Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. med. G. Gillessen-Kaesbach

Regulation des Transkriptionsfaktors TRPS1 durch die Interaktion mit der Ubiquitinligase ARKADIA

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Christiane Will

aus Neumünster

Lübeck 2012

1. Berichterstatterin: Professor Dr. med. Gabriele Gillessen-Kaesbach

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med Christine Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 4.10.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 4.10.2012

Promotionskommission der Sektion Medizin

Publikationen

Teile der Arbeit wurden auf der 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Humangenetik und der Schweizerischen Gesellschaft für Medizinische Genetik vorgestellt. Hannover, 8.-10.4.2008

Poster 167

The transcription factor TRPS1 interacts with the RINGfinger ubiquitin ligase ARKADIA

Will C. , Albrecht M. , Gkalympoudis S. , Lüdecke H.-J. , Gillessen-Kaesbach G. and Kaiser F.J.

Medizininische Genetik, Band 20 Heft 1 (128), 2008: „The transcription factor TRPS1 interacts with the RINGfinger ubiquitin ligase ARKADIA“

Will C. , Albrecht M. , Gkalympoudis S. , Lüdecke H.-J. , Gillessen-Kaesbach G. and Kaiser F.J.

1 Einleitung 1

1.1 Das Tricho-Rhino-Phalangeale Syndrom Typ I, II und III 1

1.2 Das *TRPS1*-Gen 3

1.3 Funktion des *TRPS1*-Gens 4

1.4 TRPS1 im Zusammenspiel mit spezifischen Bindeproteinen 5

1.4.1 LC8a und RNF 4 als Hemmer der TRPS1-Aktivität 6

1.4.2 TRPS1 als Regulator von RUNX2 und GLI3 7

1.4.3 Posttranslationale Modifikation von TRPS1 9

1.5 Zielsetzung/Aufgabenstellung 11

2 Material und Methoden 12

2.1 Chemikalien, Enzyme, Größenmarker, Vektoren, Kits, Geräte und Verbrauchsmittel, Lösungen 12

2.1.1 Chemikalien 12

2.1.2 Enzyme 13

2.1.3 Größenmarker 14

2.1.4 Software 14

2.1.5 Vektoren/bakterielle und eukaryotische Expressionsplasmide 14

2.1.6 Antikörper 15

2.1.7 Kits 15

2.1.8 Geräte und weitere Verbrauchsmaterialien 16

2.2 Puffer und Lösungen 17

2.3 Arbeiten mit DNA 17

2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) 17

2.3.2 *In vitro* Synthese von spezifischen Mutationen 18

2.3.3 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonuklease 19

2.3.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR- und Restriktionsansätzen 19

2.3.4.1 Microcon /Filterzentrifugation 19

2.3.4.2 Gelextraktion nach dem MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) 19

2.3.5 Ligation 20

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese 20

2.3.7 Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präp) 21

2.3.8 Präparative Plasmid-Isolierung (QIAGEN-System) (Midi-Präp) 21
2.3.9 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung 22
2.3.10 Sequenzierung von DNA 22
2.4 Bakterien 23
2.4.1 Bakterienstamm 23
2.4.2 Bakterienmedien 23
2.4.3 Herstellung kompetenter Bakterien 23
2.4.4 Transformation kompetenter Bakterien 24
2.5 Hefen 24
2.5.1 Hefestamm 24
2.5.2 Hefemedien 24
2.5.2.1 Vollmedium 24
2.5.2.2 Mangelmedien 25
2.5.3 Transformation von Hefezellen 25
2.5.4 Gewinnung von Hefeextrakten (Schnelltest) 26
2.5.5 Hefe-Zwei-Hybrid-System 26
2.5.6 β-Galaktosidase Hefe-*in vivo*-Assay 27
2.6 Zellkultur 29
2.6.1 Zelllinien 29
2.6.2 Zellkulturmedien 30
2.6.3 Kultivierung der Säugerzellen 30
2.6.4 Passagieren von Zellen 30
2.6.5 Transiente Transfektion von Zellen 31
2.6.5.1 Elektroporation 31
2.6.5.2 Transfektion mittels FuGENE-HD (Roche) 31
2.6.6 Luciferase-Reporter Assay 32
2.6.7 Immunfluoreszenz 32
2.7 Proteine 33
2.7.1 Gesamtproteinextraktion aus Zellen 33
2.7.2 Coimmunpräzipitation von Proteinen 34
2.7.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970) 35
2.7.4 Proteintransfer und –nachweis (Westernblot) 37

3 Ergebnisse 38

3.1 Der Transkriptionsfaktor TRPS1 interagiert mit dem Protein ARKADIA in Hefen 38

3.1.1 Erstellung der TRPS1- und der ARKADIA-Fragmente 38

3.1.2 Interaktionsstudien in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System 42

3.1.2.1 Interaktionsnachweis durch Selektivmedien 43

3.1.2.2 Semiquantitative Analyse der Interaktion mittels β-Galaktosidase-Versuchen (*Liquid Assays)* 46

3.2 Interaktion von TRPS1 und ARKADIA in Säugerzellen 49

3.2.1 Coimmunpräzipitierung von TRPS1 und ARKADIA 49

3.2.2 Intrazelluläre Verteilung von TRPS1 und ARKADIA 52

3.2.3 ARKADIA vermindert die Transkriptionsrepression von TRPS1 56

4 Diskussion 60

4.1 TRPS1 interagiert mit ARKADIA 60

4.1.1 ARKADIA 60

4.1.1.1 Interaktionspartner von ARKADIA 61

4.1.2 TRPS1 und ARKADIA interagieren in Hefen und Säugerzellen 62

4.2 Ubiquitinierung 64

4.2.1 ARKADIA inhibiert die TRPS1-vermittelte Repression 67

4.2.2 Bedeutung der posttranslationalen Modifikation von TRPS1 68

4.2.3 Bedeutung der Interaktion von TRPS1 mit ARKADIA 72

5 Zusammenfassung 74

6 Literaturverzeichnis 75

7 Anhang 91

1 Einleitung

Die Erbinformation jeder Zelle ist in der Basensequenz ihrer DNA gespeichert. Abschnitte, die für definierte Strukturen – meist Proteine – codieren, bezeichnet man als Gene. Nur ein sehr geringer Anteil wird ständig transkribiert und codiert meist für Moleküle und Enzyme des Intermediärstoffwechsels.

Der weitaus größere Teil des Genoms wird nur in einigen Zelltypen, in speziellen Stoffwechselsituationen oder während bestimmter Differenzierungsprozesse aktiv und kennzeichnet die Funktion einer Zelle. Um zu steuern, welche Gene zu welchem Zeitpunkt transkribiert werden, ist ein komplexes Regulationssystem aus spezifischen Aktivator- und Regulatorproteinen, Coaktivator-Komplexen, den basalen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase 2 erforderlich. Störungen innerhalb dieses Systems führen daher häufig zum Funktionsverlust bzw. Veränderungen in einer Zelle, die sich in Anomalien oder Erkrankungen widerspiegeln können.

