.4.2) und auf SD/-Leu/-Trp/-His-Platten (mittlere Stringenz) ausgestrichen. Zur weiteren Selektion wurden die potentiell positiven Transformanten auf Platten hoher Stringenz (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal) transferiert. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten, wurden die Hefe-Kolonien mehrfach umgesetzt. Die Optimierung des Verfahrens zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse ist im Kapitel 4.1.1. beschrieben.

4.1.1 Vorbereitungen für den Y2H *Screen*

4.1.1.1 Titerbestimmung der für den Y2H *Screen* eingesetzten cDNA-Bibliothek

Für den Y2H *Screen* wurde die *Human Mammary Gland Matchmaker cDNA Library* (Clontech) eingesetzt, deren Titer nach Angaben des Herstellers $\geq 10^8$ cfu/ml betragen soll. Die Titerbestimmung wurde wie in Punkt 3.2.6.1 beschrieben durchgeführt. Wie die unten aufgeführten Werte der Verdünnungen A ($\times 10^6$) und B ($\times 10^9$) zeigen, entspricht der Titer der eingesetzten cDNA Bibliothek den Empfehlungen.

Verdünnung A:	261 Kolonien	$\times 10^3 \times 10^3$	= 2.61×10^8 cfu/ml
Verdünnung B:	22 Kolonien / 50 μ l	$\times 10^3 \times 10^3 \times 10^3$	= 4.40×10^8 cfu/ml
	47 Kolonien / 100 μ l	$\times 10^3 \times 10^3 \times 10^3$	= 4.70×10^8 cfu/ml

4.1.1.2 Überprüfung der Phänotypen der Hefestämme

Die Hefestämme AH109 und Y187 sind auxotroph für Adenin (Ade), Tryptophan (Trp), Leucin (Leu) und Histidin (His) und phototroph für Uracil (Ura). Während der AH109-Stamm zusätzlich phototroph für Methionin (Met) ist, ist der Y187-Stamm für diese As auxotroph. Das Ergebnis zur Verifizierung der Phänotypen der Hefestämme ist in der Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7 Überprüfung der Phänotypen der Hefestämme AH109 und Y187.

Stamm	SD/-Ade	SD/-Met	SD/-Trp	SD/-Leu	SD/-His	SD/-Ura
AH109	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+
Y187	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+

Erwartung und Ergebnis sind in der Tabelle durch (x/) bzw. (/x) gegenübergestellt.

4.1.1.3 Test auf unspezifische Aktivierung des Reportergens *MEL1* im Hefestamm AH109

Die unspezifische Aktivierung des Reportergens *MEL1* wurde durch α -Gal Nachweis in den mit den leeren Vektoren pAS2-1 und pACT2 (s. Punkt 3.1.15) transformierten Hefezellen des AH109 Stammes überprüft. Im Kontrollversuch wurden die Zellen mit dem pCL1 Plasmid (s. Punkt 3.1.15) transformiert. Wie die in der Tab. 8 dargestellten Ergebnisse zeigen, ist das Resultat für die Plasmide pAS2-1 und pACT2 negativ.

Tab. 8 α -Gal Test auf unspezifische Aktivierung des Reportergens *MEL1* in AH109 Zellen transformiert mit den Plasmiden pAS2-1 und pACT2

Vektor	DO-Platte	Phänotyp
pAS2-1	SD/-Trp/X- α -Gal	weiß
pACT2	SD/-Leu/X- α -Gal	weiß
pCL1	SD/-Leu/X- α -Gal	blau

4.1.2 Identifizierung der potentiellen NOT-Liganden mittels Sequenzierung

Durch Selektion der Transformanten auf Platten hoher Stringenz (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal) konnte die Anzahl der positiven Klone von zunächst 1916 auf 48 reduziert werden. Zur Identifizierung der potentiellen 48 NOT-Liganden wurde eine Kolonie-PCR (s. Punkt 3.2.2.15.1) mit dem Primerpaar 5'AD-LD-Insert/3'AD-LD-Insert (s. Punkt 3.1.12, Tab. 4) durchgeführt. Die Amplifikate wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, aufgereinigt (s. Punkt 3.2.2.8) und sequenziert (s. Punkt 3.2.2.16). Mittels Datenbankanalysen (NCBI / BLAST) auf Nukleinsäure- und Proteinebene wurden 17 potentielle NOT-Liganden (Tab. 9) identifiziert. Von den 17 NOT-Partnern wurden die Proteine GBP1 (2x), CD74 (17x) und CREB3 (3x)

mehrfach isoliert. Für die weiteren Analysen wurde jeweils der Klon, der die stärkste *MEL1* Reporteraktivierung zeigte, eingesetzt. Die restlichen 12 Klone erwiesen sich nach Auswertung der Sequenzierung als falsch positiv. Bis auf CREB3 befanden sich alle isolierten cDNA-Sequenzen im gleichen Leseraster wie die GAL4-AD.

Tab. 9 Durch Sequenzierung identifizierte potentielle NOT-Liganden

Nr.	Klon	potentieller Ligand - Gen ID / Länge	Isolierte Region des Liganden (As)	Akz.
1	60	Synaptophysin-Like 1 (SYPL1) – ID: 6856 259 As (Isoform 1) 241 As (Isoform 2)	173-259 155-241	NM_006754 NM_182715
2	544	Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) – ID: 4035 4544 As	4280-4530	NM_002332
3	6	VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein)-Associated Protein A, 33kDa (VAPA) – ID: 9218 249 As (Isoform 1)	117-249	NM_194434
4	7	Sushi Repeat-Containing Protein, X-Linked (SRPX) – ID: 8406 464 As (Isoform 1) 405 As (Isoform 3) 379 As (Isoform 4)	1- 82 1- 82 1- 82	NP_006298 NP_00164222 NP_00164223
5	233	FK506 Binding Protein 8, 38kDa (FKBP8) – ID: 23770 413 As (Isoform 2)	1-250	NM_012181
6	435	Guanylate-Binding Protein 1, Interferon-Inducible (GBP1) – ID: 2633 592 As	449-592	NP_002044
7	1	Heme Oxygenase 2 (HMOX2) – ID: 3163 316 As (Isoform b)	1-226	NP_001120676
8	2	BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa Interacting Protein 3 (BNIP3) – ID: 664 228 As	1-126	AAH80643
9	318	Oxysterol Binding Protein (OSBP) – ID: 5007 807 As	195-474	NM_002556

10	433	Oxysterol Binding Protein-Like 9 (OSBPL9) – ID: 114883 719 As (Isoform b) 736 As (Isoform e) 754 As (Isoform CRA_c) 738 As (Isoform CRA_f)	55-310 72-327 90-345 72-327	NM_148906 NM_024586 EAX06812 EAX06815
11	370	CD74 Molecule, Major Histocompatibility Complex, Class II Invariant Chain (CD74) – ID: 972 232 As (Isoform b)	10-232	NP_004346
12	322	Smoothelin (SMTN) – ID: 6525 994 As (Isoform CRA_h)	525-798	EAW59932
13	392	SEC16 Homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) (SEC16B) – ID: 89866 737 As (Isoform CRA_c)	519-737	EAW91013
14	508	NDRG Family Member 2 (NDRG2) – ID: 57447 357 As (Isoform b)	26-263	NP_057334
15	565	Inverted Formin, FH2 and WH2 Domain Containing (INF2) – ID: 64423 1249 As (Isoform 1)	567-849	NP_071934
16	84	Mitochondrially Encoded Cytochrome c OxidaseIII (MT-CO3) – ID: 4514 261 As	151-261	YP_003024032
17	389	cAMP Responsive Element Binding Protein 3 (CREB3) – ID: 10488 371 As (Isoform 2)	1-253	BC009402

4.1.3 Bestätigung der Bindung der potentiellen Liganden an NOT durch Ko-Transformation in den AH109-Stamm

Zur Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion zwischen NOT und den isolierten Liganden (s. Tab. 9), wurden die AH109 Hefezellen mit dem pAS2-1-NOT-1 *Bait*-Konstrukt und den als positiv identifizierten *Prey*-Plasmiden retransformiert (s. Punkt 3.2.2.4.1). Wie beim *Screen* wurden die Transformanten erst auf Platten mittlerer Stringenz (SD/-Leu/-Trp/-His) (Abb. 6A) kultiviert und dann auf Platten hoher Stringenz (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) transferiert. Zum Nachweis der β -Galactosidase-Aktivität wurden Filter *Lift-Assays* (s. Punkt

3.2.3.9) durchgeführt (Abb. 6B). Als Positivkontrolle für eine Protein-Protein-Interaktion diente die Ko-Transformation der Hefezellen mit den Konstrukten pAS2-1-Ptc¹¹⁴³⁻¹²⁸⁶ und pACT-dTid²⁰⁶⁻³¹⁸ (Canamasas *et al.*, 2003) und als Positivkontrolle für den Filter *Lift-Assay* wurden die Zellen mit dem leeren Vektor pCL1 transformiert. Für die Negativkontrollen wurden AH109 Zellen mit den Konstrukten pAS2-1-NOT-1 und pACT2-p53 (Clontech) und den leeren Vektoren pAS2-1 und pACT2 ko-transformiert. Die Ergebnisse des Filter *Lift-Assays* nach Retransformationen der AH109 Zellen mit den identifizierten Liganden (s. Tab. 9) und dem pAS2-1-NOT-1 *Bait*-Konstrukt sind in Abb. 6 dargestellt. Des Weiteren wurde die Analyse auf die Proteine cAMP Responsive Element Binding Protein 1 (CREB1) und cAMP-Responsive Element-Binding Protein-Like 1 (CREBL1) erweitert (Abb. 6). CREB1 und CREBL1 gehören wie CREB3 zu der Familie der Basic-Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren (Landschulz *et al.*, 1988; Haze, K. *et al.*, 2001). Die für die Proteine kodierenden *Full-Length*-cDNAs, kloniert in den Vektor pACT2 (Szydowski, 2011), wurden freundlicherweise von Frau Kurzik-Dumke zur Verfügung gestellt.

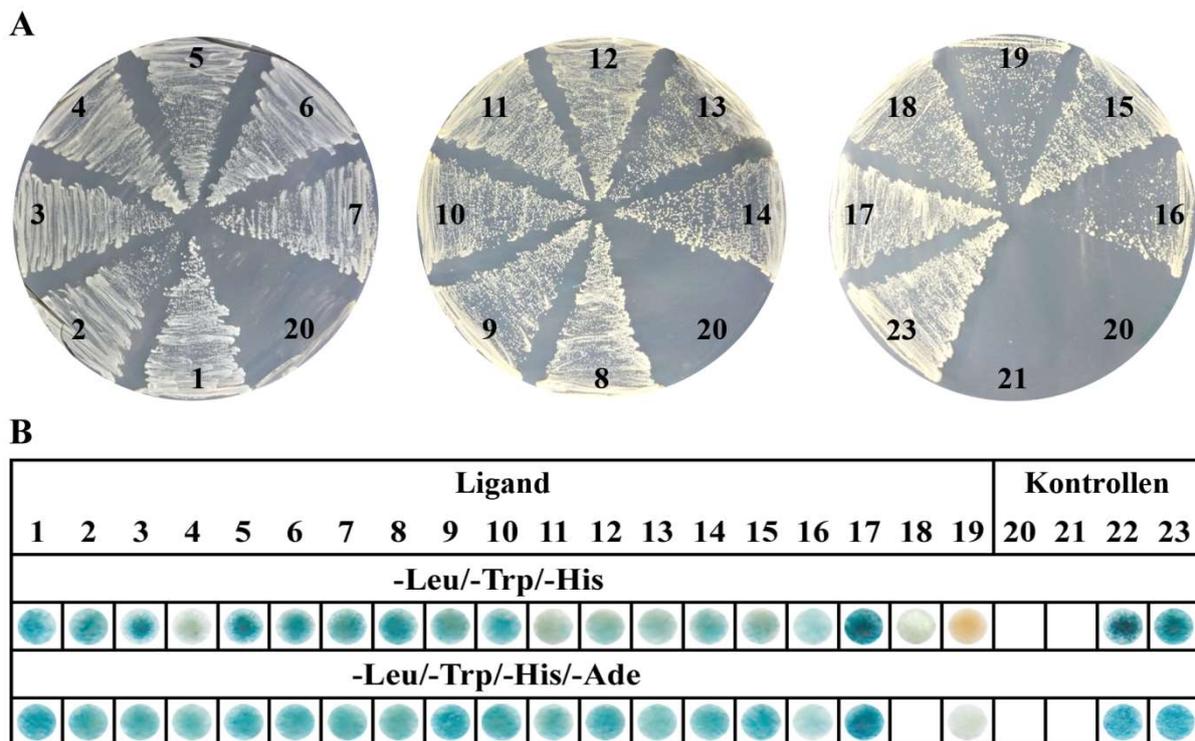


Abb. 6 Bestätigung der NOT-Liganden Bindung durch Retransformation des pAS2-1-NOT-1 Baits mit den die Liganden kodierenden Prey-Plasmiden in den Hefestamm AH109. A) Ausstrich der Transformanten auf SD/-Leu/-Trp/-His (mittlere Stringenz). Die Nummerierung der Liganden entspricht der in Tab. Nr.4. [1-17: potentielle Liganden: (1) SYPL1, (2) LRP1, (3) VAPA, (4) SRPX, (5) FKBP8, (6) GBP1, (7) HMOX2, (8) BNIP3, (9) OSBP, (10) OSBPL9, (11) CD74, (12) SMTN (13) SEC16B, (14) NDRG2, (15) INF2, (16) MT-CO3, (17) CREB3; 18-19: erweiterte potentielle Liganden: (18) CREB1 (19) CREBL1; 20-21: Negativkontrollen: (20) pAS2-1-NOT-1 + pACT2-p53,

(21) pAS2-1 + pACT2; 22-23: Positivkontrollen: (22) Vektor pCL1, (23) pAS2-1-Ptc1¹¹⁴³⁻¹²⁸⁶ + pACT-dTid²⁰⁶⁻³¹⁸]. **B)** Nachweis der Protein-Protein-Bindungen mittels Filter *Lift-Assay* 24 Std. nach erfolgter Übertragung auf die entsprechende Selektionsplatte.

Die Retransformationsexperimente bestätigen für alle isolierten Liganden die Bindung mit NOT-1. Die Proteine CREB1 und CREBL1 binden nicht an NOT (s. Kapitel: Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit CREB3, Tab. 18).

4.2 Kartierung der Interaktionsdomänen von NOT mit den Liganden SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3

Für die Experimente zur Kartierung der Bindungsdomänen mittels des Y2H Systems wurde der Hefestamm Y187 (s. Punkt 3.1.18) verwendet. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurden die kompetenten Zellen zunächst einzeln mit den *Bait*- und *Prey*-Plasmiden transformiert und auf entsprechenden Selektionsplatten (SD/-Trp, SD/-Leu) kultiviert. Im zweiten Schritt wurden die vortransformierten Hefezellen mit den NOT- bzw. Liganden-Konstrukten (s. Punkt 3.1.16, Tab. 5/6) transformiert. Für die sequentiellen Transformationen im kleinen Maßstab (s. Punkt 3.2.2.4.1) wurden jeweils 750ng Plasmid-DNA eingesetzt. Zum Nachweis der Protein-Protein-Interaktion und der damit verbundenen Aktivierung des Reportergens *lacZ*, wurden Filter *Lift-Assays* durchgeführt. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen wurde die Expression der rekombinanten Proteine mittels Kolonie-Blot (s. Punkt 3.2.3.1) und spezifischer Antikörper, gerichtet gegen die GAL4-BD und AD (s. Punkt 3.1.10, Tab. 3), überprüft (s. Punkt 3.2.3.7.2). Als Positivkontrolle für den Filter *Lift-Assay* wurden die Hefezellen mit dem leeren Vektor pCL1 (+) transformiert. Für die erste von drei Negativkontrollen (-1) wurden die Y187 Zellen mit den beiden leeren Vektoren pAS2-1 und pACT2 ko-transformiert. Die zweite Negativkontrolle (-2) bestand aus dem pAS2-1-NOT-1-Stamm, transformiert mit dem leeren Vektor pACT2, und die dritte Negativkontrolle (-3) aus dem entsprechenden *Prey*-Stamm, transformiert mit dem leeren Vektor pAS2-1. In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse zur Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und seinen Liganden separat dargestellt.

4.2.1 Für die Bindungsstudien hergestellte NOT-Konstrukte

Das NOT-1 Protein besteht aus 438 Aa (Kurzik-Dumke und Kaymer, 1996, NCBI Akz.: Y09022, Abb. 7A). Mit Hilfe des Programms TMPred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_ form. html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) wurden für das NOT-1 Protein zehn hypothetische

Transmembrandomänen (Abb. 7A, grau unterlegt) errechnet. Das Ergebnis bestätigt die bisher, in der AG Kurzik-Dumke (Kaymer, 1997), durchgeführten Analysen zur Charakterisierung des Proteins mittels eines Hydrophobizitäts-Plot nach Kyte und Doolittle (1982). Die Termini des Proteins befinden sich nach beiden Modellen im Zytosol. Zur Kartierung der Bindungsdomänen von NOT wurden 12 Konstrukte hergestellt (Abb. 7B). Das Konstrukt pAS2-1-NOT-1 kodiert für das *Full-Length* NOT Protein (Kurzik-Dumke und Kaymer, 1996, NCBI Akz.: Y09022).

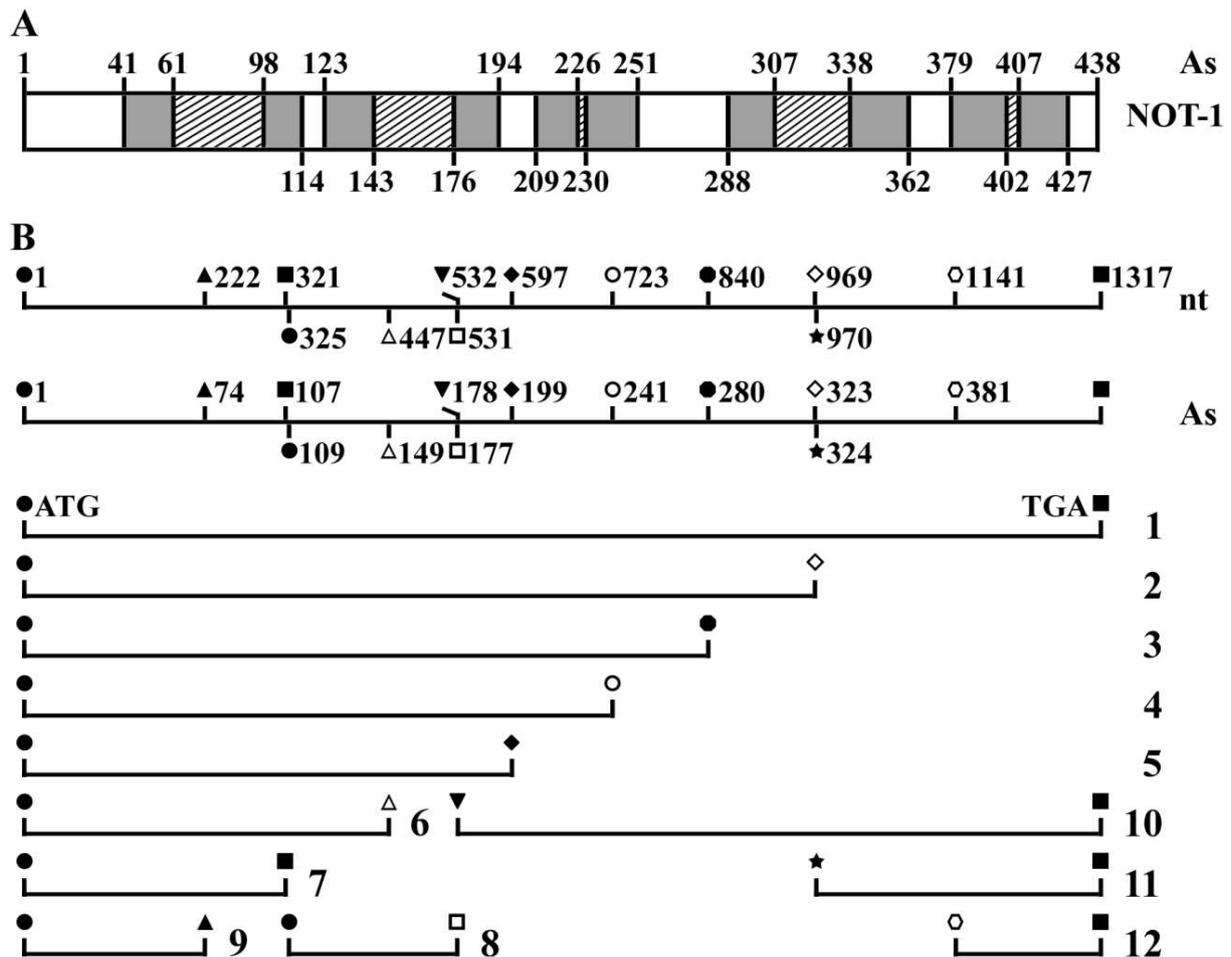


Abb. 7 Schematische Darstellung des NOT Proteins und der hergestellten Deletionskonstrukte
 A) Das NOT-1 Protein besteht aus zehn Transmembrandomänen (grau unterlegt), die mit dem Computerprogramm TMPRED berechnet wurden. Die zytosolischen Domänen sind weiß unterlegt. Die im Lumen des ER lokalisierten Domänen sind schraffiert (Kurzik-Dumke und Kaymer, 1996, NCBI Akz.: Y09022). B) Länge (nt/As) der Protein kodierenden Region des NOT-1 Proteins und der hergestellten Konstrukte.

4.2.2 Test auf NOT-Homodimerbildung

Für die folgenden Analysen und in Hinsicht auf die Bestimmung der NOT-Expressionsprofile mittels Western-Blot wurde das NOT Protein mit Hilfe der Y2H Technik auf Homodimerbildung getestet. Hierzu wurde das pACT2-NOT-1 Konstrukt in den pAS2-1-NOT-1 Hefestamm transformiert und die Transformanten auf β -Galaktosidase-Aktivität durch einen Filter *Lift-Assay* (s. Punkt 3.2.7) überprüft. Zur Sicherstellung der NOT-Expression wurden Kolonie-Blots (s. Punkt 3.2.3.1) durchgeführt. Wie den Resultaten des Filter *Lift-Assay* aus Tab. 10 zu entnehmen ist, bilden die NOT Proteine keine Homodimere aus.

Tab. 10 Test auf Homodimerbildung des NOT Proteins

	pACT2-NOT-1	Kontrollen		
		-1	-2	+
pAS2-1-NOT-1				

Der Filter *Lift-Assay* zum Nachweis der NOT Homodimerbildung ist negativ. Die Überprüfung der Transformanten mittels Kolonie-Blot (s. Punkt 3.2.3.1) und spezifischer Antikörper, gerichtet gegen die GAL4-BD und AD (s. Punkt 3.2.3.7.2), war positiv (nicht dargestellt).

4.2.3 Herstellung der Plasmidkonstrukte für die Bindungsstudien mit NOT und den Liganden SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3

Für die Bindungsstudien zwischen NOT und den Liganden SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3 mittels des Y2H wurden die in Punkt 3.1.16, Tab.5 aufgeführten Plasmidkonstrukte hergestellt. Mit Ausnahme der pAS2-1-NOT Konstrukte 1, 2 und 10 (s. Punkt, 4.2.1, Abb. 7), sowie den pACT2-Konstrukten LRP1-3 (s. Punkt, 4.2.5, Abb. 9), FKBP8-1 (s. Punkt, 4.2.7, Abb. 11), OSBPL9-1 (s. Punkt, 4.2.9, Abb.13) und CREB3-1 (s. Punkt, 4.2.10, Abb. 14) wurden alle Konstrukte nach der folgenden Klonierungsstrategie hergestellt. Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden aus den entsprechenden cDNAs (s. Punkt 3.1.13) amplifiziert und über die für Klonierungszwecke künstlich angefügten Schnittstellen (s. Punkt 3.1.16, Tab.5) in den Vektor pAS2-1 bzw. pACT2 einkloniert. Zur Herstellung des Konstruktes pAS2-1-NOT-1 wurde das cDNA-Fragment direkt aus dem not56L_IRALp962-Klon (s. Punkt 3.1.13) über die Restriktionsschnittstellen 5'-EcoRI und 3'-XhoI herausgeschnitten und nach Behandlung mit Klenow-Fragment in den Vektor pAS2-1 über die Schnittstellen 5'-EcoRI und 3'-SmaI einkloniert. Die Konstrukte pAS2-1-NOT-2 und pAS2-1-NOT-10 wurden durch Restriktion des Konstruktes pAS2-1-NOT-1 mit BamHI (für

NOT-2) bzw. NcoI (für NOT-10) und anschließender Religation hergestellt. Zur Herstellung der pACT2-Konstrukte LRP1-3, OSBPL9-1 und CREB3-1 wurden die entsprechenden Genabschnitte, erweitert um Linker mit den Klonierungsschnittstellen 5'-EcoRI und 3'-XhoI (s. Punkt 3.1.16, Tab. 5), synthetisiert. Mit den Synthesen der Fragmente wurde die Firma ATG:biosynthetics GmbH beauftragt. Durch die angefügten Restriktionsendonukleasen wurden die proteinkodierenden Regionen aus dem jeweiligen Trägervektor (pUC-Derivat) herausgeschnitten und in den Vektor pACT2 kloniert. Das *Full-Length*-Konstrukt FKBP8-1 wurde mittels OE-PCR (s. Punkt 3.2.2.15.2) hergestellt. Die benötigten überlappenden DNA-Fragmente wurden durch die Primerkombinationen FK506bP8FI/FK506bP8RII und FK506bP8FII/FK506bP8RI (s. Punkt 3.1.12, Tab. 4) aus dem im Y2H *Screen* isolierten Klon (233) und dem erworbenen cDNA-Klon IRAUp969D0560D amplifiziert. Für die OE-PCR wurde die Primerkombination FK506bp8FI/FK506bp8RI (s. Punkt 3.1.12, Tab. 4) verwendet. Die Einklonierung in den pACT2 Vektor erfolgte über die künstlich angefügten Schnittstellen 5'-BamHI und 3'-EcoRI. Zur Überprüfung der Korrektheit des Leserahmens wurden alle Konstrukte vor der Verwendung sequenziert.

4.2.4 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und SYPL1

Das SYPL1 Protein ist ein Multi-Pass-Transmembranprotein, welches in der Membran von zytoplasmatischen Transport-Vesikeln (Haass *et al.*, 1996) lokalisiert ist. Das Protein besteht aus einer N- und C-terminalen zytoplasmatischen (ZD)- und einer zentralen MARVEL-Domäne (MD) (Abb. 8A). Innerhalb der MD sind vier Transmembran (TM)-, zwei vesikuläre (V)-Domänen und eine ZD lokalisiert (UniProt: Q16563 - SYPL1_HUMAN). Die V-Domänen beinhalten jeweils eine N-Glykosylierungsstelle (^N) (UniProt: Q16563 - SYPL1_HUMAN). Für das SYPL1 Protein sind zwei Isoformen (I) beschrieben: 1 und 2 (NCBI Akz.: NM_006754 und NM_182715). Sie unterscheiden sich am N-Terminus. Die 241 As lange I2 wird von einem alternativen Startcodon translatiert und ist 18 As kürzer als die I1 (259 As) (Abb. 8A). Zur Kartierung der Bindungsdomänen wurden 13 SYPL1-Konstrukte hergestellt (Abb. 8B). Das Konstrukt Nr. 1 kodiert für das *Full-Length* SYPL1 Protein (I1). Der Bereich nt 517*-780 der I1 stellt den mittels des Y2H Systems gefischten Klon 60 (Tab. 9) dar.

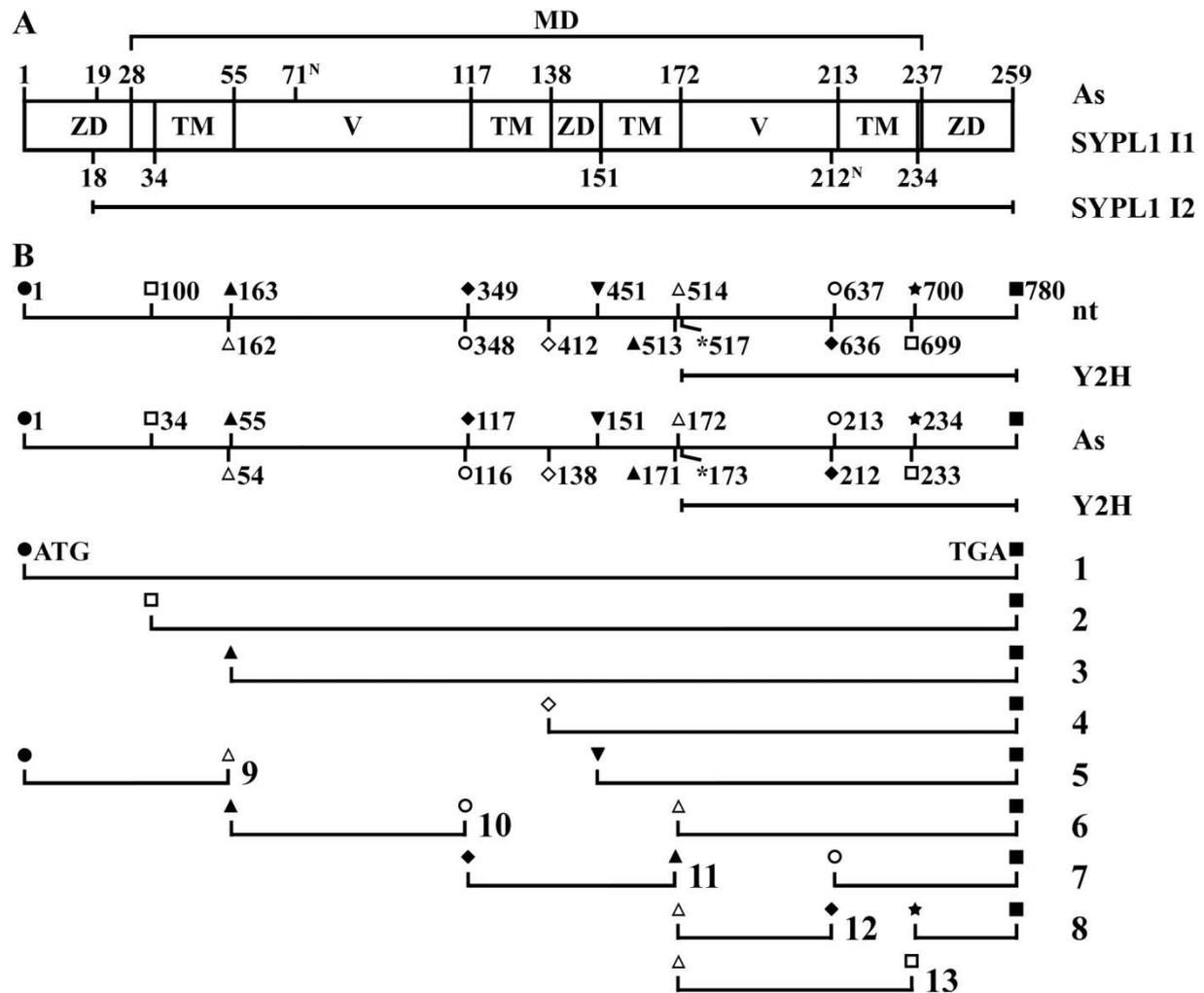


Abb. 8 Strukturelle Merkmale des SYPL1 I1 Proteins und Übersicht über die hergestellten Konstrukte. **A)** Schematische Darstellung der Isoform 1 des SYPL1 Proteins (NCBI Akz.: NM_006754). Die N-terminale ZD Domäne besteht aus den As 1-33 und die C-terminale aus den As 234-259. Die MD erstreckt sich über die As 28-237. Die vier TM-Domänen umfassen die As 34-54, 117-137, 151-171 und 213-233 und die zwei V-Domänen die As 55-116 und 172-212. Die V-Domänen beinhalten je eine N-Glykosylierungsstelle (As 71^N und 212^N) (UniProt: Q16563 - SYPL1_HUMAN). Innerhalb der MD befindet sich eine weitere ZD (As 138-150). Die I2 Form wird von einem im Exon 1, As-Position 19, der I1 Form lokalisierten alternativen Startcodon translatiert. Sie ist im Vergleich zur I1 um 18 As kürzer. Der As-Bereich 19-259 der I1 ist mit dem As-Bereich 1-241 der I2 identisch. **B)** Länge (nt/As) der Protein kodierenden Region der I1 und der hergestellten Expressionskonstrukte Nr. 1-13. Der mittels des Y2H isolierte Klon 60 (Tab. 9) kodiert für die As 173*-259.

Wie aus den in der Tab. 11A dargestellten Resultaten der Y2H Bindungsstudie ersichtlich, binden die durch die SYPL1-Konstrukte Nr. 3, 4, 5, 6 und 8 kodierten Protein-Fragmente mit NOT. Die Filter *Lift-Assays* zeigen, dass die Bindungen unterschiedlich stark sind. Anhand der Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die Region As 55-259 der I1 für die Bindung mit NOT relevant ist. Die Frage, warum die Resultate für das SYPL1 *Full-Length* Konstrukt Nr.1 und die Deletionskonstrukte 2, 7, 10, 11, 12 und 13 negativ ist, bleibt offen. Da es sich

hier um rekombinante Proteine handelt, könnte es möglich sein, dass die Proteine Konformationen ausbilden, die die Bindungsstellen blockieren. Aufgrund der starken Bindung des SYPL1-Konstrukts Nr. 3 zu NOT wurde dieses zur Identifizierung der Bindungsdomänen von NOT an SYPL1 verwendet (Tab. 11B). Wie man in der Tab. 11B erkennen kann, binden nur die NOT-Konstrukte Nr. 1 (As 1-438) und 2 (As 1-323) mit SYPL1. Das Ergebnis für die restlichen Konstrukte ist negativ. Die Bindungsstudie hat gezeigt, dass die Region As 1-323 von NOT für die Bindung mit SYPL1 essentiell ist.

Tab. 11 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und SYPL1

A	SYPL1 II Konstrukte													Kontrollen		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	-1	-2	+
NOT-1																

B	NOT Konstrukte												Kontrollen		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	-1	-3	+
SYPL1-3															

A) Filter *Lift-Assays* zur Kartierung der Bindungsdomäne von SYPL1 mit NOT-1. **B)** Bestimmung der Bindungsdomäne von NOT an SYPL1 unter Verwendung des SYPL1-Konstruktes Nr.3. Zur Überprüfung der Proteinexpression in den Transformanten wurden Kolonie-Blots (s. Punkt 3.2.3.1) durchgeführt. Der immunologische Nachweis (s. Punkt 3.2.3.7.2) mittels spezifischer Antikörper, gerichtet gegen die GAL4-BD und AD zeigte, dass alle Proteine exprimiert sind (nicht dargestellt).

4.2.5 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und LRP1

Das LRP1 Protein ist ein integrales Transmembranprotein vom Typ-I und gehört zur Low-Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptor-Gen Familie (Hussain *et al.*, 1999). Nach der Synthese im ER wird das 600 kDa große LRP1-Vorläufermolekül am Golgi-Apparat (trans-Golgi-Netzwerk) durch das Enzym Furin-Protease (Abb. 9A¹, As 3940-3943) in eine 515 kDa α - und 85 kDa β -Untereinheit gespalten (Herz *et al.*, 1990; Neels *et al.*, 1999). Die beiden Untereinheiten bleiben nicht-kovalent miteinander verknüpft. Über die TM-Domäne der β -Kette wird das LRP1 Protein in die Zellmembran integriert und die α -Kette in den extrazellulären Raum exponiert (Neels *et al.*, 1999). Der extrazelluläre Bereich (EX) besteht aus vier verschieden großen, Liganden bindenden, Domänen (Abb. 9A, Cluster I-IV, schraffiert), die aus insgesamt 31 cysteinreichen Wiederholungen, den LDL-Rezeptoren Klasse A (LDLRA), zusammengesetzt sind. Vom N-Terminus ausgehend, setzen sich die Cluster I-IV aus 2, 8, 10 und 11 LDLRA zusammen (Neels *et al.*, 1999). Zwischen den

Clustern befinden sich die *Epidermal growth factor* (EGF)- Vorläufer-Homologie-Domänen, die sich aus EGF-Wiederholungen (hellgrau) und β -Propeller-Domänen, auch YWTD-Sequenzen oder LDL-Rezeptoren Klasse B (LDLRB)-Domäne (dunkelgrau) genannt, zusammensetzen (UniProt: Q07954 - LRP1_HUMAN). Innerhalb des EX-Bereiches befinden sich zusätzlich 18 Bindungsstellen für Calcium, 6 Phosphorylierungsstellen, 53 N-Glykosylierungsstellen und es kommt zur Ausbildung von 159 Disulfidbrücken (UniProt: Q07954 - LRP1_HUMAN). Der zytosolische Bereich der β -Kette (Abb. 9A²) besteht aus 100 As und beinhaltet ein NPxY- (As 4470-4473) und FxNPxY-Motiv (As 4502-4507) (grau unterlegt), zwei Di-Leucin Motive (As 4487-4488 und 4530-4531, schwarz unterlegt) und ein YxxØ Motiv (As 4507-4510, schraffiert) (Li *et al.*, 2000). Für die Bindungsstudien wurden drei LRP1-Konstrukte hergestellt (Abb. 9B). Das Konstrukt Nr. 1 kodiert für die TM-Domäne und die Konstrukte Nr. 2 und 3 für den zytosolischen Bereich. Konstrukt Nr. 4 stellt den mittels des Y2H Screen isolierten Klon 544 (Tab. 9) dar.

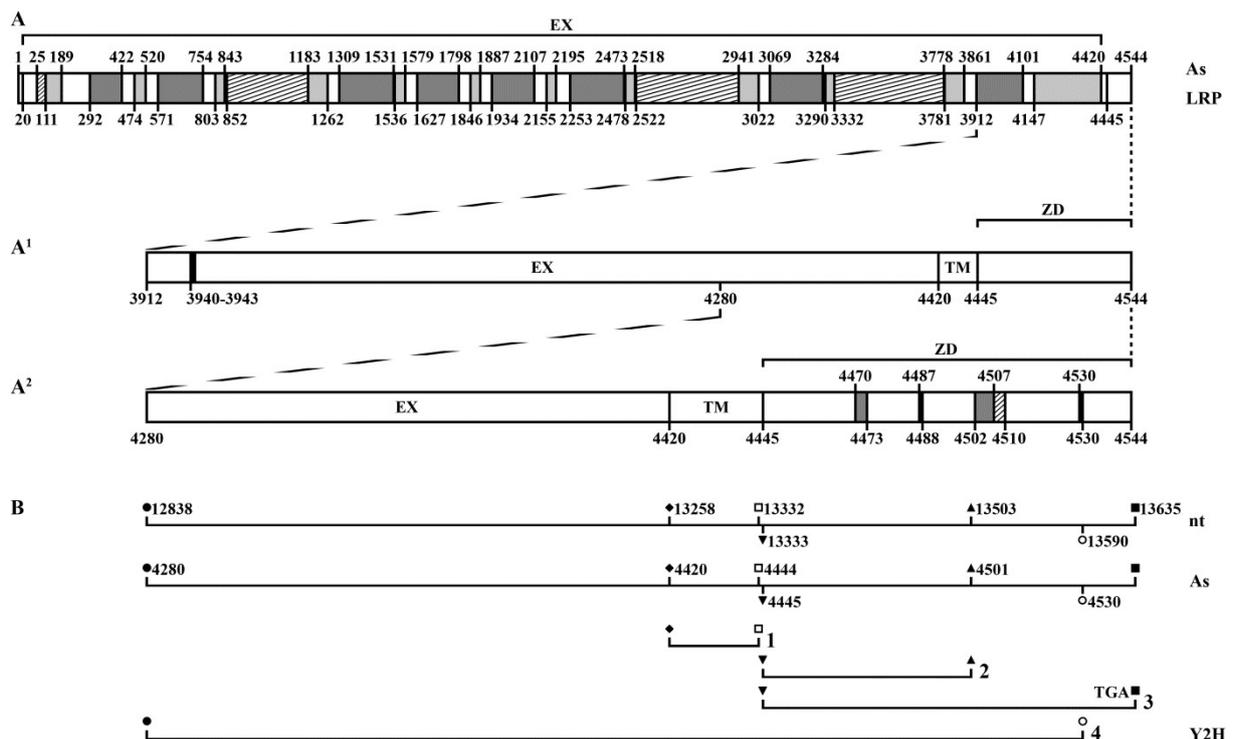


Abb. 9 Strukturelle Merkmale des LRP1 Proteins und der hergestellten Deletionskonstrukte. **A)** Schematische Darstellung des *Full-Length* LRP1 Proteins (NCBI Akz.: NM_002332). Das LRP1 Protein besteht aus drei Hauptdomänen: der EX- (As 1-4419), der TM- (As 4420-4444) und der zytosolischen Domäne (ZD, As 4445-4544). Die EX-Domäne setzt sich insgesamt aus 31 LDLR Klasse A- (schraffiert), 22 EGF-like- (hellgrau unterlegt) und 34 LDLR Klasse B-Domänen (dunkelgrau unterlegt) zusammen, die teils gruppiert sind. Der C-Terminus der EX-Domäne beinhaltet zusätzlich eine Furin-Protease Schnittstelle (A¹, As 3940-3943) für die Spaltung am Golgi-Apparat. Innerhalb der ZD (A²) sind das NPxY- (As 4470-4473) und das FxNPxY-Motiv (As 4502-4507) (grau unterlegt), die zwei Di-Leucin Motive (As 4487-4488 und 4530-4531, schwarz unterlegt) und das YxxØ-Motiv (As 4507-4510, schraffiert) lokalisiert (Li *et al.*, 2000). **B)** Länge (nt/As) der Protein

kodierenden Region der hergestellten Deletionskonstrukte 1-3. Der im *Screen* isolierte Klon 544 (Tab. 9) kodiert für die As 4280-4530 und stellt Konstrukt Nr.4 dar.