In dieser Arbeit soll die Funktion des Transkriptionsfaktors TRPS1, dessen Mutationen das Tricho-Rhino-Phalangeale-Syndrom verursachen (Momeni et al., 2000), untersucht werden.

1.1 Das Tricho-Rhino-Phalangeale Syndrom Typ I, II und III

Das Trichorhinophalangeale Syndrom (TRP-Syndrom) wird durch Mutationen (oder die Deletion) des *TRPS1*-Gens und teilweise des *EXT1*-Gens verursacht (Momeni et al., 2000). Man unterscheidet heute drei Typen: Typ I (MIM 190350) Typ II (MIM 150230) und Typ III (MIM 190351)). Typ I und III werden autosomal dominant vererbt (Giedion et al., 1973); Typ II - als Gengruppensyndrom - entsteht meist sporadisch durch eine Deletion des *TRPS1*- und des *EXT1*-Gens (Lüdecke et al.,

2001). Gemeinsamkeiten aller drei Typen sind schütteres langsam wachsendes Kopfhaar, seitlich ausgedünnte Augenbrauen, eine knollige Nasenspitze, abstehende Ohren, eine schmale Oberlippe und ein langes flaches Philtrum (Abb. 1.1 a und b). Weitere typische skelettale Anomalien sind zapfenförmige Epiphysen (Abb. 1.1 c), welche wohl durch ein vorzeitiges Schließen der Epiphysenfugen entstehen und sich in einem verzögerten und geringeren Größenwachstum widerspiegeln (Felman und Frias, 1977), sowie Hüftfehlbildungen bei mehr als 70% der Patienten. Dieses Krankheitsbild, zuerst 1966 von Giedion beschrieben, wurde später TRPS Typ I genannt (Hall et al., 1974). Weisen die Patienten zusätzlich multiple kartilaginäre Exostosen und häufig auch eine mentale Retardierung auf (Langer, 1969; Yamamoto et al.1989; Hamers et al. 1990), spricht man vom TRPS Typ II oder dem Langer-Giedion-Syndrom. Eine schwerere Form der Wachstumsretardierung und Brachydaktylie, die sich in einer Verkürzung aller Phalangen und Metacarpalia zeigen (Kajii et al., 1994), sowie eine variable Ausprägung der typischen TRPS-Symptome kennzeichnen TRPS Typ III (Niikawa und Kamei, 1986). Als Ursache für diese besonders starke Ausprägung von TRPS konnten bis heute nur Missense-Mutationen im Exon 6, welche für den Bereich eines DNA-bindenden GATA-Zinkfingers codieren, gefunden werden (Malik et al., 2002; Rossi et al., 2007). Derzeit wird angenommen, das diese Art von Mutationen einen dominant-negativen Effekt haben (Lüdecke et al., 2001 und unpublizierte Daten).

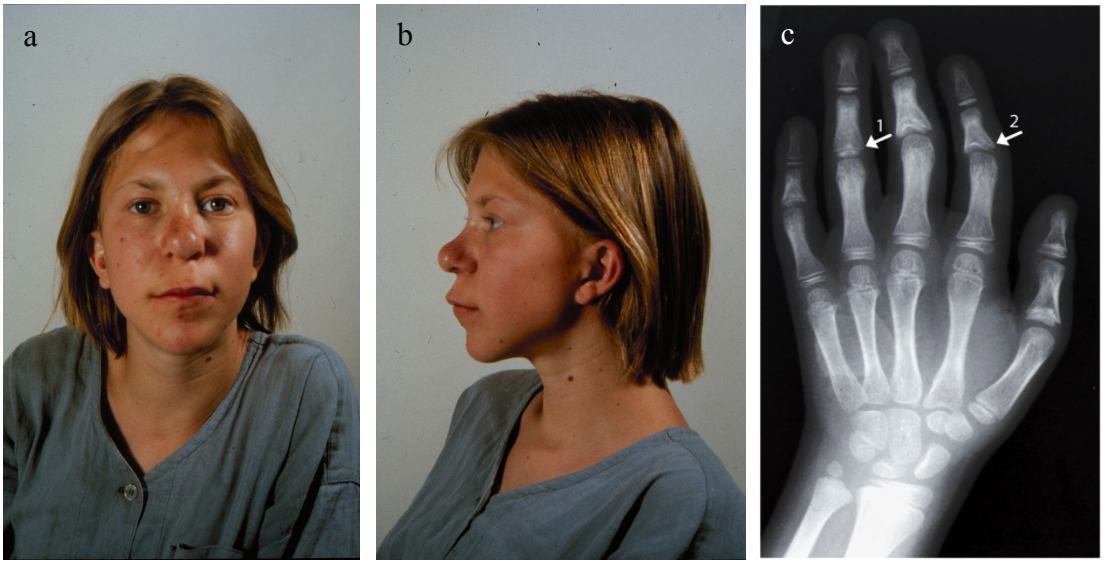

Abb. 1.1 TRPS-Phänotyp

Die abgebildete Patientin zeigt einige für das TRP-Syndrom typische Veränderungen, wie seitlich ausgedünnte Augenbrauen, eine knollige Nasenspitze, ein langes flaches Philtrum und eine schmale Oberlippe (a und b). Typische skelettale Anomalien sind Zapfenephiphysen, hier gezeigt in einem früheren (Pfeil 1) und einem späteren (Pfeil 2) Entwicklungsstadium (c).

1.2 Das *TRPS1*-Gen

Das *TRPS1*-Gen (*TRPS1*) liegt auf Chromosom 8 in der Region 8q24.1 und umfasst sieben Exons. Es codiert für einen 1281 Aminosäuren-großen Transkriptionsfaktor mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 141,58 kDa. TRPS1 ist durch eine bisher einzigartige Kombination von neun potentiellen Zinkfinger-Motiven vier verschiedener Typen gekennzeichnet (Abb. 1.3). Dabei weist der siebente Zinkfinger (Zf) große Übereinstimmungen mit der Gruppe der DNA-bindenden Zinkfinger der GATA-Transkriptionsfaktoren auf (Momeni et al. 2000; Malik, et al., 2001; Chang et al., 2002). Zf acht und neun zeigen Homologien zu den C-terminalen Doppelzinkfingern der Familie der IKAROS-Transkriptionsfaktoren. Dieses Doppel-Zf-Motiv vermittelt Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der IKAROS- Familie. Funktionelle Analysen zeigten, dass sie Teil einer Domäne von TRPS1 sind, die zur Transkriptionsrepressor-Funktion befähigt (Malik, et al., 2001; Kaiser et al., 2003a+b). Weiterhin weist der TF TRPS1 C-terminal zum GATA-Zinkfinger ein

Kernlokalisierungssignal auf. Dieses ermöglicht TRPS1 die Translokation in den Zellkern (Kaiser et al., 2004).

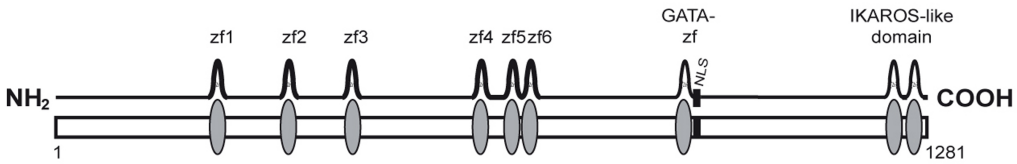

Abb. 1.2 Der Transkriptionsfaktor TRPS1

Das TRPS1-Protein umfasst 1281 Aminosäuren. Es enthält neun potentielle Zinkfinger-Motive (zf). Der GATA-Zf 7 wird C-terminal von einem potentiellen Kernlokalisierungssignal (NLS) flankiert. Am C-Terminus befindet sich der IKAROS-ähnliche Doppelzinkfinger (Zf 8 und 9).

1.3 Funktion des *TRPS1*-Gens

Die Funktion von *TRPS1* ist vor allem in den Geweben genauer erforscht, an denen sich die Symptome des TRP-Syndroms manifestieren, wie Knorpel, Knochen, der Haut mit ihren Anhangsorganen (Kunath et al., 2002; Fantauzzo et al., 2008a) und in der Niere (Gai et al., 2010, 2011). Daneben wurde die Regulation durch Androgene - besonders in Prostatazellen – und seine Funktion im Zusammenhang mit Malignomen untersucht.

So wurde bei Maus-*in-situ*-Hybridisierungen eine starke Expression während der Embryonalphase sowohl in visceralen als auch skelettalen Geweben beobachtet. Die Expression in den jeweiligen Geweben korrelierte dabei mit ihrer Beteiligung an dem TRP-Syndrom. Besonders stark wurde TRPS1 in Maxilla, Mandibula und Schnauze, Phalangen, Femurkopf und Hüfte (Malik et al., 2001) sowie in Mesenchymzellen von Haarfollikeln und Zellen der Dermis nachgewiesen (Kunath et al., 2002; Fantauzzo et al. 2008a). In Chondrozyten bzw. den Wachstumszonen von Knochen konnte gezeigt werden, dass TRPS1 dort an wichtigen Regelmechanismen der Differenzierung, Proliferation und Apoptose teilnimmt: so z.B. der *STAT3*-

Expression (Suemoto et al., 2007), der Parathormon-related-Peptid (PTHrP)-Transkription (Nishioka et al., 2008) sowie im Zusammenspiel mit GDF5, einem Wachstums- und Differenzierungsfaktor der Transforming-Growth-Factorβ(TGFβ)-Superfamilie (Itoh et al., 2008), den TF Runx2 (Napierala et al., 2005, 2008, 2011) und Gli3 (Wülling et al., 2009).

Daneben findet sich sowohl in Prostata- bzw. Prostata-Karzinomzellen als auch in Mammazellen eine starke Expression des *TRPS1*-Gens. Seine Regulation wurde bisher vor allem an Prostatazellen untersucht. Hierbei zeigte sich eine Androgen-abhängige Repression von TRPS1 - vermittelt durch den Androgenrezeptor - sowie eine erhöhte Expression nach Kastration, woraufhin einige Antioxidantien abnahmen und vermehrt Zellen in Apoptose gingen. Dies bestätigten auch Untersuchungen an Androgen-unabhängigen Prostata-Karzinomzellen. Das lässt vermuten, dass TRPS1 an oxidativem Stress und der Apoptose von Androgen-unabhängigen Prostata-Karzinom-Zellen beteiligt ist (Chang et al., 2000, 2002, 2004, 2007). An duktalen Mamma-Karzinom-Zellen zeigte sich eine starke Korrelation zwischen der TRPS1- und der Östrogen-, Progesteron-, HER2-Rezeptorexpression sowie einer höheren Überlebensrate, was TRPS1 zu einem aussagekräftigen prognostischen Marker machen könnte (Litton et al., 2008 ; Chen et al., 2010, 2011).

1.4 TRPS1 im Zusammenspiel mit spezifischen Bindeproteinen

Wie bereits beschrieben, ist an der Expressionskontrolle von Genen eine Vielzahl interagierender Proteine beteiligt. In der Verschiedenartigkeit ihres Zusammenspiels bieten sich daher zahlreiche Regulationsmöglichkeiten. Bezogen auf den Transkriptionsfaktor TRPS1 konnten bereits einige Proteine als Interaktionspartner nachgewiesen werden, die entweder dessen Funktion als Transkriptionsfaktor regulieren oder deren Funktion durch die Interaktion von TRPS1 moduliert wird.

1.4.1 LC8a und RNF 4 als Hemmer der TRPS1-Aktivität

Das Leichte Dynein Seitenkette-Protein 8 (LC8a) konnte als erster Bindepartner des Transkriptionsfaktors TRPS1 identifiziert werden (Kaiser et al., 2003a). Es ist auch unter den Namen DLC8 (Fan et al., 2001), Dlc-1 (Crépieux et al., 1997), hdlc1 (Dick et al., 1996) und PIN (Jaffrey und Snyder, 1996) bekannt. Bisher wurde dieses 89 Aminosäuren umfassende Protein vor allem mit verschiedenen zytoplasmatischen Transportprozessen in Verbindung gebracht (Rodriguez-Crespo et al., 1998; Epstein et al., 2000; Jacob et al., 2000; Raux et al., 2000; Alonso et al., 2001; Poisson et al., 2001; Wilson et al., 2001). Allerdings konnten auch schon einige nukleäre Interaktionen (Puthalakath et al., 1999; Yu et al., 2002) z.B. mit den Transkriptionsfaktoren NRF-1 und EWG (Herzig et al., 2000) nachgewiesen werden. Ferner ließen sich auch zwei Interaktions-Domänen für eine Bindung mit LC8a innerhalb von TRPS1 identifizieren und stabile Komplexe der beiden Proteine in eukaryotischen Zellen nachweisen. Funktionell bewirkte LC8a eine starke Abnahme der Repressionsaktivität von TRPS1. Daraus lässt sich eine verstärkte Expression der TRPS1-Zielgene vermuten, die wahrscheinlich an der Funktion von Chondrozyten und Haarfollikeln beteiligt sind (Kaiser et al., 2003a).