Das negative Ergebnis des Filter *Lift-Assays* für die LRP1-Deletionskonstrukte 1-3 schließt die Bindung von NOT mit der TMD oder ZD von LRP1 aus und impliziert die EX-Domäne (As 1-4419) als Bindungsstelle (Tab. 12A). Die Auswertung der Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit dem LRP1-Konstrukt Nr. 4 zeigt, dass die Bindung über den N-terminalen Bereich, As 75-177, des NOT Proteins erfolgt (Tab. 12B).

Tab. 12 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und LRP1

A	LRP1 Konstrukte				Kontrollen		
	1	2	3	4	-1	-2	+
NOT-1							

B	NOT Konstrukte												Kontrollen		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	-1	-3	+
LRP1-4															

A) Filter *Lift-Assays* zur Kartierung der Bindungsdomäne von LRP1 mit NOT-1. **B)** Bestimmung der Bindungsdomäne von NOT an LRP1 unter Verwendung des LRP1-Konstruktes Nr.4. Zur Überprüfung der Proteinexpression in den Transformanten wurden Kolonie-Blots (s. Punkt 3.2.3.1) durchgeführt. Der immunologische Nachweis (s. Punkt 3.2.3.7.2) mittels spezifischer Antikörper, gerichtet gegen die GAL4-BD und AD zeigte, dass alle Proteine exprimiert sind (nicht dargestellt).

4.2.6 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit VAPA

Das VAPA Protein ist ein *Single-Pass* Typ IV Membranprotein, welches in der Plasmamembran und intrazellulären Vesikel lokalisiert ist (Lapierre *et al.*, 1999). Das Protein besteht aus zwei Hauptdomänen: der ZD und der TM-Domäne, welche den C-Terminus bildet (Abb. 10A). Innerhalb der ZD ist eine *Major Sperm Protein* (MSP)-Domäne und eine *Coiled-Coil* (CC)-Domäne lokalisiert. Am Ende der MSP-Domäne befindet sich eine N6-Acetylierungsstelle ([^]) (UniProt: Q9P0L0 - VAPA_HUMAN). Für das VAPA Protein sind zwei Isoformen beschrieben: 1 und 2 (NCBI Akz.: NM_194434 und NM_003574). Die I1 ist durch Deletion des die As 140-184 kodierten cDNA Bereiches im Vergleich zur I2 um 45 As kürzer. Zur Kartierung der Bindungsdomänen wurden acht VAPA-Konstrukte hergestellt

(Abb. 10B). Das Konstrukt Nr. 1 ist I2 spezifisch. Der Bereich nt 349*-750 der I1 stellt den mittels des Y2H Systems gefischten Klon 6 (Tab. 9) dar.

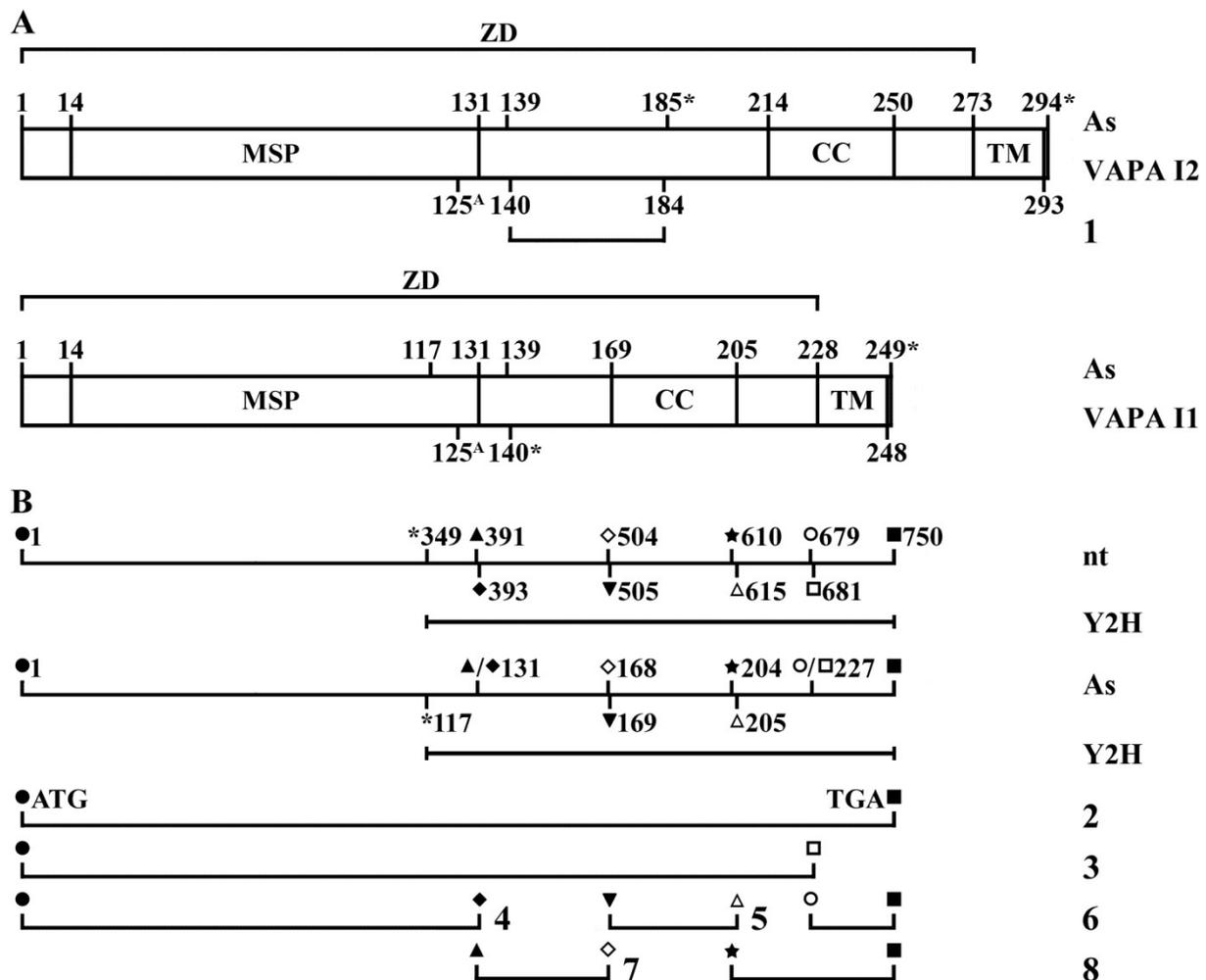


Abb. 10 Strukturelle Merkmale des VAPA Proteins und Übersicht über die hergestellten Konstrukte. A) Darstellung der Isoformen 1 und 2 des VAPA Proteins (NCBI Akz.: NM_194434 und NM_003574). Der As-Bereich 1-139 beider Isoformen, der As-Bereich 185*-294 der I2 und der As-Bereich 140*-249 der I1 sind identisch. Die ZD der I2 besteht aus den As 1-272 und der I1 aus den As 1-227. Die MSP-Domäne umfasst bei beiden Isoformen As 14-131. Innerhalb der MSP-Domäne ist eine N6-Acetylierungsstelle (As 125^A) lokalisiert. Die CC-Domäne ist in I2 an As 214-250 und I1 an As 169-205 lokalisiert. Den C-Terminus der beiden Isoformen (As 273-293 bei I2 und As 228-248 bei I1) bildet die TMD. Das Konstrukt Nr. 1 ist I2 spezifisch. **B)** Länge (nt/As) der Protein kodierenden Region der I1 und der Expressionskonstrukte 2-8. Der mittels des Y2H *Screen* isolierte Klon 6 (Tab. 9) kodiert für die As 117*-249.

Die Auswertungen der Filter *Lift-Assays* (Tab. 13A) zeigen, dass die Bindung von VAPA an NOT über die ZD (As 1-227) (Abb. 10) der I1 erfolgt, die TM-Domäne (As 228-248) für die Bindung jedoch essentiell ist. Anhand des im Y2H *Screen* isolierten Klons (Klon 6, Tab. 9) kann man schlussfolgern, dass der zytosolische Bereich As117*-227, welcher die CC-Domäne (As 169-205) enthält, für die Bindung ausreicht. Eine CC-Domäne besteht aus

mehreren α -Helices, welche umeinander zu einer Mehrfachhelix (Superhelix) gewunden sind (Lupas und Gruber, 2005). Durch Bindungsstudien konnten Weir *et al.* (2001) zeigen, dass die Dimerisierung (Homo- und Heterodimere) von VAPA über die CC-Domäne erfolgt. Der Vergleich der Ergebnisse des Filter *Lift-Assays* zeigt jedoch, dass Konstrukt Nr. 2 (Tab. 13A) stärker als Klon 6 (Abb. 6 / Nr. 3) an NOT bindet. Dies könnte bedeuten, dass die Bindung an NOT durch die MSP-Domäne (As 14-131), benannt aufgrund der Ähnlichkeit zum MSP von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), verstärkt wird bzw. die Bindung über beide, die CC- und die MSP-Domäne erfolgt. Die MSP-Domänen der VAP-Proteine bilden eine Ig-ähnliche Domäne aus, welche sieben β -Stränge umfasst und ein dreisträngiges und ein viersträngiges Faltblatt bildet (Tsuda *et al.*, 2008). Ig-ähnliche Domänen sind Protein-bindende Domänen (Tarr und Scott, 2005).

Die Kartierung der NOT-Bindungsdomäne an VAPA erfolgte mit dem VAPA-Konstrukt Nr. 2. Die Resultate (Tab. 13B) zeigen, dass die Bindung primär über den N-Terminus, As 1-74, des NOT Proteins erfolgt. Die schwache Bindung des durch das NOT Konstrukt Nr. 10 kodierten Proteins lässt jedoch darauf schließen, dass der As-Bereich 178-323 ebenfalls an der Bindung beteiligt ist. Der Filter *Lift-Assay* für die NOT-Konstrukte Nr. 3, (5) und 6 ist negativ. Das Resultat könnte eine Folge von Konformationsveränderungen der deletierten Proteine darstellen.

Tab. 13 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und VAPA

A	VAPA Konstrukte								Kontrollen		
	I2		I1						-1	-2	+
	1	2	3	4	5	6	7	8			
NOT-1											

B	NOT Konstrukte												Kontrollen		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	-1	-3	C+
VAPA-2															

A) Filter *Lift-Assays* zur Kartierung der Bindungsdomäne von VAPA mit NOT-1. **B)** Bestimmung der Bindungsdomäne von NOT an VAPA unter Verwendung des VAPA-Konstruktes Nr.2. Zur Überprüfung der Proteinexpression in den Transformanten wurden Kolonie-Blots (s. Punkt 3.2.3.1) durchgeführt. Der immunologische Nachweis (s. Punkt 3.2.3.7.2) mittels spezifischer Antikörper, gerichtet gegen die GAL4-BD und AD zeigte, dass alle Proteine exprimiert sind (nicht dargestellt).

4.2.7 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit FKBP8

Das FKBP8 Protein gehört zur Immunophilin-Unterfamilie der FK506-binding Proteine (FKBPs) (Somarelli *et al.*, 2008). Aufgrund der Fähigkeit die *cis*-/*trans*-Umwandlung von Prolin-Imid-Peptidbindungen zu katalysieren, werden die Immunophile auch als Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen (PPIase) bezeichnet (Somarelli *et al.*, 2008). Es sind vier Isoformen des FKBP8 Proteins beschrieben: 1, 2, 3 und 38 (NCBI Akz.: AY225339, NM_012181, XP_005259902 und BC009966) (Abb. 11A). Die I2 stellt mit 413 As das größte Protein dar. Im Vergleich zur I2 ist die I1 durch Deletion der As 184 (*) um eine und die I3 durch Deletion der Exone 3, 4 und 5 (As 98-257) um 160 As kürzer (Chen *et al.*, 2008). Die I38 wurde ursprünglich als neues FKBP Homolog identifiziert und aufgrund der putativen Größe von 38 kDa als FKBP-related 38-kDA Protein (FKBPr38) bezeichnet (Lam *et al.*, 1995). Diese Isoform entsteht durch einen verkürzten ORF der I2 (-As 1-57) (Nielsen *et al.*, 2004). Die FKBP8 Proteine bestehen aus zwei Hauptdomänen: der ZD und der TM-Domäne, welche den C-Terminus bildet (Abb. 11A). Innerhalb der ZD befinden sich eine Glutamin (Glu)-reiche Region, eine PPIase Domäne, drei *Teratricopeptide Repeat* (TPR)- Domänen und eine Calmodulin-Bindungsdomäne (CaM) (Shirane und Nakayama, 2002). C-terminal befinden sich zusätzlich eine Tyrosin-Phosphorylierungs (P)- und eine N6-Acetylierungsstelle (A) (UniProt: Q14318 - FKBP8_HUMAN). Zur Kartierung der Bindungsdomänen wurden sechs FKBP8-Konstrukte hergestellt (Abb. 11B). Der im Y2H *Screen* isolierte Klon 233 (Tab. 9) kodiert für die As 1-250 der I2.

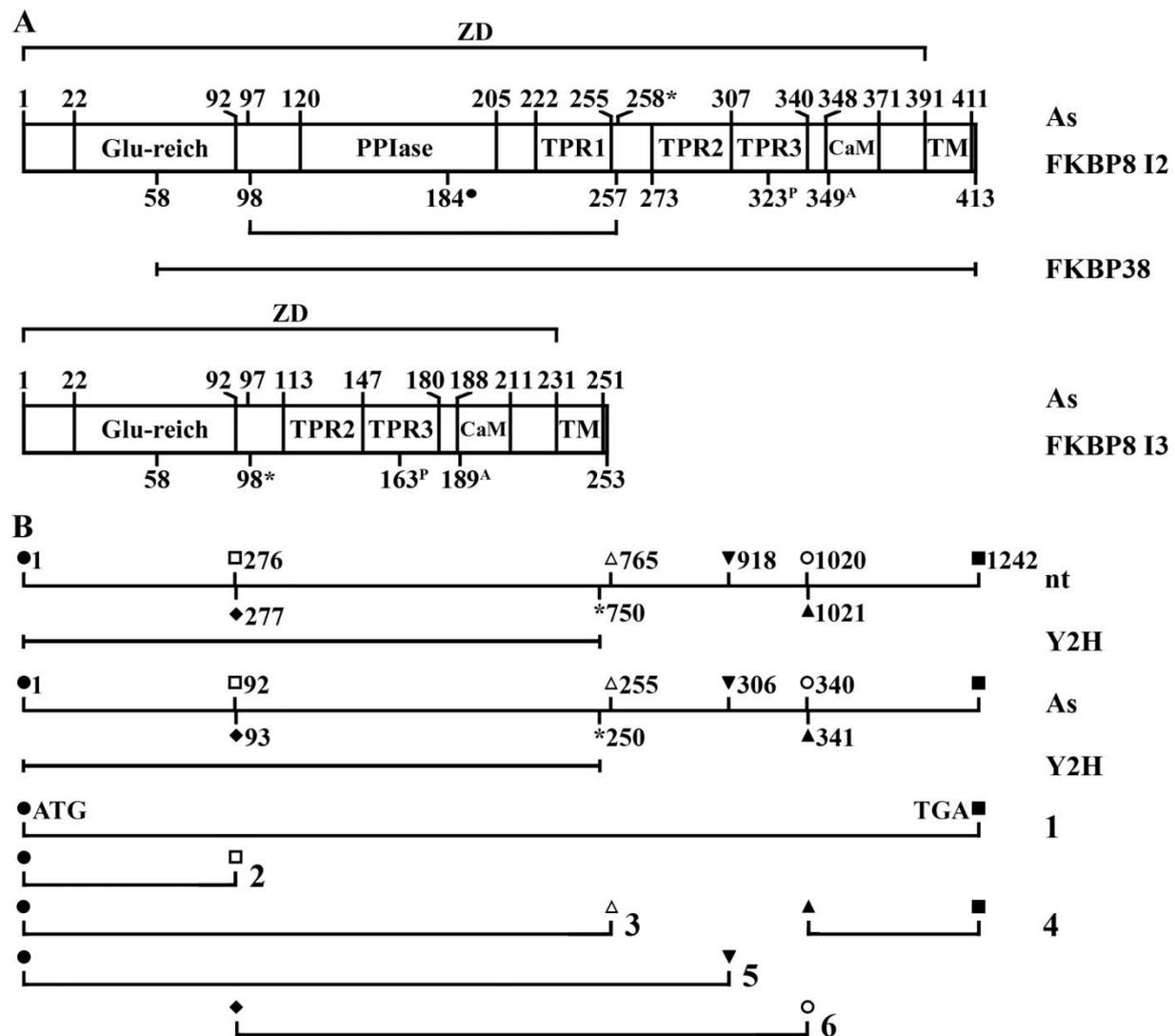


Abb. 11 Strukturelle Merkmale des FKBP8 Proteins und der hergestellten Konstrukte. A) Darstellung der Struktur der FKBP8 Isoformen 1, 2, 3 und 38 (NCBI Akz.: AY225339, NM_012181, XP_005259902 und BC009966). Die I2 besteht aus 413 As und kodiert für das größte Protein. In der I1 ist die As 184^{*} deletiert. In der I3 sind die 98-257 deletiert. Die As-Bereiche 258^{*}-413 der I2 und 98^{*}-253 der I3 sind identisch. Die I38 ist ab As 58 mit der I2 identisch. Die ZD der I2 besteht aus den As 1-390 und die TM-Domäne aus den As 391-411. Die Glu-reiche Region (As 22-92) liegt N-terminal gefolgt von der PPIase Domäne (As 120-205). Die TPR Domänen der I2 befinden sich an den As-Positionen: 222-255 (TPR1), 273-306 (TPR2) und 307-340 (TPR3). Der C-Terminus der ZD beinhaltet die CaM-Bindungsdomäne (As 348-371) (Shirane und Nakayama, 2002). Die Tyrosin-Phosphorylierungs- und die N6-Acetylierungsstelle befinden sich an As-Positionen 323^P und 349^A. **B)** Länge (nt/As) der Protein kodierenden Region der I2 und der Expressionskonstrukte Nr. 1-6. Der mittels des Y2H *Screen* isolierte Klon 233 (Tab. 9) kodiert für die As 1-250 der I2.

Die Filter *Lift-Assays* zeigen, dass die FKBP8-Konstrukte Nr. 2, 3 und 5 mit dem NOT Protein binden (Tab. 14A). Anhand dieser Resultate zeigt sich, dass die Bindung mit NOT über den N-Terminus, As 1-92, der I2 erfolgt (Abb. 11B). Warum die Bindung des *Full-Length* FKBP8-Konstruktes (Nr. 1) mit NOT in dem *Assay* negativ ist, kann zurzeit nicht erklärt werden. Die Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit dem FKBP8-Konstrukt

Nr.2 zeigt, dass für die Bindung an FKBP8 das komplette NOT Protein benötigt wird (Tab. 14B).

Tab. 14 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und FKBP8

A	FKBP8 I2 Konstrukte						Kontrollen		
	1	2	3	4	5	6	-1	-2	+
NOT-1									

B	NOT Konstrukte												Kontrollen		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	-1	-3	+
FKBP8-2															

A) Filter *Lift-Assays* zur Kartierung der Bindungsdomäne von FKBP8 mit NOT-1. **B)** Bestimmung der Bindungsdomäne von NOT an FKBP8 unter Verwendung des FKBP8-Konstruktes Nr.2. Zur Überprüfung der Proteinexpression in den Transformanten wurden Kolonie-Blots (s. Punkt 3.2.3.1) durchgeführt. Der immunologische Nachweis (s. Punkt 3.2.3.7.2) mittels spezifischer Antikörper, gerichtet gegen die GAL4-BD und AD zeigte, dass alle Proteine exprimiert sind (nicht dargestellt).

4.2.8 Kartierung der Bindungsdomänen der Proteine NOT und OSBP

Das Oxysterol-Bindeprotein ist ein Gründungsmitglied der *OSBP-related protein* (ORP) *family* (Lehto *et al.*, 2001). Die ORP-Familie besteht aus 12 Mitgliedern, welche anhand ihrer As-Homologien in sechs Unterfamilien eingeteilt sind. OSBP gehört mit ORP4 zur Unterfamilie I und besteht aus 807 As (Lehto *et al.*, 2001) (Abb. 12A). Charakteristisch für die Mitglieder der ORP-Familie ist das Vorhandensein einer Pleckstrin-Homologie (PH)- und einer Sterol-Bindedomäne (SB) sowie das Vorhandensein des hoch konservierten Sequenzmotivs „EQVSHHPP“ (schwarz unterlegt) (Lehto *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008). Am N-Terminus des OSBP Proteins befindet sich eine Alanin (A) /Glycin (G) -reiche Region (As 1-93). Der PH-Domäne (As 88-181) folgen eine Leucin-Zipper- (LZ) (As 207-242) und eine *Coiled-coil* (CC) (As 291-326) Domäne (Wang *et al.*, 2008). Zwischen der CC- und SB-Domäne befindet sich ein FFAT-Motiv (As 358-364, grau unterlegt) (Furuita *et al.*, 2010). Der C-Terminus beinhaltet eine weitere CC-Domäne (As 730-760) (Wang *et al.*, 2008). Das OSBP Protein verfügt über eine Acetylierungsstelle (^A) und neun Phosphorylierungsstellen (UniProt: P22059 – OSBP1_HUMAN). Für die Bindungsstudien wurden drei OSBP-Konstrukte hergestellt (Abb. 12B). Das Konstrukt Nr. 4 stellt den mittels des Y2H *Screen* isolierten Klon 318 (Tab. 9) dar.

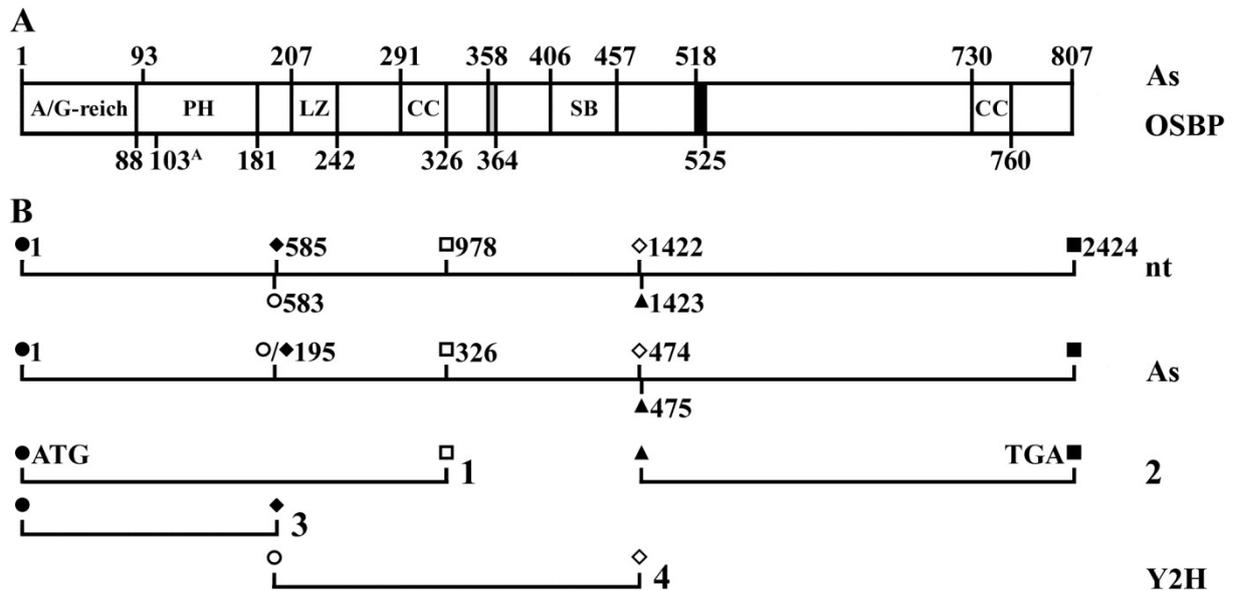


Abb. 12 Strukturelle Merkmale des OSBP Proteins und der hergestellten Konstrukte. **A)** Das OSBP Protein besteht aus 807 As (NCBI Akz.: NM_002556). Am N-Terminus befindet sich eine A/G-reiche-Region (As 1-93) gefolgt von der PH- (As 88-181) und der LZ-Domäne (As 207-242). Die beiden CC-Domänen befinden sich an den As-Positionen 291-326 und 730-760. Das FFAT-Motiv (As 358-364, grau unterlegt) ist N- und das Sequenzmotiv „EQVSHHPP“ (As 518-525, schwarz unterlegt) C-terminal der zentralen SB-Domäne (As 406-457) (Wang *et al.*, 2008) lokalisiert. Die Acetylierungsstelle befindet sich an As-Position 103^A und die Phosphorylierungsstellen (nicht dargestellt) an den As-Positionen 190^P, 193^P, 198^P, 238^P, 351^P, 377^P, 379^P, 382^P, und 389^P. **B)** Länge (nt/As) der Protein kodierenden Region der hergestellten Deletionskonstrukte 1-3. Der im *Screen* isolierte Klon 318 (Tab. 9) kodiert für die As 195-474 des OSBP Proteins und stellt Konstrukt Nr.4 dar.

Die durch die OSBP-Konstrukte Nr. 1-3 kodierten Proteine binden nicht mit NOT (Tab. 15A), was bedeutet, dass die Bindung vermutlich über den zentralen Bereich des Proteins stattfindet. Der Filter *Lift-Assay* zu Konstrukt Nr. 4 bestätigt diese Vermutung. Offensichtlich erfolgt die Bindung von OSBP an NOT über den As-Bereich 326-474, welcher das FFAT-Motiv (As 358-364, grau unterlegt) und die SB-Domäne (As 406-457) enthält (Abb. 12B). Das Kartierungsergebnis für NOT zeigt, dass die Bindung an OSBP über den N-Terminus, As 1-107, erfolgt (Tab. 15B).

Tab. 15 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und OSBP

A	OSBP Konstrukte				Kontrollen		
	1	2	3	4	-1	-2	+
NOT-1							

B	NOT Konstrukte												Kontrollen		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	-1	-3	+
OSBP-4															

A) Filter *Lift-Assays* zur Kartierung der Bindungsdomäne von OSBP mit NOT-1. **B)** Bestimmung der Bindungsdomäne von NOT an OSBP unter Verwendung des OSBP-Konstruktes Nr.4. Zur Überprüfung der Proteinexpression in den Transformanten wurden Kolonie-Blots (s. Punkt 3.2.3.1) durchgeführt. Der immunologische Nachweis (s. Punkt 3.2.3.7.2) mittels spezifischer Antikörper, gerichtet gegen die GAL4-BD und AD zeigte, dass alle Proteine exprimiert sind (nicht dargestellt).

4.2.9 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit OSBPL9

Das OSBPL9 Protein gehört wie OSBP zur ORP-Familie (Lehto *et al.*, 2001). Charakteristisch für die Mitglieder der ORP-Familie sind die stark konservierten PH- und SB-Domänen (Lehto *et al.*, 2001). Die PH-Domäne liegt bei OSBPL9 N-terminal und die SB-Domäne bildet den C-Terminus (Abb. 13A). Das ebenfalls stark konservierte Sequenzmotiv „EQVSHHPP“ (schwarz unterlegt) ist innerhalb der SD-Domäne lokalisiert (Lehto *et al.*, 2001). Vor der SD-Domäne befindet sich ein FFAT-Motiv (grau unterlegt) (Furuita *et al.*, 2010). N-terminal befindet sich eine N-Glykosylierungsstelle (^N) und zentral eine Phosphorylierungsstelle (^P) (UniProt: Q96SU4 - OSBPL9_HUMAN). Für das OSBPL9 sind zwölf OSBPL9 Isoformen identifiziert: a, b, c, d, e, f, CRA_b, CRA_c, CRA_e, CRA_f, CRA_h und CRA_i (NCBI Akz.: NM_148904, NM_148906, NM_148907, NM_148908, NM_024586, NM_148909, EAX06811, EAX06812, EAX06814, EAX06815, EAX06818 und EAX06819). Das durch die ICRA_b kodierte Protein stellt mit 764 As die größte Form dar. Ein *Alignment* (Tab. 17) der Proteinsequenzen aller 12 Isoformen mit der des im Y2H *Screen* isolierten Klones 433 zeigte eine 100%ige Übereinstimmung mit den Isoformen b, e, CRA_f und CRA_c. Da die ICRA_c mit 754 As von den potentiellen Kandidaten die größte Form darstellt, wurde diese zur Kartierung der Bindungsdomänen auserwählt. Insgesamt wurden zwei OSBPL9-Konstrukte hergestellt (Abb.13B). Das Konstrukt Nr. 3 stellt den mittels des Y2H *Screen* isolierten Klon 433 (Tab. 9) dar.

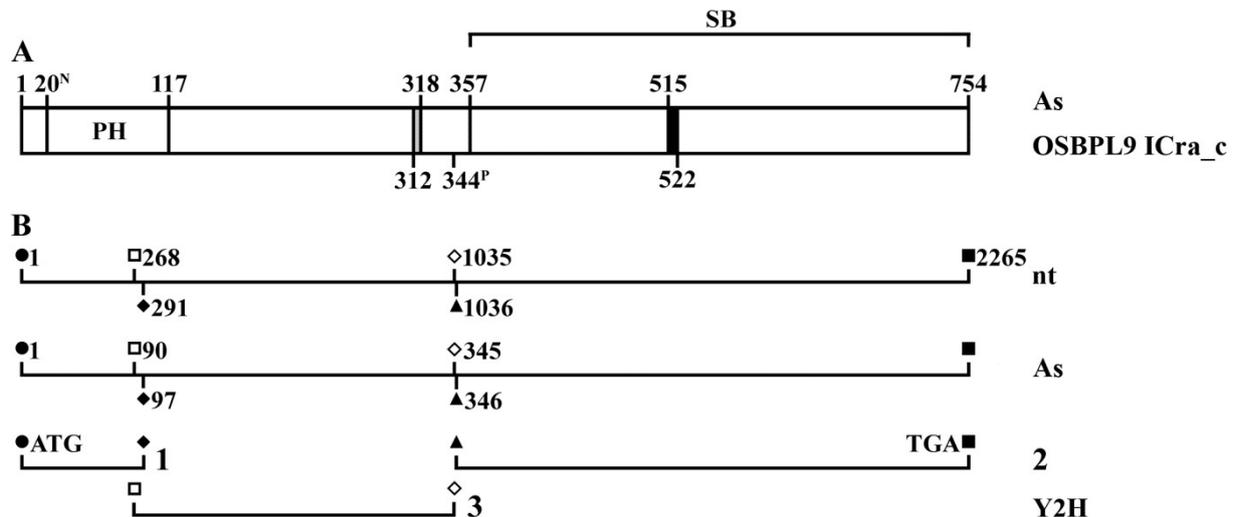


Abb. 13 Strukturelle Merkmale des OSBPL9 Proteins und der hergestellten Konstrukte. A) Die Isoform CRA_c (NCBI Akz.: EAX06812) stellt mit 754 As die längste Form der potentiellen NOT-Bindungspartner dar. Das Protein besteht aus zwei Hauptdomänen: der PH- (As 20^N-117) und der SB-Domäne (As 357-754). Das FFAT-Motiv (grau unterlegt) befindet sich an der As-Position 312-318. Innerhalb der SB-Domäne ist das Sequenzmotiv „EQVSHHPP“ (As 515-522, schwarz unterlegt) lokalisiert. Die N-Glykosylierungsstelle (As 20^N) befindet sich am N-Terminus und die Phosphorylierungsstelle an As-Position 344^P. B) Länge (nt/As) der Protein kodierenden Region der hergestellten Deletionskonstrukte 1-2. Der im *Screen* isolierte Klon 433 (Tab. 9) kodiert für die As 90-345 der ICRA_c des OSBPL9 Proteins und ist durch das Konstrukt 3 dargestellt.

Wie die in der Tab. 16A dargestellten Resultate zeigen, findet die Bindung von OSBPL9 an NOT mit dem zum Konstrukt Nr. 3 (As 90-345) korrespondierenden Bereich statt. Der Abb. 13 entsprechend könnte das FFAT-Motiv (As 312-318, grau unterlegt) eine Rolle für die Bindung mit NOT spielen. Die Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit dem OSBPL9-Konstrukt 3 zeigt, dass für die Bindung an OSBPL9 das NOT Protein intakt sein muss (Tab. 16B).

Tab. 16 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und OSBPL9

A	OSBPL9 Konstrukte			Kontrollen		
	1	2	3	-1	-2	+
NOT-1						

B	NOT Konstrukte												Kontrollen		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	-1	-3	+
OSBPL9-3															

A) Filter *Lift-Assays* zur Kartierung der Bindungsdomäne von OSBPL9 mit NOT-1. **B)** Bestimmung der Bindungsdomäne von NOT an OSBPL9 unter Verwendung des OSBPL9-Konstruktes Nr.3. Zur Überprüfung der Proteinexpression in den Transformanten wurden Kolonie-Blots (s. Punkt 3.2.3.1) durchgeführt. Der immunologische Nachweis (s. Punkt 3.2.3.7.2) mittels spezifischer Antikörper, gerichtet gegen die GAL4-BD und AD zeigte, dass alle Proteine exprimiert sind (nicht dargestellt).

Tab. 17 Alignment der Isoformen CRA_b und CRA_c des OSBPL9 Proteins

ICRA-b	MPYRRVTSGR	LLSLAAPKMA	SIMEGPLSKW	TNVMKGWQYR	WFVLDYNAGL	50
ICRA_c	MPYRRVTSGR	LLSLAAPKMA	SIMEGPLSKW	TNVMKGWQYR	WFVLDYNAGL	50
ICRA-b	LSYYTSKDKM	MRGSRRGCVR	LRGAVIGIDD	EDDSTFTITV	DQKTFHFQAR	100
ICRA_c	LSYYTSKDKM	MRGSRRGCVR	LRGAVIGIDD	EDDSTFTITV	<u>DQKTFHFQAR</u>	100
				90		
			125		147	
ICRA-b	DADEREKWIH	ALEETILRHT	LQLQISTTLA	FFQSSGISPV	LEFSKIIGLD	150
ICRA_c	<u>DADEREKWIH</u>	<u>ALEETILRHT</u>	<u>LQLQ</u> -----	-----	----- <u>GLD</u>	127
ICRA-b	SGFVPSVQDF	DKKLTEADAY	LQILIEQLKL	FDDKLQNCKE	DEQRKKIETL	200
ICRA_c	<u>SGFVPSVQDF</u>	<u>DKKLTEADAY</u>	<u>LQILIEQLKL</u>	<u>FDDKLQNCKE</u>	<u>DEQRKKIETL</u>	177
ICRA-b	KETTNSMVES	IKHCIVLLQI	AK-----	-----STINP	VDAIYQPSPL	237
ICRA_c	<u>KETTNSMVES</u>	<u>IKHCIVLLQI</u>	<u>AKDQSNAEKH</u>	<u>ADGMISTINP</u>	<u>VDAIYQPSPL</u>	227
			199			
ICRA-b	EPVISTMPSQ	TVLPPEPVQL	CKSEQRPSSL	PVGPVLATLG	HHQTPTPNST	287
ICRA-c	<u>EPVISTMPSQ</u>	<u>TVLPPEPVQL</u>	<u>CKSEQRPSSL</u>	<u>PVGPVLATLG</u>	<u>HHQTPTPNST</u>	277
ICRA-b	GSGHSPSSS	LTSPSHVNL	PNTVPEFSYS	SSEDEFYDAD	EFHQSGSSPK	337
ICRA-c	<u>GSGHSPSSS</u>	<u>LTSPSHVNL</u>	<u>PNTVPEFSYS</u>	<u>SSEDEFYDAD</u>	<u>EFHQSGSSPK</u>	327
			312	318		
ICRA-b	RLIDSSGSAS	VLTHSSSGNS	LKRPDTTESL	NSSLSNGTSD	ADLFDSSHDD	387
ICRA-c	<u>RLIDSSGSAS</u>	<u>VLTHSSSGNS</u>	LKRPDTTESL	NSSLSNGTSD	ADLFDSSHDD	377
		345				
ICRA-b	DDDAEAGSVE	EHKSVIMHLL	SQVRLGMDLT	KVVLPTFILE	RRSLLEMYAD	437
ICRA-c	DDDAEAGSVE	EHKSVIMHLL	SQVRLGMDLT	KVVLPTFILE	RRSLLEMYAD	427
ICRA-b	FFAHPDLFVS	ISDQKDPKDR	MVQVVKWYLS	AFHAGRKGSV	AKKPYNPILG	487
ICRA-c	FFAHPDLFVS	ISDQKDPKDR	MVQVVKWYLS	AFHAGRKGSV	AKKPYNPILG	477
ICRA-b	EIFQCHWTL	NDTEENTELV	SEGPVPWVSK	NSVTFVAEQV	SHHPPISAFY	537
ICRA-c	EIFQCHWTL	NDTEENTELV	SEGPVPWVSK	NSVTFVAEQV	SHHPPISAFY	527
ICRA-b	AECFNKKIQF	NAHIWTKSKF	LGMSIGVHNI	GQGCVSCLDY	DEHYILTFPN	587
ICRA-c	AECFNKKIQF	NAHIWTKSKF	LGMSIGVHNI	GQGCVSCLDY	DEHYILTFPN	577
ICRA-b	GYGRSILTVP	WVELGGECNI	NCSKTGYSAN	IIFHTKPFYG	GKKHRITAEI	637
ICRA-c	GYGRSILTVP	WVELGGECNI	NCSKTGYSAN	IIFHTKPFYG	GKKHRITAEI	627
	581					
ICRA-b	FSPNDKKSFC	SIEGEWNGVM	YAKYATGENT	VFVDTKKLPI	IKKKVRKLED	687
ICRA-c	FSPNDKKSFC	SIEGEWNGVM	YAKYATGENT	VFVDTKKLPI	IKKKVRKLED	677

Ergebnisse

ICRA-b	QNEYESRSLW	KDVTFNLKIR	DIDAATEAKH	RLEERQRAEA	RERKEKEIQW	737
ICRA-c	QNEYESRSLW	KDVTFNLKIR	DIDAATEAKH	RLEERQRAEA	RERKEKEIQW	727
ICRA-b	ETRLFHEDGE	CWVYDEPLLK	RLGAAKH			764
ICRA-c	ETRLFHEDGE	CWVYDEPLLK	RLGAAKH			754

Den Datenbanken der NCBI und UniProt entsprechend wurden für das OSBPL9 Protein 12 Isoformen identifiziert: a, b, c, d, e, f, CRA_b, CRA_c, CRA_e, CRA_f, CRA_h und CRA_i (NCBI Akz.: NM_148904, NM_148906, NM_148907, NM_148908, NM_024586, NM_148909, EAX06811, EAX06812, EAX06814, EAX06815, EAX06818 und EAX06819). Die Isoformen CRA_b und CRA_c, bestehend aus 764 As und 745 As, stellen die größten Isoformen dar. Im Unterschied zur ICRA_b sind in der ICRA_c die As 125-147 deletiert und an Stelle der As-Position 199 tritt die As-Sequenz: K → KDQSNAEKHADGMI. Die If unterscheidet sich von der CRA_b Form durch Deletion der As 1-18 und besteht aus 746 As. In der CRA_e Form sind die As 125-147 der 764 As langen ICRA_b deletiert. Die ICRA_e besteht aus 741 As. In der aus 723 As bestehenden d Form sind die As 1-18 und die As 125-147 im Vergleich zu ICRA_b deletiert. Die restlichen Isoformen, a, b, c, e, CRA_f, CRA_h und CRA_i, können von der ICRA_c abgeleitet werden. Durch Deletion der As 1-223 stellt die ICRA_h mit 521 As die kleinste Isoform dar, gefolgt von der Ia, bestehend aus 558 As, und der ICRA_i mit 571 As. Während die ICRA_i durch Deletion der As 1-183 entsteht, sind in der Ia zusätzlich die As 200-212 deletiert. Sowohl in der ICRA_f (738 As) als auch in der Ic (736 As) sind die As 1-18 der ICRA_c deletiert. Der Längenunterschied von zwei As zwischen den Formen CRA_f (738 As) und e (736 As) entsteht durch einen As-Austausch an der As-Position 563, R → RQV, in der ICRA_f. Die Ib besteht aus 719 As und unterscheidet sich durch die Deletion der As 1-18 und As 56-72 von der CRA_c Form. In der Ic sind die As 1-115 und 200-212 im Vergleich zur CRA_c Form deletiert. Des Weiteren ist sie durch einen As-Austausch an der Position 116 - ILRHTLQLQ → MAFLLATCG - charakterisiert. Der im Y2H *Screen* isolierte Klon 433 (Tab. 9) kodiert die As 90-345 der ICRA_c. Dieser Bereich ist zu 100% identisch mit den As 55-310 der Ib und den As 72-327 der Isoformen e und CRA_f. Wie das *Alignment* zeigt, ist der isolierte Bereich zu 94.92% identisch mit der CRA_b Form. Innerhalb des isolierten Bereichs, As-Positionen 322-328 (ICRA_b) und 312-318 (ICRA_c), ist das FFAT-Motiv (grau) lokalisiert.