Das 194 aa große RING-Finger-Protein 4 (RNF-4) wurde ebenfalls als Interaktionspartner von TRPS1 in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System bestimmt (Kaiser et al., 2003b). Hierbei handelt es sich um ein in Menschen, Ratten und Mäusen hoch konserviertes Coregulator-Protein der Transkription und der Zellwachstumsregulation (Häkli, et al., 2005), dessen Ratten-Ortholog ursprünglich SNURF (small nuclear RING finger protein) (Moilanen et al., 1998) genannt wurde. Funktionell werden meist zwei Bereiche – der N- und der C-Terminus - unterschieden. In der N-terminalen Region befindet sich ein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal (NLS), weiter am C-Terminus liegt der namensgebende RINGfinger. Für jeweils beide Regionen sind bisher verschiedene Bindepartner bekannt. Die N-terminale Domäne assoziiert u.a. mit den Transkriptionsrepressoren Gscl (Galili et al., 2000), dem POZ-AT hook-zinc finger protein (PATZ) (Fedele et

al., 2000), mit Steroidrezeptoren (Moilanen et al., 1998; Hirvonen-Santti et al., 2004) sowie mit TRPS1. Der C-terminale RINGfinger ist zur Interaktion mit dem TATA-bindenden Protein, mit SPBP (Lyngsø et al., 2000) und Sp1 (Poukka et al., 2000) erforderlich. Weiterhin ist RNF4 in die Expression der GTP-Cyclohydrolase (GCH), des Schlüsselenzyms der Tetrahydrobiopterin-Synthese, einbezogen (Wu et al., 2004).

Von Häkli wies als erster die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von RNF4 nach, bei der es sich selbst E2-selektiv mono- oder polyubiquitiniert. Diese Funktion ist eng mit der Transkriptionsregulation verbunden (Häkli et al., 2004) und funktionell u.a. bei der Progression der akuten Promyelozyten-Leukämie von Bedeutung (Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Weisshaar et al., 2008).

In der Zusammenschau stellt sich RNF4 als ein wichtiges Protein für die Transkriptionsregulation unterschiedlicher Gene dar.

Bezogen auf den Transkriptionsfaktor TRPS1 war RNF4 in der Lage, dessen Repressionsaktivität komplett zu unterdrücken und somit als Cofaktor auf die GATA-vermittelte Transkription zu wirken.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen nukleären Lokalisation scheinen beide Proteine jedoch zum großen Teil an verschiedenen zellulären Prozessen teil zu haben. In wie fern das RINGfinger-Protein 4 in die Pathogenese der TRP-Syndrome einbezogen ist, bleibt aufgrund seiner weitgehend unbekannten Gewebeexpression weiterhin schwer zu fassen.

1.4.2 TRPS1 als Regulator von RUNX2 und GLI3

TRPS1 reguliert seinerseits die Aktivität der Transkriptionsfaktoren RUNX2 (Napierala et al., 2005, 2008, 2011) und GLI3 (Wülling et al., 2009).

RUNX2 gehört zur *RUNX*-Genfamilie von Transkriptionsfaktoren, die in die Gewebedifferenzierung während der Entwicklung und in die Entstehung von Krebs einbezogen ist. Die direkte Interaktion mit TRPS1 bewirkt eine Hemmung der RUNX2-Aktivität und es wird angenommen, dass eine ungenügende Repression der

RUNX2-vermittelten Transaktivierung durch eine Dysregulation der Chondrozyten im Perichondrium und eine beschleunigte Mineralisierung zu den skelettalen Dysplasien im TRP-Syndrom führt (Napierala et al., 2005, 2008, 2011).

GLI3 ist ein DNA-bindender Zinkfinger-TF der aus GLI1-3 bestehenden GLI-Familie. Mutationen im *GLI3*-Gen werden mit dem Greig-Cephalopolysyndaktylie-, dem Pallister-Hall-Syndrom, dem Akrocallosal-Syndrom, der Postaxialen Polydactylie Typ A und der Präaxialen Polydaktylie Typ 4 in Verbindung gebracht (Schinzel, 1979; Wild et al., 1997; Kalff-Suske et al. 1999; Radhakrishna et al., 1999; Elson et al., 2002; Johnston et al., 2005).

Das GLI3-Protein verändert seine Struktur und Funktion abhängig vom Hedgehog(Hh)-Signal: In Gegenwart des Signals liegt es in seiner vollen Länge und phosphoryliert vor und wirkt als Transkriptionsaktivator (GLI3A). In Abwesenheit des Hh-Signals ist es C-terminal trunkiert und agiert als Transkriptionsrepressor (GLI3R) der Hedgehog-Zielgene (Mo et al., 1997; Wang et al., 2000; Ahn und Joyner, 2004; Lei et al., 2004; Hilton et al., 2005; Pan und Wang 2007; Low et al., 2008). Beide Formen interagieren mit spezifischen Proteinen. Neben dem CREB-bindenden Protein und dem Mediator-Komplex ist TRPS1 eines der wenigen, das mit der Aktivator-Form von GLI3 interagiert (Zhou et al., 2006). An morphologischen Analysen von Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass TRPS1 in den verschiedenen Differenzierungsstadien unterschiedliche Funktionen erfüllt: In den distalen Zellen inhibiert es die GLI3A-Aktivität und trägt so zu der Erhaltung dieser Zellen bei. In den proliferierenden Zellen scheint TRPS1 die Aktivator-Form von GLI3 zur Geltung zu bringen und somit abhängig vom zellulären Kontext als Transkriptionsaktivator oder -repressor zu wirken, was sich auch in der Haarentwicklung zeigt (Fantauzzo et al., 2008b). Da TRPS1 und GLI3 überlappend in vielen Organen wie der Lunge, dem Mesenchym des Gastrointestinaltrakts, dem Nierenstroma, den Hoden und dem Gehirn (Kunath et al., 2002; Mullor and Ruiz i Altaba, 2002) exprimiert sind, wird vermutet, dass die Interaktion beider Proteine

auch die Entwicklung anderer Organe entscheidend beeinflusst (Wülling et al., 2009).

1.4.3 Posttranslationale Modifikation von TRPS1

Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Regulation der Funktion von Proteinen ist deren posttranslationale Modifikation. Besonders gut untersucht sind solche Arten der chemischen Modifikation von Proteinen beispielsweise bei der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren. Darüber hinaus ist in den letzten Jahren die kovalente Verbindung mit einem Polypeptid wie Ubiquitin, einem kleinen ubiquitär exprimierten Protein, oder den Ubiquitin-ähnlichen Proteinen (Jentsch und Pyrowolakis, 2000; Yeh et al., 2000) NEDD8, ISG15, FAT10, APG12 und dem Small Ubiquitin Related Modifier (SUMO)(Goettsch und Bayer, 2002) von großem Interesse. Sie alle haben eine ähnliche dreidimensionale Struktur und werden kovalent an Lysinreste ihrer Substrate gebunden (Weissman, 2001; Hecker und Dikic, 2006). Dieser Prozess wird von drei Enzymen katalysiert: dem Aktivierungsenzym (E1)(Johnson et al., 1997), dem Konjugierungsenzym (E2)(Johnson und Blobel, 1997) und der Ubiquitinligase (E3)(Johnson und Gupta, 2001; Kahyo et al., 2001; Sachdev et al., 2001; Schmidt und Muller, 2002).