4.2.10 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT mit CREB3

Das CREB3 Protein gehört zu der Familie der Basic-Leucin-Zipper (bZIP) Transkriptionsfaktoren (Burbelo *et al.*, 1994). Das Protein besteht aus drei Hauptdomänen: der ZD, der TM- und der im Lumen des ER lokalisierten (ER-L) Domäne (Abb. 14A). Den N-Terminus des Proteins bildet die Transkriptions-Aktivierungsregion (TAR) welche zwei LXXLL-Motive (grau unterlegt) und ein HCF1-Bindungsmotiv (schraffiert) enthält. Innerhalb der ZD befindet sich die bZIP-Domäne, die aus der DNA-Bindungs (DB)- und der Leucin-Zipper Domäne (LZ) besteht. Die DB beinhaltet zusätzlich das Kern-Lokalisierungs-Signal (NLS), eine Signalsequenz charakteristisch für Proteine, die in den Zellkern eingeschleust werden (Nguyen *et al.*, 2009). Während die ER-L-Domäne eine *Site-1 protease*-Schnittstelle (S1P, schwarz unterlegt) (Raggio *et al.*, 2002), eine Prolin (Pro)-reiche Region und zwei N-Glykosylierungsstellen (^N) beinhaltet (UniProt: Q43889 - CREB3_HUMAN), ist innerhalb der TM-Domäne eine *Site-2 protease*-Schnittstelle (S2P) lokalisiert (Raggio *et al.*, 2002). Für das CREB3 Protein wurden drei Isoformen identifiziert: 1, 2 und 3 (NCBI Akz.: U88528,

BC009402 und FJ263669) (Abb. 14A). Die I1 stellt mit 395 As das größte Protein dar. Die Isoformen 2 und 3 sind durch Deletion der As 93-116 (I2 und I3) und As 229-245 (I3) im Vergleich zur I1 um 24 As bzw. 41 As kürzer (Abb. 14A/B). Zur Kartierung der Bindungsdomänen wurden zehn CREB3-Konstrukte hergestellt (Abb. 14A/C). Das Konstrukt Nr. 1 ist I1 spezifisch. Der Bereich nt 1-759* der I2 stellt den mittels des Y2H Systems gefischten Klon 389 (Tab. 9) dar.

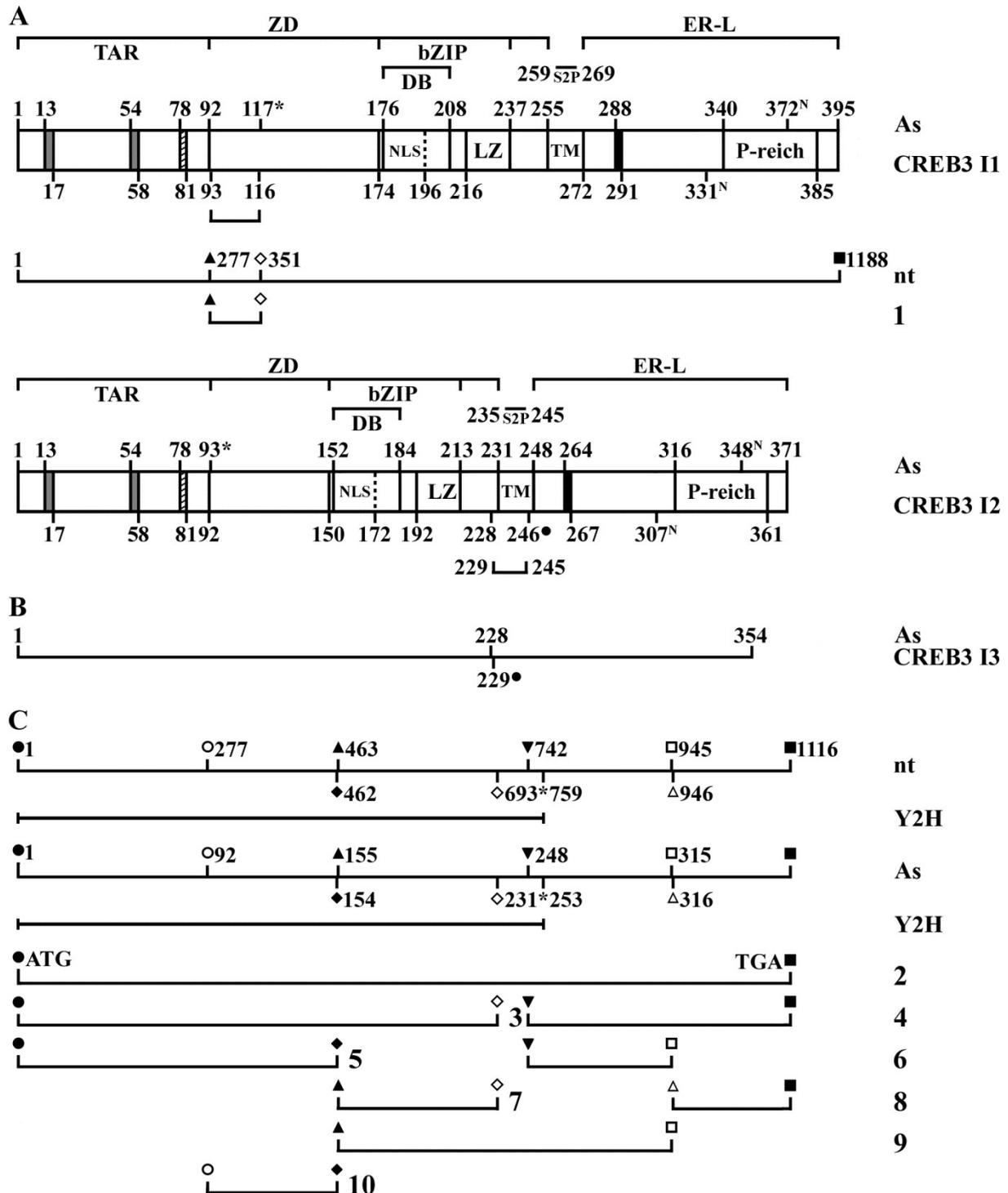


Abb. 14 Strukturelle Merkmale des CREB3 Proteins und der hergestellten Konstrukte. A) Darstellung der Isoformen 1 und 2 (NCBI Akz.: U88528 und BC009402) des CREB3 Proteins. Der As-Bereich 1-92 beider Isoformen und der As-Bereich 117*-395 der I1 und der As-Bereich 93*-371 der I2 sind identisch. Die TAR (As 1-92) beinhaltet zwei LXXLL-Motive (As 13-17 und 54-58, grau unterlegt) sowie das HCF1-Bindungsmotiv, As 78-81 (schraffiert). Die bZIP-Domäne (As 174-237 I1 und As 150-213 I2) beinhaltet die DB (As 176-208 I1 und As 152-184 I2) und die LZ-Domäne (As 216-237 I1 und As 192-213 I2). Das NLS befindet sich in der I1 an As-Position 176-196 und in der I2 an As-Position 152-172. Die ER-L-Domäne (As 272-395 I1 und As 248-371 I2) beinhaltet eine Bindungsstelle für die Spaltung durch S1P (As 288-291 I1 und As 264-267 I2, schwarz unterlegt), eine Pro-reiche Region (As 340-385 I1 und As 316-361 I2) und zwei N-Glykosylierungsstellen (As 331^N und 372^N I1 und As 307^N und 348^N I2). Innerhalb der TM-Domäne (As 255-271 I1 und As 231-247 I2) ist eine S2P-Schnittstelle lokalisiert (As 259-269 I1 und As 235-245 I2) (Raggio *et al.*, 2002). Das Konstrukt Nr. 1 ist I1 spezifisch. **B)** Die As-Bereiche 1-228 und 246•-371 der Isoform 2 und die As-Bereiche 1-228 und 229•-354 der Isoform 3 sind identisch. **C)** Länge (nt/As) der Protein kodierenden Region der I2 und der hergestellten Deletionskonstrukte 3-10. Der im *Screen* isolierte Klon 389 (Tab. 9) kodiert für den As-Bereich 1-253.

Die Auswertungen der Filter *Lift-Assays* (Tab. 18A) zeigen, dass die Bindung von CREB3 an NOT über die TAR (As 1-92), welche die zwei LXXLL-Motive (As 13-17 und 54-58, grau unterlegt) und das HCF1-Bindungsmotiv (As 78-81, schraffiert) enthält, stattfindet (Abb. 14A). CREB1 und CREBL1 binden nicht mit NOT. Zur Kartierung der NOT-Bindungsdomäne wurden die mit den CREB3-Konstrukten 2 und 5 etablierten Y187 Stämme mit den in der Abb. 7 dargestellten Not-Konstrukten transformiert. Wie man aus den in der Tab. 18B und C dargestellten Resultaten erkennen kann, ist das ganze NOT Protein an der Bindung mit CREB3 beteiligt.

Tab. 18 Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und der CREB Proteine

A	CREB Konstrukte												Kontrollen		
	C311		C312								C1	C11	-1	-2	+
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	1			
NOT-1															

B	NOT Konstrukte												Kontrollen		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	-1	-3	+
CREB3-2															

C	NOT Konstrukte												Kontrollen		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	-1	-3	+
CREB3-5															

A) Filter *Lift-Assays* zur Kartierung der Bindungsdomäne von CREB3 mit NOT-1. **B/C)** Bestimmung der Bindungsdomäne von NOT an CREB3 unter Verwendung der CREB3-Konstrukte Nr.2 und 5. Zur Überprüfung der Proteinexpression in den Transformanten wurden Kolonie-Blots (s. Punkt 3.2.3.1) durchgeführt. Der immunologische Nachweis (s. Punkt 3.2.3.7.2) mittels spezifischer Antikörper, gerichtet gegen die GAL4-BD und AD zeigte, dass alle Proteine exprimiert sind (nicht dargestellt).

4.2.11 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Kartierung der Bindungsdomäne von NOT mit den Proteinen SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3

In der Tab. 19 sind die Ergebnisse zur Kartierung der Bindungsdomänen des NOT-1 (438As) Proteins und der Partner SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3 zusammengefasst.

Tab. 19 Summarische Darstellung der Ergebnisse zur Kartierung der Bindungsdomänen des NOT Proteins mit den Partnern SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3

Bindedomänen (As)					
SYPL1(259)	NOT	LRP1(4544)	NOT	VAPA (249)	NOT
55-259	1-323	4280-4419	74-177	1-249	1-74 178-323
FKBP8 (413)	NOT	OSBP (807)	NOT	OSBPL9 (754)	NOT
1-92	1-438	326-474	1-107	90-345	1-438
CREB3 (371)	NOT				
1-92	1-438				

*Die Zahlen in Klammern geben die Gesamtlänge des Proteins an.

4.3 Analyse der Struktur des NOT Proteins

4.3.1 Spleißvarianten von *NOT*

Eine Recherche in der NCBI Nukleotid Datenbank zeigt, dass neben der von Kurzik-Dumke und Kaymer (1996) ursprünglich publizierten cDNA-Sequenz von *NOT* (NCBI Akz. Y09022) drei weitere Spleißformen identifiziert wurden. Die als Transkript-Variante Nr.4 (NCBI Akz. NM_001006941) beschriebene Form unterscheidet sich in Bezug auf die von Kurzik-Dumke und Kaymer (1996) veröffentlichte Variante Nr.1 in der 5' untranslatierten- und der 5' proteinkodierenden Region (Exon 1). Das daraus resultierende Protein besteht aus 390 As mit einem Molekulargewicht (Mw) von 44.37 kDa. Der As-Bereich 67-438 der Variante Nr.1 und der As-Bereich 19-390 der Variante Nr.4 sind identisch. Die Transkript-Varianten 2 (NCBI Akz. NR_024534) und 5 (NCBI Akz. NR_024533) kodieren aufgrund von Verschiebungen des Leserasters (*Frameshift*) durch alternatives Spleißen und den daraus resultierenden frühen Stopcodons für sehr kleine Proteine mit einem Mw von 7.45 kDa bzw. 11.87 kDa. Die Verschiebung des ORF wird in Transkript-Variante 2 durch Deletion der nt 160-196 in Exon 1 und in Variante Nr.5 durch Deletion von Exon 3 ausgelöst. Vermutlich werden diese Proteine gar nicht exprimiert oder direkt durch den NMD abgebaut. Kürzlich wurden von Frau Kurzik-Dumke und Herrn Schultheiß (Doktorand in der AG von Frau Kurzik-Dumke) weitere *NOT*-Spleißformen identifiziert (NCBI Akz. KP189312-KP189327). In Bezug auf die *NOT* Proteine sind bisher lediglich die *NOT* Proteine der *Dmel* und *Dvir* beschrieben (Kurzik-Dumke *et al.*, 1996; Kaymer *et al.*, 1996). Die humanen und murinen *NOT* Proteine wurden bisher nicht identifiziert. Im Vorfeld der Analyse zur Identifizierung der humanen *NOT* Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Analyse der Sequenz der putativen *NOT* Proteine durchgeführt.

4.3.2 Voraussage von Transmembrandomänen im *NOT-1* Protein

Das *NOT-1* Protein wird durch die Spleißform *NOT-1* (Kurzik-Dumke und Kaymer, 1996, Akz. Y09022) kodiert. Zur Berechnung und Bestimmung der Topologie von α -helikalen Transmembrandomänen (TMD) des *NOT-1* Proteins wurden 11 bioinformatische Programme (s. Punkt 3.1.5) eingesetzt. Während die Programme TMHMM Server v. 2.0 (Sonnhammer *et al.*, 1998), HMMTOP (Tusnady und Simon, 2001), Phobius (Kall *et al.*, 2004) und PolyPhobius (Kall *et al.*, 2005) Hidden-Markov-Modelle zur Berechnung der TMDs benutzen, bedienen sich die Programme Tmpred (Hofmann und Stoffel, 1993), MINNOU (Cao *et al.*, 2006), TOPCONS (Bernsel *et al.*, 2009) MEMSAT3, MEMSAT3VM (Jones *et*

al., 2007) und MemPype (Pierleoni *et al.*, 2011) multipler Sequenz-Alignments homologer Proteine. Das Programm Split 4.0 (Juretic *et al.*, 2002) vergleicht Eigenschaften und Zusammensetzung von Aminosäuren. Vergleicht man die in Tab. 14 mit Hilfe dieser Programme erzielten Ergebnisse wird deutlich, dass die Mehrheit der Programme (TMpred, HMMTOP, SPLIT, Phobius, MEMSAT3 und TOPCONS) für das NOT-1 Protein 10 TMD vorhersagt. Die Programme PolyPhobius und MemPype bevorzugen ein Modell mit 11 TMD, TMHMM und MEMSAT3 eines mit 7 TMD und das Programm MINNOU eines mit 9 TMD. Die Aussagen bezüglich der Lokalisierung der N- und C-Termini sind sehr unterschiedlich. Nach dem Programm TMpred sind z.B. der N- und der C-Terminus im Zytosol lokalisiert.

Tab. 20 Vergleich der Membrantopologie des NOT-1 Proteins vorhergesagt mit Hilfe diverser Programme

Programm		TMD1	TMD2	TMD3	TMD4	TMD5	TMD6
TMpred	N _{ou} /C _{ou}	41- 61	98-114	123-143		176-194	209-226
TMHMM	N _{in} /C _{ou}	43- 65	96-115	128-147		167-189	201-223
HMMTOP	N _{in} /C _{in}	42- 61	98-116	127-143	152-168	175-191	200-224
SPLIT	-----	40- 64	100-116	123-146	152-172	175-192	199-228
Phobius	N _{cy} /C _{cy}	41- 61	98-115	127-146	152-170	177-194	200-223
PolyPhobius	N _{cy} /C _{ncy}	41- 61	98-114	126-144	150-170	177-196	200-224
MINNOU	-----	41- 62		121-145	157-172	175-198	200-224
MEMSAT3	N _{ex} /C _{cy}	44- 63		122-140		177-200	214-238
MEMSAT3VM	N _{cy} /C _{cy}	42- 63		124-144	151-173	177-193	197-226
TOPCONS	N _{in} /C _{in}	42- 62	95-115	127-147		170-190	209-229
MemPype	N _{cy} /C _{ncy}	40- 61	98-112	122-144	152-173	176-191	196-227

Programm	TMD7	TMD8	TMD9	TMD10	TMD11
TMpred	230-251	288-307	338-362	379-402	407-427
TMHMM		284-306		360-382	
HMMTOP	235-251	291-307	338-356		407-423
SPLIT	233-251	279-306		361-395	403-422
Phobius	235-251	288-307		360-379	399-422
PolyPhobius	235-251	288-307	338-358	370-395	403-423
MINNOU	229-250	287-310	337-373		405-415
MEMSAT3		291-310	345-368		404-423
MEMSAT3VM	230-249	289-308	343-373	381-396	406-421
TOPCONS	231-251	289-309	336-356	379-399	404-424
MemPype	229-249	284-308	334-355	360-393	404-422

In der Tabelle sind die Vorhersagen der verschiedenen Programme mit Angabe der Orientierung des N- und C-Terminus sowie der Anzahl und Position der TMD aufgeführt. Die Bezeichnungen zur Orientierung der Termini entsprechen den der Programme: ou: *outside*, in: *inside*, cy: *cytoplasmic*, ncy: *non cytoplasmic* und ex: *extra cellular*. Die Bezeichnung *outside* bezieht sich auf das Zytosol.

4.3.3 Bioinformatische Analyse der NOT-1 Sequenz

Den Schwerpunkt der bioinformatischen Analyse bildete die Identifizierung von Signalpeptiden im Kontext der subzellulären Lokalisation. Die Ergebnisse der Analysen mit Hilfe der Programme SubCellProt (Garg *et al.*, 2009) und Hum-mPLOC 2.0 (Shen und Chou, 2009) implizieren, dass das NOT-Protein, wie für die Fliege experimentell bestätigt (Kurzik-Dumke *et al.*, 1996), am ER lokalisiert ist. Zur Analyse der NOT-1 Sequenz auf das Vorhandensein N-terminaler Signalsequenzen wurden 7 verschiedene Computerprogramme verwendet (s. Punkt 3.1.5). Ähnlich wie bei der Prädiktion von TMD (s. Punkt 4.3.2) unterscheiden sich die Analyse-Methoden voneinander. Die Programme SPEPLip (Fariselli *et al.*, 2003) und SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011) errechnen potentielle Signalpeptide auf Grundlage neuronaler Netzwerke, während das Programm SOSUISignal (Gomi *et al.*, 2004) einen eigens entwickelten Algorithmus benutzt. Andere Programme wie MemPype, TOPCONS (s. Punkt 4.3.2) und Signal-BLAST (Frank und Sippl, 2008) bedienen sich wiederum diverser Sequenz-Alignments oder analysieren, wie PrediSi (Hiller *et al.*, 2004), die Aminosäurezusammensetzung.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass das NOT Protein keine typische Signalsequenz besitzt, jedoch zwei potentielle Schnittstellen an den As-Position 57 (Signal-BLAST) und 195 (PrediSi).

4.3.4 Durchsuchung der ELM Datenbank nach konservierten Sequenzmotiven

Die *Eukaryotic Linear Motif* (ELM) Datenbank ist ein nützliches Instrument zur Identifizierung potentieller kurzer linearer Sequenzmotive in Proteinen (Puntervoll *et al.*, 2003). In der Tab. 21 sind die Ergebnisse der Datenbankanalyse für das NOT-1 Protein dargestellt.

Tab. 21 Identifizierte Sequenzmotive des NOT-1 Proteins

As-Sequenz	As-Position	Funktionelle Klasse / Lokalisierung / Zellkompartiment	Konsensus Sequenz*	Referenz
LRK RRL KRK	5-7 32-34 325-327	<i>N-arginine dibasic convertase</i> (NRD) Schnittstelle Extrazellulär, Golgi-Apparat	(.RK) (RR[[^] KR])	Hospital <i>et al.</i> , 2000

KRG KRK	7-9 325-327	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin</i> (PCSK) Schnittstellen: PCSK1/2 Extrazellulär, Golgi-Apparat	KR.	Johanning <i>et al.</i> , 1998
RDPSKRK	321-327	PCSK7 Extrazellulär, Golgi-Apparat	R...[KR]R.	Blais <i>et al.</i> , 2002
RLLLL RLLLR RGALP RQFLF	32-36 33-37 229-233 266-270	<i>Subtilisin/kexin isozyme-1</i> (SKI1) (alias <i>Site-1 protease</i> / S1P) Extrazellulär, Golgi-Apparat, ER	[RK].[AILMFV][LTKF].	Seidah <i>et al.</i> , 1999
FRGALPKLG	228-236	<i>Anaphase-promoting complex / cyclosome</i> (APC/C)-binding <i>Destruction-Motiv</i> Zytosol, Nukleus	.R..L..[LIVM].	Colombo <i>et al.</i> , 2011
PLTPNQ	332-337	<i>Cyclin-dependent kinase subunit 1</i> (Cks1) Bindungsmotiv Zytosol, Nukleus	[MPVLIFWYQ].(T)P..	Kõivomägi <i>et al.</i> , 2013
RLLLL RLLL RFLP RSLHY RLLVL	32-36 33-36 277-280 354-358 385-389	Erkennungsmotiv für Cyclin Zytosol, Nukleus	[RK].L.{0,1}[FY LIVMP]	Takeda <i>et al.</i> , 2001
LGLP	245-248	Calcineurin-Bindungsmotiv LxvP Zytosol, Nukleus, Calcineurin-Komplex	L.[LIVAPM]P	Grigoriu <i>et al.</i> , 2013
PSTSC	400-404	<i>Ubiquitin-specific protease 7</i> (USP7) Bindungsmotiv Nukleus	[PA][^P][^FYWIL]S[^P]	Sheng <i>et al.</i> , 2006
QPLTPN	331-336	Bindungsmotiv für Klasse IV WW Domänen Zytosol, Nukleus	...([ST])P.	Ingham <i>et al.</i> , 2005
RTGESIL	311-317	Interagierendes Motiv für 14-3-3 Proteine - <i>Mode 2</i> Innenseite der Plasmamembran, Zytosol, Nukleus, Mitochondrien	R..[^P]([ST])[IVLM].	Yaffe <i>et al.</i> , 1997
MAAGL	1-5	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i> (IAP)- <i>Binding Motif</i> (IBM) Zytosol, Mitochondrien	^M{0,1}[AS]...	Salvesen und Duckett, 2002
LSRSF VSTLF	258-262 339-343	<i>Breast cancer carboxy-terminal domain</i> (BRCT) Bindungs-domäne Nukleus, BRCA1-BARD1-Komplex	.(S)..F	Glover <i>et al.</i> , 2004
PPFVF	150-154	Proline-reiches Motiv: Bindung an Signaltransduktion Klasse II <i>Enabled/Vasodilator-Stimulated Phosphor-Protein Homology 1</i> (EVH1) Domänen Innenseite der Plasmamembran, Zytosol	PP..F	Holtzman <i>et al.</i> , 2007
TYDYTQL DYTQL TVNWRFL	85-91 87-91 273-279	<i>LC3-interacting region</i> (LIR) Motiv - Bindung Mitglieder der <i>Autophagy-related protein 8</i> (Atg8)	[EDST].{0,2}[WFY]..[ILV]	Birgisdottir <i>et al.</i> , 2013

TSNFIGI SNFIGI	344-350 345-350	Proteinfamilie Zytosol, Endosomen Membran (zytosolische Seite)		
GVINGTYD	80-87	Bindung an <i>Dab-Like Phospho-Tyrosine Binding</i> (PTB) Domänen → Phosphorylierung unabhängig	(.[^P].NP.[FY].)(.[ILVMFY].N..[FY].)	Smith <i>et al.</i> , 2006
GVINGTY	80-86	Bindung an <i>Shc-Like-PTB</i> und <i>IRS-Like PTB</i> Domänen → Phosphorylierung abhängig Innenseite der Plasmamembran, Zytosol, Membran gebundene Vesikel	(.[^P].NP.(Y))(.[ILVMFY].N.(Y))	
YTEI YTQL YLSR	66-69 88-91 257-260	Bindung an STAT5 <i>Src-Homology 2</i> (SH2) Domänen Zytosol	(Y)[VLTFIC]..	Hoyt <i>et al.</i> , 2007
RKVPPQP	326-332	Erkennungsmotiv für Klasse I <i>Src-Homology 3</i> (SH3) Domänen	[RKY]..P..P	Ren <i>et al.</i> , 1993
RKVPPQP PPQLTP	326-332 329-335	Erkennungsmotiv für nicht Klasse I spezifische SH3 Domänen Plasmamembran, Zytosol, Fokale Adhäsionen	...[PV]..P	
ESILSLLRD SILSLLRD	314-322 315-322	Antiparallel β -Augmentation Modus	[DEST]{1,10}.{0,1}[VIL][DESTVILMA[VIL][VILM].][DEST]{0,5}	Hecker <i>et al.</i> , 2006
GLIELS	390-395	Parallel β -Augmentation Modus Nukleus	[DEST]{0,5}.[VILPTM][VIL][DESTVILMA][VIL].{0,1}[DEST]{1,10}	
AWQE	28-31	<i>TNFR-associated factor 2</i> (TRAF2) Bindungsmotiv Zytosol	[PSAT].[QE]E	Ye <i>et al.</i> , 1999
SRGTDIR SILSLLR SWNTYPS SCSSAAL	116-122 315-321 395-401 403-409	<i>Casein kinase 1</i> (CK1) Phosphorylierungsstelle Zytosol, Nukleus	S..([ST])...	Dupre-Crochet <i>et al.</i> , 2007
RSGS FSGC GSAA PSGY SSAA	10-13 12-15 254-257 405-408	Glykosaminoglykan-Bindestellen Extrazellulär, Golgi-Apparat	[ED]{0,3}.(S)[GA].	Häcker <i>et al.</i> , 2005
INGTYDYT ENPSGYLSQI VSTLFT IVSTLFTS SWNTYPST TYPSTSCS	82-89 252-259 337-344 338-345 395-402 398-405	<i>Glykogen Synthase Kinase 3</i> (GSK3) Phosphorylierungsstelle Zytosol, Nukleus	...([ST])...[ST]	Xu <i>et al.</i> , 2009

YPSTSCSS FPKSTQHS	399-406 427-434			
INGTYD	82-87	Motiv für N-Glykosylierung Extrazellulär, Golgi-Apparat, ER	.(N)[^P][ST]..	Mellquist <i>et al.</i> , 1998
FHWTVN LFTSNF FSRSLH	270-275 342-347 352-357	<i>Never in mitosis kinase 2</i> (Nek2) Phosphorylierungsstelle Zytosol, Nukleus, Zentrosom, NDC80 Kinetochore Komplex	[FLM][^P][^P]([S T])[^DEP][^DE]	Alexander <i>et al.</i> , 2011
YDYTQLQ PKSTQHS	86-92 428-434	<i>Phosphoinositide-3-kinase-related protein kinases</i> (PIKK) Phosphorylierungsstelle Nukleus	...([ST])Q..	Hiom, 2005
SRGTDIR	116-122	<i>Protein kinase A</i> (PKA) Phosphorylierungsstelle Zytosol, Nukleus, cAMP- dependent protein kinase complex	.R.([ST])[^P]..	Neuberger <i>et al.</i> , 2007
RKRGRSGSA RGRSGSAAQ	6-14 8-16	<i>Protein kinase B</i> (PKB) Phosphorylierungsstelle Zytosol, Nukleus	R.R..([ST])[^P]..	Obata <i>et al.</i> , 2000
IELSWNT	392-398	<i>Polo-like kinase 1</i> (Plk) Phosphorylierungsstelle Zytosol, Nukleus	.[DE].([ST])[ILF WMVA]..	Nakajima <i>et al.</i> , 2003
QPLTPNQ	331-337	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (MAPK) Phosphorylierungsstelle Zytosol, Nukleus	...([ST])P..	Bardwell, 2006
YTEI YTQL	66-69 88-91	Tyrosin basierende Sortierungs- sequenz Plasmamembran, Zytosol, Clathrin ummantelte endozytotische Vesikel	Y..[LMVIF]	Mardones <i>et al.</i> , 1999
LRKR RRL	5-8 32-34	<i>Di Arginine Retention/Retrieving</i> Signal Zytosol, ER, ER-Golgi Transport- Vesicle	([LIVMFYWPR] R[^YFWDE]{0,1 }R)(R[^YFWDE] {0,1}R[LIVMFY WPR])	Schutze <i>et al.</i> , 1994
KKAH	435-438	<i>Di Lysine ER retrieving</i> Signal Zytosol, ER, ER-Golgi Transport- Vesicle, COPI Vesikel	K.{0,1}K.{2,3}\$	Stornaiuolo <i>et al.</i> , 2003
QERRLL ERRLLL	30-35 31-36	Endosom-Lysosome Basolateral Sortierungssignal Zytosol, endozytotische Vesikel	[DERQ]...L[LVI]	Bonifacino <i>et al.</i> , 2014
LRKRGR SKRKVP	5-10 324-329	<i>Monopartite Nuclear Localisation Signal</i> (NLS): C-erweiterte Version	[^DE]((K[RK])R K)(([^DE][KR]) ([KR][^DE]))((PK R))([^DE][DE]))	Lange <i>et al.</i> , 2007
RKRGRS PSKRKVP	6-11 323-329	C-erweiterte Version Nukleus, Kernporen, Kern-Import Komplex	(([PKR].{0,1}[^D E])([PKR]))(K[R K])(RK)(([^DE] [KR])([KR][^DE]))[^DE]	

WGCCF	196-200	Wxxx[FY] Motiv	W...[FY]	Neufeld <i>et al.</i> , 2009
FVFFF	152-156	Fxxx[WF] Motiv	F...[WF]	
FLFHW	268-272			
FTSNF	343-347	Zytosol, Peroxisomen, Glykosomen		

*: Die Nomenklatur der kurzen linearen Sequenzmotive entspricht der von Aasland *et al.* (2002) vorgeschlagenen.

Insgesamt wurden für das NOT-1 Protein 41 verschiedene potentielle Sequenzmotive identifiziert. Wie man der Tab. 21 entnehmen kann, sind einige Motive mehrfach vertreten. Motive wie das *Di Arginine Retention / Retrieving* Signal (Schutze *et al.*, 1994) oder das *Di Lysine ER retrieving* Signal (Stornaiuolo *et al.*, 2003) deuten zusätzlich auf die ER-Lokalisierung von NOT hin. Andere Motive, wie z. B. das *Monopartite Nuclear Localisation Signal* (Lange *et al.*, 2007) implizieren, dass man das NOT Protein auch im Zytosol und im Zellkern lokalisieren kann.

4.3.5 2D-Modelle des NOT-1 Proteins zur Darstellung der Sekundärstruktur

Zur Darstellung der Sekundärstruktur des NOT-1 Proteins wurde ein 2D-Modell (Abb. 15) mit Hilfe des Programms TOPO2 (s. Punkt 3.1.5) unter Berücksichtigung der Voraussage von TMD (s. Punkt 4.3.2, Tab. 20), der bioinformatischen Analysen der NOT-1 Sequenz (s. Punkt 4.3.3) und der Durchsuchung der ELM Datenbank nach konservierten Sequenzmotiven (s. Punkt 4.3.4, Tab. 21) erstellt. Den Ergebnissen zur Bestimmung der TMD von NOT zufolge (s. Punkt 4.3.2, Tab. 20) besteht das NOT-1 Protein aus 10 TMD. Aufgrund des N-terminalen *Di Arginine Retention/Retrieving* Signals und des C-terminalen *Di Lysine ER retrieving* Signals (s. Punkt 4.3.4, Tab. 21) müssen sich die beiden Termini im Zytosol befinden. Die in dem 2D-Modell orange markierten As kennzeichnen den Beginn wichtiger Sequenzmotive, die Einfluss auf die Proteinstruktur nehmen oder im Kontext der subzellulären Lokalisierung der NOT Proteine stehen, wie die NLS (As 5-11, 323-329), die *Di Arginine Retention/Retrieving* Signale (As 5-8, 32-34), das Motiv für N-Glykosylierung (As 82-87) und das *Di Lysine ER retrieving* Signal (As 435-438). Die potentiellen NRD- (As 5-7, 32-34, 325-327), PCSK1/2- (As 7-9, 325-327), PCSK7- (321-327) und S1P- (32-36, 33-37, 229-233, 266-270) Schnittstellen sind zusätzlich durch Pfeile markiert. Das Fehlen einer N-terminalen Signalsequenz (s. Punkt 4.3.3) für den Transport zum ER impliziert, dass die erste TMD von NOT-1 als Signal-Anker-Sequenz fungiert, die im Gegensatz zur N-terminalen Signalsequenz nach dem Eintritt in das ER-Lumen nicht abgespalten wird (Higy *et al.*, 2004).

Die Schnittstellen an den As-Positionen 57 und 195 wurden durch die bioinformatischen Programme Signal-BLAST und PrediSi (s. Punkt 4.3.3) errechnet. Ein Abgleich mit der Datenbank des ISB *N-glycosylation peptide prediction server* (<http://www.unipep.org/>) zeigt, dass neben dem durch die ELM Datenbank identifizierten NXS/T Konsensus-Motiv ein weiteres, im As-Bereich 253-255, lokalisiert ist. NXS/T Motive stellen potentielle N-Glykosylierungsstellen dar (Lam *et al.*, 2013).

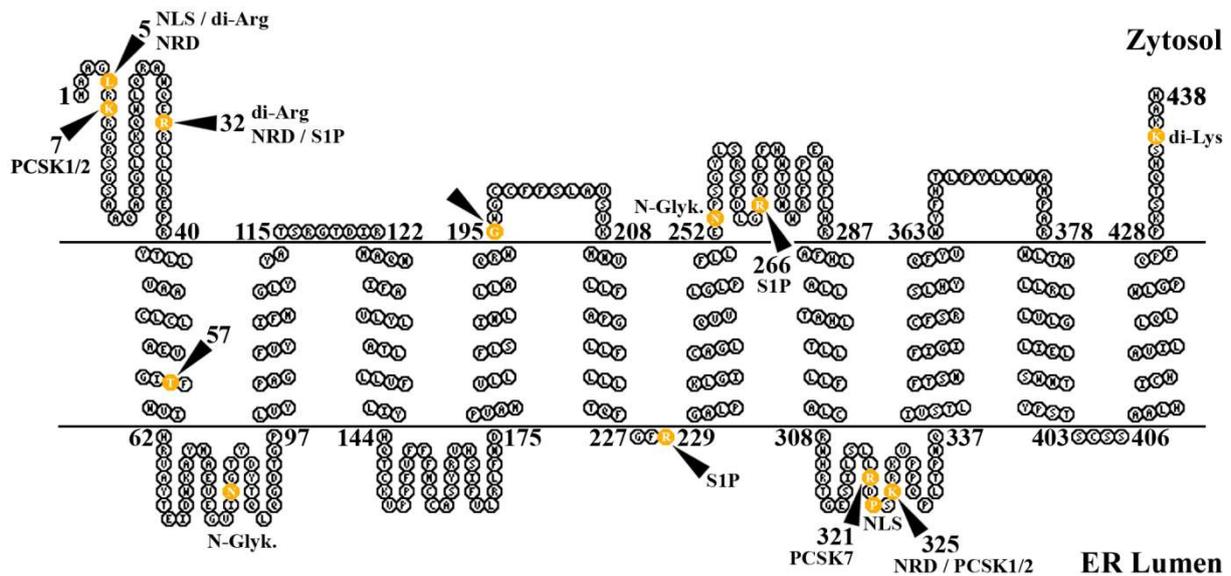


Abb. 15 2D-Modell des NOT-1 Proteins zur Darstellung der Sekundärstruktur. 2D-Modell mit 10 TMD nach TMpred (s. Punkt 4.3.2, Tab. 20). Die orange markierten As kennzeichnen den Beginn ausgewählter durch die ELM Datenbank identifizierten Motive: NLS (As 5-11, 323-329), *Di Arginine Retention/Retrieving Signal* (As 5-8, 32-34), Motiv für N-Glykosylierung (As 82-87) und *Di Lysine ER retrieving Signal* (As 435-438) (s. Punkt 4.3.4, Tab. 21). Die potentiellen Schnittstellen in den As-Positionen 5 (NRD), 7 (PCSK1/2), 32 (NRD / S1P), 229 (S1P), 266 (S1P), 321 (PCSK7) und 325 (NRD / PCSK1/2) sind zusätzlich durch Pfeile markiert. Die Schnittstellen an den As-Positionen 57 und 195 wurden durch die Programme Signal-BLAST und PredSi (s. Punkt 4.3.3) errechnet und die zusätzliche N-Glykosylierungsstelle (As 253) durch eine Abfrage der Datenbank des ISB *N-glycosylation peptide prediction server* (<http://www.unipep.org/>) bestimmt.

4.4 Identifizierung der NOT Proteine und Bestätigung der Bindung von NOT mit den Liganden SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3 durch Ko-Immunpräzipitation

Basierend auf den Retransformationsergebnissen zur Bestätigung der Bindung der identifizierten Proteine mit NOT (s. Punkt 4.1.3, Abb. 6) und in Hinblick auf die bekannten funktionellen Zusammenhänge zwischen einigen der identifizierten NOT-Partnern (s. Diskussion), wurden das Synaptophysin-Like Protein 1 (SYPL1), das Prolow-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1), das Vesicle-Associated Membrane Protein-

Associated Protein A (VAPA), das Homo Sapiens FK506 Binding Protein 8, 38kDa (FKBP8), das Oxysterol Binding Protein 1 (OSBP), das Oxysterol Binding Protein-Like 9 (OSBPL9) und das Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein 3 (CREB3) für weitere *in vivo* Untersuchungen mittels Ko-IP ausgewählt.

4.4.1 Expressionsprofil und subzelluläre Lokalisierung der NOT Proteine

Zur Bestimmung des Expressionsprofils und der subzellulären Lokalisation der NOT Proteine wurden Western-Blot Analysen mit den in Punkt 3.1.10 aufgeführten NOT AK und dem gekauften α -ALG3 (Abnova, PAB24386) durchgeführt (Abb. 16). Während der AK α -NOT 4 das durch die Transkript-Variante 4 (NCBI Akz. NM_001006941, KP189321) kodierte Protein (Punkt 4.3.1) spezifisch erkennt, ist der AK α -NOT 1^b gegen die durch die Transkript-Varianten 1, 2 und 5 kodierten Proteine (NCBI Akz. Y09022, NR_024534, NR_024533) gerichtet. Die AK α -NOT 1/4 und α -ALG3 erkennen die durch die Transkript-Varianten 1 und 4 kodierten Proteine. Wie oben beschrieben, unterscheiden sich die beiden Transkripte durch ein alternatives Exon 1 (Punkt 4.3.1). Die putative Länge des NOT-1 Proteins beträgt 438 As und die des NOT-4 Proteins 390 As. Den Berechnungen der Molekulargewichte mittels des Programms Compute pI/Mw (s. Punkt 3.1.5) zufolge, beträgt das vorhergesagte Laufverhalten der beiden Proteine 50.13 kDa (NOT-1) und 44.37 kDa (NOT-4). Vergleicht man die in der Abb. 16 durch die NOT AK detektierten Proteine mit den errechneten Molekulargewichten der durch die Transkript-Varianten 1 und 4 kodierten Proteine, kann postuliert werden, dass das Protein um die 55 kDa (●) das *Full-Length* NOT-1 Protein und das Protein von ~50 kDa (○○) das *Full-Length* NOT-4 Protein darstellt. Aufgrund der Spezifität der angewandten AK und in Bezug auf das Laufverhalten der Proteine kann man schlussfolgern, dass die durch die AK α -NOT 1/4 und α -NOT 1^b detektierten Proteine im Bereich von 35-50 kDa Spaltprodukte von NOT-1 darstellen. Da das Protein von ~35 kDa (■) durch den α -NOT 1/4 AK nicht erkannt wird, deutet alles darauf hin, dass es sich um ein Transkript-Variante 1 spezifisches Produkt handelt. Die Größe des Proteins impliziert, dass die hierfür erforderliche Spaltung kurz vor oder im Bereich des α -NOT 1/4 AKs Epitopes (As 320-333) stattfindet. Nach Angaben der ELM Datenbank sind im As-Bereich 321-327 gleich mehrere potentielle Schnittstellen vorhanden (s. Punkt 4.3.5, Abb. 15). Die durch ◇◇ und ◇ markierten Proteine können trotz des vergleichbaren Laufverhaltens (~20 kDa, Abb. 16,) aufgrund der Spezifität der AK und der subzellulären Lokalisierung als nicht identisch identifiziert werden. Bei dem Protein das durch die AK α -NOT 1^b und ALG3 detektiert wird

(◇) muss es sich um ein N-terminales und im Fall von α -NOT 1/4 um ein C-terminales Spaltprodukt von NOT handeln (◇◇). Zum Nachweis der putativen Proteine, kodiert durch die Transkript-Varianten 2 und 5, erfolgte die Trennung der Proteinextrakte auf 15%- und 20%igen Gelen (nicht dargestellt). Das Resultat der Analyse zeigte, dass diese Varianten nicht translatiert werden. Bei den durch α -NOT 1/4, α -NOT 1^b und ALG3 nachgewiesenen Proteinbanden ab \sim 70-170 kDa (▲, ▽, +) könnte es sich um nicht-denaturierte hochmolekulare Proteinkomplexe oder prozessierte Formen handeln. Der Nachweis der NOT Proteine in den nach zytoplasmatischer (F1)-, membranassoziierter (F2)- und Kernfraktion (F3) aufgetrennten SK-BR-3 Lysaten (Abb. 16, F1-F3) zeigt, dass die NOT Proteine nicht nur am ER (F2), sondern auch im Zytosol (F1) und Zellkern (F3) lokalisiert sind. Während das *Full-Length* NOT-1 Protein (●) primär am ER lokalisiert ist wird das putative Spaltprodukt von \sim 35 kDa (■) in den Zellkern (F3) transportiert. Somit muss die Untersuchung einer Kernfunktion in die weiteren Analysen zur zellulären Rolle der NOT Proteine mit einbezogen werden. Der zusätzliche Nachweis der Proteine von \sim 70 kDa (▲) und von \sim 42 kDa (◆) in der Kernfraktion impliziert, dass das NOT Protein offensichtlich sequentiell gespalten wird und das \sim 35 kDa (■) Protein das finale Produkt darstellt. Warum die hochmolekularen Proteinbanden im Bereich \sim 130-170 kDa (▽, +) ebenfalls in der Kernfraktion nachgewiesen werden können, muss weiter untersucht werden. Der schwache Nachweis dieser Proteine könnte ein Artefakt der Fraktionierung darstellen.

Im Fall von NOT-4 kann das *Full-Length* NOT-4 Protein (○○) nur im RH, jedoch in keiner Fraktion nachgewiesen werden. Den bioinformatischen Analysen mittels der Programme Hum-mPLOC 2.0 und TMPred zufolge, ist das NOT-4 Protein genau wie das NOT-1 Protein am ER lokalisiert und besteht aus 10 TMD. Eine Durchsuchung der ELM Datenbank nach konservierten Sequenzmotiven zeigte, dass das NOT-4 Protein im Unterschied zum NOT-1 Protein (s. Punkt 4.3.4) über kein N-terminales *Di Arginine Retention/Retrieving* Signal verfügt. Die WB-Analysen implizieren, dass das *Full-Length* NOT-4 Protein offensichtlich direkt in ein \sim 42 kDa (◆◆) und \sim 30 kDa (▼) gespalten wird. Aufgrund der Anreicherung des Proteins von \sim 30 kDa (▼) kann man schlussfolgern, dass die Prozessierung sequentiell über das \sim 42 kDa (◆◆) Intermediärprodukt erfolgt. Da der α -NOT-4 AK weder das rekombinante ALG3 Protein noch das murine NOT erkennt, wurden zum Ausschluss unspezifischer Banden Rohomogenate zweier muriner Zelllinien (3T3 und Mocha) aufgetragen. Wie man den WB (Abb. 16) entnehmen kann, stellen die hochmolekularen Banden im Bereich von 70-30 kDa Produkte unspezifischer Bindung dar.

Zur Bestätigung der Funktionalität der NOT AK und zum Vergleich der Affinitäten, wurden 100ng des rekombinanten ALG3-GST Fusionsproteins (s. Punkt 3.1.11) im WB untersucht. Die Kontrolle der gleichmäßigen Beladung und die Überprüfung der Kernfraktionen (F3) erfolgten durch Actin und TBP Nachweis.

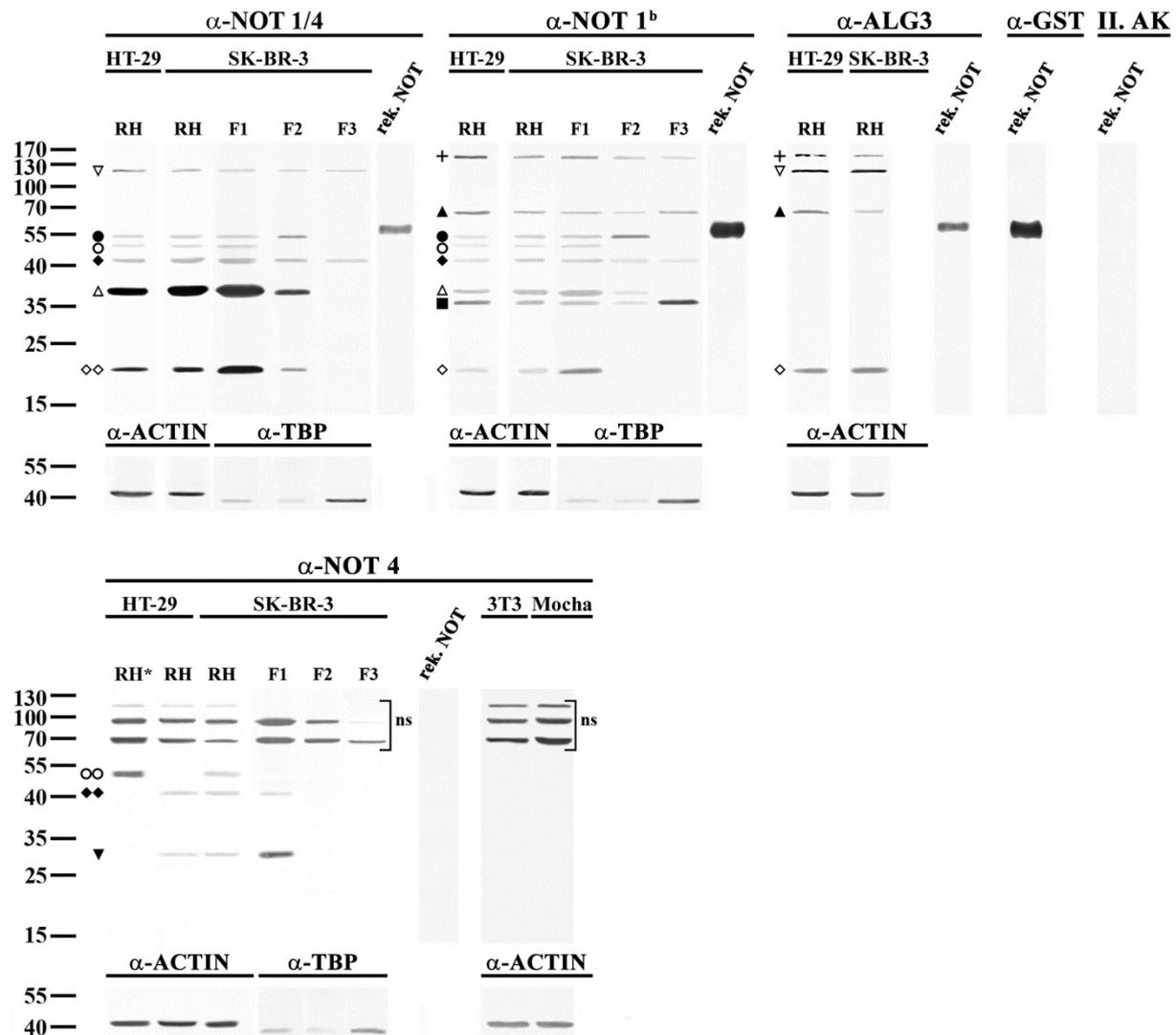


Abb. 16 Expressionsprofil und subzelluläre Lokalisierung der NOT Proteine. Für die Analysen mittels SDS-PAGE (10%) und WB wurden Extrakte aus HT-29, SK-BR-3, 3T3 und Mocha Zellen verwendet. Proteine gleicher Größe sind durch Zeichen markiert. Die Zahlen links geben die Molekulargewichte des Größenstandards wieder. Alle AK wurden gemäß der in Punkt 3.1.10, Tab. 3 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Der sekundäre AK (II. AK) dient als Negativkontrolle. Die Herstellung der Rohhomogenate (RH/RH*) erfolgte nach dem Protokoll des *Immunoprecipitation Kit (Protein A)* der Firma Roche (s. Punkt 3.2.3.3). Die subzellulären Fraktionen (F1-F3) wurden nach dem Protokoll des *Qproteome Cell Compartment Kit* der Firma Qiagen (s. Punkt 3.2.3.4) isoliert. Für alle Proben wurde eine photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung (s. Punkt 3.2.3.5) durchgeführt und 40µg im Gel aufgetragen.

4.4.2 Herstellung stabiler NOT- und CREB3-EGFP Transfektanten

Vorversuche zeigten, dass die NOT und CREB3 AK (s. Punkt 3.1.10) nicht IP tauglich sind. Daher wurde die NOT-CREB3 Interaktion mit Hilfe von stabilen T-NOT und T-CREB3 HEK293 Transfektanten (Abb. 17) nachgewiesen. Die für die Transfektion (s. Punkt 3.2.4.4) der Zellen eingesetzten rekombinanten Vektoren pEGFP-N3-NOT-1 und pEGFP-N3-CREB3 kodieren für das komplette NOT-1 und CREB1 Protein in Fusion mit dem EGFP Protein am C-Terminus. Sie wurden im Rahmen einer in der AG von Frau Kurzik-Dumke durchgeführten Diplomarbeit von Michael Döring (2012) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

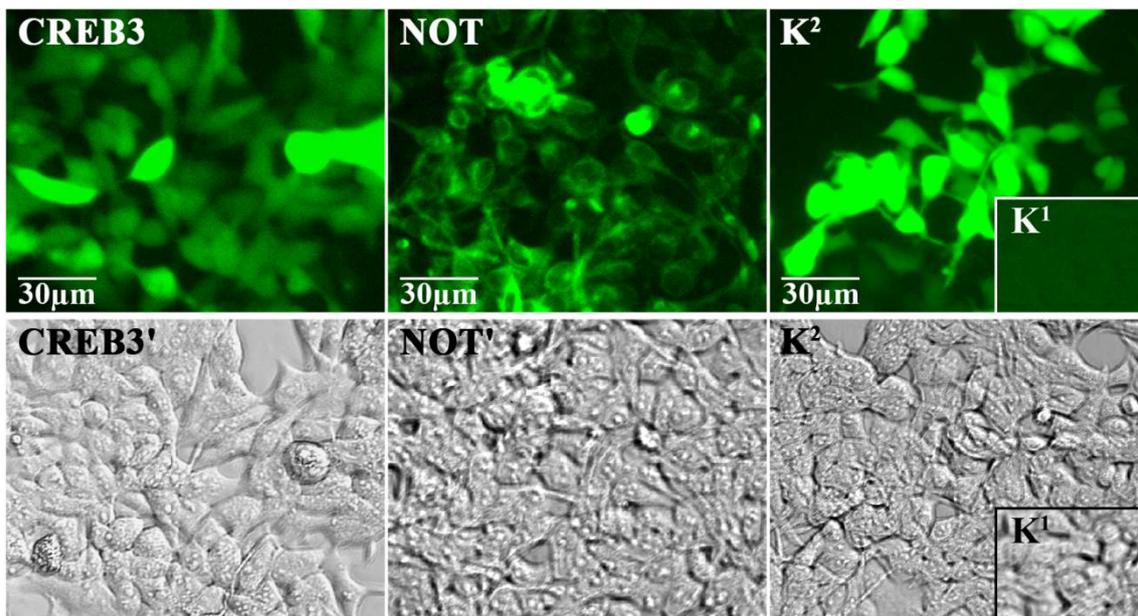


Abb. 17 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der stabilen NOT- und CREB3 Transfektanten. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz sind in der Abb. fluoreszenzmikroskopische- (obere Reihe) und Durchlichtaufnahmen (untere Reihe) gegenüber gestellt. Die Negativkontrolle für die Transfektion besteht aus nicht-transfizierten HEK-293 Zellen (K^1) und die Positivkontrolle (K^2) aus mit dem leeren Vektor pEGFP-N3 transfizierten HEK-293 Zellen. Der Maßstab entspricht $30\mu\text{m}$.

Wie man in der Abb. 17 erkennen kann, ist die Expression der zu untersuchenden Proteine in den NOT- und CREB3-Transfektanten vergleichbar mit den Zellen, welche mit dem leeren Vektor pEGFP-N3 transfiziert wurden.

4.4.3 Nachweis der EGFP-Fusionsproteine mittels Western-Blot

Zur Bestätigung der Expression der rekombinanten Proteine in den NOT- und CREB3 Transfektanten wurden Western-Blot Analysen durchgeführt (Abb. 18). Die Nachweise erfolgten mit dem α -NOT 1/4-, α -NOT 1^b-, α -CREB3¹ AK (Abnova, H00010488-D01P) und dem, gegen den EGFP-Tag gerichteten, α -GFP AK (Roche Diagnostics, 11814460001). Ein Vergleich der in der Abb. 18A dargestellten Resultate mit den in Punkt 4.4.1, Abb. 16, dargestellten Expressionsprofilen der NOT Proteine zeigt, dass die Bande > 55 kDa (*) dem rekombinanten NOT-EGFP Protein entspricht. Der AK α -NOT 1/4 erkennt das rekombinante NOT Protein nicht. Die Untersuchung der aus Transfektanten hergestellten subzellulären Fraktionierungen (F1-F3) bestätigt, dass das *Full-Length* NOT Protein am ER (F2) lokalisiert ist. Abb. 18B zeigt, dass der α -GFP AK das Fusionsprotein NOT-EGFP erkennt und immunoprecipitiert. Interessanterweise erkennt und immunoprecipitiert der α -GFP AK zwei Banden (Abb. 18B, *). Das höhere Molekulargewicht der zweiten Bande und die Erkenntnis, dass diese durch den α -NOT 1^b AK nicht erkannt wird, könnten auf eine posttranslationale Modifikation am N-Terminus hindeuten. Die Untersuchung der Fraktionen (Abb. 18B) bestätigt das mit dem α -NOT 1^b AK erzielte Ergebnis (Abb. 18A), wonach das rekombinante NOT Protein ausschließlich am ER lokalisiert ist. Zur Kontrolle der Funktionalität des α -GFP AK wurden 40 μ g RH aus mit dem leeren Vektor pEGFP-N3 transfizierten HEK-293 Zellen (T-V) aufgetragen.

In der Abb. 18C ist die Expression und subzelluläre Lokalisierung der nativen CREB3 Proteine und die des CREB3-EGFP Fusionsproteins dargestellt. Wie in Punkt 4.2.10 beschrieben, wurden für das CREB3 Protein drei Isoformen (NCBI Akz.: U88528, BC009402 und FJ263669) identifiziert (Abb. 14). Die mit Hilfe des Programms Compute pI/Mw (s. Punkt 3.1.5) errechneten Molekulargewichte der I1-I3 betragen 43.92 kDa (I1), 41.38 kDa (I2) und 39.58 kDa (I3). Der für die Analysen eingesetzte α -CREB3¹ AK ist gegen das *Full-Length* CREB3 (I2) Protein gerichtet und sollte daher alle drei Isoformen erkennen. Eine Literatursuche zur Identifizierung der detektierten CREB3 Proteine zeigte, dass entgegen der Angaben der UniProt Datenbank, offensichtlich nur die zwei CREB3 Isoformen 2 und 3, exprimiert (Kang *et al.*, 2009) werden. Beide von Kang *et al.* (2009) beschriebenen Proteine sind ubiquitär exprimiert. Im Gegensatz zum *Full-Length* CREB3 ist die Kurzform (I3) nicht im Zytoplasma, sondern primär im Kern lokalisiert (Kang *et al.*, 2009). Mittels CREB3 transfizierten Vero Zellen konnten Raggo *et al.* (2002) zeigen, dass das *Full-Length* CREB3 Protein aufgrund von Glykosylierung ein höheres Molekulargewicht (55-60 kDa) aufweist

und durch „Regulierte Intramembran Proteolyse“ (RIP) prozessiert wird. Bei der RIP wird CREB3 durch das Enzym *Site-1 Protease* (S1P) in ein N-terminal membrangebundenes 40 kDa und in ein C-terminal, luminales 20 kDa Fragment gespalten. Durch eine zweite Spaltung des N-terminal membrangebundenen Fragments, vermutlich durch das Enzym *Site-2 Protease* (S2P), entsteht ein 35 kDa Fragment, welches in den Zellkern transportiert wird (Raggio *et al.*, 2002). Die Ergebnisse von Raggio *et al.* (2002) decken sich mit den Studien von Eleveld-Trancikova *et al.* (2010) im Kontext der Identifizierung von Bindungspartnern des *Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein* (DC-STAMP). Mittels eines gegen den N-Terminus des CREB3 Proteins gerichteten AK weisen Eleveld-Trancikova *et al.* (2010) in Zelllysaten unreifer und reifer dendritischer Zellen mehrere Proteine im Bereich 35-70 kDa nach und zeigen ebenfalls, dass durch Proteolyse aktiviertes CREB3 im Zellkern lokalisiert ist.

Der Western-Blot in Abb. 18C zeigt, dass im RH nicht-transfizierter Zellen (NT) primär drei Banden, eine hochmolekulare mit ~130 kDa (-), eine mit ~70 kDa (▼) und eine mit ~42 kDa (□), zu erkennen sind. Im RH der transfizierten Zellen (T-CREB3) werden zusätzlich drei weitere Banden detektiert (►, ◁, ★). Anhand der publizierten Daten und den Resultaten der Hybridisierung der aus CREB3 Transfektanten hergestellten subzellulären Fraktionierungen (F1-F3) mit dem α -GFP AK (Abb. 18D) ist es offensichtlich, dass die detektierten Proteine um die 70- (▼) und 95 kDa (★) die posttranslational modifizierten *Full-Length* CREB3 Proteine darstellen. Aufgrund des EGFP-*Tags* am C-Terminus (~27 kDa) besitzt das durch T-CREB3 kodierte Protein (★) ein höheres Molekulargewicht als das native (▼). Die Fraktionierungen (Abb. 18C/D) zeigen, dass das *Full-Length* CREB3 Protein (▼, ★) primär am ER (F2) lokalisiert ist. Den Analysen von Raggio *et al.* (2002) und Eleveld-Trancikova *et al.* (2010) zufolge, stellen die Proteine im Bereich von 35-40 kDa (►, ◁) die beschriebenen N-terminalen S1P- und S2P-Spaltprodukte dar. Wie man anhand der Fraktionierungen erkennen kann, bleibt das S1P- Spaltprodukt (◁) ER gebunden, während das kleinere Protein von ~37 kDa (►) in den Zellkern transportiert wird. Der Vergleich der RH nicht-transfizierter und transfizierter Zellen bestätigt die Beobachtung von Raggio *et al.* (2002), wonach die Spaltprodukte von CREB3 einem schnellen Abbau durch das Proteasom unterliegen. Erst die CREB3-Überexpression erlaubt den Nachweis der beiden Proteine im Bereich von 35-40 kDa. Das Protein von ~42 kDa (□), welches ausschließlich im Zytosol lokalisiert ist, kann anhand der publizierten Literatur nicht erklärt werden. Eine Abfrage der ELM Datenbank nach weiteren konservierten Sequenzmotiven, die potentielle Schnittstellen darstellen, blieb erfolglos. Vermutlich stellt das ~42 kDa Protein das Vorläufer-, bzw. das unmodifizierte *Full-*

Length CREB3 Protein der Isoform 2 dar, dessen Größe den Berechnungen des Molekulargewichtes zufolge 41.38 kDa beträgt. Bei dem Protein um 130 kDa (-) könnte es sich um ein hochmolekularen nicht denaturierten Proteinkomplex handeln. Im Fall der Transfektante ist zu beobachten, dass das *Full-Length* CREB3 Protein ebenfalls im Kern lokalisiert ist. Ein Protein in der Kernfraktion, welches der von Kang *et al.* (2009) beschriebenen I3 (39.58 kDa) entsprechen könnte, wurde nicht detektiert.

Zum Vergleich und zur Kontrolle des α -CREB3¹ AK wurden 200ng CREB3 rekombinantes Protein (s. Punkt 3.1.11) aufgetragen. Das rekombinante CREB3 Protein verfügt über einen GST-Tag (~27.5 kDa) am N-Terminus. Der TBP Nachweis bestätigt die Korrektheit der Kernfraktionen (F3).

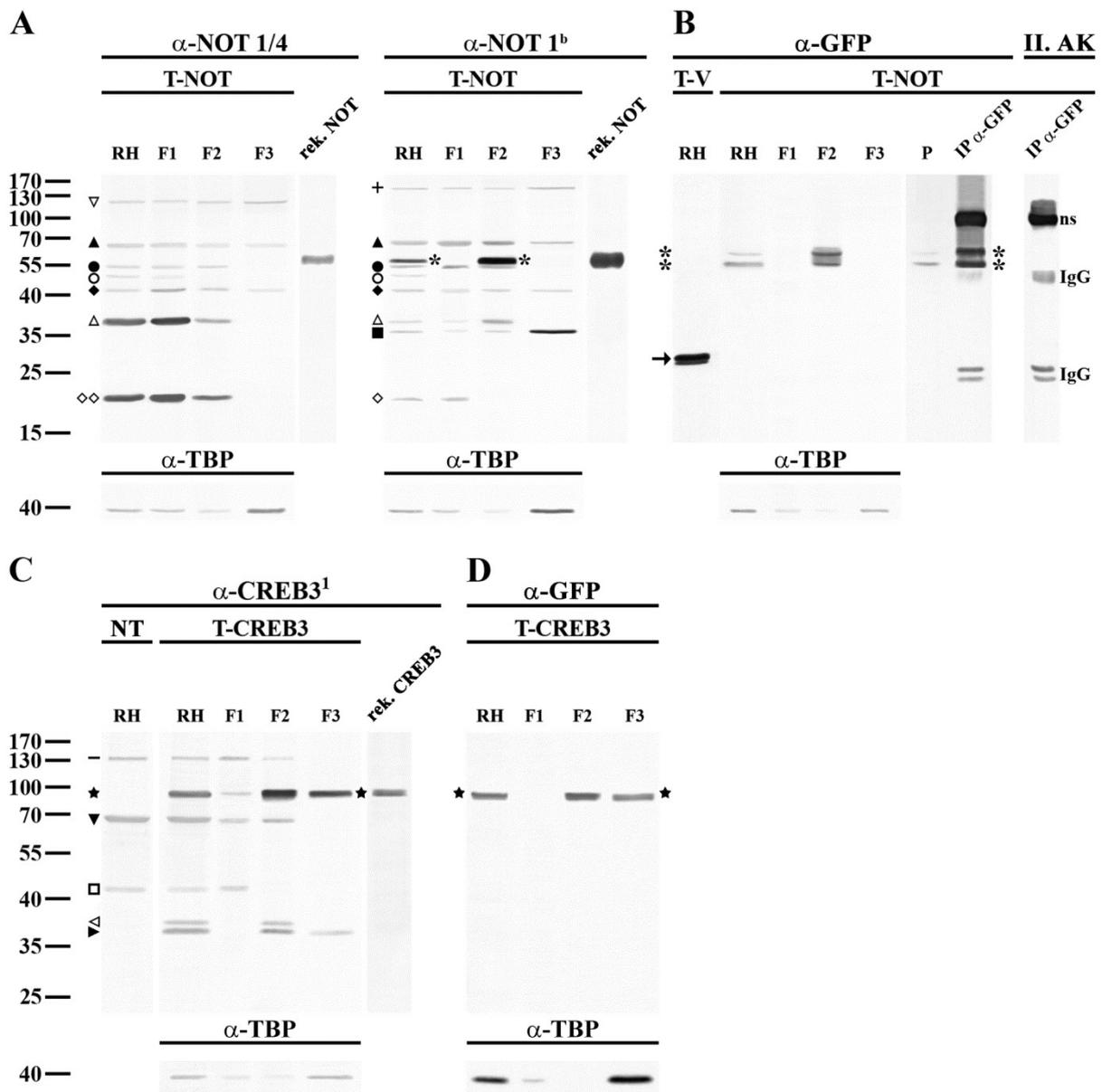


Abb. 18 Analyse der NOT- und CREB3 Transfektanten. Für die Analysen wurden Extrakte aus transfizierten- (T) und nicht-transfizierten (NT) Zellen verwendet. **A)** Nachweis des NOT-EGFP Fusionproteins (*). Im Gegensatz zum α -NOT 1^b AK erkennt der α -NOT 1/4 AK das rekombinante Protein nicht. **B)** Nachweis und Immunoprecipitation des NOT-1-EGFP Fusionproteins (*) mit dem α -GFP AK. Die Fraktionierungen (F1-F3) zeigen, dass das rekombinante NOT Protein (*) ausschließlich am ER (F2) lokalisiert ist. Das *Full-Length* NOT-1 Protein kann über den EGFP-Tag immunoprecipitiert werden. **C/D)** Nachweis des CREB3-EGFP Fusionproteins mit den α -CREB3¹- (Abnova, H00010488-D01P) und dem α -GFP AK (Roche Diagnostics, 11814460001). Die Fraktionierungen zeigen, dass das native (\blacktriangledown)- und rekombinante *Full-Length* CREB3 Protein (\star) primär am ER (F2) lokalisiert sind. Das nachgewiesene Laufverhalten der Proteine ist vermutlich auf Glykosylierung und/oder weitere posttranslationale Modifizierungen zurückzuführen. Die Proteine im Bereich von 35-40 kDa ($\blacktriangleright, \blacktriangleleft$) stellen die S1P- und S2P-Spaltprodukte dar (Raggio *et al.*, 2002; Eleveld-Trancikova *et al.*, 2010). Erst nach Spaltung mit dem Enzym S2P wird das N-terminale Fragment (\blacktriangleright) vom ER gelöst und in den Zellkern transportiert. Das zytosolische Protein von ~42 kDa (\square) stellt vermutlich das CREB3 Vorläufer- bzw. unmodifizierte *Full-Length* CREB3 Protein der Isoform 2 dar. Alle AK wurden gemäß der in Punkt 3.1.10, Tab. 3 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Proteine gleicher Größe sind durch Zeichen markiert. Die Zahlen links geben die Molekulargewichte des Größenstandards wieder. Die IPs und die Herstellung der RH erfolgte nach dem Protokoll des *Immunoprecipitation Kit (Protein A)* der Firma Roche (s. Punkt 3.2.3.3) und die subzellulären Fraktionierungen (F1-F3) nach dem Protokoll des *Qproteome Cell Compartment Kit* der Firma Qiagen (s. Punkt 3.2.3.4). Für die SDS-PAGE (10%) wurden 40 μ g RH und Fraktionen 1-3, 15 μ l *Preclearing* (P) und IP, 100ng rekombinantes NOT- und 200ng rekombinantes CREB3 Protein aufgetragen.

4.4.4 Bestätigung der Bindung von NOT mit den Liganden SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3 durch Ko-Immunoprecipitation

In Vorversuchen wurde die Funktionalität der α -VAPA-, α -FKBP8-, α -CREB3-, α -OSBPL9, α -OSBP-, α -SYPL1- und α -LRP1 AK in 10 verschiedenen humanen Zelllinien (s. Punkt 3.1.19.1) überprüft. Mit Ausnahme von LRP1, wurde die Expression der untersuchten Proteine in allen Zellen nachgewiesen. LRP1 wurde in den Zellen MDA-MB-468, MCF-7, HEK-293, HaCaT, T98G und HeLa nachgewiesen, jedoch nicht in den Zellen HT-29, SK-BR-3 und den T-Lymphozyten J16/RAPO und Jurkat. Die Experimente zur Überprüfung der AK auf IP-Tauglichkeit zeigten, dass nur die AK α -LRP1 (Abcam, ab92544), α -SYPL1 (Sigma-Aldrich, SAB3500080), α -OSBP² (Proteintech, 11096-1-AP) und α -OSBPL9² (Antikörper-Online, ABIN1013879) für IP-Analysen einsetzbar sind.

4.4.4.1 Bestätigung der Bindung von NOT mit VAPA und FKBP8 *in vivo*

Die Bindung von NOT mit VAPA und FKBP8 konnte mittels Ko-IP nicht bestätigt werden. Im Fall von VAPA (Abb. 19 A/B) ist auffallend, dass beide AK unterschiedliche Proteine detektieren. Wie in Punkt 4.2.6. beschrieben, wurden zwei VAPA Isoformen identifiziert: 1 (249 As) und 2 (294 As) (NCBI Akz.: NM_194434 und NM_003574). Die mit Hilfe des

Programms Compute pI/Mw (s. Punkt 3.1.5) errechneten Molekulargewichte der beiden Isoformen betragen 27.89 kD (I1) und 32.61 kDa (I2). Beide AK α -VAPA¹ (Sigma-Aldrich, SAB1406797) und α -VAPA² (Abnova, H00009218-D01) sind gegen dasselbe Epitop, As 8-249 der I1 bzw. As 8-139 und As 185-294 der I2, gerichtet und können daher beide Isoformen erkennen. Der AK α -VAPA¹ wurde in der Maus und der AK α -VAPA² im Kaninchen hergestellt. Wie man in der Abb. 19A erkennen kann, detektiert der α -VAPA¹ AK im RH ein einziges Protein unterhalb der ~35 kDa Bande. Den Berechnungen der Molekulargewichte zufolge handelt es sich bei dem detektierten Protein um die I2. Der Befund deckt sich mit den Ergebnissen von Teuling *et al.* (2007). Mit einem gegen As 132-225 der I1 gerichteten AK konnten Teuling *et al.* (2007) u.a. in HeLa Zellen ein einzelnes spezifisches Protein, um 33 kDa, nachweisen. Die mit dem AK α -VAPA² nachgewiesenen Banden um 40 kDa und 45 kDa (Abb. 19B) entsprechen nicht den errechneten und beschriebenen VAPA-Proteinen.

Für das FKBP8 Protein sind vier Isoformen beschrieben: 1, 2, 3 und 38 (NCBI Akz.: AY225339, NM_012181, XP_005259902 und BC009966) (s. Punkt 4.2.7). Mit einem errechneten (Compute pI/Mw) Molekulargewicht von 44.56 kDa (I1) und 44.65 kDa (I2) sind die beiden Proteine I1 und I2 im WB nicht zu unterscheiden. Für die Isoformen 3 und 38 wurden Molekulargewichte von 27.55 kDa und 38.41 kDa errechnet. Der α -FKBP¹ AK (Sigma-Aldrich, SAB1407248) ist gegen das *Full-Length* Protein der I2 und der α -FKBP² AK (Santa Cruz, sc-166607) gegen die As 136-355 der I1/I2 gerichtet. Wie man in der Abb. 19 C/D erkennen kann, detektieren beide AKs ein Protein im Bereich von ~55 kDa (▼). Anhand der publizierten Daten von Okamoto *et al.* (2006) und den Angaben der AK-Hersteller kann es sich bei dem Protein von ~55 kDa nur um die I1 bzw. I2 des FKBP Proteins handeln. Die WB zeigen, dass der α -FKBP² AK eine höhere Affinität für sein Antigen besitzt als der α -FKBP¹ AK. Die durch den α -FKBP² AK detektierte ~40 kDa Bande könnte potentiell I38 darstellen. Da Okamoto *et al.* (2006) in HEK-293T Zellen nur ein endogenes Protein von ~50 kDa nachweisen konnten, geht die Arbeitsgruppe davon aus, dass dieses FKBP8 Protein das Hauptprodukt in humanen Zellen darstellt und nicht die I38 Form.

Wie die Abb. 19 zeigt, sind die α -VAPA- und α -FKBP8 AK für IP-Experimente jedoch ungeeignet. In den α -GFP IPs aus der NOT-Transfektante konnte kein VAPA oder FKBP8 nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

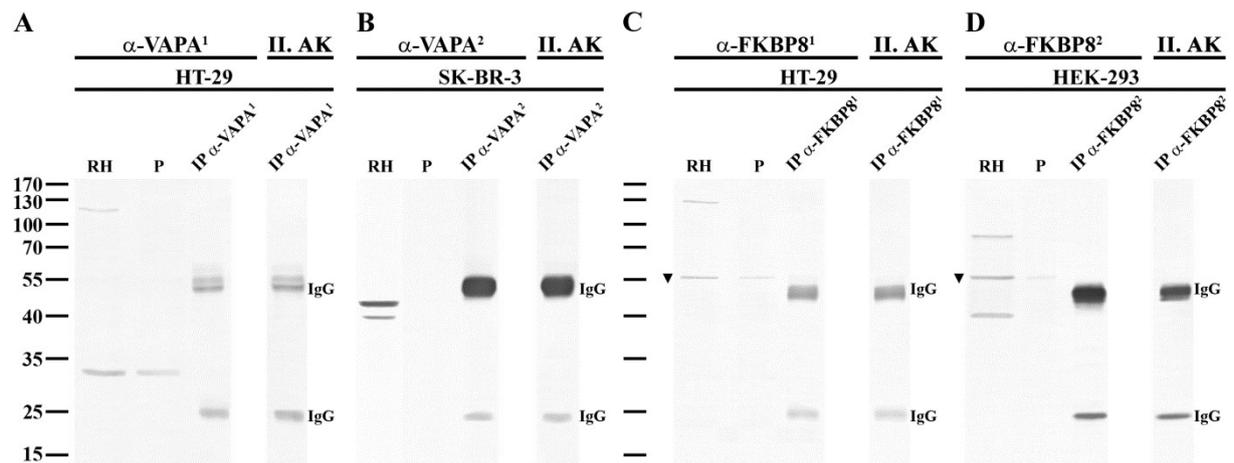


Abb. 19 Ergebnisse der Ko-IP Experimente zur Bestätigung der Bindung von NOT mit VAPA und FKBP8. Die IP-Experimente mit dem α -VAPA¹- (Sigma-Aldrich, SAB1406797) (A), α -VAPA²- (Abnova, H00009218-D01) (B), α -FKBP8¹- (Sigma-Aldrich, SAB1407248) (C) und α -FKBP8² AK (Santa Cruz, sc-166607) (D) zeigen, dass die AK ihr spezifisches Protein erkennen, jedoch nicht immunoprecipitieren. Alle AK wurden gemäß der in Punkt 3.1.10, Tab. 3 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Zahlen links geben die Molekulargewichte des Größenstandards wieder. Die IPs und die Herstellung der RH erfolgte nach dem Protokoll des *Immunoprecipitation Kit* (Protein A) der Firma Roche (s. Punkt 3.2.3.3). Für die SDS-PAGE (10%) wurden 40 μ g RH, 15 μ l P und 15 μ l IP aufgetragen.

4.4.4.2 Bestätigung der Bindung von NOT mit CREB3 mittels Ko-Immunopräzipitation

In der Abb. 20 sind die Ergebnisse der Ko-IP Experimente zur Bestätigung der Bindung von NOT mit CREB3 dargestellt. Die Analysen wurden mit Hilfe der stabilen NOT- und CREB3-Transfektanten (s. Punkt 4.4.3) und den α -CREB3¹- und α -CREB3² AK durchgeführt. Der α -CREB3² AK (Abnova, H00010488-M01) ist gegen den C-Terminus des CREB3 Proteins, As 273-371 I2 gerichtet und wurde daher nur für die IPs eingesetzt. Die Abb. 20A zeigt, dass beide CREB3 AK das rekombinante Protein (★) immunoprecipitieren können und bestätigt die CREB3-NOT Bindung. Der α -CREB3¹ AK immunoprecipitiert in der Transfektante zusätzlich die beiden Proteine im Bereich von 35-40 kDa (▶, ◁) und der α -CREB3² AK das native *Full-Length* CREB3 Protein um ~70 kDa (▼) (vgl. Abb. 20A, RH T-NOT). Der Nachweis mit dem α -CREB3¹ AK im IP α -GFP aus mit NOT transfizierten Zellen zeigt, dass NOT sowohl mit dem nativen, posttranslational modifiziertem *Full-Length* CREB3 Protein (▼) als auch mit dem im Zytosol lokalisiertem potentiell Vorläufer- bzw. unmodifiziertem *Full-Length* Protein von ~42 kDa (□) bindet (s. Punkt 4.4.3, Abb. 18C). Den Berechnungen der Molekulargewichte und den Befunden von Kang *et al.* (2009) zufolge, handelt es sich hierbei um die I2 (41.38 kDa). Die mit dem α -NOT 1^b AK (Abb. 20B) und α -NOT 1/4 AK

(Abb. 20C) hybridisierten α -CREB3² IPs bestätigen die Ergebnisse aus der Hefe, wonach dass CREB3 Protein mit dem NOT *Full-Length* Protein (●) bindet.