SUMO ist das zurzeit am besten charakterisierte Ubiquitin-ähnliche Protein (Hecker und Dikic, 2006) und nimmt die Funktion eines Schlüsselregulators für nukleäre und zytoplasmatische Proteine ein (Martin et al., 2007; Zhao, 2007): Es verändert die Aktivität, Stabilität (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Kaiser et al., 2007) und Funktion seiner Substrate, indem es ihre intrazelluläre Lage, ihre Protein- und DNA-Interaktionen verändert oder eine Ubiquitinierungsstelle blockiert (Johnson, 2004; Martin et al., 2007; Zhao, 2007; Takahashi et al., 2008;). Dadurch spielt die SUMOylierung eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen zur Regulation der Genexpression (Gill 2003; Ouyang et al., 2009), der Genom- und Chromosomen-Stabilität, -Integrität und -Struktur, der RNA-Prozessierung (Gocke et al., 2005) sowie der Signaltransduktion (Zhao, 2007). Die SUMOylierung ist ein hoch

dynamischer Prozess, der in Wechselwirkung mit intra- und extrazellulären Stimuli und mit pathogenen Veränderungen steht.

Eine ausbalancierte SUMOylierung ist somit für einen normalen Zellablauf notwendig (Zhao, 2007), und eine veränderte Aktivität des SUMOylierungssystems ist mit Krebs und Inflammation assoziiert (Liu und Shuai, 2008).

SUMO wurde bereits als Expressionsregulator und Bindepartner für unterschiedlichste Proteine identifiziert, so u.a. HSF1 und 2, β-catenin-activated factor Tcf-4 (Hong et al., 2001; Hietakangas et al., 2003; Yamamoto et al., 2003), die IKAROS-Proteine (Gomez-del Arco et al., 2005), Elk-1, Sp-3, SREBPs, STAT-1, SRF, c-myb, C/EBPs, den Androgenrezeptor und p 300 (Bies et al., 2002; Kim et al., 2002; Ross et al., 2002; Sapetschnig et al., 2002; Hirano et al., 2003; Ungureanu et al., 2003; Yang et al., 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor TRPS1 durch das Ubiquitin-Konjugationsenzym 9 (UBC9) mit E2-Funktion an mehreren Akzeptorstellen mit SUMO modifiziert wird. Eine Überexpression des SUMO-Wildtyp-Proteins führte zu einer Verstärkung der GATA-vermittelten Transkriptionsrepression von TRPS1.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SUMOylierung die erste verifizierte posttranslationale Modifizierung von TRPS1 ist. In wie weit SUMO die Transkriptionsaktivität von TRPS1 auch durch einen anderen Mechanismus als den der direkten Modifikation beeinflusst und in wie weit andere Protein-Interaktionen dabei von Bedeutung sind, wird sich in zukünftigen Studien erweisen.

1.5 Zielsetzung/Aufgabenstellung

Eine weitere mögliche – bisher nicht verifizierte – posttranslationale Modifizierung von TRPS1 ist die Ubiquitinierung. Hinweise darauf ergeben sich aus einem Yeast-two-Hybrid-Screen des TRPS1-Transkriptionsfaktors, in dem, neben der bereits beschriebenen Ubiquitin-E3-Ligase RNF4, das ARKADIA-Protein als möglicher TRPS1-Bindepartner identifiziert wurde. ARKADIA ist ebenfalls eine E3-Ligase, die u.a. die Polyubiquitinierung und proteasomale Degradation von SMAD7 – einer wichtigen Komponente des TGFβ-Signalwegs - induziert. Ob diese Funktion auch für die Regulation des TRPS1-Proteins von Bedeutung ist, stellt einen Hauptteil dieser Arbeit dar. Zunächst soll die Binderegion innerhalb beider Proteine eingegrenzt werden. Anschließend verifizieren wir die in den Hefen gefundenen Interaktionen in Säugerzellen und analysieren ihre funktionelle Relevanz.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme, Größenmarker, Vektoren, Kits, Geräte und Verbrauchsmittel, Lösungen

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co
Alpha-D-Glukose	Merck
Ammoniumpersulphat	Carl Roth GmbH & Co
Beta-Galaktosidase	SIGMA
Beta-Mercaptoethanol	Merck
Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform	Merck
Comassie R250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	Invitrogen, USA
DTT	Merck kGaA, Germany
EDTA	Invitrogen, USA
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ficoll	GE Healthcare Biosciences AB, Chalfont St. Giles
FKS (Fetales Rinderserum	Invitrogen, USA
Glycerin	Sigma
Kaliumacetat	Sigma
KCl	Fluka BioChemika GmbH
KH2PO4	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver	Merck KGaA
Na2HPO4	FLUKA BioChemika
NaCl	Merck
NaHCO3	Fluka BioChemika GmbH
NaOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ONPG	Sigma
Sorbitol	Aldrich
Tris-Acetat	MP Biomedicals

Tris-Borat	MP Biomedicals
Tris-HCl	MP Biomedicals
Pepton	Life Technologies
Yeast-Nitrogenbase w/o aa	Becton, Dickinson and Company Sparks
X-gal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Lactacystin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
-Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Solution Supplement	Clontech, USA
FuGENE HD Transfection Reagent	Roche
Gene Pulser Electroporation Buffer	Bio-Rad, Hercules
Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche
Lipofectamine2000	Invitrogen
Protein G PLUS/ Protein A-Agar Suspension	Calbiochem

2.1.2 Enzyme

BamHI	New England Biolabs (NEB)
EcoRI	New England Biolabs
Expand Lang Range, dNTPaco	Roche
GC RICH PCR System	Roche
Hind III	NEB
KpnI	Roche
NcoI	NEB
NotI	NEB
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen
SacI	NEB
SalI	NEB
T4- Ligase	Roche
XbaI	NEB
XhoI	NEB

2.1.3 Größenmarker

DNA-Größenmarker: HyperLadder I 200-10000 bp	Bioline
Protein-Größenmarker: vorgefärbter SDS-PAGE Standard PageRuler, 10-250 kDa	Fermentas
Hundert-Basenpaar-Leiter	Lab AidTMGene Ruler TM (Fermentas)

2.1.4 Software

DNAStar	Lasergene,
Sequencher	Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA
Sequencing Analysis	Applied Biosystems