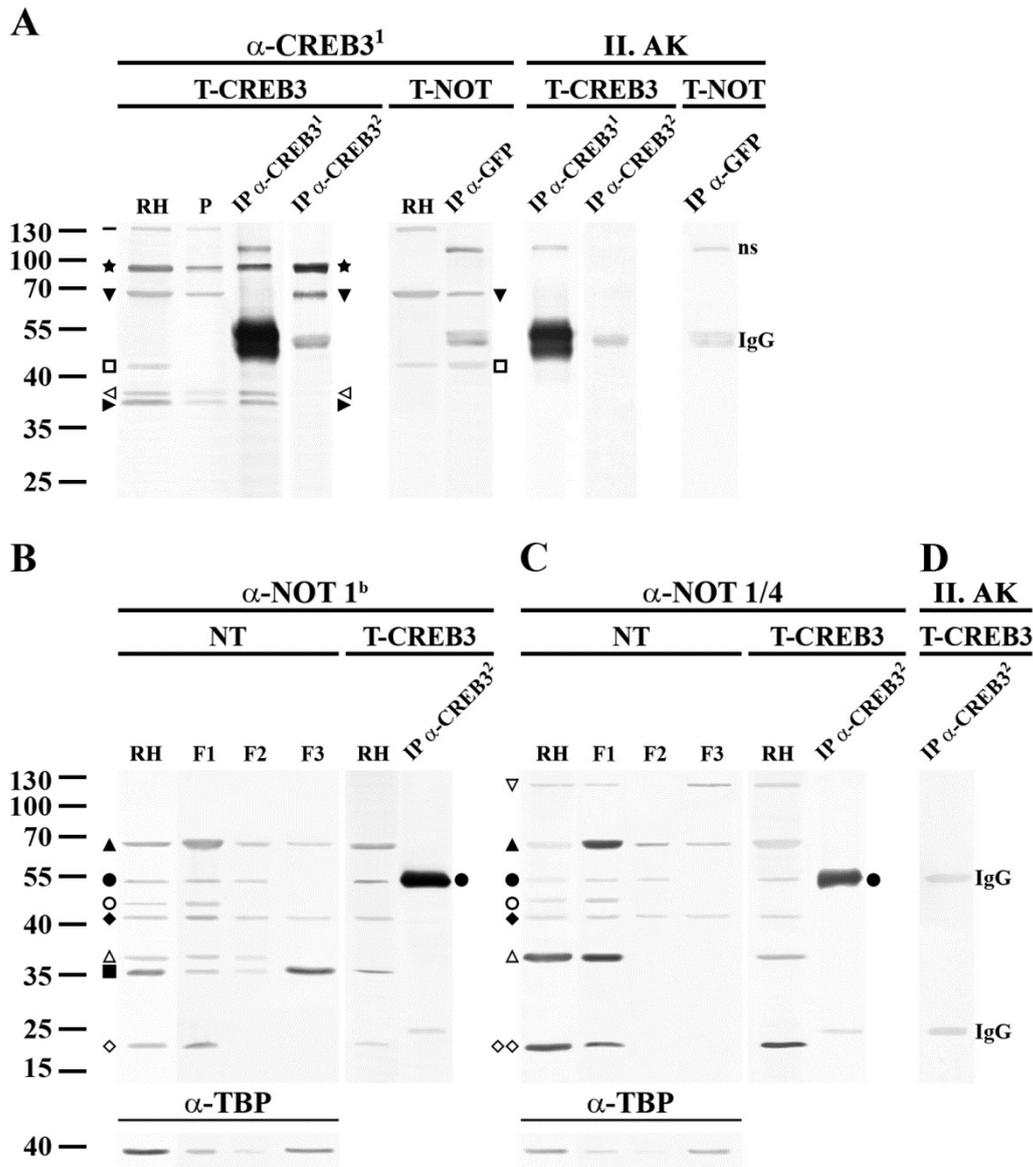


Abb. 20 Ergebnisse der Ko-IP Experimente zur Bestätigung der Bindung von NOT mit CREB3. A) Ko-IP von CREB3 mit NOT. Beide CREB3 AK können das rekombinante Protein immunoprecipitieren. Der α -CREB3¹ AK (Abnova, H00010488-D01P) immunoprecipitiert zusätzlich die beiden Proteine im Bereich von 35-40 kDa (▶,◁) und der α -CREB3² AK (Abnova, H00010488-M01) das native *Full-Length* CREB3 Protein um ~70 kDa (▼). In Immunopräzipitaten aus der NOT-Transfektante mit dem α -GFP AK können sowohl das native, posttranslational modifizierte, *Full-Length* CREB3 Protein (▼) sowie das potentielle Vorläufer- bzw. unmodifizierte Protein von ~42 kDa (□), welches im Zytosol lokalisiert ist, nachgewiesen werden. B/C) Ko-IP von NOT mit CREB3. Der Nachweis mit den NOT AK α -NOT 1^b (B) und α -NOT 1/4 (C) zeigt, dass CREB3 mit dem *Full-Length* NOT Protein (●) bindet. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse aufgrund unspezifischer Bindungen und der Überlagerung der NOT- mit der IgG Bande, sind in der Abb. 20A und D Nachweise mit dem sekundären AK dargestellt. Wie man in der Abb. erkennen kann, ist der IgG-Anteil in den Extrakten sehr gering. Alle AK wurden gemäß der in Punkt 3.1.10, Tab. 3 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Zahlen links geben die Molekulargewichte des Größenstandards wieder. Die IPs und die Herstellung der RH erfolgte nach dem Protokoll des *Immunoprecipitation Kit*

(Protein A) der Firma Roche (s. Punkt 3.2.3.3). Für die SDS-PAGE (10%) wurden 40µg RH, 15µl P und 15µl IP aufgetragen.

4.4.4.3 Bestätigung der Bindung von NOT mit OSBPL9, OSBP, SYPL1 und LRP1 mittels Ko-Immunopräzipitation

Die *in vivo* Bindung von NOT mit den Liganden OSBPL9, OSBP, SYPL1 und LRP1 konnte ebenfalls bestätigt werden. Die Ergebnisse der Ko-IP Experimente sind in der Abb. 21 dargestellt. Wie im Punkt 4.2.9 beschrieben, wurden für das OSBPL9 Protein zwölf Isoformen identifiziert: a, b, c, d, e, f, CRA_b, CRA_c, CRA_e, CRA_f, CRA_h und CRA_i (NCBI Akz.: NM_148904, NM_148906, NM_148907, NM_148908, NM_024586, NM_148909, EAX06811, EAX06812, EAX06814, EAX06815, EAX06818 und EAX06819). Die ICRA_h stellt mit einem errechneten (Compute pI/Mw) Molekulargewicht von 58.50 kDa das kleinste und die ICRA_b mit 86.25 kDa das größte Protein dar. Für das auf dem Chromosom 1 lokalisierte OSBPL9 Gen postulieren Wyles und Ridgway (2004) die Existenz von zwei Isoformen ORP9L und ORP9S. Diese Isoformen entsprechen der in der NCBI Datenbank beschriebenen Formen d (723 As; Akz.: NM_148908) und a (558 As, Akz.: NM_148904). Die errechneten (Compute pI/Mw) Molekulargewichte der Id und Ia betragen 81.79 kDa und 62.53 kDa. Mittels eines gegen die As 90-288 der Id gerichteten polyklonalen AK konnten Wyles und Ridgway (2004) in diversen Geweben zwei Proteine von 95 kDa und 70-75 kDa nachweisen. Die in transfizierten CHO Zellen durchgeführten Analysen zeigten, dass das Laufverhalten der Proteine der postulierten Größe der ORP9L und ORP9S Formen entspricht. An dieser Stelle ist anzumerken, dass der AK von Wyles und Ridgway (2004) potentiell alle Isoformen erkennen kann. Den Berechnungen (Compute pI/Mw) der Molekulargewichte der restlichen Isoformen (b: 81.17 kDa, c: 70.24 kDa, e: 83.18 kDa, f: 84.26 kDa, CRA_c: 85.18 kDa, CRA_e: 83.79 kDa, CRA_f: 83.41 kDa und CRA_i: 63.93 kDa) zufolge, ist es teilweise nicht möglich, im WB zwischen den einzelnen Isoformen zu unterscheiden. Wie man in der Abb. 21A erkennen kann, detektiert der α -OSBPL9² AK (Antikörper-Online, ABIN1013879) im RH zwei Banden: eine unterhalb der 70 kDa- und eine über der 40 kDa Markierung. Bei dem Protein um 70 kDa könnte es sich potentiell um die von Wyles und Ridgway (2004) beschriebene ORP9S Form (Ia) handeln. Interessanterweise immunoprezipitiert der α -OSBPL9² AK nur das Protein um 40 kDa, zudem in der Literatur bisher allerdings nichts beschrieben ist. Vermutlich stellt dieses Protein eine postranslational modifizierte Form oder ein Spaltprodukt dar. Der mit dem α -NOT 1/4 AK erbrachte Nachweis von NOT in den IPs bestätigt die OSBPL9-NOT Bindung. OSBPL9 bindet mit dem im Zytosol und am ER lokalisierten NOT Protein von ~42 kDa (◆).

Obwohl für OSPB nur eine Isoform beschrieben ist (NCBI Akz.: NM_002556) detektiert und immunoprecipitiert der α -OSBP² AK (Proteintech, 11096-1-AP) mehrere Proteine (Abb. 21B). Mit einem errechneten Molekulargewicht von 89.42 kDa stellen die beiden Proteine im Bereich von 100 kDa (Doppelbande) potentiell das *Full-Length* Protein dar. Den Ergebnissen von Mohammadi *et al.* (2001) aus mit Kaninchen OSBP transfizierten CHO Zellen zufolge, ist der Größenunterschied von 2-3 kDa auf differenzielle Phosphorylierung zurückzuführen. Der Datenbank der UniProt (UniProt: P22059 - OSBP1_HUMAN) ist zu entnehmen, dass das OSPB Protein über neun Phosphorylierungsstellen und eine Acetylierungsstelle verfügt. Die hohe Anzahl an Phosphorylierungsstellen könnte u.a. das hohe Laufverhalten des detektierten Proteins von ~130 kDa erklären. Eine Literaturrecherche zur Identifizierung der Proteine um 63- und < 35 kDa erbrachte keine Hinweise. Vermutlich stellen diese Proteine prozessierte Formen dar. Die Überprüfung des α -OSBP² IP mit dem α -NOT 1/4 AK zeigt, das OSBP ähnlich wie OSBPL9 mit dem NOT Protein von ~42 kDa (◆) bindet. In den mit dem α -GFP AK durchgeführten IPs aus NOT-Transfektanten konnte kein OSBPL9 oder OSBP nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Für das SYPL1 Protein sind zwei Isoformen beschrieben: 1 und 2 (NCBI Akz.: NM_006754 und NM_182715) (s. Punkt 4.2.4). Das errechnete Molekulargewicht der I1 beträgt 28.57 kDa und das der I2 26.41 kDa. Der für die IPs eingesetzte α -SYPL1 AK (Sigma-Aldrich, SAB3500080) ist I1 spezifisch. Wie man in der Abb. 21C erkennen kann, detektiert der α -SYPL1 AK im RH mehrere Banden. Die prominentesten Banden stellen die Proteine im Bereich von ~25 kDa und das Protein <100 kDa dar. Interessanterweise wird nur das Protein <100 kDa immunoprecipitiert. Nach den Studien von Brooks *et al.* (2000) zur Expression von SYPL1 während der Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten ist das Auftreten mehrerer Banden auf N-Glykosylierung zurückzuführen. Die durch Brooks *et al.* (2000) detektierten Proteine befanden sich im Bereich von ~25-50 kDa. Zur Erklärung des dominanten Proteins von <100 kDa wurde die SYPL1 Sequenz auf weitere Sequenzmotive für putative Modifizierungen mittels der ELM Datenbank untersucht. Die Analyse zeigte, dass das SYPL1 Protein neben dem Motiv für N-Glykosylierung über mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen (CK1, GSK3, PIKK, PKA, PIK und MAPK), sowie zwei Glykosaminoglykan-Bindestellen verfügt. Die Hybridisierung des α -SYPL1 IP mit dem α -NOT 1/4 AK zeigt, dass das SYPL1 Protein mit dem NOT Protein oberhalb der 35 kDa Markierung (△) und dem als C-terminales Spaltprodukt bestimmten Protein (s. Punkt 4.4.1) von ~20 kDa (◇◇) bindet. Eine weitere Bestätigung für die Bindung von NOT mit SYPL1 ist in der Abb. 21D dargestellt. Der mit dem α -GFP Ak durchgeführte IP aus der NOT-

Transfektante zeigt, dass das *Full-Length* NOT Protein mit den beiden SYPL1 Proteinen im Bereich von 25-35 kDa (▼,▲) bindet.

Der für die IP-Experimente eingesetzte α -LRP1 AK (Abcam, ab92544) ist gegen die in Punkt 4.2.5 beschriebene 85 kDa β -Untereinheit gerichtet. Wie man in der Abb. 21E erkennen kann, detektiert der α -LRP1 AK zwei Proteine im Bereich von ~85-100 kDa. Vermutlich handelt es sich hierbei, wie im Fall von OSPB beschrieben, um Proteine verschiedener Phosphorylierungsstufen. Nach Angaben der UniProt (UniProt: Q07954 - LRP1_HUMAN) verfügt die β -Untereinheit über sechs Phosphorylierungsstellen. Aufgrund der Stärke der IP-Bande kann man davon ausgehen, dass beide Proteine durch α -LRP1 AK immunoprezipitiert wurden. Der Nachweis des α -LRP1 IP mit dem α -NOT 1/4 AK zeigt, dass das LRP1 Protein mit dem NOT Protein von ~42 kDa (◆) bindet. In den α -GFP IPs aus der NOT-Transfektante konnte kein LRP1 nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

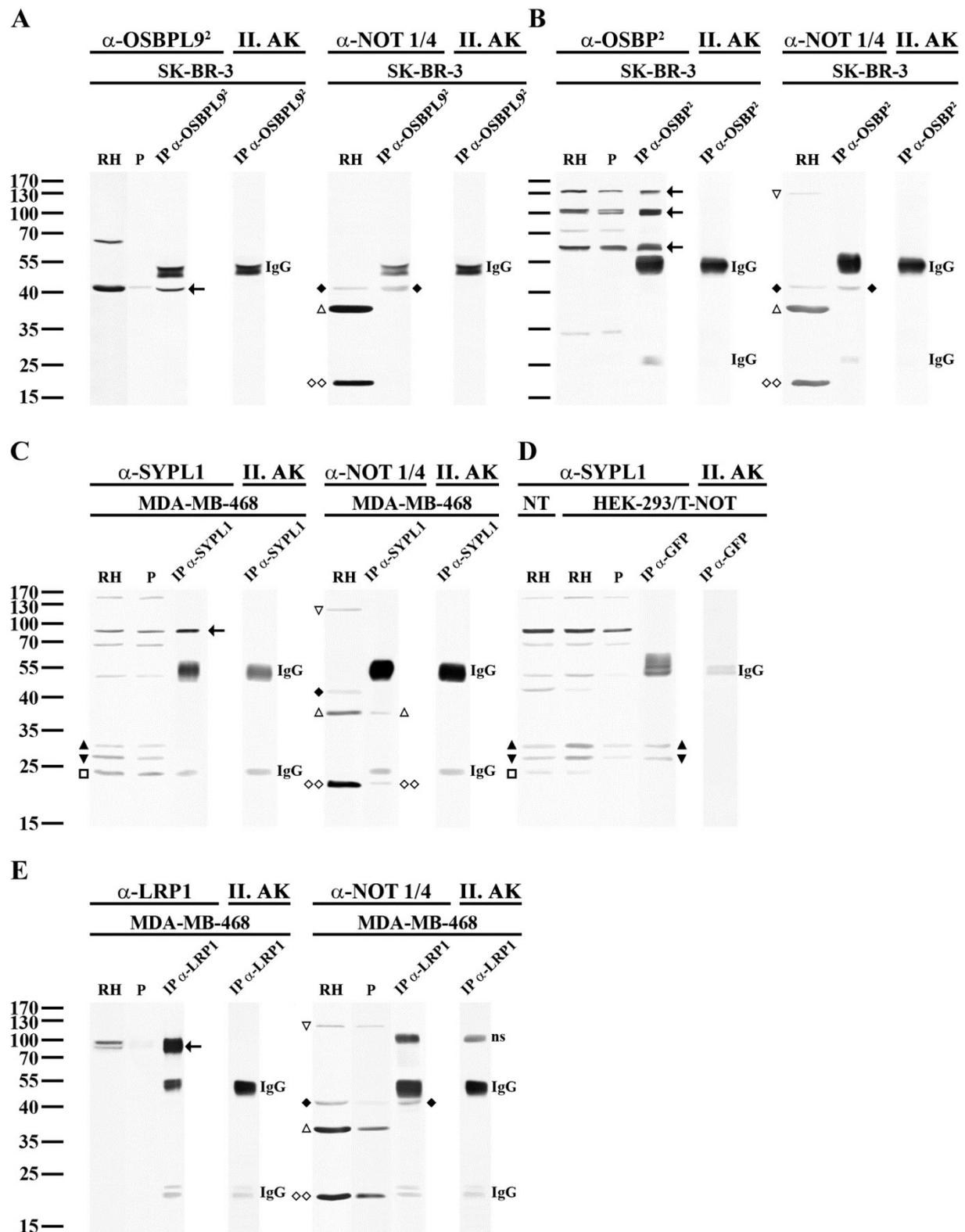


Abb. 21 Ergebnisse der Ko-IP Experimente zur Bestätigung der Bindung von NOT mit OSBPL9, OSBP, SYPL1 und LRP1. Für die IP-Experimente wurden die jeweiligen Zelllinien aus den Vorversuchen mit der stärksten Ligandenexpression ausgewählt (nicht dargestellt). **A)** Ko-IP von NOT mit OSBPL9. Der α -OSBPL9² AK (Antikörper-Online, ABIN1013879) immunoprezipitiert eine Bande von ~40 kDa. Der Nachweis des OSBPL9 IP mit dem α -NOT 1/4 zeigt, dass das OSBPL9 mit dem NOT Protein von ~42 kDa (◆) bindet. **B)** Ko-IP von NOT mit OSBP. Der α -OSBP² AK

(Proteintech, 11096-1-AP) weist im RH mehrere Banden nach. Die drei am stärksten exprimierten Proteine werden immunoprecipitiert. Der Nachweis des OSBP IP mit dem α -NOT 1/4 zeigt, dass das OSBP Protein ebenfalls mit dem NOT Protein von ~42 kDa (\blacklozenge) bindet. **C)** Ko-IP von NOT mit SYPL1. Der α -SYPL1 AK (Sigma-Aldrich, SAB3500080) immunoprecipitiert nur das Protein <100 kDa. Die kleineren Proteine im Bereich von 20-30 kDa können im IP nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis des SYPL1 IP mit dem α -NOT 1/4 AK zeigt, dass das SYPL1 Protein mit dem NOT Protein um 20 kDa ($\diamond\diamond$) und dem Protein oberhalb der 35 kDa (\triangle) bindet. **D)** Ko-IP von SYPL1 mit NOT. Das NOT Protein bindet mit den beiden SYPL1 Proteinen im Bereich von 25-35 kDa ($\blacktriangledown, \blacktriangle$). **E)** Ko-IP von NOT mit LRP1. Der α -LRP1 AK (Abcam, ab92544) detektiert im RH zwei Banden im Bereich von 100 kDa, vermutlich werden auch beide immunoprecipitiert. Wie OSBP bindet LRP1 mit dem NOT Protein von ~42 kDa (\blacklozenge). Die Nachweise mit dem sekundären AK dienen als Kontrolle. Alle AK wurden gemäß der in Punkt 3.1.10, Tab. 3 angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Zahlen links geben die Molekulargewichte des Größenstandards wieder. Die IPs und die Herstellung der RH erfolgte nach dem Protokoll des *Immunoprecipitation Kit (Protein A)* der Firma Roche (s. Punkt 3.2.3.3). Für die SDS-PAGE (10%) wurden 40 μ g RH, 15 μ l P und 15 μ l IP aufgetragen.

5. Diskussion

5.1 Isolierung und Identifizierung von molekularen Partnern des NOT-1 Proteins

Das *not*-Gen wurde zuerst in den Fruchtfliegen *Drosophila melanogaster* (*Dm*) (Kurzik-Dumke *et al.*, 1995; 1997b) und *Drosophila virilis* (*Dv*) (Kaymer *et al.*, 1997) entdeckt und danach im Menschen (Kurzik-Dumke und Kaymer, 1996) identifiziert. Die genomische Organisation der Gene in *Dm* sowie in *Dv* ist vergleichbar. Ein Sequenzvergleich des putativen Not56-Proteins aus *Dm* mit Not58 aus *Dv* zeigt, dass die beiden Proteine zu 71% identisch sind (Kaymer *et al.*, 1997). Weitere Analysen zeigten, dass das Not56-Protein zu 48,7% mit dem humanen NOT Protein (Kurzik-Dumke und Kaymer, 1996; Kaymer, 1997) und zu 31% mit dem Hefe ALG3-Protein (Obermaier *et al.*, 1995; Kurzik-Dumke *et al.*, 1997; Kaymer *et al.*, 1997) identisch ist. Das *ALG3* Gen der Hefe kodiert eine Dol-P-Man:Man₅GlcNAc₂-PP-Dol-Mannosyltransferase, die in der N-Glykosylierung (Robbins, 1994; Aebi *et al.*, 1996) wirkt. Ob eine funktionelle Homologie zwischen den *not*-Genen der Fliege, des Menschen und der Hefe besteht ist unbekannt. Während Körner *et al.* (1999) mittels der für das humane *not*-Gen kodierenden cDNA den Glykosylierungsdefekt im $\Delta alg3$ Hefestamm zu 7% komplementieren konnten, gelang es Sun *et al.* (2005) und Kranz *et al.* (2007) durch Klonierung der humanen *not*-cDNA in lentivirale Vektoren und Transfektion in Patienten Fibroblasten den Glykosylierungsdefekt komplett zu beheben. Die Autoren gehen davon aus, dass das humane *not*-Gen das Orthologe des *S.cerevisiae* *ALG3*-Gens ist und für die Entstehung von CDG-Id / ALG3-CDG verantwortlich ist. Die Sequenzanalyse des *ALG3* Gens aus 9 Patienten mit CDG-Id (s. Punkt 1.2, Tab. 1) (Denecke *et al.* 2004; 2005; Schollen *et al.* 2005; Rimella-Le-Huu *et al.* 2008; Riess *et al.* 2013) lieferte durchaus interessante Resultate, die dennoch kritisch zu betrachten sind. Die von Denecke *et al.* (2004) beschriebene homozygote *Silent*-Mutation, nt 165, kann als CDG-Id relevant ausgeschlossen werden. Ein Vergleich der von Denecke *et al.* (2004; 2005) beschriebenen Sequenz mit den in der NCBI Nukleotid Datenbank publizierten Sequenzen zeigt, dass diese Mutation für die Transkript-Variante 2 (Akz. NR_024534) charakteristisch ist. Da diese verkürzten *not*-Transkripte nicht vom NMD abgebaut werden (Denecke *et al.*, 2004; 2005) könnten sie biologisch aktiv sein.

Die in der AG Kurzik-Dumke durchgeführten Analysen zur Expression des humanen *not* Gens in Tumoren zeigten, dass es sich bei *hnot*, ähnlich wie bei *htid*, um ein neues tumorrelevantes Gen handelt (pers. Mitteilung Kurzik-Dumke). Diese Resultate sind mit den

in verschiedenen Tumorbanken publizierten Daten zur veränderten Expression des Gens in diversen Tumoren stimmig.

Zur Aufklärung der zellulären Funktionen des humanen *not*-Gens wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit die *Human Mammary Gland Matchmaker cDNA Library* (Clontech) mittels des Hefe Zwei-Hybrid Systems auf molekulare Partner der NOT Proteine untersucht. Ein Konstrukt, welches für das *Full-Length*-NOT Protein kodiert, wurde als Köder eingesetzt. Durch den *Screen* konnten 17 potentielle molekulare Partner - Synaptophysin-Like 1 (SYPL1), Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1), VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein)-Associated Protein A, 33kDa (VAPA), Sushi Repeat-Containing Protein, X-Linked (SRPX), FK506 Binding Protein 8, 38kDa (FKBP8), Guanylate-Binding Protein 1, Interferon-Inducible (GBP1), Heme Oxygenase 2 (HMOX2), BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa Interacting Protein 3 (BNIP3), Oxysterol Binding Protein (OSBP), Oxysterol Binding Protein-Like 9 (OSBPL9), CD74 Molecule, Major Histocompatibility Complex, Class II Invariant Chain (CD74), Smoothelin (SMTN), SEC16 Homolog B (*S. cerevisiae*) (SEC16B), NDRG Family Member 2 (NDRG2), Inverted Formin, FH2 and WH2 Domain Containing (INF2), Mitochondrially Encoded Cytochrome c OxidaseIII (MT-CO3), cAMP Responsive Element Binding Protein 3 (CREB3) - von NOT identifiziert werden (s. Punkt 4.1.2, Tab. 9).

Von den isolierten Bindungspartnern erwiesen sich das Synaptophysin-Like Protein 1 (SYPL1), das Pro-low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1), das Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein A (VAPA), das Homo Sapiens FK506 Binding Protein 8, 38kDa (FKBP8), das Oxysterol Binding Protein 1 (OSBP), das Oxysterol Binding Protein-Like 9 (OSBPL9) und das Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein 3 (CREB3) aufgrund ihrer bisher bekannten funktionellen Eigenschaften als besonders interessant. Zur Kartierung der Bindungsdomänen von NOT und den auserwählten Liganden wurden diverse Deletionskonstrukte hergestellt. Die Analysen erfolgten mittels des Y2H. Für die Bindungspartner SYPL1, LRP1, OSBP, OSBPL9 und CREB3 konnte mit Hilfe spezifischer Antikörper die Bindung *in vivo* durch Ko-IP gezeigt werden. Für die Interaktionen von NOT mit den restlichen 10 Liganden wurden im ersten Schritt lediglich präliminäre Literaturrecherchen durchgeführt und zur Übersicht die biologischen Funktionen tabellarisch zusammengefasst (s. Anhang).

5.2 CREB3 als Interaktionspartner von NOT

Die publizierten Daten zu CREB3 implizieren, dass es sich um ein multifunktionales Protein, involviert in diversen zellularen Prozessen, handelt. Durch die Bindung mit dem *Host cell factor 1* (HCF1) wurde dem CREB3 Protein zunächst eine Funktion bei der Suppression der Herpes-simplex-Virus (HSV) Replikation durch Etablierung viraler Latenz aber auch durch Aktivierung der Gene *Immediate-early protein IE110*- und *Latency-associated transcript* (LAT) bei der HSV-Reaktivierung zugeschrieben (Lu *et al.*, 1997; Freiman und Herr, 1997; Lu und Misra, 2000). Weitere Untersuchungen in diesem Kontext zeigten, dass CREB3 ebenfalls mit dem *HCF-like kelch repeat protein* (HCLP-1) bindet und HCLP-1 als Korepressor von CREB3 fungiert (Zhou *et al.*, 2001). Die Kernfunktion von CREB3 betreffend, konnten Raggio *et al.* (2002) in ihrer Arbeit zeigen, dass zellulärer Stress zur Aktivierung der „Antwort auf ungefaltete Proteine“ (*Unfolded Protein Response*, UPR) und zur „Regulierten Intramembran Proteolyse“ (RIP) von CREB3 führt. In der Funktion als Transkriptionsfaktor spielt CREB3 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation* (ERAD) Signalweges (Den Boer *et al.*, 2005) durch Regulierung der Genexpression des *Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein* (Herp) (Liang *et al.*, 2006). Die UPR assoziierte transkriptionelle Aktivität von CREB3 wird durch die Bindung des *Luman Recruitment factor* (LRF) inhibiert (Audas *et al.*, 2005). Interessanterweise zeigte die Arbeit von Blot *et al.* (2006), dass CREB3 in zwei verschiedenen Funktionen im Kontext der humanen Immundefizienz-Virus (HIV) Replikation beteiligt ist. Während die gespaltene aktive Form von CREB3 mit dem HIV *Transactivator of transcription* (TAT) Protein bindet und somit an der negativen Regulation der HIV-Replikation beteiligt ist, wirkt sich die Bindung mit der Untereinheit TMgp41 des HIV-*Envelope* (Env) *glycoproteins* stabilisierend auf das *Full-Length* CREB3 Protein am ER aus (Blot *et al.*, 2006). Den Befunden von Jin *et al.* (2000) zufolge, wonach die Bindung von CREB3 mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV)- Kernprotein im Zytosol zur Unterdrückung der CREB3 Genregulation und einer Entartung von NIH 3T3 Zellen führt, stellt CREB3 ein Tumorsuppressor dar. Neuere Befunde zeigten, dass CREB3 durch die Genregulierung des *CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4* (CXCR4) und der damit verbundenen chemotaktischen Signalgebung in metastasiertem Brustkrebs auch Onkogen-Funktionen besitzt (Kim *et al.*, 2010). In weiteren Funktionen spielt CREB3 durch die Bindung mit dem *Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein* (DC-STAMP) eine entscheidende Rolle bei der Reifung dendritischer Zellen (Eleveld-Trancikova *et al.*, 2010) oder ist als Ligand des C-C Chemokin-Rezeptors Typ 1 (CCR1) an der positiven Regulation der Leukotaktin-1 (Lkn-1) induzierten

Leukozytenmigration und der differentiellen Aktivierung des NF- κ B Signalweges (Ko *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2006) beteiligt.

Interessanterweise beziehen sich alle bisher in der Literatur beschriebenen Funktionen von CREB3 ausschließlich auf die in Punkt 4.2.10 beschriebene Isoform 2 (371 As). Dies bestätigt die Analysen von Kang *et al.* (2009), wonach, entgegen der Angaben der UniProt Datenbank, anstatt drei, offensichtlich nur zwei CREB3 Isoformen, 2 und 3, exprimiert werden. Den Befunden von Kang *et al.* (2009) zufolge übt die primär im Kern lokalisierte I3 (Kang *et al.*, 2009) eine spezifische Funktion als Negativregulator der durch Liganden wie z.B. der Histon-Deacetylasen (HDACs) 1, 2 und 6 induzierten transkriptionellen Aktivierung des Glukokortikoid-Rezeptors aus.

Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen aus der Hefe (s. Punkt 4.2.10, Tab. 18) und den Ko-IP Experimenten (s. Punkt 4.4.4.2, Abb. 20) zeigten, dass jeweils die *Full-Length* Proteine miteinander interagieren. Interessanterweise konnten im IP α -GFP aus mit NOT transfizierten Zellen sowohl das native, posttranslational modifizierte *Full-Length* CREB3 Protein (\blacktriangledown) als auch das im Zytosol lokalisierte potentielle Vorläufer- bzw. unmodifizierte *Full-Length* Protein von ~ 42 kDa (\square) nachgewiesen werden. Den Kartierungsergebnissen mittels des Y2H Systems zufolge wird für die Bindung an CREB3 das *Full-Length* NOT Protein benötigt, wohingegen die Bindung von NOT an CREB3 über dessen TAR-Domäne (As 1-92) erfolgt (Abb. 22B). Da die TAR-Domäne im Zytosol lokalisiert ist, kann die Bindung an NOT nur über dessen zytosolische Domänen erfolgen (Abb. 22A). Die TMD, sowie die sich im Lumen des ER (LER) befindlichen Domänen von NOT, scheinen für die Bindung mit CREB3 irrelevant zu sein.

Die vorliegenden Resultate implizieren, dass NOT durch die Bindung mit dem zytosolischen ~ 42 kDa Protein eine potentielle Rolle bei der Reifung des *Full-Length* CREB3 Proteins spielt. Ob das NOT Protein zusätzlich auch an der posttranslationalen Modifikation von CREB3 beteiligt ist oder eine stabilisierende Funktion auf das *Full-Length* CREB3 Protein ausübt, ähnlich wie z.B. für die Untereinheit TMgp4 des HIV-Env Glykoprotein von Blot *et al.* (2006) beschrieben, muss untersucht werden.

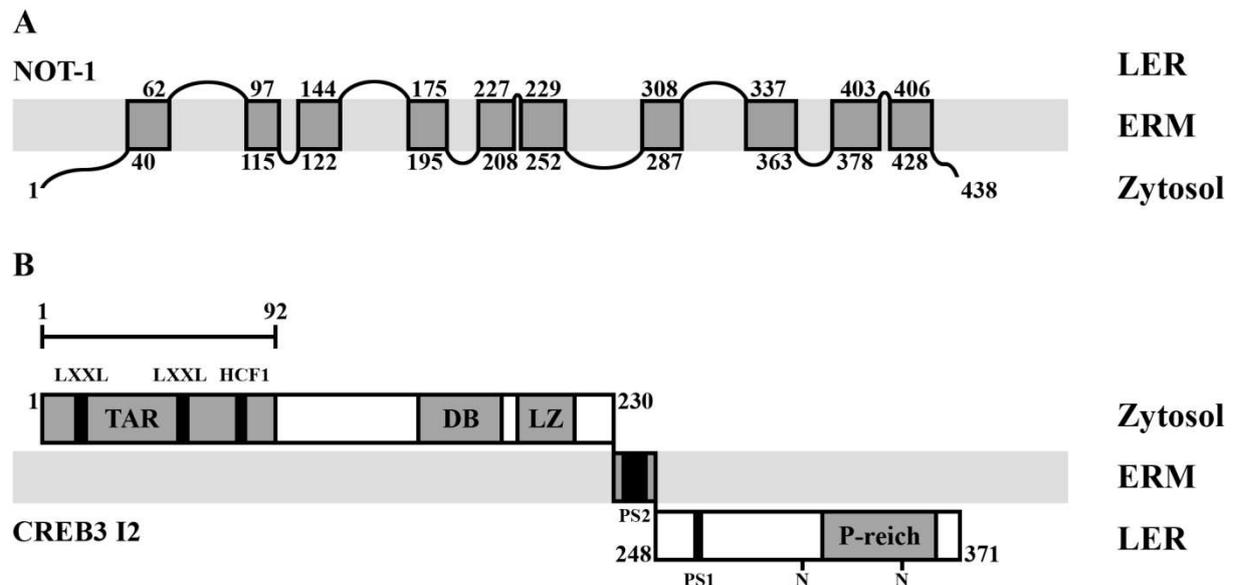


Abb. 22 Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und CREB3. **A)** Darstellung des NOT-1 Proteins mit 10 TMD nach TMpred (s. Punkt 4.3.2, Tab.19) am ER. Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen und die Ko-IP Experimente zeigten, dass für die Bindung mit CREB3 das *Full-Length* NOT Protein benötigt wird. Die markierten As kennzeichnen den Beginn / das Ende der zytosolischen bzw. im Lumen des ER befindlichen Domänen (LER: Lumen ER, ERM: ER Membran) **B)** Darstellung der I2 des CREB3 Proteins (NCBI Akz.: BC009402). Der zytosolische Bereich des CREB3 Proteins (As 1-230) beinhaltet drei funktionelle Domänen: die TAR (As 1-92), die DB (As 152-184) und den LZ (As 192-213). Innerhalb der TAR-Domäne sind zwei LXXL-Motive (As 13-17 und 54-58, schwarz) und ein HCF1-Bindungsmotiv (As 78-81, schwarz) lokalisiert. Der C-Terminus (As 248-371) beinhaltet eine Pro-reiche Region (As 316-361) und zwei N-Glykosylierungsstellen (As 307^N und 348^N), sowie eine PS1-Schnittstelle (As 264-267, schwarz). Innerhalb der TM-Domäne (As 231-247) ist eine PS2-Schnittstelle lokalisiert (As 235-245, schwarz). Mittels des Y2H Systems konnte die TAR-Domäne (As 1-92) als der NOT bindende Bereich identifiziert werden. Dies bedeutet, dass die Bindung von CREB3 an NOT ausschließlich über dessen im Zytosol gelegenen Domänen erfolgt.

5.3 OSBP und OSBPL9 als Interaktionspartner von NOT

Sowohl OSBP als auch OSBPL9 gehören zur ORP-Familie, die aus sechs Unterfamilien besteht (Lehto *et al.*, 2001). Neben der namensgebenden SB-Domäne verfügt die Mehrheit der ORPs über die charakteristische N-terminale PH-Domäne für die Bindung von Phosphatidylinositol-phosphat (PIP) am Golgi-Apparat und über ein FFAT-Motiv für die Bindung mit den VAMP-associated Proteinen A (VAPA) und B (VAPB) (Ngo *et al.*, 2010) am ER. In Bezug auf die PH-Domäne von OSBP und OSBPL9 konnte gezeigt werden, dass diese mit hoher Affinität Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P) bindet (Ngo und Ridgway, 2009, Liu und Ridgway, 2014). Während sich die Funktion von OSBPL9 primär auf den Transport von Cholesterol zwischen dem ER und dem trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Aufrechterhaltung des Cholesterolspiegels im sekretorischen System beschränkt (Ngo und Ridgway, 2009), ist OSBP durch die Bindung von 25-Hydroxycholesterol (25-OH) und

VAPA an der Aktivierung des Ceramid Transfer Protein (CERT) und der damit verbundenen Sphingomyelin-Synthese (SM) beteiligt (Wyles *et al.*, 2002; Perry und Ridgway, 2006). Die Bindung von OSBP mit VAPA fördert offensichtlich dessen Multimerbildung, was wiederum zu einer erhöhten Bindung von CERT und folglich dem Ceramid Transport führt (Perry und Ridgway, 2006). Eine Bindung von OSBPL9 mit VAPA konnte ebenfalls gezeigt werden (Wyles und Ridgway, 2004). Wyles und Ridgway (2004) postulieren, dass der OSBPL9/VAPA-Komplex eine fundamentale Komponente des ER-Golgi sekretorischen Systems darstellt und eine Rolle beim COPII-Vesikel Transport spielt. Die Arbeitsgruppe Lessmann *et al.* (2006) konnte zeigen, dass OSBPL9 durch Bindung des Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) des mTORC2-Komplexes an der negativen Regulation der Protein Kinase B (PKB) beteiligt ist und folglich ein neuer Regulator des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Signalweges darstellt. OSBP hingegen ist durch die Cholesterol-aktivierte Bindung der Protein-Phosphatase 2 (PP2A) und der Hämatopoetischen Tyrosin-Phosphatase (HePTP) an der Kontrolle, der durch die Extrazelluläre-signalregulierte Kinasen 1/2 (ERK1/2) regulierten Signaltransduktion beteiligt (Wang *et al.*, 2005). Die Bindung von Oxysterol führt zum Abbau des OSBP, PP2A und HePTP Oligomern (Wang *et al.*, 2005). Die Arbeit von Amako *et al.* (2009) zeigte, dass OSBP in einer weiteren Funktion durch die Bindung des nicht-strukturellen HCV Proteins 5A (NS5A) für dessen Transport zum Golgi-Apparat verantwortlich ist und somit eine entscheidende Rolle bei der viralen Reifung spielt. Genauere Untersuchungen zeigten schließlich, dass OSBP und NS5A neben dem Golgi-Apparat auch am membranösem Netz kolokalisieren und OSBP zusammen mit der Phosphatidylinositol 4-Kinase Alpha (PI4KA) eine essentielle Komponente zur Aufrechterhaltung des membranösen Netzes und der HCV-Replikation darstellt (Wang *et al.*, 2014).

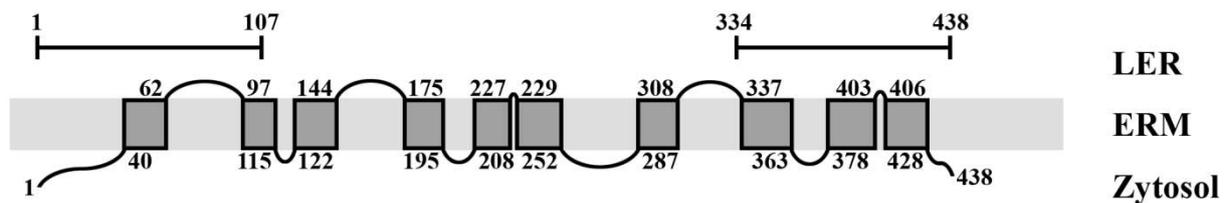
Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen von OSBP (s. Punkt 4.2.8, Tab. 15) und OSBPL9 (s. Punkt 4.2.9, Tab. 16) mit NOT zeigten, dass OSBP mit dem N-Terminus, As 1-107, des NOT Proteins bindet (Abb. 23A) und OSBPL9 mit dem *Full-Length* NOT Protein interagiert (Abb. 24A). Als Bindedomänen für NOT an OSBP und OSBPL9 konnten die As-Bereiche 326-474 des OSBP Proteins (Abb. 23B) und 90-345 der ICRA_c des OSBPL9 Proteins (Abb. 24B) identifiziert werden. Interessanterweise beinhalten die identifizierten As-Bereiche jeweils das FFAT-Motiv. Wie die Analyse der OSBPL9 Isoformen in Punkt 4.2.9 zeigte, korrespondiert der As-Bereich 90-345 der ICRA_c, zu 100% mit den As 55-310 der Ib und den As 72-327 der Isoformen e und CRA_f. Da die NOT-Bindedomäne, bestehend aus 256 As, nicht weiter eingegrenzt werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass die restlichen OSBPL9 Isoformen (a, c, d, f, CRA_b, CRA_e, CRA_h und CRA_i) potentiell auch mit NOT

binden. Ein *Alignment* (nicht dargestellt) der NOT bindenden Domäne (256 As) mit dem durch die kleinste Isoform, CRA_h (521 As), kodierten Protein zeigt, dass diese zu 43,75 % (As 154-256) mit dem identifizierten Bereich korrespondiert. Das FFAT-Motiv ist in allen OSBPL9 Isoformen enthalten.

Die Ko-IP Experimente zeigen, dass OSBPL9 und OSBP mit dem ~42 kDa (◆) NOT Protein (s. Punkt 4.4.4.3, Abb. 21A+B), welches vermutlich eine prozessierte Form des *Full-Length* NOT Proteins darstellt und sowohl im Zytosol als auch am ER lokalisiert ist (s. Punkt 4.4.1, Abb. 16), binden. Da das Protein sowohl durch den gegen den N-Terminus, As 1-14, (α -NOT 1^b) und die zentrale Region, As 320-333, gerichteten AK (α -NOT 1/4) erkannt wird (s. Punkt 4.4.1, Abb. 16), kann eine Spaltung im As-Bereich 334-438 vermutet werden (Abb. 23A/24A). Durch die bioinformatische Analyse der NOT-1 Sequenz mit den Programmen Signal-BLAST und PrediSi (s. Punkt 4.3.3), sowie der Durchsichtung der ELM Datenbank nach konservierten Sequenzmotiven (s. Punkt 4.3.4), konnten in diesem Bereich allerdings keine putativen Schnittstellen identifiziert werden. Da OSBPL9 und OSBP ausschließlich im Zytosol lokalisiert sind, kann im Fall von ER gebundenem NOT die Interaktion nur über dessen sich im Zytosol befindlichen Domänen erfolgen (Abb. 23A/24A). Mit welcher OSBPL9 Isoform NOT bindet, konnte durch die IP-Analysen nicht geklärt werden, da in den mit dem α -GFP AK durchgeführten IPs aus NOT-Transfektanten kein OSBPL9 nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis für OSBP war ebenfalls negativ.

A

NOT-1



B

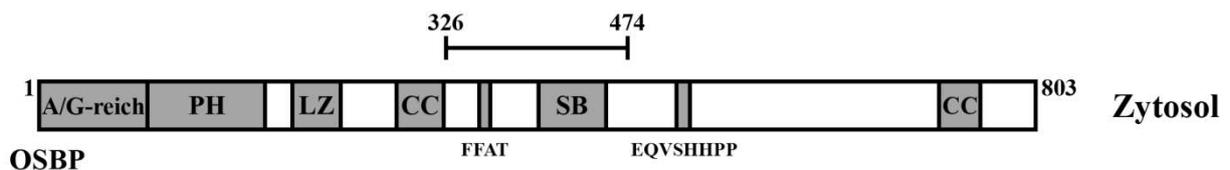


Abb. 23 Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und OSBP. **A)** Darstellung des NOT-1 Proteins mit 10 TMD nach TMpred (s. Punkt 4.3.2, Tab.19) am ER. Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen und die Ko-IP Experimente zeigten, dass OSBP mit dem am ER und im Zytosol lokalisiertem ~42 kDa NOT Protein bindet und die Bindung über den As-Bereich 1-107 erfolgt. Da das ~42 kDa Protein von beiden NOT AK (α -NOT 1^b und α -NOT 1/4) erkannt wird, muss die Spaltung des *Full-Length* NOT Proteins innerhalb des As-Bereichs 334-438 erfolgen. Die markierten As kennzeichnen den Beginn / das Ende der zytosolischen bzw. im Lumen des ER befindlichen Domänen (LER: Lumen ER, ERM: ER Membran) **B)** Darstellung des OSBP Proteins (NCBI Akz.: NM_002556). Das OSBP Protein besteht aus 803 As und ist im Zytosol lokalisiert. Den N-Terminus bildet eine A/G-reiche-Region (As 1-93), gefolgt von einer PH- (As 88-181) und einer LZ-Domäne (As 207-242). Zentral befindet sich die charakteristische SB-Domäne (As 406-457) (Wang *et al.*, 2008), welche von dem FFAT- (As 358-364) und dem Sequenzmotiv „EQVSHHPP“ (As 518-525) flankiert wird. An den As-Positionen 291-326 und 730-760 sind zwei CC-Domänen lokalisiert. Die Resultate der Bindungsstudien zeigten, dass OSBP über den As-Bereich 326-474, welcher das FFAT-Motiv und die SD-Domäne enthält, mit NOT bindet.

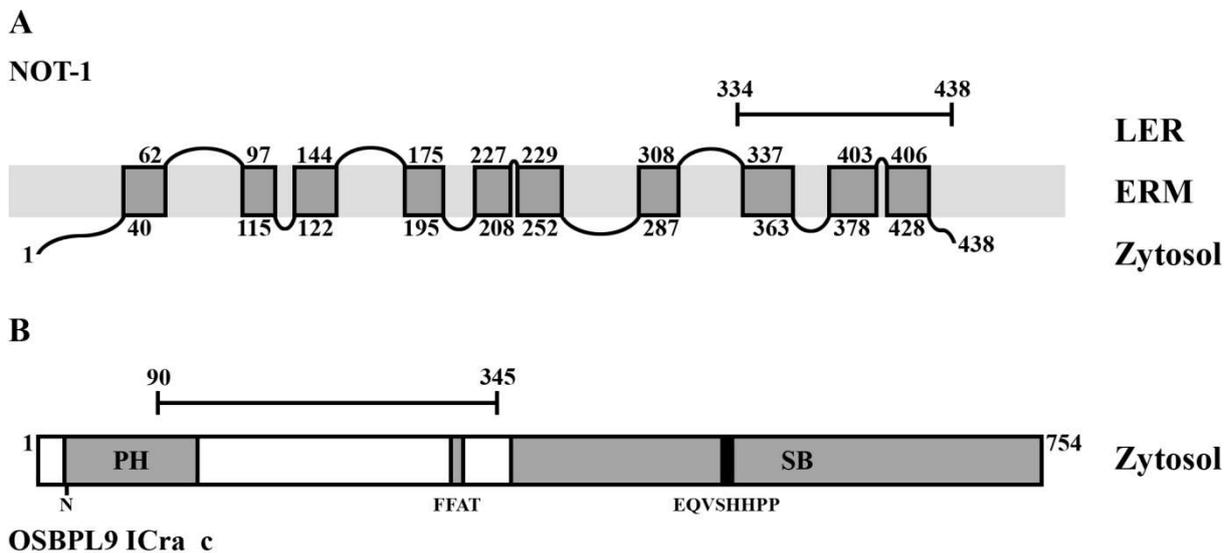


Abb. 24 Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und OSBPL9. **A)** Darstellung des NOT-1 Proteins mit 10 TMD nach TMpred (s. Punkt 4.3.2, Tab.19) am ER. Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen und die Ko-IP Experimente zeigten, dass OSBPL9 mit dem am ER und im Zytosol lokalisiertem ~42 kDa NOT Protein bindet und für die Bindung das komplette NOT Protein benötigt wird. Da das ~42 kDa Protein von beiden NOT AK (α -NOT 1^b und α -NOT 1/4) erkannt wird, muss die Spaltung des *Full-Length* NOT Proteins innerhalb des As-Bereichs 334-438 erfolgen. Die markierten As kennzeichnen den Beginn / das Ende der zytosolischen bzw. im Lumen des ER befindlichen Domänen (LER: Lumen ER, ERM: ER Membran) **B)** Darstellung der ICra_c des OSBPL9 Proteins (NCBI Akz.: EAX06812). Bestehend aus 754 As stellt die ICRA_c mit die längste Form der potentiellen NOT-Bindungspartner dar. Innerhalb des Proteins sind zwei funktionelle Domänen lokalisiert. Während die PH-Domäne (As 20-117) am N-Terminus lokalisiert ist, erstreckt sich die SB-Domäne über den kompletten As-Bereich 357-754 und beinhaltet das Sequenzmotiv „EQVSHHPP“ (As 515-522). Eine N-Glykosylierungsstelle ist am N-Terminus, As 20, lokalisiert. Die Resultate der Bindungsstudien zeigten, dass OSBPL9 über den As-Bereich 90-345, welcher ein Teil der PH-Domäne und das FFAT-Motiv enthält, mit NOT bindet.

Das Ergebniss der Literaturrecherche zeigte, dass beide Proteine u.a. durch die Bindung von 25-OH am Transport von Cholesterol vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt sind und demzufolge eine wichtige Komponente bei der Aufrechterhaltung des Cholesterolspiegels darstellen. In Bezug auf das OSBP und OSBPL9 bindende ~42 kDa (◆) NOT Protein, welches im Zytosol und am ER lokalisiert ist, muss in künftigen Analysen eine Funktion der NOT-OSBP/OSBPL9 Bindung in den oben beschriebenen Prozessen überprüft werden.

Da die identifizierten Bindedomänen von OSBP und OSBPL9 interessanterweise jeweils das FFAT-Motiv beinhalten, muss geprüft werden, ob die Bindung über dieses Motiv erfolgt. Im Unterschied zu OSBPL9 beinhaltet die Bindedomäne von OSBP zusätzlich die SB-Domäne. Eine Bestätigung oder ein Ausschluss dieser funktionellen Domänen ist für die biologische Funktion/Rolle der Bindung entscheidend.

Mit dem VAPA Protein haben OSBP und OSBPL9 zwar einen gemeinsamen Liganden, jedoch kann eine parallele Bindung mit dem gleichen VAPA Molekül ausgeschlossen werden, da OSBP und OSBPL9 beide am ER über ihr FFAT-Motiv an die MSP-Domäne von VAPA binden. Obwohl in der Literatur zu einer parallelen Bindung von OSBP und OSBPL9 mit VAPA bisher nichts beschrieben ist, könnte eine gemeinsame Interaktion mit VAPA womöglich in Form eines großen Proteinkomplexes stattfinden. Den Befunden von Perry und Ridgway (2006) zufolge bedingt z.B. die Bindung von OSBP an VAPA vermutlich dessen Multimerbildung und es kommt zu einer Erhöhung der CERT-Bindung und somit auch des Ceramid Transportes.

5.4 VAPA als potentieller Interaktionspartner von NOT

Das VAPA Protein wurde zuerst in der Meeresschnecke *Aplysia californica* als Bindungspartner des *Soluble n-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor* (SNARE) Proteins VAMP im Kontext der Neurotransmitterausschüttung entdeckt (Skehel *et al.*, 1995). Die Entdeckung des humanen VAPA Proteins, im Original hVAP-33 benannt, erfolgte durch die Arbeitsgruppe Weir *et al.* (1998). Mittels GST-Bindungsstudien konnten Weir *et al.* (1998; 2001) zeigen, dass das humane VAPA Protein mit dem *Vesicle-associated membrane protein 1* (VAMP1), VAMP2, Syntaxin 1A (Stx1a), *Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein* (Bet1), *SEC22 homolog B, vesicle trafficking protein* (Sec22), *N-ethylmaleimide-sensitive factor* (NSF) und dem *NSF attachment protein alpha* (α SNAP) aus der Ratte bindet. SNARE Proteine sind als Proteinkomplexe in Vesikeln von eukaryotischen Zellen lokalisiert und katalysieren die Verschmelzung von Vesikeln untereinander oder mit

der Zellmembran (Chen *et al.*, 2001). Die Beobachtung, dass das VAPA Protein primär am ER und *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC) lokalisiert ist impliziert, dass VAPA eine generelle Rolle im SNARE-vermittelten Vesikeltransport zwischen dem ER und Golgi-Apparat spielt (Weir *et al.*, 2001). Neben den SNARE Proteinen ist auch das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) als Komplex mit dem Ko-Chaperon TPR1 an der Regulierung von Vesikeltransport- und fusion beteiligt (Lotz *et al.*, 2008). Lotz *et al.* konnten zeigen, dass VAPA durch die Bindung mit TPR1 eine entscheidene Rolle bei der Aktivierung des Chaperons Hsp90 spielt. Weiterhin ist VAPA am Transport des Transmembranproteins Occludin, einer Komponente zur Bildung der *Tight Junctions* (Lapierre *et al.*, 1999), oder durch die Bindung mit VAMP2 an der Insulin-stimulierten Translokation des Glukosetransporters Typ-4 (GLUT4) beteiligt (Foster *et al.*, 2000). Die Interaktion von VAPA mit dem Membranprotein Protrudin ist wichtig für die ER Lokalisierung von Protrudin und dessen Schlüsselrolle bei der Regulierung *Ras-related in brain* (Rab11)- abhängiger Transportprozesse für neurale Differenzierung und Neuriten-Wachstum (Saita *et al.*, 2009). In den äußeren Haarzellen (*Outer hair cells*, OHCs) ist VAPA als Bindungspartner von Prestin für dessen Transport zur Zellmembran involviert (Sengupta *et al.*, 2010).

Wie bereits in Punkt 5.3 beschrieben, bindet VAPA über seine MSP-Domäne mit dem FFAT-Motiv der ORP-Familienmitglieder OSBP und OSBPL9, die als NOT-Liganden identifiziert wurden, und weiteren ORP Proteinen, wie OSBPL1A, OSBPL2, OSBPL3, OSBP2, OSBPL6 und OSBPL7 (Wyles und Ridgway, 2004). Der Bindung von VAPA mit OSBPL9 wurde eine fundamentale Rolle im ER-Golgi sekretorischen System zugeschrieben (Wyles und Ridgway, 2004). Die Analysen von Perry und Ridgway (2006) implizieren, dass die 25-OH induzierte Bindung von OSBP an VAPA offensichtlich dessen Multimerbildung bedingt, was wiederum zu einer erhöhten VAPA/CERT-Interaktion und SM-Synthese führt. Die Bindung von CERT mit VAPA bedingt einen effizienten Ceramid Transport vom ER zum Golgi-Apparat (Kawano *et al.*, 2006). Weiterführenden Analysen, wie die von Saito *et al.* (2008) zur Aufklärung der genaueren Funktion von VAPA im Kontext der CERT-Aktivierung, dem Ceramid Transport und SM-Synthese zeigten letztendlich, dass VAPA nicht am direkten Transport beteiligt ist, sondern vielmehr als Faltungsprotein an der Transportregulierung.

Neben den beschriebenen Funktionen von VAPA in der Transportmaschinerie stellt das Protein auch eine Komponente der viralen Replikation dar. Die Bindung mit den HCV-Proteinen NS5A und NS5B zeigt, dass VAPA als Membranrezeptor für die Bildung des HCV-Replikationskomplexes verantwortlich ist (Tu *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2004). VAPA bindet ebenfalls mit dem nichtstrukturellen p48 des Norwalk-Viruses, welcher zur Familie der

Caliciviridea, Gattung Norovirus gehört (Ettayebi und Hardy, 2003). Basierend auf den Ergebnissen von u.a. Tu *et al.* (1999) postulieren Ettayebi und Hardy (2003) das VAPA auch hier als Membranrezeptor zur Ausbildung eines stabilen Proteinkomplexes dient und an der Initiierung des Replikationskomplexes beteiligt ist. In mit dem Vesicular stomatitis virus G (VSV G) Gen transfizierten Zellen konnten Ettayebi und Hardy (2003) zeigen, dass die Komplexbildung von p48 und VAPA zum Abbruch des intrazellulären Proteintransportes führt.

Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen zeigten (s. Punkt 4.2.6, Tab. 13), dass die Bindung von VAPA an NOT über den N-Terminus, As 1-74, und das Zentrum, As 178-323, des *Full-Length* NOT Proteins erfolgt (Abb. 25A) und NOT mit dem kompletten VAPA Protein bindet (Abb. 25B). Obwohl der durch den im Y2H *Screen* isolierten Klon 6 (s. Punkt 4.1.2, Tab. 9) kodierte Proteinbereich spezifisch für die VAPA Isoform 1 (249 As) ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass potentiell auch die I2 (294 As) mit NOT bindet. Die I1 ist durch Deletion der As 140-184 im Vergleich zur I2 um 45 As kürzer. Der deletierte Bereich betrifft keine funktionellen Domänen. Auch wenn die Bindung von NOT mit VAPA mittels Ko-IP nicht bestätigt werden konnte, zeigten die WB-Analysen, dass der α -VAPA¹ AK im RH ein einziges Protein unterhalb der ~35 kDa Bande detektiert, das potentiell der I2 entspricht (s. Punkt 4.4.4.1, Abb. 19A).

Die Daten implizieren, dass die NOT-VAPA Bindung am ER stattfindet. Über die biologische Bedeutung der Bindung kann zum aktuellen Zeitpunkt allerdings keine Aussage getroffen werden. Dass NOT mit dem *Full-Length* VAPA Protein bindet könnte darauf hindeuten, dass NOT eine entscheidene Rolle bei der Reifung/Prozessierung oder auch Regulierung des Proteins spielt.

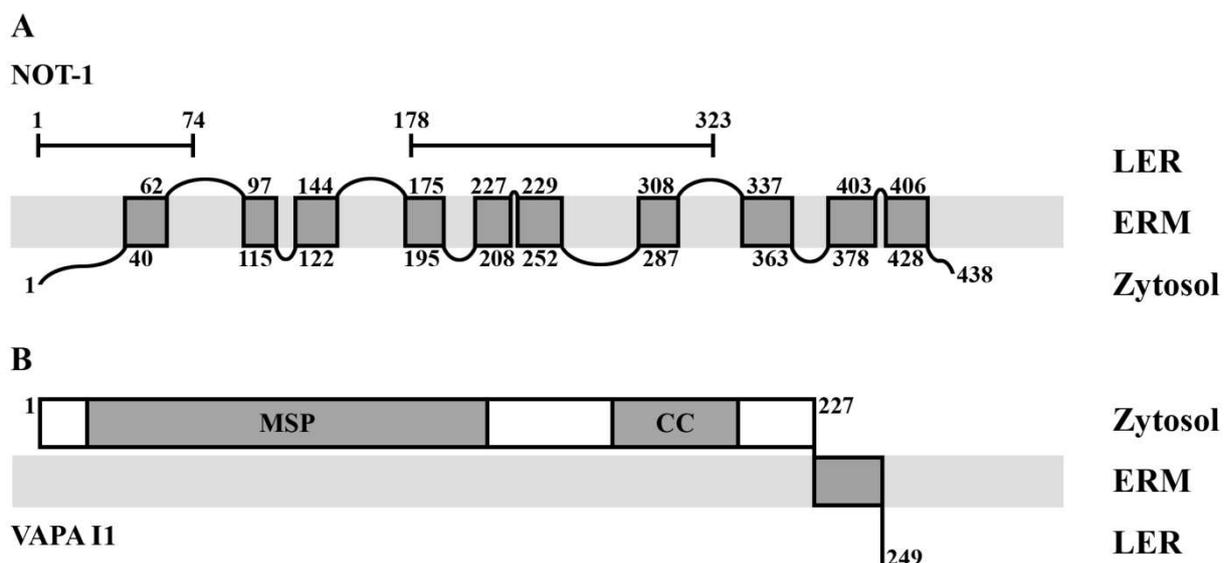


Abb. 25 Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und VAPA. **A)** Darstellung des NOT-1 Proteins mit 10 TMD nach TMpred (s. Punkt 4.3.2, Tab.19) am ER. Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen zeigten, dass die Bindung von VAPA an NOT über den N-Terminus As 1-74 und die As 178-323 des *Full-Length* NOT Proteins erfolgt. Die markierten As kennzeichnen den Beginn / das Ende der zytosolischen bzw. im Lumen des ER befindlichen Domänen (LER: Lumen ER, ERM: ER Membran) **B)** Darstellung der I1 des VAPA Proteins (NCBI Akz.: NM_194434). Der zytosolische Bereich des VAPA Proteins (As 1-227) beinhaltet zwei funktionelle Domänen, die MSP (As 14-131) und die CC (As 169-205). Den C-Terminus, As 228-248, bildet die TMD. Die Resultate des Y2H Systems zeigten, dass für die Bindung an NOT das komplette VAPA Protein benötigt wird.

5.5 SYPL1 als Interaktionspartner von NOT

Das SYPL1 Gen wurde durch die Suche nach verwandten Genen des Synaptophysin (SYP) Gens entdeckt (Leube *et al.*, 1994; Haass *et al.*, 1996). Die Proteine weisen 43%ige As-Identität auf (Brooks *et al.*, 2000). Die höchste Identität zeigen dabei die TMD von SYPL1 und SYP. Das SYPL1 Protein ist ubiquitär exprimiert und in der Membran kleiner zytoplasmatischen Transport-Vesikeln lokalisiert (Haass *et al.*, 1996; Brooks *et al.*, 2000). Durch ihre Analysen in 3T3-L1 Adipozyten konnten Brooks *et al.* (2000) zeigen, dass SYPL1 u.a. in GLUT4 Vesikeln exprimiert ist und mit VAMP2 bindet. Die Daten von Brooks *et al.* (2000) implizieren, dass SYPL1 eine Rolle bei der Regulierung der SNARE-Komplex Bildung spielt.

Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen zeigten (s. Punkt 4.2.4, Tab. 11), dass die Bindung von SYPL1 an NOT über den As-Bereich 1-323 des NOT Proteins (Abb. 26A) und die Bindung von NOT an SYPL1 über den As-Bereich 55-259 der I1 (Abb. 26B) bzw. 37-241 der I2 erfolgt. Da das SYPL1 Protein in der Membran von zytoplasmatischen Transportvesikel lokalisiert ist, dürfte die NOT-Bindedomäne auf die zytosolischen As- Bereiche 138-150 und 234-259 der I1 und 120-132 und 216-241 der I2 begrenzt sein. Interessanterweise konnten in den, mittels eines für die I1 des SYPL1 Proteins spezifischen AK, durchgeführten IPs (s. Punkt 4.4.4.3, Abb. 21C) das NOT Protein oberhalb der 35 kDa Bande (Δ) und das Protein von ~20 kDa ($\diamond\diamond$) nachgewiesen werden. Wie die Analysen zur Bestimmung des Expressionsprofils und der subzellulären Lokalisierung der NOT Proteine zeigte (s. Punkt 4.4.1, Abb. 16), stellen diese Proteine offensichtlich prozessierte Formen des *Full-Length* NOT Proteins dar, die im Zytosol als auch am ER lokalisiert sind. Da das >35 kDa Protein (Δ) durch beide NOT AK, α -NOT 1^b und α -NOT 1/4, gerichtet gegen die As 1-14 und 320-333 des *Full-Length* NOT Proteins erkannt wird, kann eine potentielle Spaltung im As-Bereich 334-438 vermutet werden (Abb. 26A). Im Fall des als C-terminales Spaltprodukt von NOT bestimmten ~20 kDa ($\diamond\diamond$) Proteins, muss eine Spaltung innerhalb

der zentralen Region erfolgen. Mittels der ELM Datenbank konnten zwei potentielle S1P Schnittstellen an den As-Positionen 229 und 266 bestimmt werden (s. Punkt 4.3.4, Tab. 29) (Abb. 26A). Die IPs aus der *Full-Length* NOT-Transfektante zeigten, dass NOT mit den beiden SYPL1 Proteinen im Bereich von 25-35 kDa (▼,▲) bindet (s. Punkt 4.4.4.3, Abb. 21D), die der II entsprechen. Den Studien von Brooks *et al.* (2000) zufolge ist das Auftreten mehrerer Banden auf differenzielle N-Glykosylierung zurückzuführen.

Die bisher wenigen Befunde zu SYPL1 implizieren, dass das Protein eine Rolle bei der Regulierung der SNARE-Komplex Bildung spielt (Brooks *et al.*, 2000). Ob die Bindung mit NOT ebenfalls im Zusammenhang mit der Ausbildung von SNARE-SNARE-Komplexen steht, muss analysiert werden. Weiter müssen die beiden NOT Proteine von >35 kDa und ~20 kDa (◇◇) in Hinsicht auf ihre subzelluläre Lokalisierung und potentielle Spaltstellen untersucht werden. Zusätzlich stellt sich die Frage, inwiefern der Grad der Glykosylierung von SYPL1 die Bindung an NOT beeinflusst. Nach Brooks *et al.* (2000) dient die differenzielle Glykosylierung von SYPL1 der zielgesteuerten Verteilung des Proteins und/oder zur Unterscheidung von Geweben.

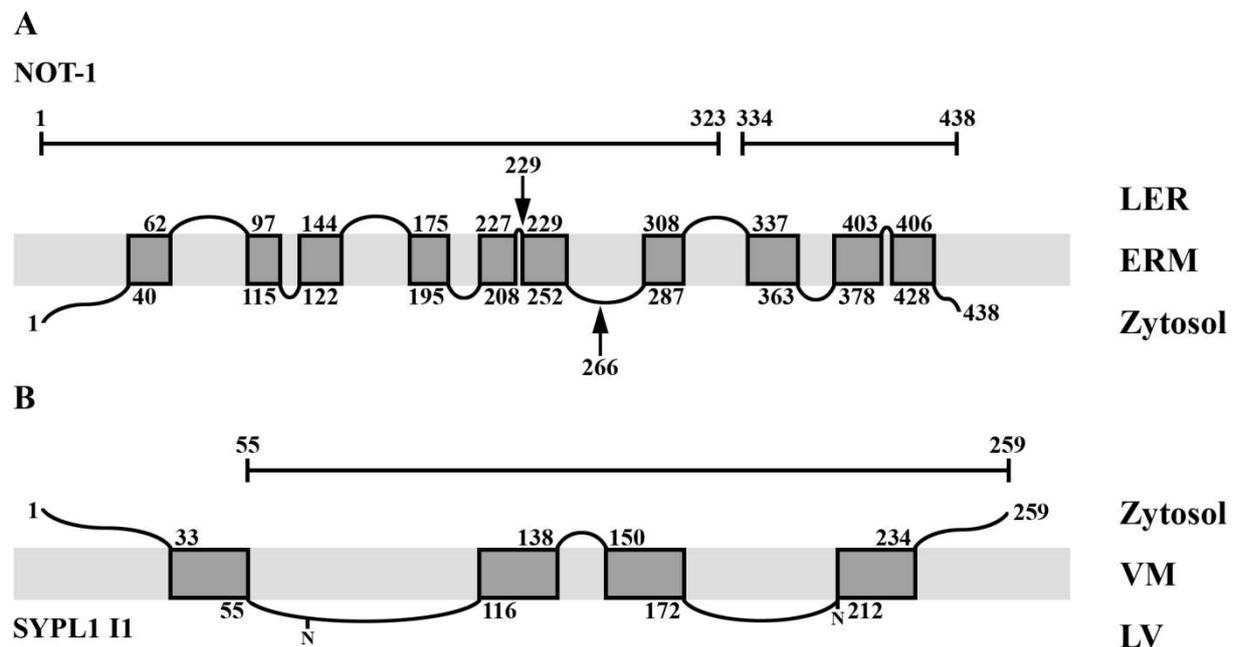


Abb. 26 Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und SYPL1. A) Darstellung des NOT-1 Proteins mit 10 TMD nach TMpred (s. Punkt 4.3.2, Tab.19) am ER. Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen in der Hefe zeigten, dass die Bindung von SYPL1 an NOT über den As-Bereich 1-323 des NOT Proteins erfolgt. Den Ergebnissen der Ko-IP Experimenten zufolge bindet SYPL1 mit denen am ER und im Zytosol lokalisierten NOT Proteinen von >35 kDa (△) und ~20 kDa (◇◇). Zur Entstehung des mittels Ko-IP identifizierten >35 kDa NOT Proteins (s. Punkt 4.4.4.3, Abb. 21C), muss die Spaltung innerhalb des As-Bereichs 334-438 stattfinden. Potentielle Spaltstellen zur Generierung des C-terminalen ~20 kDa NOT Proteins stellen der ELM Datenbank zufolge die S1P Schnittstellen an den As-Positionen 229 und 266 dar. Die markierten As kennzeichnen den Beginn /

das Ende der zytosolischen bzw. im Lumen des ER befindlichen Domänen (LER: Lumen ER, ERM: ER Membran) **B**) Darstellung der II des SYPL1 Proteins (NCBI Akz.: NM_006754). Das SYPL1 Protein ist über 4 TMD (As 34-54, 117-137, 151-171 und 213-233) in der Membran von zytoplasmatischen Transportvesikeln lokalisiert (VM). Der N- (As 1-33) und C-Terminus (234-259) des Proteins, sowie der As-Bereich 55-259 befinden sich im Zytosol. Die As-Bereiche 55-116 und 172-212 bilden die sich im Lumen der Vesikel (LV) befindlichen Domänen aus. Innerhalb der vesikulären Domänen ist je eine N-Glykosylierungsstelle (As 71^N und 212^N) lokalisiert. Mittels des Y2H Systems konnte der As-Bereich 55-259 des SYPL1 Proteins als NOT-bindende Domäne identifiziert werden.

5.6 LRP1 als Interaktionspartner von NOT

Das LRP1 Protein gehört zur LDL-Rezeptor (LDL-R)-Gen Familie (Hussain *et al.*, 1999). Neben dem Namengebenden LDL-R und LRP1 wurden fünf weitere Mitglieder, das Megalin (LRP2), der *Very Low-Density Lipoprotein Receptor 1* (VLDL-R), LRP1b, das *Multiple Epidermal Growth Factor-Like Domains 7* (MEGF7) und der Apolipoprotein E Rezeptor 2 (ApoER2) identifiziert (May *et al.*, 2007). Zunächst als 600 kDa großes Vorläufermolekül am ER synthetisiert, wird das LRP1 Protein im trans-Golgi-Kompartiment durch die Furin-Protease in eine 515 kDa α - und 85 kDa β -Untereinheit gespalten. Die beiden Untereinheiten werden nicht-kovalent miteinander verknüpft (Neels *et al.*, 1999). Die Arbeit von Bu und Rennke (1996) zeigte, dass das Rezeptor-Assoziierte Protein (RAP) durch die Bindung mit LRP1 als Chaperon an der korrekten Faltung des Proteins während der Synthese am ER beteiligt ist. Die α -Kette, die nach der Integration des LRP1 durch die TM-Domäne der β -Kette in den extrazellulären Raum exponiert wird, beinhaltet vier Liganden bindende Domänen (Cluster I-IV) (s. Punkt 4.2.5) (Neels *et al.*, 1999), für die mehr als 40 unterschiedliche Liganden, wie Proteinasen, Protease Inhibitoren, Wachstumsfaktoren, Matrixproteine und Toxine identifiziert wurden (Strickland *et al.*, 2002). Genauere Untersuchungen zeigten, dass die Mehrheit der Liganden mit den Ligandenbindungsdomänen II und IV bindet (Strickland und Ranganathan, 2003). Der zytosolische Bereich der β -Kette beinhaltet ein NPxY- und FxNPxY- Motiv für die Bindung intrazellulärer Adapter- und Gerüstproteine, sowie zwei Di-Leucin Motive und ein YxxØ Motiv die als Endozytose-Signal fungieren (Li *et al.*, 2000). In seiner Arbeit konnte van der Geer (2002) zeigen, dass die Internalisierung durch Serin- und die Bindung von Adaptorproteine durch Tyrosin-Phosphorylierung reguliert wird. Neben dem membrangebundenen LRP1 wurde durch Quinn *et al.* (1999) eine weitere, proteolytisch prozessierte LRP1-Form im Blutplasma entdeckt. Genauere Analysen zeigten, dass es sich hierbei um die extrazelluläre Domäne von LRP1 handelt, die durch Metalloproteinasen innerhalb der β -Kette dicht an der Transmembranregion abgespalten wird (Quinn *et al.*, 1999). Bedingt durch die Abspaltung

der extrazellulären Domäne wird die „Regulierte Intramembran Proteolyse“ (RIP) durch eine γ -Sekretase-ähnliche Protease eingeleitet und es kommt zur Freisetzung der intrazellulären Domäne (May *et al.*, 2002). Obwohl ubiquitär in Zellen der Leber, des zentralen Nervensystems, der Gefäßwand und der Lunge exprimiert (Moestrup *et al.*, 1992), zeigten selektive *Knockout* Studien, dass LRP1 gewebespezifische Funktionen ausübt (Lillis *et al.*, 2008). Während LRP1 in der Leber durch Endozytose am intrazellulären Abbau von Plasmaproteinen wie α_2 -Makroglobulin (α_2 M) (Willnow *et al.*, 1995), Blutgerinnungsfaktor VIII (Saenko *et al.*, 1999), Serpin-Enzym Komplexe (Kounnas *et al.*, 1996) und Chylomikronen-Resten (Remnants) (Mahley und Huang, 2007) beteiligt ist, schützt es in einer weiteren Funktion durch die Regulierung des *Platelet-derived growth factor receptor* (PDGF-R) (Boucher *et al.*, 2003), als Rezeptor für den *Transforming growth factor beta* (TGF- β) (Boucher *et al.*, 2007) oder durch Unterstützung der LDL-Oxidation die Zellen in der Gefäßwand, u.a. vor der Entstehung von Atherosklerose (Boucher *et al.*, 2003). Studien zur Funktion von LRP1 im Hirn zeigten, dass LRP1 durch die Bindung mit dem *Tissue-type Plasminogen Activator* (t-PA) an der Regulierung/Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist (Yepes *et al.*, 2003) und durch Prozessierung des β -Amyloid-Vorläuferprotein (APP), sowie dem Abbau von β -Amyloid eine entscheidene Rolle bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit spielt (Pietrzik *et al.*, 2004; Sagare *et al.*, 2007). In Bezug auf den β -Amyloid-Abbau zeigten die Resultate von Sagare *et al.* (2007), dass der Abbau nicht nur über den membrangebundenen Rezeptor, sondern primär über die von Quinn *et al.* (1999) beschriebene prozessierte Form erfolgt. Die Entdeckung des zellulären Prion-Proteins (PrP^C) als LRP1-Bindungspartner offenbarte eine weitere Funktion von LRP1. Mittels Ko-IP Experimenten aus ER Fraktionen konnten Parkyn *et al.* (2008) zeigen, dass LRP1 nicht nur an der Regulierung der PrP^C Expression durch Endozytose beteiligt ist, sondern auch an dessen intrazellulären Biosynthese und Transport. Interessanterweise erfolgt die Interaktion von LRP1 und PrP^C auch in Anwesenheit von RAP. Durch die Wechselwirkung/Bindung diverser extrazellulärer Matrixproteine spielt LRP1 ebenfalls eine Rolle bei der Modellierung des Zytoskeletts oder durch Regulierung des Auf- und Abbaus von Zellverbindungen bei der Zellmigration. Während eine direkte Bindung von LRP1 mit dem Glykoprotein Thrombospondin 1 dessen endosomalen Abbau bedingt (Godyna *et al.*, 1995), führt die Bindung im Komplex mit Calreticulin zur Aktivierung von ERK und PI3K durch die Adhesion Kinase (FAK) und die Tyrosinkinase Src und letztendlich zur Aktivierung des *Ras homolog gene family member A* (RhoA), was zur Auflösung fokaler Adhäsionen führt (Orr *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu dem durch Orr *et al.* (2003) beschriebenen positiven Effekt auf die

Zellmigration konnten Weaver *et al.* (1997) zeigen, dass die LRP1 bedingte Endozytose des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und dessen Rezeptor (uPAR) sich negativ auf die Zellmigration auswirkt. Im Kontext der uPA/uPAR Internalisierung verdeutlichten bereits die Versuche von Herz *et al.* (1992) in *Knockout*-Mäusen, dass LRP1 eine essentielle Rolle bei der Embryonalentwicklung spielt. Die Embryonen homozygoter *Knockout*-Mäuse waren nicht in der Lage in den Uterus zu implantieren und starben ab. In glatten Muskelzellen führt die Bindung von Apolipoprotein E (ApoE) an LRP1 zur Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA und zu Inhibierung der Zellmigration (Zhu und Hui, 2003). Die Studien von Salicioni *et al.* (2004) zur Rolle von LRP1 bei der Regulierung der Zelloberflächen-Expression der Intergrin β_1 -Untereinheit zeigten, dass dies nicht wie angenommen, durch rezeptorvermittelte Endozytose erfolgt, sondern LRP1 indirekt durch Adaptorproteine wie Calreticulin, Hsp90, Fe65 oder das *Integrin β_1 -binding protein 1* (ICAP-1) an der Synthese im ER und dem intrazellulären Transport beteiligt ist. Die Rolle von LRP1 bei der Regulierung perizellulärer Proteasen verbunden mit Zellmigration impliziert, dass LRP1 auch eine Rolle bei der Invasion von Krebszellen spielen könnte. Durch *Small interfering RNA* (siRNA) Experimente konnten Dedieu *et al.* (2008) zeigen, dass die Suppression der LRP1 Expression in direktem Zusammenhang mit der Invasion von Krebszellen steht. Genauere Untersuchungen durch Langlois *et al.* (2010) zeigten schließlich, dass LRP1 durch Aktivierung des ERK-Signalweges und Repression des JKN-Signalweges an der Regulierung der Auflösung fokaler Adhäsionen und der damit verbundenen Invasion maligner Zellen beteiligt ist. Durch die Eigenschaft der rezeptorvermittelten Endozytose spielt das LRP1 Protein eine weitere Rolle beim postprandialen Stoffwechsel von Triacylglycerinen (Chappell *et al.*, 1993) und bei der Immunantwort (Lillis *et al.*, 2008). In Bezug auf die Rolle bei der angeborenen Immunantwort zeigten gleich mehrere Arbeiten, dass LRP1 durch die Calreticulin vermittelte Bindung mit diversen Collectinen wie der Komplementkomponente C1q, dem Mannose-bindende Lektin (MBL) (Ogden *et al.*, 2001) oder den Oberflächen-aktiven Proteine A und D der Lunge (*Surfactant protein A / D*) (Gardai *et al.*, 2003) an der Induktion der Phagozytose beteiligt ist. In diesem Kontext konnten Su *et al.* (2002) zuerst in *C. elegans* und dann beim Menschen zeigen, dass der Prozess der Phagozytose offensichtlich über den zytosolischen Bereich von LRP1, durch die Bindung des Adaptorproteins *Engulfment Adaptor PTB Domain Containing 1* (GULP) eingeleitet wird. Der Nachweis der Bindung mit dem *Myelin basic protein* (MBP) wiederum zeigte, dass LRP1 als essentieller Rezeptor verantwortlich für den Abbau von Myelin-Resten ist und somit ein potentieller Regulator bei der Entwicklung bzw. dem Fortschreiten von Multipler Sklerose (MS) darstellt (Gaultier *et al.*, 2009). Weitere

Studien zur Rolle von LRP1 bei der Immunantwort zeigten, dass LRP1 durch die gezielte Aufnahme von Antigenen durch α_2 M- (Chu und Pizzo, 1993) oder HSP-Antigenkomplexe (Binder und Srivastava, 2004) eine wichtige Funktion bei der Antigenpräsentation zukommt. Im Kontext der Rolle von LRP1 bei der Regulierung von Entzündungsreaktionen konnten Zurhove *et al.* (2008) zeigen, dass LRP1 im Zellkern mit dem Interferon Regulatory Factor 3 (IRF-3) bindet und somit die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen unterdrückt. Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen von LRP1 und NOT (s. Punkt 4.2.5, Tab.12B) zeigten, dass LRP1 an die As 74-177 des NOT Proteins bindet (Abb. 27A). Die Bindung von NOT an LRP1 erfolgt über die extrazelluläre Domäne, As 4280-4419 (Abb. 29B). In den mit dem α -LRP1 AK (Abcam, ab92544) durchgeführten IPs konnte das am ER und im Zytosol lokalisiert NOT Protein von \sim 42 kDa (\blacklozenge) nachgewiesen werden (s. Punkt 4.4.4.3, Abb. 21E). Da das \sim 42 kDa Protein wie bereits in Punkt 5.3 beschrieben offensichtlich eine prozessierte Form des *Full-Length* NOT Proteins darstellt und von beiden NOT AK, α -NOT 1/4 und α -NOT 1^b, erkannt wird (s. Punkt 4.4.1, Abb. 16), muss eine potentielle Spaltung im As-Bereich 334-438 stattfinden (Abb. 27A).

Die Analysen zu LRP1 zeigten, dass das reife LRP1 Protein nach vollendeter Prozessierung am Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert wird und dort als Oberflächenrezeptor fungiert. Die Tatsache, dass NOT an die extrazelluläre Domäne von LRP1 bindet impliziert daher eine Bindung mit dem unreifen LRP1-Vorläufermolekül. Ob NOT womöglich in ähnlicher Funktion wie RAP (Bu und Rennke, 1996), als Chaperon an der korrekten Faltung und Synthese des 600 kDa großen LRP1-Vorläufermoleküls beteiligt ist muss analysiert werden. Im Fokus zukünftiger Analysen steht daher besonders das \sim 42 kDa (\blacklozenge) NOT Protein, dass sowohl im Zytosol als auch am ER lokalisiert ist. Eine Interaktion am ER würde die Chaperon-Theorie stützen.