2.1.5 Vektoren/bakterielle und eukaryotische Expressionsplasmide

pEGFP-N3	eukaryotischer Expressions-Vektor; CMV-Promotor reguliert die Expression der inserierten Konstrukte, die 3' mit der codierenden Region des GFP-Proteins gekoppelt sind; enthält einen Kanamycin-Resistenz-Marker und die SV40-poly(A)-Sequenz (Clontech)
pGADT7 (Prey)	enthält eine GAL4-aktivierende Domäne und eine SV40-Kern-Lokalisierungs-Sequenz; als Selektionsmarker in E.coli dient Ampicillin, in S.cerevisiae LEU2.
pGBKT7 (Bait)	enthält eine GAL4-DNA-bindende Domäne; als Selektionsmarker in E.coli dient Kanamycin, in S.cerevisiae TRP1
pGEM®-T Easy-Vektor	lac-Operon, lacZ-Gen zur α-Komplementation, Ampicillin-Resistenz-Marker, TA-Cloning
pcDNA3.1/myc-His	CMV-Promotor; Neomycin-Resistenz-Gen; SV40-Polyadenylierungssignal; myc-Epitop

pFLAG-N3	modifizierter pEGFP-N3-Vektor; die für GFP codierende Region ist gegen die für das Flag-Peptid codierende Region ausgetauscht
αD3	Reporterplasmid; enthält multiple AGATAA- Sequenzen stromaufwärts zum Luciferase-Gen
XGATA4	codiert für den XGATA4-Transkriptionsfaktor unter Kontrolle des CMV-Promoters

2.1.6 Antikörper

Bezeichnung	Quelle
Ig für Immunfluoreszenz Rhodamin-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper	Molecular Probes
anti-TRPS1	Eurogentec
anti-FLAG (M2 anti-FLAG)	Sigma-Aldrich
anti-myc	Roche
Sekundärantikörper Anti-Maus	USB
Sekundärantikörper Anti-Kaninchen	USB
Anti-GAL4-AD-Antikörper	Santa Cruz
Anti-GAL4-DBD-Antikörper	Santa Cruz

2.1.7 Kits

Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega
pGEM t-easy cloning	Promega
Plasmid MIDI Prep.	Promega
QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kits	Stratagene
MinElute Gel Extraction Kit	QIAGEN
PrismTM BigdyeTM TerminatorCycle ReadyReactionKit	Applied Biosystems (Life Technologies)

2.1.8 Geräte und weitere Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
50 ml Gefäße	Greiner
96 half area well Platten	Corning
Elektroporator GenePulser Xcell	Bio-Rad, Hercules
Gelkammern Hoefer 99x	bezogen über: Amersham Biosciences
Inkubatorschränke Bakterien	Heraeus
Inkubatorschränke Zellen	Köttermann
Inkubatorschränke Hefe	Heraeus
PCR Cycler UnoII	Biometra
PCR Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems
Petrischale	Nunc
Rührfischplatte	Fischer Bioblock Scientific
Schüttelinkubator Bakterien inova 4300	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator Hefe	Heraeus
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Transilluminator Chroma 43	Vetter GmbH
Vortex Top Mixer	Fischer Bioblock Scientific
Wasserbad	GFL / Köttermann
Westernblot SemiDry Trans-Blot SD	Bio-Rad, Hercules
Westernblot Spannungquelle PowerPac basic	Bio-Rad, Hercules
Zellkulturschalen	Nunc
Omnifuge 2.0RS	Heraeus Sepatech
Zentrifuge, gekühlt, MikrorapidK	Hettich
Biofuge 93	Heraeus
Centrifuge 5415D	Eppendorf
Luminometer GeniosPro	Tecan
Große Fuge Avanti J-30I	Beckmann Coulter
Helios Omega UV-VIS Photometer	Thermo Scientific

2.2 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Prozentangaben bei Flüssigkeiten auf v/v und bei Feststoffen auf w/v.

10x DNA-Probenpuffer:	15 % 0,25 % 10 mM	Ficoll 400 Bromphenolblau EDTA (pH 8,0)
TBE:	50 mM 4 mM	Tris-Borat (pH 8,3) EDTA
TE:	10 mM 1 mM	Tris-HCl (pH von 7,5- 8,0) EDTA
PBS:	137 mM 2,6 mM 6,5 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na2HPO4 KH2PO4 pH 7,3 einstellen

2.3 Arbeiten mit DNA

2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde angewendet, um definierte DNA-Fragmente zur Insertion in verschiedene Vektoren zu erzeugen. Einem 50 µl Ansatz wurden als Template 10-100 ng Plasmid DNA hinzugefügt. Weiterhin enthielt der Ansatz 1,5 µl AmpliTaq-Polymerase, je 0,5-2,5 µl eines 5´ und eines 3´Oligodesoxynukleotids (Primer), 2 µl dNTP-Mix und 5 µl Reaktionspuffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,001 % Gelatine).

Der Ansatz wurde initial für 2,5 Min. auf 95 °C erhitzt. Danach durchlief der Ansatz folgendes PCR-Programm:

Denaturierung	30 Sekunden 95 °C
Primer-Anlagerung	30 Sekunden 55 °C
Polymerase-Reaktion	30 s - 3 Minuten 72 °C

Die Anzahl der Zyklen betrug 35. Im Anschluss an die Zyklen folgte eine finale Elongation von 5 Min. Dauer bei 72 °C und ein Herunterkühlen auf 4°C.
Um größere DNA-Fragmente von bis zu 5 kb Länge herzustellen, wurden die Polymerasen „High Fidelity“ und „Expand Long Range“ verwendet und die Reaktionsbedingungen den Herstellerangaben angepasst.
Primersequenzen (im Anhang)

2.3.2 *In vitro* Synthese von spezifischen Mutationen

Für einige funktionelle Analysen wurden unter Verwendung des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) spezifische Mutanten hergestellt. Das hier verwendete *in vitro* System beruht auf der Verwendung spezifisch veränderter Primer in der PCR. Als Vorlage dient hierbei ein Plasmid welches die zu mutierende Sequenz enthält. Kompetente Bakterien werden nach der methylierungssensitiven Verdauung der Matrize mittels *Dpn*I direkt mit dem zirkulären PCR-Produkt, das zwei Einzelstrangbrüchen enthält, transformiert. Diese Brüche werden im Bakterium repariert. Die Parameter der PCR waren wie folgt:

Erhitzen	1 Minute 95°C
Denaturierung	30 Sekunden 95 °C
Primer-Anlagerung	1 Minute 55 °C
Polymerase-Reaktion	7 Minuten 68 °C

Für Basensubstitutionen wurden Primer von 20-35 bp Länge verwendet, die im mittleren Teil die gewünschte Substitution aufwiesen. Um einzelne Bereiche zu deletieren, wurden Primer verwendet, die an die zu deletierende Region angrenzen. Der 3' liegende Primer wurde am 5'-Ende mit einem Phosphat-Rest gekoppelt. Dieses Phosphat wird von der T4-Ligase benötigt, um aus dem linearen ein zirkuläres DNA-Fragment generieren zu können.

2.3.3 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonuklease

Für analytische und präparative Zwecke wurde Plasmid-DNA im Verhältnis 1 µg DNA zu 20 U Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer in 15 bis 100 µl Gesamtvolumen für 1-20 Std. bei 37°C oder einer anderen - für die jeweilige Restriktionsendonuklease spezifische – Temperatur verdaut. Die verwendete Menge an Restriktionsendonuklease wurde dem Maßstab der Reaktion angepasst, überschritt jedoch nie einen Anteil von 10 % des Gesamtvolumens. Hierdurch wurde sichergestellt, dass eine zu hohe Glycerinkonzentration nicht die Enzymaktivität hemmte.

2.3.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR- und Restriktionsansätzen

2.3.4.1 Microcon /Filterzentrifugation

Zur schnellen und möglichst verlustarmen Aufreinigung und Konzentration von DNA wurde eine Microcon Filterzentrifugation verwendet. Die verwendete Filtergröße entfernt sämtliche Oligonukleotide mit weniger als 300 bp.

Hierbei wurden die DNA enthaltenden Ansätze in mitgelieferte Zentrifugations-Gefäße mit speziellen Filtermembraneinsätzen überführt und mit destilliertem Wasser (A.d.) auf 500 µl aufgefüllt. Daran schloss sich eine Zentrifugation von 500g für 15 Min. an. Die Flüssigkeit wurde verworfen und der Reinigungsvorgang unter gleichen Bedingungen wiederholt. Anschließend wurde der Filtereinsatz umgedreht und auf ein neues Gefäß gesteckt. Die gereinigte DNA konnte nun für 3 Min. bei 500g aus der Membran zentrifugiert und aufgefangen werden. Fand sich nach diesem Schritt nur ein geringes Volumen A.d. mit DNA, wurden 20 µl A.d. auf der Rückseite der Membran aufgetragen und die Zentrifugation wiederholt.

2.3.4.2 Gelextraktion nach dem MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)

DNA-Fragmente von 70 bp - 4 kb Länge wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel mittels eines Skalpells unter UV-Licht aus dem

Gel geschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Aufreinigung wurde das MinElute Gel Extraction Kit verwendet. Pro Säule können 400 mg Agarosegel aufgearbeitet werden. Das jeweilige Gelfragment, das bis zu 2% Agarose enthalten durfte, wurde mit einem dreifachen Volumen an Puffer QC versetzt und das Gemisch bei 50°C für 10 Min. in einem Schüttelinkubator inkubiert. Der Lösung wurde anschließend ein Gelvolumen Isopropanol zugesetzt und der Ansatz nach leichtem Schwenken auf eine QIAquick Säule überführt. Nach 1 min. Zentrifugation bei 10000g wurden der Überstand verworfen, weitere 500 µl Puffer QC auf die Säule gegeben und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde mit 750 µl PE-Puffer gewaschen (1 Min., 10000g) und der Überstand entfernt. Es schloss sich eine abschließende Zentrifugation von 2 Min. an. Dann wurde die Säule für 1-3 Min. offen stehen gelassen und danach in ein neues 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß gesteckt. Nach Zugabe von 10 µl A.d. in die Mitte der Membran und einer Inkubation von 2 Min. wurde der Extrakt durch eine weitere Zentrifugation (2 Min., 10000 g) eluiert.

2.3.5 Ligation

In einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 10-20 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen Überschuss an DNA-Fragment versetzt. Der Ansatz wurde in Gegenwart von 1 µl T4-DNA-Ligase (Roche) 1-2 Std. bei Raumtemperatur (RT) und dann weiter bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden je nach ihrer Länge in 0,8 – 2 %igen Agarosegelen der Größe nach aufgetrennt. Zur Herstellung dieser Gele wurde die Agarose in TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE. Den DNA-Proben wurde 10-fach konzentrierter DNA-Probenpuffer zugegeben. Dann erfolgte die Auftrennung bei 100 – 130 V. Durch das in die DNA interkalierende EtBr konnte die DNA anschließend auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von $\lambda = 302$ nm sichtbar gemacht

werden und zur Kontrolle ihre spezifische Größe anhand von Größenstandards ermittelt werden.

2.3.7 Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präp)

Die durch eine Einzelkolonie (*E.coli* Stamm DH5α) in LB-Medium (+ Ampicillin oder Kanamycin) angeimpften Übernachtkulturen (37°C) wurden sedimentiert (1 Min., 2500g), das Pellet in 300 µl P1 Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 300 µl P2 lysiert. Nach zweiminütiger Inkubation führte das Versetzen mit 300 µl P3 zur Fällung der Protein-Komplexe. Nach einer Zentrifugation (15 Min., mind. 10000g, 4°C) wurde der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500 µl 100 %igem Ethanol versetzt und das DNA-Präzipitat sedimentiert (20 Min., mind. 10000g). Das Pellet wurde in 300 µl 70 %igem Ethanol (7/10 des Volumen) gewaschen, der Überstand verworfen, das Sediment getrocknet und in 12-20 µl A.d. aufgenommen.

Puffer P1:	10 mM 50 mM 100 µg/ml	EDTA Tris-HCl, pH 8,0 RNaseA
Puffer P2:	0,2 M 1 %	NaOH SDS
Puffer P3:	3 M	Kaliumacetat mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen

2.3.8 Präparative Plasmid-Isolierung (QIAGEN-System) (Midi-Präp)

Zur Gewinnung größerer Mengen gereinigter Plasmid-DNA wurde das „QIAfilter Plasmid Purification Kit“ (QIAGEN) verwendet. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium mit 100 µl eines mit dem Resistenzmarker der Plasmide konformen Antibiotikums versetzt und mit einer Über-Nacht-Kultur eines Bakterienklons angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C und 260 UpM im Schüttelinkubator wurde die Bakteriensuspension sedimentiert (15 Min., 2500g, RT) und die Plasmid-DNA nach

Angaben des Herstellers über Ionenaustauscher-Säulen aufgereinigt. Die erhaltene DNA wurde je nach Menge in 20 – 100 µl H_2O aufgenommen.

2.3.9 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung

Sofern es die weiteren Versuche erforderten, wurde die genaue Konzentration der DNA in Lösungen in einer Nano-Küvette photometrisch (Helios Omega UV-VIS Photometer) bestimmt.

2.3.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mit dem *Prism*^{TM} *Bigdye*^{TM} *TerminatorCycle ReadyReactionKit* durchgeführt. Einer 10 µl Sequenzierreaktion wurden 4 µl Terminator Ready Reaction Mix BigDye, 300 – 500 ng Plasmid-DNA als Matrize und 5 pmol des jeweiligen Primers zugesetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte nach folgenden Parametern:

Einer initialen Denaturierung von 15 Sek. bei 94°C schlossen sich 35 Zyklen aus je 15 Sek. Denaturierung bei 95°C, 15 Sek. Annealing und 30 sec Elongation bei 72°C an. Abschließend erfolgte eine verlängerte Syntheseperiode von 7 Min. bei 72 °C.