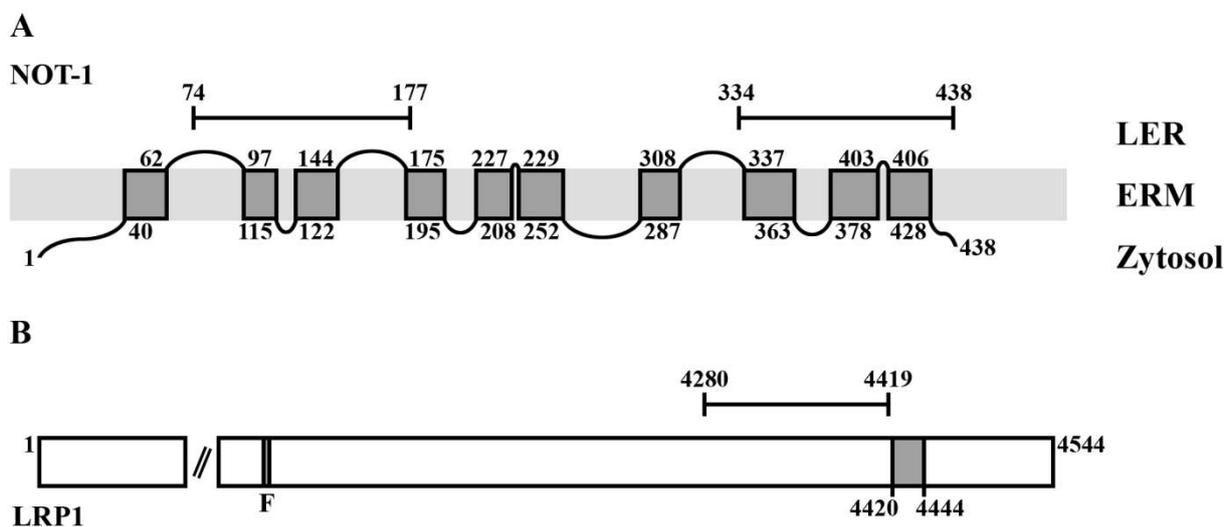


Abb. 27 Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und LRP1. **A)** Darstellung des NOT-1 Proteins mit 10 TMD nach TMpred (s. Punkt 4.3.2, Tab.19) am ER. Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen in der Hefe zeigten, dass die Bindung von LRP1 an NOT über den As-Bereich 74-177 des NOT Proteins erfolgt. Den Ergebnissen der Ko-IP Experimenten zufolge bindet LRP1 mit dem am ER und im Zytosol lokalisiertem ~42 kDa NOT Protein. Da das ~42 kDa Protein von beiden NOT AK (α -NOT 1^b und α -NOT 1/4) erkannt wird, muss die Spaltung des *Full-Length* NOT Proteins innerhalb des As-Bereichs 334-438 erfolgen. (LER: Lumen ER, ERM: ER Membran) **B)** Darstellung des *Full-Length* LRP1 Proteins (NCBI Akz.: NM_002332). Das LRP1 Protein besteht aus einer großen extrazellulären- (As 1-4419), einer TM- (As 4420-4444) und einer zytosolischen Domäne (As 4445-4544). Nach der Synthese am ER wird das 600 kDa großes Vorläufermolekül am Golgi-Apparat durch das Enzym Furin-Protease (F) an der As-Position 3940-3943 in eine 515 kDa α - und 85 kDa β -Untereinheit gespalten. Mit Hilfe des Y2H Systems konnte der As-Bereich 4280-4419 des LRP1 Proteins als NOT bindende Domäne identifiziert werden.

5.7 FKBP8 als potentieller Interaktionspartner von NOT

Die FKBP Proteine sind gemeinsam mit den Proteinen der Cyclophilin-Familie durch die Bindung der Immunsuppressiva FK506, Rapamycin und Cyclosporin A (Cyclophiline) zur Gruppe der Immunophilinen zusammengefasst (Fruman *et al.*, 1994). Aufgrund ihrer zusätzlichen Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase (PPIase) Aktivität wird den Immunophilinen eine Rolle bei der Proteinfaltung sowie der Immunsuppression zugeschrieben (Fruman *et al.*, 1994). Bisher wurden insgesamt 15 humane FKBP8s identifiziert, die sich jedoch aufgrund ihrer Anzahl an PPIase-Domänen (FKBP-Domänen) und durch Ergänzung weiterer funktioneller Domänen sowie Sequenzmotive in ihrer Funktion und Struktur unterscheiden (Somarelli *et al.*, 2008). Mittels des Y2H Systems konnte das FKBP8 Protein als NOT Bindungspartner identifiziert werden. Zunächst durch die Bindung der pro-apoptischen Proteine *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) und *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL) als Negativregulator der Apoptose identifiziert (Shirane und Nakayama, 2002), zeigten weiterführende Studien, dass das FKBP8 Protein ein zentrales Molekül des Bcl-2-regulierten intrinsischen Apoptoseweges (Elmore, 2007) darstellt und einer komplexen Regulierung unterliegt. So konnten Edlich *et al.* (2005) in ihrer Arbeit zeigen, dass FKBP8 durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit CaM bindet und die dadurch hervorgerufene Konformationsänderung von FKBP8 zur Aktivierung der PPIase Aktivität führt. Entgegen der von Shirane und Nakayama (2002) postulierten Funktion als Negativregulator der Apoptose führt die durch Ca^{2+} und CaM induzierte Aktivierung von FKBP8 zu einer erhöhten Bindung von Bcl-2 und Bcl-xL Domäne und Induktion der Apoptose. Im Kontext ihrer Analysen konnten Edlich *et al.* (2007) das Hsp90 Protein als weiteren Bindungspartner und Regulator von FKBP8 identifizieren. Durch die Bindung von Hsp90 mit dem FKBP8/ Ca^{2+} /CaM Komplex kommt es zur Inaktivierung der PPIase Aktivität von FKBP8 und zur Blockierung der Bindung mit Bcl-2. Unabhängig von Ca^{2+} /CaM wurde

ein weiterer Regulator der FKBP8/Bcl-2 Interaktion, das GTP-bindende Protein *Ras homologue enriched in Brain* (Rheb) identifiziert und gezeigt, dass FKBP8 mit den Proteinen mTOR, *Target of rapamycin complex subunit LST8* (MLST8) und *Regulatory associated protein of mTOR* (Raptor) des mTORC1 Komplexes bindet (Bai *et al.*, 2007). Eine zusätzliche Negativregulation von FKBP8 erfolgt durch die Bindung mit den Presenilinen-1 und 2 (Wang *et al.*, 2005). In ihrer Arbeit konnten Wang *et al.* (2005) zeigen, dass die Interaktion mit PS-1/2 einen γ -Sekretase unabhängigen Abbau von FKBP8 und Bcl-2 sowie eine Anreicherung dieser Proteine am ER / Golgi-Apparat bedingt. Durch den Nachweis der Bindung von FKBP8 mit dem K_v11.1 Protein, das durch das *human Ether-à-go-go-Related Gene* (hERG) auch KCNH2 Gen genannt (Vandenberg *et al.*, 2012) kodiert wird, konnten Walker *et al.* (2007) zeigen, dass FKBP8 in einer weiteren Funktion als Ko-Chaperon u.a. zusammen mit dem *Heat shock cognate protein* (Hsc70) und Hsp90 an der Faltung, der ER-Freisetzung und dem Transport von hERG beteiligt ist. Mutationen des KCNH2 Gens stehen im Zusammenhang einer häufig auftretenden Form des Long-QT-Syndroms (LQT2) (Walker *et al.*, 2007). In Versuchen mit der LQT2 Mutante F805C konnten Walker *et al.* (2007) zeigen, dass eine Überexpression von FKBP8 den Transport der hERG-Mutante unterbindet. Die Überexpression von FKBP8 hatte jedoch keinen Einfluss auf das Wt-hERG. Weitere Arbeiten zeigten, dass FKBP8 zusammen mit PI3K an der Tuberösen Sklerose (TSC) abhängigen Regulierung der Zellgröße beteiligt ist (Rosner *et al.*, 2003) oder durch die Bindung der S4 Untereinheit des 19S Proteasomes für die Verankerung des 26S Proteasomes an der Mitochondrienmembran (Nakagawa *et al.*, 2007). Nakagawa *et al.* postulieren, dass FKBP38 nicht nur für die Lokalisierung des 26S Proteasomes verantwortlich ist, sondern auch eine Rolle bei der Regulierung der Aktivität der 20S Untereinheit und somit auch beim Proteinabbau spielt. Im Kontext ihrer Analysen zur Regulierung des *Prolyl hydroxylase domain-containing protein 2* (PHD2) konnten Barth *et al.* (2007) mittels eines Y2H Screens FKBP8 als Bindungspartner von PHD2 identifizieren. Die Ergebnisse von Barth *et al.* (2007) zeigen, dass FKBP8 unabhängig von seiner PPIase Aktivität an der Proteinregulierung von PHB2 beteiligt ist. Ähnlich wie VAPA (s. Punkt 5.4) ist auch das FKBP8 Protein durch die Bindung des HCV-Proteins NS5A an der Regulierung der Virusreplikation beteiligt (Okamoto *et al.*, 2006). Mittels Ko-IP Experimenten konnten Okamoto *et al.* (2006) zeigen, dass FKBP8 ebenfalls mit Hsp90 bindet und zusammen mit NS5A einen multimeren Komplex ausbildet. Da keine direkte Bindung von Hsp90 mit dem NS5A Protein nachgewiesen werden konnte, postulieren Okamoto *et al.* (2006), dass FKBP8 als Ko-Chaperon für Hsp90 zur Regulierung der HCV-Replikation dient.

Zuvor als Bindungspartner des Proteins Protrudin entdeckt (Shirane und Nakayama, 2006), konnten Shirane *et al.* (2008) zeigen, dass abnormales Wachstum von Nervenfasern des Neuralrohres in Maus FKBP8 Null-Mutanten mit einer Hyperphosphorylierung von Protrudin einhergeht. Shirane *et al.* (2008) gehen daher davon aus, dass FKBP8 an der Regulierung der Funktion von Protrudin im Kontext der neuronalen Differenzierung und Neuriten-Wachstum durch Inhibition der Phosphorylierung von Protrudin beteiligt ist. Bereits die Arbeit von Bulgakov *et al.* (2004) mit Maus FKBP8 Null-Mutanten zeigte, dass FKBP8 ein Negativregulator des Maus Hedgehog-Signalweges in neuronalen Geweben ist. Der FKBP8 *Knockout* führte zu einer ektopischen Expression des Sonic hedgehog Proteins und einer Liganden unabhängigen Aktivierung des Hedgehog-Signalweges verbunden mit einer gestörten Entwicklung der Zellen des posterioren Neuralrohrs sowie einer fehlenden Entwicklung der Augen (Bulgakov *et al.*, 2004).

Die Resultate zur Kartierung der Bindungsdomänen zeigten (s. Punkt 4.2.7, Tab. 14), dass FKBP8 mit dem kompletten NOT Protein bindet (Abb. 28A) und die Bindung von NOT an FKBP8 über dessen N-Terminus, As 1-92, erfolgt. (Abb. 28B). Auch wenn der im Y2H *Screen* isolierte Klon 233 (s. Punkt 4.1.2, Tab. 9) für die As 1-250 der I2 kodiert, kann aufgrund des Kartierungsergebnisses nicht ausgeschlossen werden, dass die Isoformen 1 und 3 auch mit NOT binden. In Bezug auf die Expression der Isoformen zeigte sich, dass sich die entdeckte I38 (Lam *et al.*, 1995) durch einen verkürzten ORF von der I2 (As 1-57) (Nielsen *et al.*, 2004) unterscheidet. Während sich die I1 nur durch Deletion der As 184 zur I2 unterscheidet, sind in der I3 die Exone 3, 4 und 5 (As 98-257) deletiert (Chen *et al.*, 2008). In ihren Experimenten konnten Chan *et al.* (2008) zeigen, dass die I3 ebenfalls an den Mitochondrien lokalisiert ist und mit Bcl-xL bindet. Obwohl die α -FKBP8 AK für IP-Experimente ungeeignet waren, konnte in den WB-Analysen experimentell die Existenz eines Proteins das potentiell der I1 od. I2 des FKBP8 Proteins entspricht und die der I38 bestätigt werden (s. Punkt 4.4.4.1., Abb. 19). Interessanterweise wird in der Literatur ausschließlich auf die in Punkt 4.2.7 beschriebene Isoform 2, bestehend aus 413 As, Bezug genommen. Ein Protein, das potentiell der Isoform 3 entspricht, konnte in den untersuchten Zelllinien nicht nachgewiesen werden. In Bezug auf die Rolle der Funktion der NOT/FKBP8 Bindung stellen die Resultate einen durchaus interessanten Aspekt dar. Während die meisten Liganden direkt mit der PPIase-Domäne binden oder über die TPR-Domänen und/oder CaM-Bindungsdomäne auf diese Einfluss nehmen, scheint die NOT/FKBP8 Interaktion, ähnlich wie für die Bindung von FKBP8 mit PHD2 beschrieben (Barth *et al.*, 2007), unabhängig von seiner PPIase Aktivität zu sein. Offensichtlich steht die NOT/FKBP8-Interaktion nicht im Kontext der Bcl-2

regulierten Apoptose. Welche zelluläre Bedeutung die NOT/FKBP8 Interaktion hat, werden zukünftige Analysen zeigen

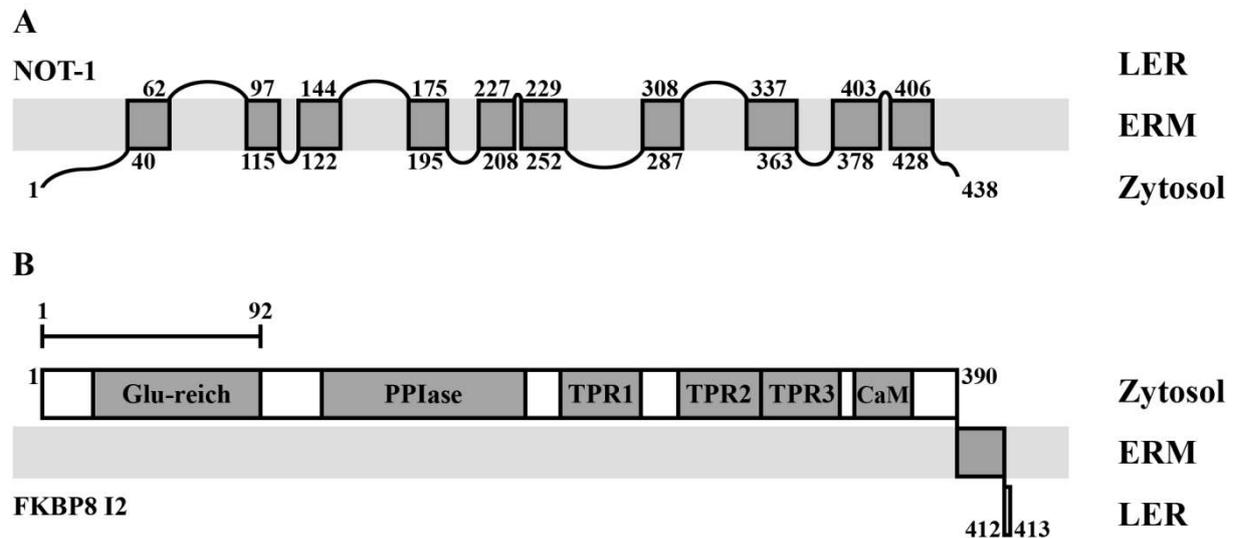


Abb. 28 Schematische Darstellung der Interaktion von NOT und FKBP8. **A)** Darstellung des NOT-1 Proteins mit 10 TMD nach TMpred (s. Punkt 4.3.2, Tab.19) am ER. Die Resultate des Y2H Systems zeigten, dass für die Bindung von FKBP8 an NOT das komplette NOT Protein benötigt wird. Die markierten As kennzeichnen den Beginn / das Ende der zytosolischen bzw. im Lumen des ER befindlichen Domänen (LER: Lumen ER, ERM: ER Membran) **B)** Darstellung der I2 des FKBP8 Proteins (NCBI Akz.: NM_012181) am ER. Innerhalb der zytosomatischen Domäne (As 1-390) des FKBP8 Proteins ist eine Glu-reiche Region (As 22-92), eine PPlase Domäne (As 120-205), drei TPR Domänen (As 222-255, 273-306 und 307-340) und eine CaM-Bindungsdomäne (As 348-371) (Shirane und Nakayama, 2002) lokalisiert. Die TMD (As 391-411) bildet den C-Terminus. Den Resultaten des Y2H Systems zufolge findet die Bindung an NOT über den N-Terminus, As 1-92, des FKBP8 Proteins statt.

Die Literaturrecherche zu OSBP (s. Punkt 5.3), VAPA (s. Punkt 5.4) und FKBP8 (s. Punkt 5.7) hat gezeigt, dass alle drei Proteine mit dem HCV-Protein NS5A, welches zusammen mit den nicht-strukturellen Proteinen 2 (NS2), 3 (NS3), 4A (NS4A), 4B (NS4B) und 5B (NS5B) primär an der HCV-Replikation beteiligt ist (Dimitrova *et al.*, 2003), binden. Aufgrund dieses durchaus interessanten Aspektes, kommt daher die Idee auf, ob NOT nicht eventuell ebenfalls eine, noch unbekannte, Komponente in der HCV-Replikationsmaschinerie darstellt.

Eine Analyse der publizierten Daten allerdings zeigt, dass die drei NOT-Liganden im Kontext der HCV-Replikation unterschiedliche Funktionen ausüben und die Interaktionen mit dem NS5A Protein in verschiedenen Zellkompartimenten, dem ER, Golgi-Apparat und membranösem Netz, erfolgen.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen essentiellen Beitrag zur Aufklärung der zellulären Funktionen der durch das humane *not*-Gen kodierten Proteine zu erbringen. Obwohl das *not*-Gen für 17 Spleißformen kodiert, zeigten die Studien, dass nur die Transkript-Variante-1 und -4 translatiert werden. Der Nachweis, der durch diese Varianten kodierten Proteine zeigte, dass das *Full-Length* NOT-1 Protein primär am ER und das *Full-Length* NOT-4 Protein im Zytosol lokalisiert ist. Eine wichtige Erkenntnis ist, dass sowohl das NOT-1- als auch das NOT-4 Protein prozessiert werden. Im Fall von NOT-1 sind die Spaltprodukte nicht nur am ER, sondern auch im Zytosol und im Zellkern lokalisiert. Ausführliche bioinformatische Analysen zur Charakterisierung des NOT-1 Proteins erlaubten erste grundlegende Informationen über die Struktur, die Anzahl und Position der potentiellen Transmembrandomänen, das Vorhandensein von Schnittstellen und hochkonservierten Sequenzmotiven, die mit bestimmten Funktionen assoziiert sind, zu gewinnen. Anhand dieser Daten wurde ein 2D-Modell entwickelt wonach das NOT-1 Protein am ER lokalisiert ist und aus 10 TMD besteht. Innerhalb der NOT-1 Sequenz konnten mehrere potentielle NRD-, PCSK1/2-, S1P-, PCSK7-Schnittstellen und u.a. zwei Kern-Lokalisierungs-Signale identifiziert werden. Die Proteinmuster deuten darauf hin, dass zumindest zwei S1P-Schnittstellen aktiv sind.

Mittels der Hefe Zwei-Hybrid Technik wurden 17 potentielle molekulare Partner - Synaptophysin-Like 1 (SYPL1), Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1), VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein)-Associated Protein A, 33kDa (VAPA), Sushi Repeat-Containing Protein, X-Linked (SRPX), FK506 Binding Protein 8, 38kDa (FKBP8), Guanylate-Binding Protein 1, Interferon-Inducible (GBP1), Heme Oxygenase 2 (HMOX2), BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa Interacting Protein 3 (BNIP3), Oxysterol Binding Protein (OSBP), Oxysterol Binding Protein-Like 9 (OSBPL9), CD74 Molecule, Major Histocompatibility Complex, Class II Invariant Chain (CD74), Smoothelin (SMTN), SEC16 Homolog B (*S. cerevisiae*) (SEC16B), NDRG Family Member 2 (NDRG2), Inverted Formin, FH2 and WH2 Domain Containing (INF2), Mitochondrially Encoded Cytochrome c Oxidase III (MT-CO3), cAMP Responsive Element Binding Protein 3 (CREB3) - des NOT-1 Proteins identifiziert. Für die isolierten Liganden SYPL1, LRP1, VAPA, FKBP8, OSBP, OSBPL9 und CREB3 wurden die Interaktionsdomänen kartiert. Im Fall von SYPL1, LRP1, OSBP, OSBPL9 und CREB3 wurde die Interaktion *in vivo* bestätigt. Während das CREB3 Protein mit dem *Full-Length* NOT-1 Protein am ER bindet, interagieren SYPL1, LRP1, OSBP und OSBPL9 mit denen am ER und im Zytosol lokalisierten prozessierten NOT

Formen. Die Involvierung der Liganden in eine Vielzahl von biologischen Prozessen zeigt, dass das NOT Protein ein multifunktionales Protein darstellt.

Die künftige Aufgabe wird daher die Ermittlung der spezifischen zellulären Funktionen der detektierten NOT Proteine umfassen. Im Kontext der identifizierten Interaktionen wird die Aufklärung der Bedeutung der NOT-Interaktion für die Funktion des jeweiligen Liganden den Schwerpunkt der Analysen darstellen.

7. Literaturverzeichnis

Abel, T. and Maniatis, T. (1989) Action of leucine zippers. *Nature*, **341**, 24-25.

Aebi, M., Gassenhuber, J., Domdey, H., Heesen, S. (1996) Cloning and characterization of the *ALG3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology*, **6**, 439-444.

Alexander, J., Lim, D., Joughin, B.A., Hegemann, B., Hutchins, J.R., Ehrenberger, T., Ivins, F., Sessa, F., Hudecz, O., Nigg, E.A., Fry, A.M., Musacchio, A., Stukenberg, P.T., Mechtler, K., Peters, J.-M., Smerdon, S.J. and Yaffe, M.B. (2011) Spatial exclusivity combined with positive and negative selection of phosphorylation motifs is the basis for context-dependent mitotic signaling. *Sci. Signal*, **4**, ra42.

Amako, Y., Sarkeshik, A., Hotta, H., Yates III, J. and Siddiqui, A. (2009) Role of oxysterol binding protein in hepatitis c virus infection. *J. Virol.*, **83**, 9237-9246.

Ampe, C., Ball, L.J., Bedford, M.T., Cesareni, G., Gimona, M., Hurley, J.H., Jarchau, T., Lehto, V.P., Lemmon, M.A., Linding, R., Mayer, B.J., Nagai, M., Sudol, M., Walter, U. and Winder, S.J. (2002) Normalization of nomenclature for peptide motifs as ligands of modular protein domains. *FEBS Lett.*, **513**, 141-144.

Audas, T.E., Li, Y., Liang, G. and Lu, R. (2008) A novel protein, Luman/CREB3 recruitment factor, inhibits Luman activation of the unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 3952-3966.

Bai, X., Ma, D., Liu, A., Shen, X., Wang, Q.J., Liu, Y. and Jiang, Y. (2007) Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science*, **318**, 977-980.

Bangham, J. A. (1988) Data-sieving hydrophobicity plots. *Anal. Biochem.*, **174**, 142-145.

Bardwell, L. (2006) Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 837-841.

Bartel, P. L., Chien, C.-T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In: Cellular Interactions in Development: A Practical Approach. Hartley, D.A. (ed.), Oxford University Press, Oxford pp. 153-179.

Barth, S., Nesper, J., Hasgall, P.A., Wirthner, R., Nytko, K.J., Edlich, F., Katschinski, D.M., Stiehl, D.P., Wenger, R.H. and Camenisch, G. (2007) The peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase FKBP38 determines hypoxia-inducible transcription factor prolyl-4-hydroxylase PHD2 protein stability. *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 3758-3768.

Bein, K and Simons, M. (2000) Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 32167-32173.

Bernsel, A., Viklund, H., Hennerdal, A. and Elofsson, A. (2009) TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucl. Acids Res.*, **37**, W465-W468.

Binder, R.J. and Srivastava, P.K. (2004) Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 6128-6133.

Birgisdottir, Å.B., Lamark, T. and Johansen, T. (2013) The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J. Cell. Sci.*, **126**, 3237-3247.

Blais, V., Fugere, M., Denault, JB., Klarskov, K., Day, R., Leduc, R. (2002) Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS Lett.*, **524**: 43-48.

Blot, G., Lopez-Vergès, S., Treand, C., Kubat, N.J., Delcroix-Genête, D., Emiliani, S., Benarous, R. And Berlioz-Torrent, C. (2006) Luman, a New Partner of HIV-1 TMgp41, Interferes with Tat-mediated Transcription of the HIV-1 LTR. *J. Mol. Biol.*, **364**, 1034-1047.

Blumenberg, B., MacKrell, A.J. and Fessler, J.H. (1988) *Drosophila* basement membrane Procollagen a1(IV). *J. Biol. Chem.*, **263**, 18328-18337.

Bonifacino, J.S. (2014) Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J. Cell Biol.*, **204**, 7-17.

Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W.-P., Anderson, R.G. and Herz, J. (2003) LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science*, **300**, 329-332.

Boucher, P., Li, W.-P., Matz, R.L., Takayama, Y., Auwerx, J., Anderson, R.G. and Herz, J. (2007) LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome. *PLoS One*, **2**, e448.

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

Brooks, C.C., Scherer, P.E., Cleveland, K., Whittemore, J.L., Lodish, H.F. and Cheatham, B. (2000) Pantophysin Is a Phosphoprotein Component of Adipocyte Transport Vesicles and Associates with GLUT4-containing Vesicles. *JBC*, **275**, 2029-2036.

Bu, G. and Rennke, S. (1996) Receptor-associated protein is a folding chaperone for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.*, **271**, 22218-22224.

Bulgakov, O.V., Eggenschwiler, J.T., Hong, D.-H., Anderson, K.V. and Li, T. (2004) FKBP8 is a negative regulator of mouse sonic hedgehog signaling in neural tissues. *Development*, **131**, 2149-2159.

Burbelo, P.D., Gabriel, G.C., Kibbey, M.C., Yamada, Y., Kleinman, H.K. and Weeks, B.S. (1994) LZIP-1 and LZIP-2: two novel members of the bZIP family. *Gene*, **139**, 241-245.

Canamasas, I., Debes, A., Natali, P.G. and Kurzik-Dumke, U. (2003) Understanding human cancer using *Drosophila*: Tid47, a cytosolic product of the *dnaJ*-like tumor suppressor gene *l(2)tid*, is a novel molecular partner of Patched related to skin cancer. *JBC*, **278**, 30952-30960.

Cao, B., Porollo, A., Adamczak, R., Jarrell, M. and Meller, J. (2006) Enhanced recognition of protein transmembrane domains with prediction-based structural profiles. *Bioinformatics*, **22**, 303-309.

Chappell, D.A., Fry, G.L., Waknitz, M.A., Muhonen, L.E., Pladet, M.W., Iverius, P.-H. and Strickland, D.K. (1993) Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in vitro. A process facilitated by cell-surface proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14168-14175.

Chen, Y.A. and Scheller, R.H. (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 98-106.

Chen, Y., Sternberg, P. and Cai, J. (2008) Characterization of a Bcl-XL-interacting protein FKBP8 and its splice variant in human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 1721-1727.

Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. And Fields, S. (1991) The two-hybrid-system: A method to identify and clone genes für proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **88**, 9578-9582.

Chu, C.T. and Pizzo, S.V. (1993) Receptor-mediated antigen delivery into macrophages. Complexing antigen to alpha 2-macroglobulin enhances presentation to T cells. *J. Immunol.*, **150**, 48-58.

Colombo, S.L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., Carcamo, S., Kovacs, I., Tudzarova, S. and Moncada, S. (2011) Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 21069-21074.

Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**, 33-38.

Dedieu, S., Langlois, B., Devy, J., Sid, B., Henriet, P., Sartelet, H., Bellon, G., Emonard, H. and Martiny, L. (2008) LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 2980-2995.

Den Boer, L.M., Hardy-Smith, P.W., Hogan, M.R., Cockram, G.P., Audas, T.E. and Lu, R. (2005) Luman is capable of binding and activating transcription from the unfolded protein response element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 113-119.

Denecke, J., Kranz, C., Kemming, D., Koch, H.-G. and Marquardt, T. (2004) An activated 5-prime cryptic splice site in the human ALG3 gene generates a premature termination codon insensitive to nonsense-mediated mRNA decay in a new case of congenital disorder of glycosylation type Id (CDG-Id). *Hum. Mutat.*, **23**, 477-486.

Denecke, J., Kranz, C., von Kleist-Rezow, J. C., Bosse, K., Herkenrath, P., Debus, O., Harms, E. and Marquardt, T. (2005) Congenital disorder of glycosylation type Id: clinical phenotype, molecular analysis, prenatal diagnosis, and glycosylation of fetal proteins. *Pediat. Res.*, **58**, 248-253.

Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M.P. and Schuster, C. (2003) Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.*, **77**, 5401-5414.

Döring, M. (2012) Generierung von Vektoren zur kontrollierbaren transienten Expression und Abschaltung des humanen *not* Gens. Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg Universität Mainz.

Dupre-Crochet, S., Figueroa, A., Hogan, C., Ferber, E.C., Bialucha, C.U., Adams, J., Richardson, E.C. and Fujita, Y. (2007) Casein kinase 1 is a novel negative regulator of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 3804-3816.

Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. and Elledge, S.J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Devel.*, **7**, 555-569.

Edlich, F., Weiwad, M., Erdmann, F., Fanghänel, J., Jarczowski, F., Rahfeld, J.-U. and Fischer, G. (2005) Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca²⁺/calmodulin. *EMBO J.*, **24**, 2688-2699.

Edlich, F., Erdmann, F., Jarczowski, F., Moutty, M.-C., Weiwad, M. and Fischer, G. (2007) The Bcl-2 regulator FKBP38-calmodulin-Ca²⁺ is inhibited by Hsp90. *J. Biol. Chem.*, **282**, 15341-15348.

Eleveld-Trancikova, D., Sanecka, A., van Hout-Kuijper, M.A., Looman, M.W.G., Hendriks, I.A.M., Jansen, B.J.H., Adema, G.J. (2010) DC-STAMP interacts with ER-resident transcription factor LUMAN which becomes activated during DC maturation. *Mol. Immun.*, **47**, 1963-1973.

Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, **35**, 495-516.

Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-879.

Ettayebi, K. and Hardy, M.E. (2003) Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J. Virol.*, **77**, 11790-11797.

Fariselli, P., Finocchiaro, G. and Casadio, R. (2003) SPEPlip: the detection of signal peptide and lipoprotein cleavage sites. *Bioinformatics*, **19**, 2498-2499.

Fields, S., Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.

Foster, L.J., Weir, M.L., Lim, D.Y., Liu, Z., Trimble, W.S. and Klip, A. (2000) A Functional Role for VAP-33 in Insulin-Stimulated GLUT4 Traffic. *Traffic*, **1**, 512-521.

Frank, K. and Sippl, M.J. (2008) High-performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques. *Bioinformatics*, **24**, 2172-2176.

Freiman, R.N. and Herr, W. (1997) Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. *Genes Dev.*, **11**, 3122-3127.

Fruman, D.A., Burakoff, S.J. and Bierer, B.E. (1994) Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J.*, **8**, 391-400.

Furuita, K., Jee, J., Fukada, H., Mishima, M. and Kojima, C. (2010) Electrostatic interaction between oxysterol-binding protein and VAMP-associated protein A revealed by NMR and mutagenesis studies. *J. Biol. Chem.*, **285**, 12961-12970.

Gao, L., Aizaki, H., He, J.-W. and Lai, M.M.C. (2004) Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J. Virol.*, **78**, 3480-3488.

Gardai, S.J., Xiao, Y.-Q., Dickinson, M., Nick, J.A., Voelker, D.R., Greene, K.E. and Henson, P.M. (2003) By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell.*, **115**, 13-23.

Garg, P., Sharma, V., Chaudhari, P., Roy, N. (2009) SubCellProt: predicting protein subcellular localization using machine learning approaches. *In Silico Biol.*, **9**, 35-44.

Gaultier, A., Wu, X., Le Moan, N., Takimoto, S., Mukandala, G., Akassoglou, K., Campana, W.M. and Gonias, S.L. (2009) Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is an essential receptor for myelin phagocytosis. *J. Cell. Sci.*, **122**, 1155-1162.

Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1425.

Glover, J.N., Williams, R.S. and Lee, M.S. (2004) Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 579-585.

Godyna, S., Liau, G., Popa, I., Stefansson, S. and Argraves, W.S. (1995) Identification of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) as an endocytic receptor for thrombospondin-1. *J. Cell Biol.*, **129**, 1403-1410.

Gomi, M., Sonoyama, M., and Mitaku, S. (2004) High performance system for signal peptide prediction: SOSUisignal. *Chem.-Bio. Info. J.*, **4**, 142-147.

Gong, Y., Lee, J.N., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Ye, J. (2006) Juxtamembranous aspartic acid in Insig-1 and Insig-2 is required for cholesterol homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 6154-6159.

Greenaway, J., Lawler, J., Moorehead, R., Bornstein, P., Lamarre, J. and Petrik, J. (2007) Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J. Cell Physiol.*, **210**, 807-818.

Grigoriu, S., Bond, R., Cossio, P., Chen, J.A., Ly, N., Hummer, G., Page, R., Cyert, M.S. and Peti, W. (2013) The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin. *PLoS Biol.*, **11**, e1001492.

Haass, N.K., Kartenbeck, J. and Leube, R.E. (1996) Pantophysin is a ubiquitously expressed synaptophysin homologue and defines constitutive transport vesicles. *J. Cell Biol.*, **134**, 731-746.

Häcker, U., Nybakken, K. and Perrimon, N. (2005) Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **6**, 530-541.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.

Haze, K., Okada, T., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. and Mori, K. (2001) Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activation transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.*, **355**, 19-28.

Hecker, C.-M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P. and Dikic, I. (2006) Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J. Biol. Chem.*, **281**, 16117-16127.

Herz, J., Kowal, R.C., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1990) Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J.*, **9**, 1769-1776.

Herz, J., Clouthier, D.E. and Hammer, R.E. (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell*, **71**, 411-421.

Higy, M., Junne, T. and Spiess, M. (2004) Topogenesis of membrane proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochemistry*, **43**, 12716-12722.

Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Münch, R. and Jahn, D. (2004) PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res.*, **32**, W375-W379.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.

Hiom, K. (2005) DNA repair: how to PIKK a partner. *Curr. Biol.*, **15**, 473-475.

Hofman, K. and Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*, **374**, 166.

Holtzman, J.H., Woronowicz, K., Golemi-Kotra, D. and Schepartz, A. (2007) Miniature protein ligands for EVH1 domains: interplay between affinity, specificity, and cell motility. *Biochemistry*, **46**, 13541-13553.

Hospital, V., Chesneau, V., Balogh, A., Joulie, C., Seidah, N.G., Cohen, P. and Prat, A. (2000) N-arginine dibasic convertase (nardilysin) isoforms are soluble dibasic-specific metalloendopeptidases that localize in the cytoplasm and at the cell surface. *Biochem. J.*, **349**, 587-597.

Hoyt, R., Zhu, W., Cerignoli, F., Alonso, A., Mustelin, T. and David, M. (2007) Cutting edge: selective tyrosine dephosphorylation of interferon-activated nuclear STAT5 by the VHR phosphatase. *J. Immunol.*, **179**, 3402-3406.

Hussain, M.M., Strickland, D.K. and Bakillah, A. (1999) The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu. Rev. Nutr.*, **19**, 141-172.

Ingham, R.J., Colwill, K., Howard, C., Dettwiler, S., Lim, C.S., Yu, J., Hersi, K., Raaijmakers, J., Gish, G., Mbamalu, G., Taylor, L., Yeung, B., Vassilovski, G., Amin, M., Chen, F., Matskova, L., Winberg, G., Ernberg, I., Linding, R., O'donnell, P., Starostine, A., Keller, W., Metalnikov, P., Stark, C. and Pawson, T. (2005) WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 7092-7106.

Inoue, T. and Tsai, B. (2013) How viruses use the endoplasmic reticulum for entry, replication, and assembly. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a013250.

Jackson, M.R., Nilson, T. and Peterson, P.A. (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, **9**, 3153-3162.

James, P., Haliaday, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.

Jang, S.-W., Kim, Y.K., Lee, Y.H. and Ko, J. (2006) Role of human LZIP in differential activation of the NF- κ B pathway that is induced by CCR1-dependent chemokines. *J. Cell. Physiol.*, **211**, 630-637.

Jin, D.-Y., Wang, H.-L., Zhou, Y., Chun, A.C., Kibler, K.V., Hou, Y.-D., Kung, H. and Jeang, K.-T. (2000) Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation. *EMBO J.*, **19**, 729-740.

Johanning, K., Juliano, MA., Juliano, L., Lazure, C., Lamango, NS., Steiner, DF. and Lindberg, I. (1998) Specificity of prohormone convertase 2 on proenkephalin and proenkephalin-related substrates. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22672-22680.

Jones, D.T. (2007) Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics*, **23**, 538-544.

Juretic, D., Zoranic, L. and Zucic, D. (2002) Basic charge clusters and predictions of membrane protein topology. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **423**, 620-632.

Käll, L. Anders Krogh, A. and Sonnhammer, E.L. (2004) A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. *J. Mol. Biol.*, **338**, 1027-1036.

Käll, L. Anders Krogh, A. and Sonnhammer, E.L. (2005) An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information. *Bioinformatics*, **21**, 251-257.

Kang, H., Kim, Y.S. and Ko, J. (2009) A novel isoform of human LZIP negatively regulates the transactivation of the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.*, **23**, 1746-1757.

Kawano, M., Kumagai, K., Nishijima, M. and Hanada, K. (2006) Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J. Biol. Chem.*, **281**, 30279-30288.

Kaymer, M. (1997) Sequenzanalyse der *lethal(2)tumorous imaginal discs*-Region [*l(2)tid*-Region] aus drei *Drosophila melanogaster l(2)tid*-Mutanten, der homologen Region aus *Drosophila virilis*-Wildtyp und Vervollständigung der Sequenz des humanen Homologen Gens *lethal(2)neighbour of tid* [*l(2)not*] von *Drosophila melanogaster*. Dissertation.

Kaymer, M., Debes, A., Kress, H. and Kurzik-Dumke, U. (1997) Sequence, molecular organization and products of the *Drosophila virilis* homologs of the *Drosophila melanogaster* nested genes *lethal(2)tumorous imaginal discs* (*l(2)tid*) and *lethal(2)neighbour of tid* (*l(2)not*). *Gene*, **204**, 91-103.

Kaymer, M. und Kurzik-Dumke, U. (1996) Sequence of the human homolog of the *Drosophila melanogaster* gene *lethal(2)neighbour of tid* (*l(2)not*). Accession number: Y09022.

Keegan, L., Gill, G. and Ptashne, M. (1986) Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, **231**, 699-704.

Kim, H.-C., Choi, K.-C., Choi, H.-K., Kang, H.-B., Kim, M.-J., Lee, Y.-H., Lee, O.-H., Lee, J., Kim, Y.J., Jun, W., Jeong, J.-W. and Yoon, H.-G. (2010) HDAC3 selectively represses CREB3 mediated transcription and migration of metastatic breast cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, **67**, 3499-3510.

Ko, J., Jang, S.-W., Kim, Y.S., Kim, I.S, Sung, H.J., Kim, H.-H., Park, J.-Y., Lee, Y.H., Kim, J. and Na, D.S. (2004) Human LZIP binds to CCR1 and differentially affects the chemotactic activities of CCR1-dependent chemokines. *FASEB J.*, **18**, 890-892.

Kõivomägi, M., Ord, M., Iofik, A., Valk, E., Venta, R., Faustova, I., Kivi, R., Balog, E.R., Rubin, S.M. and Loog, M. (2013) Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1415-1424.

Körner, C., Knauer, R., Stephani, U., Marquardt, T., Lehle, L. and von Figura, K. (1999) Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-PP-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase. *EMBO J.*, **18**, 6816-6822.

Kounnas, M.Z., Church, F.C., Argraves, W.S. and Strickland, D.K. (1996) Cellular internalization and degradation of antithrombin III-thrombin, heparin cofactor II-thrombin, and alpha 1-antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.*, **271**, 6523-6529.

Kranz, C., Sun, L., Eklund, E. A., Krasnewich, D., Casey, J. R. and Freeze, H. H. (2007) CDG-Id in two siblings with partially different phenotypes. *Am. J. Med. Genet.*, **143A**, 1414-1420.

Kurzik-Dumke, U., Phannavong, B., Gundacker, D. and Gateff, E. (1992) Genetic, cytogenetic and developmental analysis of the *Drosophila melanogaster* tumor suppressor gene *lethal(2)tumorous imaginal discs (l(2)tid)*. *Differentiation*, **51**, 91-104.

Kurzik-Dumke, U., Gundacker, D., Rentrop, M. and Gateff, E. (1995) Tumor suppression in *Drosophila* is causally related to the function of the *lethal(2)tumorous imaginal discs gene*, a *dnaJ* homolog. *Dev. Genet.*, **16**, 64-76.

Kurzik-Dumke, U., Neubauer, M. and Debes, A. (1996) Identification of a novel *Drosophila melanogaster* heat shock gene, *lethal(2)denticleless (l(2)dtl)*, coding for a 83 kDa protein. *Gene*, **171**, 163-170.

Kurzik-Dumke, U., Gundacker, D. and Debes, A. (1997a) Tid56. In: Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Factors. Gething, M.-J. (ed.), Sambrook & Tooze Publication, Oxford University Press, Oxford, pp. 176-181.

Kurzik-Dumke, U., Kaymer, M., Gundacker, D., Debes, A. and Labitzke, K. (1997b) Gene within gene configuration and expression of the *Drosophila melanogaster* genes *lethal(2) neighbour of tid [l(2)rot]* and *lethal(2) relative of tid [l(2)rot]*. *Gene*, **200**, 45-58.

Kurzik-Dumke, U., Schirmacher, P., Bobkiewicz, W., Kedzia, H. and Gozdzicka-Józefiak, A. (1997c) Preliminary study on expression of the human hTid protein, a homolog of the *Drosophila melanogaster* tumor suppressor Tid56 in various tumors. *The Cancer J.*, **10**, 56-62.

Kurzik-Dumke, U., Debes, A., Kaymer, M. and Dienes, P. (1998) Mitochondrial localization and temporal expression of the *Drosophila melanogaster* DnaJ homologous tumor suppressor Tid50. *Cell Stress & Chaperon.*, **3**, 12-27.

Kurzik-Dumke, U., Hörner, M., Nicotra, M.R., Czaja, J., Simiantonaki, N., Koslowski, M. and Natali P.G. (2008) Progression of colorectal cancers correlates with overexpression and loss of polarization of expression of the *htid-1* tumor suppressor. *Int. J. Mol. Oncol.*, **21**, 19-31.

Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Bioph. Meth.*, **10**, 203-209.

Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.

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

Lam, E., Martin, M. and Wiederrecht G. (1995) Isolation of a cDNA encoding a novel human FK506-binding protein homolog containing leucine zipper and tetratricopeptide repeat motifs. *Gene*, **160**, 297-302.

Lam, P.V., Goldman, R., Karagiannis, K., Narsule, T., Simonyan, V., Soika, V. and Mazumder, R. (2013) Structure-based comparative analysis and prediction of N-linked glycosylation sites in evolutionarily distant eukaryotes. *Genomics Proteomics Bioinformatics.*, **11**, 96-104.

Landschulz, W..H., Johnson, P.F. and Mc Knight, S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **240**, 1759-1764.

Lange, A., Mills, R.E., Lange, C.J., Stewart, M., Devine, S.E. and Corbett, A.H. (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.*, **282**, 5101-5105.

Langlois, B., Perrot, G., Schneider, C., Henriot, P., Emonard, H., Martiny, L. and Dedieu, S. (2010) LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways. *PLoS One*, **5**, e11584.

Lapierre, L.A., Tuma, P.L., Navarre, J., Goldenring, J.R. and Anderson, J.M. (1999) VAP-33 localizes to both an intracellular vesicle population and with occludin at the tight junction. *J. Cell Sci.*, **112**, 3723-2732.

Lehto, M., Laitinen, S., Chinetti, G., Johansson, M., Ehnholm, C., Staels, B., Ikonen, E., and Olkkonen, V. M. (2001). The OSBP-related protein family in humans. *J. Lipid Res.*, **42**, 1203-1213.

Lessmann, E., Ngo, M., Leitges, M., Minguet, S., Ridgway, ND. and Huber, M. (2006) Oxysterol-binding protein-related protein (ORP) 9 is a PDK-2 substrate and regulates Akt phosphorylation. *Cell Signal.*, **19**, 384-392.

Leube, R.E. (1994) Expression of the synaptophysin gene family is not restricted to neuronal and neuroendocrine differentiation in rat and human. *Differentiation*, **56**, 163-171.

Li, J., Lee G.-I., Van Doren, S.R. and Walker, J.C. (2000) The FHA domain mediates phosphoprotein interactions. *J. Cell Sci.*, **113**, 4143-4149.

Li, Y., Marzolo, M.P., van Kerkhof, P., Strous, G.J. and Bu, G. (2000) The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17187-17194.

Liang, G., Audas, T.E., Li, Y., Cockram, G.P., Dean, J.D., Martyn, A.C., Kokame, K. and Lu, R. (2006) Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 7999-8010.

Lillis, A.P., Van Duyn, L.B., Murphy-Ullrich, J.E. and Strickland, D.K. (2008) LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol. Rev.*, **88**, 887-918.

Liu, X. and Ridgway, N.D. (2014) Characterization of the sterol and phosphatidylinositol 4-phosphate binding properties of Golgi-associated OSBP-related protein 9 (ORP9). *PLoS One*, **9**, e108368.

Lotz, G.P., Brychzy, A., Heinz, S., Obermann, W.M.J. 2008. A novel HSP90 chaperone complex regulates intracellular vesicle transport. *J. Cell Sci.*, **30**:342-353.

Lu, R., Yang, P., O'Hare, P. and Misra, V. (1997) Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 5117-5126.

Lu, R. and Misra, V. (2000) Potential role for Luman, the cellular homologue of herpes simplex virus VP16 (α gene *trans*-inducing Factor), in herpesvirus latency. *J. Virol.*, **74**, 934-943.

Lupas, A.N. and Gruber, M. (2005) The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv. Protein Chem.*, **70**, 37-78.

Ma, D., Bai, X., Zou, H, Lai, Y. and Jiang, Y. (2009) Rheb GTPase controls apoptosis by regulating interaction of FKBP38 with Bcl-2 and Bcl-X_L. *J. Biol. Chem.*, **285**, 8621-8627.

Mahley, R.W. and Huang, Y. (2007) Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J. Clin. Invest.*, **117**, 94-98.

Mardones, G.A., Burgos, P.V., Lin, Y., Kloer, D.P., Magadán, J.G., Hurley, J.H. and Bonifacino, J.S. (2013) Structural basis for the recognition of tyrosine-based sorting signals by the μ 3A subunit of the AP-3 adaptor complex. *J. Biol. Chem.*, **288**, 9563-9571.

May, P., Reddy, Y.K. and Herz, J. (2002) Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J. Biol. Chem.*, **277**, 18736-18743.

May, P., Woldt, E., Matz, R.L. and Boucher, P. (2007) The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann. Med.*, **39**, 219-228.

Mellquist, J.L., Kasturi, L., Spitalnik, S.L. and Shakin-Eshleman, S.H. (1998) The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochem.*, **37**, 6833-6837.

Messal, H. (2010) Herstellung von Expressionsvektoren des VAMP associated protein A (VAPA) für Protein-Protein Bindungsstudien. Bachelorarbeit. Johannes-Gutenberg Universität Mainz.

Mohammadi, A., Perry, R.J., Storey, M.K., Cook, H.W., Byers, D.M. and Ridgway, N.D. (2001) Golgi localization and phosphorylation of oxysterol binding protein in Niemann-Pick C and U18666A-treated cells. *J. Lipid Res.*, **42**, 1062-1071.

Moestrup, S.K., Gliemann, J. and Pallesen, G. (1992) Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res.*, **269**, 375-382.

Nakagawa, T., Shirane, M., Iemura, S.-I., Natsume, T. and Nakayama, K.I. (2007) Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38. *Genes Cells*, **12**, 709-719.

Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. and Nishida, E. (2003) Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25277-25280.

Neels, J.G., van Den Berg, B.M., Lookene, A., Olivecrona, G., Pannekoek, H. and van Zonneveld, A.-J. (1999) The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J. Biol. Chem.*, **274**, 31305-31311.

Neuberger, G., Schneider, G. and Eisenhaber, F. (2007) pKaPS: prediction of protein kinase A phosphorylation sites with the simplified kinase-substrate binding model. *Biol. Direct.*, **2**, 1.

Neufeld, C., Filipp, F.V., Simon, B., Neuhaus, A., Schüller, N., David, C., Kooshapur, H., Madl, T., Erdmann, R., Schliebs, W., Wilmanns, M. and Sattler, M. (2009) Structural basis for competitive interactions of Pex14 with the import receptors Pex5 and Pex19. *EMBO J.*, **28**, 745-754.

Ngo, M. and Ridgway, N.D. (2009) Oxysterol binding protein-related protein 9 (ORP9) is a cholesterol transfer protein that regulates golgi structure and function. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 1388-1399.

Ngo, M.H., Colbourne, T.R. and Ridgway, N.D. (2010) Functional implications of sterol transport by the oxysterol-binding protein gene family. *Biochem. J.*, **429**, 13-24.

Nguyen, B. A., Pogoutse, A., Provart, N. and Moses, Am. (2009) **NLStradamus**: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, **10**, 202.

Nielsen, J.V., Mitchelmore, C., Pedersen, K.M., Kjaerulff, K.M., Finsen, B. and Jensen, N.A. (2004) Fkbp8: novel isoforms, genomic organization, and characterization of a forebrain promoter in transgenic mice. *Genomics*, **83**, 181-192.

Nilsson, T., Jackson, M. and Peterson, P.A. (1989) Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **58**, 707-718.

Obata, T., Yaffe, M.B., Leparo, G.G., Piro, E.T., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Kikkawa, R., Cantley, L.C. (2000) Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J. Biol. Chem.*, **275**, 36108-36115.

Obermaier, B., Gassenhuber, J., Piravandi, E. and Domdey, H. (1995) Sequence analysis of a 78.6kb segment of the left end of *Saccharomyces cerevisiae* Chromosome II. *Yeast*, **11**, 1103-1112

Ogden, C.A., deCathelineau, A., Hoffmann, P.R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V.A. and Henson, P.M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J. Exp.Med.*, **194**, 781-795.

Okamoto, T., Nishimura, Y., Ichimura, T., Suzuki, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Moriishi, K. and Matsuura, Y. (2006) Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. *EMBO J.*, **25**, 5015-5025.

Orr, A.W., Elzie, C.A., Kucik, D.F. and Murphy-Ullrich, J.E. (2003) Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J. Cell Sci.*, **116**, 2917-2927.

Parkyn, C.J., Vermeulen, E.G., Mootosamy, R.C., Sunyach, C., Jacobsen, C., Oxvig, C., Moestrup, S., Liu, Q., Bu, G., Jen, A. and Morris, R.J. (2008) LRP1 controls biosynthetic and endocytic trafficking of neuronal prion protein. *J. Cell Sci.*, **121**, 773-783.

Perry, R.J. and Ridgway, N.D. (2006) Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 2604-2616.

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods*, **8**, 785-786.

Pierleoni, A., Indio, V., Savojardo, C., Fariselli, P., Martelli, P.L. and Casadio, R. (2011) MemPype: a pipeline for the annotation of eukaryotic membrane proteins. *Nucl. Acids Res.*, **39**, W375-380.

Pietrzik, C.U., Yoon, I.-S., Jaeger, S., Busse, T., Weggen, S. and Koo, E.H. (2004) FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.*, **24**, 4259-4265.

Puntervoll, P., Linding, R., Gemünd, C., Chabanis-Davidson, S., Mattingsdal, M., Cameron, S., Martin, D.M., Ausiello, G., Brannetti, B., Costantini, A., Ferrè, F., Maselli, V., Via, A., Cesareni, G., Diella, F., Superti-Furga, G., Wyrwicz, L., Ramu, C., McGuigan, C., Gudavalli, R., Letunic, I., Bork, P., Rychlewski, L., Küster, B., Helmer-Citterich, M., Hunter, W.N., Aasland, R. and Gibson, T.J. (2003) ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucl. Acids Res.*, **31**, 3625-3630.

Quinn, K.A., Pye, V.J., Dai, Y.-P., Chesterman, C.N. and Owensby, D.A. (1999) Characterization of the soluble form of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Exp. Cell Res.*, **251**, 433-441.

Raggio, C., Rapin, N., Stirling, J., Gobeil, P., Smith-Windsor, E., O'Hare, P. And Misra, V. (2002) Luman, the Cellular Counterpart of Herpes Simplex Virus VP16, Is Processed by Regulated Intramembrane Proteolysis. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 5639-5649.

Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P. and Baltimore, D. (1993) Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science*, **259**, 1157-1161.

Rimella-Le-Huu, A., Henry, H., Kern, I., Hanquinet, S., Roulet-Perez, E., Newman, C.J., Superti-Furga, A., Bonafe, L. and Ballhausen, D. (2008) Congenital disorder of glycosylation type Id (CDG Id): phenotypic, biochemical and molecular characterization of a new patient. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **31**, 381-386.

Riess, S., Reddihough, D.S., Howell, K.B., Dagia, C., Jaeken, J., Matthijs, G., Yapfite-Lee, J. (2013) ALG3-CDG (CDG-Id): clinical, biochemical and molecular findings in two siblings. *Mol. Genet. Metab.*, **110**, 170-175.

Robbins, P.W. (1994) The ALG (asparagine linked glycosylation) genes. In: Guidebook to the Secretory Pathway. Rothblatt, J., Novick, P. and Stevens, T. (eds), Oxford University Press, Oxford, pp. 57-59.

Rosner, M., Hofer, K., Kubista, M. and Hengstschlager, M. (2003) Cell size regulation by the human TSC tumor suppressor proteins depends on PI3K and FKBP38. *Oncogene*, **22**, 4786-4798.

Saenko, E.L., Yakhyaev, A.V., Mikhailenko, I., Strickland, D.K. and Sarafanov, A.G. (1999) Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37685-37692.

Sagare, A., Deane, R., Bell, R.D., Johnson, B., Hamm, K., Pendu, R., Marky, A., Lenting, P.J., Wu, Z., Zarcone, T., Goate, A., Mayo, K., Perlmutter, D., Coma, M., Zhong, Z. and Zlokovic, B.V. (2007) Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat. Med.*, **13**, 1029-1031.

Salicioni, A.M., Gaultier, A., Brownlee, C., Cheezum, M.K. and Gonias, S.L. (2004) Low density lipoprotein receptor-related protein-1 promotes beta1 integrin maturation and transport to the cell surface. *J. Biol. Chem.*, **279**, 10005-10012.

Saita, S., Shirane, M., Natume, T., Iemura, S.-I. and Nakayama, K.I. (2009) Promotion of neurite extension by protrudin requires its interaction with vesicle-associated membrane protein-associated protein. *J. Biol. Chem.*, **284**, 13766-13777.

Saito, S., Matsui, H., Kawano, M., Kumagai, K., Tomishige, N., Hanada, K., Echigo, S., Tamura, S., Kobayashi, T. (2008) Protein phosphatase 2Cepsilon is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes. *J. Biol. Chem.*, **283**, 6584-6593.

Salvesen, G.S. and Duckett, C.S. (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 401-410.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 5463-5467.

Schollen, E., Grünewald, S., Keldermans, L., Albrecht, B., Körner, C. and Matthijs, G. (2005) CDG-Id caused by homozygosity for an ALG3 mutation due to segmental maternal isodisomy UPD3(q21.3-qter). *Eur. J. Med. Genet.*, **48**, 153-158.

Schutze, M.-P., Peterson, P.A. and Jackson, M.R. (1994) An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, **13**, 1696-1705.

Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.-C., Lazure, C., Murphy, R.A., Chretien, M. and Marcinkiewicz, M. (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 1321-1326.

Sengupta, S., Miller, K.K., Homma, K., Edge, R., Cheatham, M.A., Dallos, P. And Zheng, J. (2010) Interaction between the motor protein prestin and the transporter protein VAPA. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1803**, 796-804.

Shen, H.-B. and Chou, K.-C. (2009) A top-down approach to enhance the power of predicting human protein subcellular localization: Hum-mPLoc 2.0. *Anal. Biochem.*, **394**, 269-274.

Sheng, Y., Saridakis, V., Sarkari, F., Duan, S., Wu, T., Arrowsmith, C.H. and Frappier, L. (2006) Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 285-291.

Shirane, M. and Nakayama, K.I. (2002) Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat. Cell. Biol.*, **10**, 1-11.

Shirane, M. and Nakayama, K.I. (2006) Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science*, **314**, 818-821.

Shirane, M., Ogawa, M., Motoyama, J. and Nakayama, K.I. (2008) Regulation of apoptosis and neurite extension by FKBP38 is required for neural tube formation in the mouse. *Genes Cells*, **13**, 635-651.

Skehel, P.A., Martin, K.C., Kandel, E.R. and Bartsch, D. (1995) A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science*, **269**, 1580-1583.

Smith, M.J., Hardy, W.R., Murphy, J.M., Jones, N. and Pawson, T. (2006) Screening for PTB domain binding partners and ligand specificity using proteome-derived NPXY peptide arrays. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 8461-8474.

Somarelli, J.A., Lee, S.Y., Skolnick, J. and Herrera, R.J. (2008) Structure-based classification of 45 FK506-binding proteins. *Proteins*, **72**, 197-208.

Sonnhammer, E.L., von Heijne, G. and Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*, **6**, 175-182.

Stibler, H., Stephani, U. and Kutsch, U. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: a fourth subtype. (1995) *Neuropediatrics*, **26**, 235-237.

Stornaiuolo, M., Lotti, L.V., Borgese, N., Torrisi, M.-R., Mottola, G., Martire, G. and Bonatti, S. (2003) KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex. *Mol. Biol. Cell.*, **14**, 889-902.

Strickland, D.K., Gonias, S.L. and Argraves, W.S. (2002) Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol. Metab.*, **13**, 66-74.

Strickland, D.K. and Ranganathan, S. (2003) Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling. *J. Thromb. Haemost.*, **1**, 1663-1670.

Su, H.P., Nakada-Tsukui, K., Tosello-Trampont, A.-C., Li, Y., Bu, G., Henson, P.M. and Ravichandran, K.S. (2002) Interaction of CED-6/GULP, an adapter protein involved in engulfment of apoptotic cells with CED-1 and CD91/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *J. Biol. Chem.*, **277**, 11772-11779.

Sun, L., Eklund, E. A., Chung, W. K., Wang, C., Cohen, J. and Freeze, H. H. (2005) Congenital disorder of glycosylation Id presenting with hyperinsulinemic hypoglycemia and islet cell hyperplasia. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **90**, 4371-4375.

Szydklowski, M. (2011) Identification of the regulatory elements and factors of the human tumor suppressor gene *tumorous imaginal discs (tid)*. Dissertation. Johannes-Gutenberg Universität Mainz.

Takeda, D.Y., Wohlschlegel, J.A. and Dutta, A. (2001) A bipartite substrate recognition motif for cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.*, **276**, 1993-1997.

Tarr, D.E. and Scott, A.L. (2005) MSP domain proteins. *Trends Parasitol.*, **21**, 224-231.

Teuling, E., Ahmed, S., Haasdijk, E., Demmers, J., Steinmetz, M.O., Akhmanova, A., Jaarsma, D. and Hoogenraad, C.C. (2007) Motor neuron disease-associated mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) B recruits wild-type VAPs into endoplasmic reticulum-derived tubular aggregates. *J. Neurosci.*, **27**, 9801-9815.

Tsuda, H., Han, S.M., Yang, Y., Tong, C., Lin, Y.Q., Mohan, K., Haueter, C., Zoghbi, A., Harati, Y., Kwan, J., Miller, M.A. and Bellen, H.J. (2008) The amyotrophic lateral sclerosis 8 protein VAPB is cleaved, secreted, and acts as a ligand for Eph receptors. *Cell*, **133**, 963-977.

Tu, H., Shi, S.T., Taylor, D.R., Yang, T., Mircheff, A.K., Wen, Y., Gorbalenya, A.E., Hwang, S.B., Lai, M.M.C. 1999. Hepatitis C Virus RNA Polymerase and NS5A Complex with a SNARE-like Protein. *Virology*, **263**, 30-41.

Tusnády, G.E. and Simon, I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, **17**, 849-850.

Vandenberg, J.I., Perry, M.D., Perrin, M.J., Mann, S.A., Ke, Y. and Hill, A.P. (2002) hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev.*, **92**, 1393-1478.

Van der Geer, P. (2002) Phosphorylation of LRP1: regulation of transport and signal transduction. *Trends Cardiovasc. Med.*, **12**, 160-165.

Van de Roemer, N. (2010) Herstellung von Expressionsvektoren der Proteine FK506, Sec16, Smoothelin und Inverted Formin 2 für Protein-Protein Bindungsstudien. Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg Universität Mainz.

Walker, V.E., Atanasiu, R., Lam, H. and Shrier, A. (2007) Co-chaperone FKBP38 promotes HERG trafficking. *J. Biol. Chem.*, **282**, 23509-23516.

Wang, H-Q., Nakaya, Y., Du, Z., Yamane, T., Shirane, M., Kudo, T., Takeda, M, Takebayashi, K., Noda, Y., Nakayama, K. I. and Nishimura, M. (2005) Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2. *Hum. Mol. Gen.*, **14**:1889-1902.

Wang, P.-Y., Weng, J. and Anderson, R.G.W. (2005) OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation. *Science*, **307**, 1472-1476.

Wang, P.-Y., Weng, J., Lee, S. and Anderson, R.G. (2008) The N terminus controls sterol binding while the C terminus regulates the scaffolding function of OSBP. *J. Biol. Chem.*, **283**, 8034-8045.

Wang, H., Perry, J.W., Lauring, A.S., Neddermann, P., De Francesco, R. and Tai, A.W. (2014) Oxysterol-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking. *Gastroenterology*, **146**, 1373-1385.

Weaver, A.M., Hussaini, I.M., Mazar, A., Henkin, J. and Gonias, S.L. (1997) Embryonic fibroblasts that are genetically deficient in low density lipoprotein receptor-related protein demonstrate increased activity of the urokinase receptor system and accelerated migration on vitronectin. *J. Biol. Chem.*, **272**, 14372-14379.

Weir, M.L., Klip, A. and Trimble, W.S. (1998) Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochem. J.*, **333**, 247-251.

Weir, L M., Xie, H., Klip, A., Trimble, S. (2001) VAP-A binds promiscuously to both v- and t-SNAREs. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **286**:616-621.

Willnow, T.E., Armstrong, S.A., Hammer, R.E. and Herz, J. (1995) Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 4537-4541.

Wyles, J.P., McMaster, C.R. and Ridgway, N.D. (2002) Vesicle-associated Membrane Protein-associated protein-A (VAP-A) interacts with the oxysterol binding protein (OSBP) to modify export from the endoplasmic reticulum. *JBC*, **277**, 29908-29918.

Wyles, J.P. and Ridgway, N.D. (2004) VAMP-associated protein-A regulates partitioning of oxysterol-binding protein-related protein-9 between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Exp. Cell Res.*, **297**, 533-547.

Xu, C., Kim, N.-G. and Gumbiner, B.M. (2009) Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle*, **8**, 4032-4039.

Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J. and Cantley, L.C. (1997) The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell*, **91**, 961-971.

Ye, H., Park, Y.C., Kreishman, M., Kieff, E. and Wu, H. (1999) The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol. Cell*, **4**, 321-330.

Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K. and Lawrence, D.A. (2003) Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J. Clin. Invest.*, **112**, 1533-1540.

Zhou, H.-J., Wong, C.-M., Chen, J.-H., Qiang, Yuan, J.-G. and Jin, D.-Y. (2001) Inhibition of LZIP-mediated Transcription through Direct Interaction with a Novel Host Cell Factor-like Protein. *JBC*, **276**, 28933-28938.

Zhu, Y. and Hui, D.Y. (2003) Apolipoprotein E binding to low density lipoprotein receptor-related protein-1 inhibits cell migration via activation of cAMP-dependent protein kinase A. *J. Biol. Chem.*, **278**, 36257-36263.

Zhu, J., Sun, Z., Cheng, K., Chen, R., Ye, M., Xu, B., Sun, D., Wang, L., Liu, J., Wang, F. and Zou H. (2014) Comprehensive mapping of protein N-glycosylation in human liver by combining hydrophilic interaction chromatography and hydrazide chemistry. *J. Proteome Res.*, **13**, 1713-1721.

Zurhove, K., Nakajima, C., Herz, J., Bock, H.H. and May, P. (2008) Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1. *Sci. Signal.*, **1**, ra15.

8. Anhang

Für die Liganden: Sushi Repeat-Containing Protein, X-Linked (SRPX), Guanylate-Binding Protein 1, Interferon-Inducible (GBP1), Heme Oxygenase 2 (HMOX2), BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa Interacting Protein 3 (BNIP3), CD74 Molecule, Major Histocompatibility Complex, Class II Invariant Chain (CD74), Smoothelin (SMTN), SEC16 Homolog B (*S. cerevisiae*) (SEC16B), NDRG Family Member 2 (NDRG2), Inverted Formin, FH2 and WH2 Domain Containing (INF2), Mitochondrially Encoded Cytochrome c OxidaseIII (MT-CO3) wurden präliminäre Literaturrecherchen durchgeführt. Die Ergebnisse zu den bekannten biologischen Funktionen und Charakteristika sind in der Tab. 22 zusammengefasst.

Tab. 22 Mit Hilfe des Y2H-Systems isolierte molekulare Partner der humanen NOT Proteine

Potentieller Ligand - Gen ID / Länge / Akz.	Isolierte Region (As)	Bekannte Funktionen u. Charakteristika
Sushi Repeat-Containing Protein, X-Linked (SRPX) – ID: 8406 464 As (Isoform 1) / NP_006298 405 As (Isoform 3) / NP_00164222 379 As (Isoform 4) / NP_00164223	1- 82 1- 82 1- 82	- Mitglied der Selektin Familie der Adhäsionsmoleküle ¹ - Chaperon-Funktion ¹ - das Gen ist in Patienten mit Retinitis Pigmentosa deletiert ² - ursprünglich als Suppressor der <i>v-src</i> Transformation identifiziert ^{3,4} - Apoptose-Induktor ⁵ - Tumorsuppressor in Prostata-, Lungen- und Dickdarm Tumoren ⁶⁻⁸
Guanylate-Binding Protein 1, Interferon-Inducible (GBP1) – ID: 2633 592 As / NP_002044	449-592	- Mitglied der GTPase Proteinfamilie – Aktivierung durch inflammatorische Zytokine (IFN γ , NF- κ B, IL-1 β , TNF- α) in Endothelzellen ^{9,12} - spezifischer Marker proliferierender Endothelzellen, die durch inflammatorische Zytokine induziert wurden ^{10,11} - zentrales Molekül in der Immunantwort gegen bakterielle und virale Pathogene ⁹ - spezifischer diagnostischer Marker bei Meningitis Patienten ⁹
Heme Oxygenase 2 (HMOX2) – ID: 3163 316 As (Isoform b) / NP_001120676	1-226	- Rolle bei der Regulierung des Häm-Katabolismus ^{13,14} und von Entzündungsreaktionen ¹⁵
BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa Interacting Protein 3 (BNIP3) – ID: 664 228 As / AAH80643	1-126	- mitochondriales Protein: Regulator des Zelltods durch Nekrose und Apoptose ^{16,17} - Hypoxie induziert ¹⁸ - Rollen in Tumorgenese und Progression ^{19,20}

CD74 Molecule, Major Histocompatibility Complex, Class II Invariant Chain (CD74) – ID: 972 232 As (Isoform b) / NP_004346	10-232	- Rolle in der Antigenpräsentation ²¹ - Expression in diversen Karzinomen (Niere, Lunge, Magen, Thymus), Myelomen und Sarkomen ²¹ - Target für Immun- und Tumorthherapie, z.B. B-Lymphomen ²¹ - strikt begrenzte Expression in normalen Geweben ²¹ - Rolle bei der Proliferation, maligne Entartung und Vitalität von B-Zellen ²² - MHC Klasse II Chaperon ²²
Smoothelin (SMTN) – ID: 6525 994 As (Isoform CRA_h) / EAW59932	525-798	- zytoskellatales Protein spezifisch für ausdifferenzierte glatte Muskelzellen / Differenzierungsmarker ²³
SEC16 Homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) (SEC16B) – ID: 89866 737 As (Isoform CRA_c) / EAW91013	519-737	- Rolle ER Export und Organisation ²⁴
NDRG Family Member 2 (NDRG2) – ID: 57447 357 As (Isoform b) / NP_057334	26-263	- Tumorsuppressor / Differenzierungsmarker ²⁵⁻³⁰ - Tumorstadium assoziiert mit der Aktivierung des STAT3 Signalweges ³⁰ - Rolle bei der Angiogenese ³¹ - Differenzierung von dendritischen Zellen und T-Zell-Stimulation ³²
Inverted Formin, FH2 and WH2 Domain Containing (INF2) – ID: 64423 1249 As (Isoform 1)	567-849	- Modulator der Aktin-Dynamik ^{33,34}
Mitochondrially Encoded Cytochrome c Oxidase III (MT-CO3) – ID: 4514 261 As / YP_003024032	151-261	- Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase; funktionelle Bildung - kein essentielles Element der Protonenpumpe ^{35,36} - COX3 bindet mit Hepatitis B Virus X Protein ³⁷

Referenzen:

1. Shin, B.K., Wang, H., Yim, A.M., Le Naour, F., Brichory, F., Jang, J.H., Zhao, R., Puravs, E., Tra, J., Michael, C.W., Misek, D.E. and Hanash, S.M. (2003) Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J. Biol. Chem.*, **278**, 7607-7616.
2. Meindl, A., Carvalho, M.R.S., Herrmann, K., Lorenz, B., Achatz, H., Lorenz, B., Apfelstedt-Sylla, E., Wittwer, B., Ross, M. and Meitinger, T. (1995) A gene (SRPX) encoding a sushi-repeat-containing protein is deleted in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 2339-2346.

3. Pan, J., Nakanishi, K., Yutsudo, M., Inoue, H., Li, Q., Oka, K., Yoshioka, N. and Hakura, A. (1996) Isolation of a novel gene down-regulated by *v-src*. *FEBS Lett.*, **407**, 313-319.
4. Inoue, H., Pan, J. and Hakura, A. (1998) Suppression of *v-src* transformation by the *drs* gene. *J. Virol.*, **72**, 2532-2537.
5. Tambe, Y., Isono, T., Haraguchi, S., Yoshioka-Yamashita, A., Yutsudo, M., Inoue, H. (2004) A novel apoptotic pathway induced by the *drs* tumor suppressor gene. *Oncogene*, **23**, 2977-2987.
6. Kim, C.J., Shimakage, M., Kushima, R., Mukaisho, K.-I., Shinka, T., Okada, Y., Inoue, H. (2003) Down-regulation of *drs* mRNA in human prostate carcinomas. *Hum. Pathol.*, **34**, 654-657.
7. Shimakage, M., Kawahara, K., Kikkawa, N., Sasagawa, T., Yutsudo, M. and Inoue, H. (2000) Down-regulation of *drs* mRNA in human colon adenocarcinomas. *Int. J. Cancer.*, **87**, 5-11.
8. Shimakage, M., Takami, K., Kodama, K., Mano, M., Yutsudo, M. and Inoue, H. (2002) Expression of *drs* mRNA in human lung adenocarcinomas. *Hum. Pathol.*, **33**, 615-619.
9. Naschberger, E., Lubeseder-Martellato, C., Meyer, N., Gessner, R., Kremmer, E., Gessner, A. and Stürzl, M. (2006) Human guanylate binding protein-1 is a secreted GTPase present in increased concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis. *Am. J. Pathol.*, **169**, 1088-1099.
10. Naschberger, E., Bauer, M. and Stürzl, M. (2005) Human guanylate binding protein-1 (hGBP-1) characterizes and establishes a non-angiogenic endothelial cell activation phenotype in inflammatory disease. *Adv. Enzyme Regul.*, **45**, 215-227.

11. Guenzi, E., Töpolt, K., Cornali, E., Lubeseder-Martellato, C., Jörg, A., Matzen, K., Zietz, C., Kremmer, E., Nappi, F., Schwemmle, M., Hohenadl, C., Barillari, G., Tschachler, E., Monini, P., Ensoli, B. and Stürzl, M. (2001) The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J.*, **20**, 5568-5577.

12. Naschberger, E., Werner, T., Vicente, A.B., Guenzi, E., Töpolt, K., Leubert, R., Lubeseder-Martellato, C., Nelson, P.J. and Stürzl, M. (2004) Nuclear factor- κ B motif and interferon- α -stimulated response element co-operate in the activation of guanylate-binding protein-1 expression by inflammatory cytokines in endothelial cells. *Biochem. J.*, **179**, 409-420.

13. Shibahara, S. (2003) The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: New insights for the feedback regulation of heme catabolism. *Tohoku J. Exp. Med.*, **200**, 167-186.

14. Chang, E.F., Wong, R.J., Vreman, H.J., Igarashi, T., Galo, E., Sharp, F.R., Stevenson, D.K. and Noble-Haeusslein, L.J. (2003) Heme Oxygenase-2 protects against lipid peroxidation-mediated cell loss and impaired motor recovery after traumatic brain injury. *J. Neurosci.*, **23**, 3689-3695.

15. Willis, D., Moore, A.R., Frederick, R. and Willoughby, D.A. (1996) Heme oxygenase: A novel target for the modulation of inflammatory response. *Nat. Med.*, **2**, 87-93.

16. Van de Velde, C., Cizeau, J., Dubik, D., Alimonti, J., Brown, T., Israels, S., Hakem, R., and Greenberg, A.H. (2000) BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 5454-5468.

17. Chen, G., Ray, R., Dubik, D., Shi, L., Cizeau, J., Bleackley, R.C., Saxena, S., Gietz, R.D. and Greenberg, A.H. (2008) The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J. Exp. Med.*, **186**, 1975-1983.

18. Shaida, N., Launchbury, R., Boddy, J.L., Jones, C., Campo, L., Turley, H., Kanga, S., Banham, A.H., Malone, P.R., Harris, A.L. and Fox, S.B. (2007) Expression of BNIP3 correlates with hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , HIF-2 α and the androgen receptor in prostate cancer and is regulated directly by hypoxia but not androgens in cell lines. *The Prostate*, **68**, 336-343.

19. Lee, H. and Paik, S.-G. (2006) Regulation of BNIP3 in normal and cancer cells. *Mol. Cells.*, **21**, 1-6.

20. Tan, E.Y., Campo, L., Han, C., Turley, H., Pezzella, F., Gatter, K.C., Harris, A.L. and Fox, S.B. (2007) BNIP3 as a progression marker in primary human breast cancer; opposing functions *in situ* versus invasive cancer. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 467-474.

21. Burton, J.D., Ely, S., Reddy, P.K., Stein, R., Gold, D.V., Cardillo, T.M. and Goldenberg, D.M. (2004) CD74 is expressed by multiple myeloma and is a promising target for therapy. *Clin. Cancer Res.*, **10**, 6606-6611.

22. Stein, R., Mattes, M.J., Cardillo, T.M., Hansen, H.J., Chang, C.-H., Burton, J., Govindan, S. and Goldenberg, D.M. (2007) CD74: A new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 5556-5563.

23. Van der Loop, F.T.L., Schaart, G., Timmer, E.D.J., Ramaekers, F.C.S. and Van Eys, G.J.J.M. (1996) Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **134**, 401-411.

24. Bhattacharyya, D. and Glick, B.S. (2007) Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 839-849.

-
25. Lorentzen, A., Vogel, L.K., Lewinsky, R.H., Saebø, M., Skjelbred, C.F., Godiksen, S., Hoff, G., Tveit, K.M., Bowitz Lothe, I.M., Ikdahl, T., Kure, E.H. and Mitchelmore, C. (2007) Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma. *BMC Cancer*, **7**, 192-199.
26. Lusic, E.A., Watson, M.A., Chicoine, M.R., Lyman, M., Roerig, P, Reifenberger, G., Gutmann, D.H., and Perry, A. (2005) Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res.*, **65**, 7121-7126.
27. Deng, Y., Yao, L., Chau, L., NG, S., Peng, Y., Liu, X., Au, W., Wang, J., Li, F., Ji, S., Han, H., Nie, X., Li, Q., Kung, H., Leung, S. and Lin, M.C. (2003) N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int. J. Cancer*, **106**, 342-347.
28. Liu, N., Wang, L., Liu, X., Yang, Q., Zhang, J., Zhang, W., Wu, Y., Shen, L., Zhang, Y., Yang, A., Han, H., Zhang, J. and Yao, L. (2007) Promotor methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDGR2 expression levels in several cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 164-169.
29. Choi, S.-C., Yoon, S.R., Park, Y.P., Song, E.Y., Kim, J.W., Kim, W.H., Yang, Y., Lim, J-S. and Lee, H.G. (2007) Expression of NDRG2 is related to tumor progression and survival of gastric cancer patients through Fas-mediated cell death. *Expert. Mol. Med.*, **39**, 705-714.
30. Park, Y., Shon, S.-K., Kim, A., Kim K.II, Yang, Y., Cho, D.H., Lee, M.-S. and Lim, J.-S. (2007) SOCS1 induced by NDRG2 expression negatively regulates STAT3 activation in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **363**, 361-367.

31. Song, M. and Cho, S. (2007) N-myc downstream-reulated gene 2 induces angiogenesis. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **28**, 1206-1208.

32. Choi, S.-C., Kim, K.D., Kim, J.-T, Kim, J.W., Lee, H.G., Kim, J.-M., Jang, Y.-S., Yoon, D.-Y., Kim, K.II, Yang, Y., Cho, D.H. and Lim, J.-S. (2008) Expression of human NDRG2 by myeloid dendritic cells inhibits down-regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) and contributes to maintenance of T cell stimulatory activity. *J. Leukoc. Biol.*, **83**, 89-98.

33. Chhabra, E.S. and Higgs, H.N. (2006) INF2 is a WASP homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization. *J. Biol. Chem.*, **281**, 26754-26767.

34. Higgs, H.N. (2005) Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 342-353.

35. Haltia, T., Finel, M., Harms, N., Nakari, T., Raitio, M., Wikström, M. and Saraste, M. (1989) Deletion of the gene for subunit III leads to defective assembly of bacterial cytochrome oxidase. *EMBO*, **8**, 3571-3579.

36. Haltia, T., Saraste, M. and Wikström, M. (1991) Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study. *EMBO*, **10**, 2015-2021.

37. Li, D., Wang, X.-Z., Yu, J.-P., Chen, Z.-X., Huang, Y.-H. and Tao, Q.-M. (2004) Cytochrom c oxidase III interacts with hepatitis b virus x protein *in vivo* by yeast two-hybrid system. *World J. Gastroenterol.*, **10**, 2805-2808.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt und verfasst habe, dass alle Hilfsmittel und sonstigen Hilfen angegeben und dass alle Stellen, die ich wörtlich oder dem Sinne nach aus anderen Veröffentlichungen entnommen habe, kenntlich gemacht worden sind.

Die Dissertation in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung wurde bisher keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Mainz, den 22.03.2016

Benedikt Hacker

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Benedikt Hacker
Geburtsdatum: 30.12.1980
Geburtsort: Frankfurt/Höchst (D)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

seit September 2007 Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz (D)
Promotionsstudium: Biologie

2003-2007 Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz (D)
Studiengang: Biologie
Diplom (1.01)

2001-2003: Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz (D)
Studiengang: Biologie
Vordiplom (2.5)

1991- 2000: Heinrich-Böll-Schule , Hattersheim (D)
Gymnasiale Oberstufe / Abitur (2.6)

1985-1991: Albert-Schweitzer-Schule, Okriftel (D)
Grundschule

Grundwehrdienst

2000 -2001: Stammatterie, Idar-Oberstein (D)
Sanitäter / ArtS UstgGrp (Artillerie)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich im Rahmen dieser Dissertation begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner „Doktormutter“, die mich in Ihrer Arbeitsgruppe aufgenommen hat und es mir ermöglichte, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen. Für die hervorragende Betreuung, fachliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der ganzen Zeit, bedanke ich mich sehr herzlich.

Ein weiterer Dank gilt meinen beiden Arbeitskollegen. Ich bedanke mich bei euch für die sehr gute Zusammenarbeit, die Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die Freundschaft, die über das kollegiale Verhältnis hinaus entstanden ist.

Insbesondere möchte ich mich vor allem bei meiner Mutter, meiner Schwester und Freundin von ganzem Herzen für die liebevolle, uneingeschränkte und vielseitige Unterstützung während der gesamten Dissertation bedanken. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.