Die Sequenzierreaktion wurde mit 90 µl H_2O, 2 µl Dextranblau (20 mg/ml) und 10 µl Natriumacetat (3 M) und 250 µl Ethanol versetzt und gevortext. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zentrifugation (15 Min. bei mind. 10000 g). Die gefällten DNA Fragmente wurden zweimal mit jeweils 300 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und anschließend im Dunkeln getrocknet. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm „DNAStar“ (Lasergene) oder mit „Sequencher“ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

2.4 Bakterien

2.4.1 Bakterienstamm

E.coliDH5α:	F', endA1, hsdR17, (rk-mk+), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nalr), relA1, D(lacIZYA-argF), U169, deoR, (f80dlacD(lacZ)M15)

2.4.2 Bakterienmedien

LB-Medium:	1 % 1 % 0,5 %	NaCl Bacto-Tryptone Hefe-Extrakt pH 7,5 mit NaOH einstellen
LB-Agar:	15 g/l	Bacto-Agar in LB-Medium

Ampicillin:	Endkonzentration 100 µg/ml
Kanamycin:	Endkonzentration 35 µg/ml

2.4.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterienzellen, die DNA aus der sie umgebenden Lösung aufnehmen können (kompetente Zellen), wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode (Maniatis *et al.,* 1982) hergestellt. Hierbei wurde eine Bakterienkolonie des *E. coli*-Stamms DH5α in 10 ml φa-Medium (für 1 Liter: 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Bacto-Trypton, 5 g $MgSO_4$, pH 7,6 mit KOH eingestellt) bei 37°C und 250 rpm bis zum Erreichen einer OD_{550} von 0,3 inkubiert. Von der Kultur wurden 5 ml in 100 φa-Medium überführt und bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{550} von 0,48 wurden je 25 ml der Kultur in vorgekühlte 50 ml-Gefäße überführt, die Zellen für 15 Min. bei 1250g und 4°C sedimentiert und das Sediment vorsichtig in 10 ml kaltem TbfI-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM $RbCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 50 mM $MnCl_2$, 15 % Glycerin, pH 5,8 (mit 0,2 M HAc eingestellt))

resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 Min. auf Eis wurden die Zellen erneut sedimentiert (15 Min. bei 1250 g und 4°C) und das Sediment in 1 ml kalten TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM $RbCl_2$) aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde in 100 µl Aliquots in eiskalte Eppendorfgefäße gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.4 Transformation kompetenter Bakterien

5 µl eines Ligationsansatzes oder 0,1 – 10 ng Plasmid-DNA wurden mit 50 µl einer aufgetauten Suspension kompetenter Bakterien gemischt und 10 Min. in einem eisgekühlten Gefäß (Greiner Röhrchen) auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein so genannter Hitzeschock von 2 Min. bei 42°C im Wasserbad. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium wurde der Ansatz 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert (225 UpM). Entsprechend dem Selektionsmarker des Plasmids wurden die Bakterien auf den - mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzten - LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.5 Hefen

2.5.1 Hefestamm

AH109: System: GAL4 2H-3

Genotyp: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ,
LYS2:: $GAL1_{UAS}$-$GAL1_{TATA}$-HIS3, MEL1
$GAL2_{UAS}$-$GAL2_{TATA}$-ADE2, URA3::$MEL1_{UAS}$-$MEL1_{TATA}$-lacZ

Reporter: HIS3, ADE2, lacZ, MEL1

2.5.2 Hefemedien

2.5.2.1 Vollmedium

YPD:	10 g 20 g	Hefe-Extrakt Pepton

	20 g	a-D-Glukose
bei Platten: +	20 g/l	Agar

2.5.2.2 Mangelmedien

SD-Medium:	6,7 g	Yeast nitrogen base ohne AA
	850 ml	A.d.
bei Platten: +	20 g/l	Agar
		autoklavieren
	50 ml	der jeweiligen Dropoutsolution (je nachdem -leu und -trp oder – ade und - his, /Stamm-Lsg.: 5 mg/ml)
	25 ml	a-D-Glukose (40 %)

Es wurden 20 ml Aminosäuren-Mix pro Liter Mangelmedium zugegeben.

Aminosäuren-Mix:	10 ml	L-Arginin (HCl), 0,24 g/100 ml
	50 ml	L-Aspartat, 1,2 g/100 ml
	50 ml	L-Glutamat, 1,2 g/100 ml
	20 ml	L-Isoleucin, 0,24 g/100 ml
	25 ml	L-Phenylalanin, 0,6 g/100 ml
	25 ml	L-Serin, 4,5 g/100 ml
	25 ml	L-Threonin, 2,4 g/100 ml
	100 ml	L-Tyrosin, 0,18 g/100 ml
	25 ml	L-Valin, 1,8 g/100 ml
	10 ml	L-Methionin, 0,24 g/100 ml (nicht bei Plasmiden mit MET25-Promotor)

ad 400 ml A.d. und durch 0,2 µm Filter steril filtriert

2.5.3 Transformation von Hefezellen

Hefezellen wurden nach der Lithium-Acetat-Methode chemisch transformiert. Dabei wurde eine 3 ml-Vorkultur in 50 ml Medium gegeben und bei 250 UpM und 30°C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,4 – 0,6 (meist nach 4-5 Std.) inkubiert. Die Zellen wurden durch 5 Min. Zentrifugation bei 1500g sedimentiert, unter gleichen Bedingungen in 20 ml sterilem Wasser gewaschen, anschließend in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Darauf folgend wurden

die Zellen in 1 ml frisch angesetztem TE/LiAc-Puffer (0,1 M LiAc (pH 7,5), 0,01 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,001 M EDTA) gewaschen und resuspendiert. 50 µl der Hefe-Suspension wurden mit 1 µg der zu transformierenden DNA und 50 µg einzelsträngiger Lachs-DNA als Carrier-DNA versetzt. Nach Zugabe von 300 µl 40 %-igem PEG 4000 (in TE/LiAc-Puffer) wurde das Gemisch für 30 Min. bei 30°C inkubiert und nach einer Hitzeschockbehandlung (42°C, 15 Min.) auf entsprechenden Agar-Platten ausplattiert.

2.5.4 Gewinnung von Hefeextrakten (Schnelltest)

Zur Gewinnung eines Proteinextraktes aus Hefen zur Expressionskontrolle wurde eine 3 ml-Mangel-Medium-Kultur angeimpft und bei Erreichen einer OD_{600} von 0,3 sedimentiert (2500 g, 5 Min.). Das Pellet wurde in 200 µl 4x SDS-Probenpuffer resuspendiert, bei -80°C eingefroren und bei 30°C aufgetaut. Nach einer Präzipitierung der Festbestandteile (10000 g, 5 Min.) wurden aus dem Überstand 20 µl durch SDS-PAGE analysiert.

2.5.5 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Grundlage dieses Systems (Fields und Song, 1989) ist der *GAL4*-Transkriptionsfaktor aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Dieser besteht im Wesentlichen aus zwei Struktur- bzw. Funktionsdomänen, nämlich einer DNA-bindenden (DBD) und einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD). Sie liegen getrennt in je einem Expressionsplasmid (DBD in pGBKT7/*bait* und AD in pGADT7/*prey*) und wurden mit den zu analysierenden Proteinen fusioniert. Das DBD-Fusionsprotein bindet an eine spezifische Upstream-Aktivatorsequenz (UAS) innerhalb eines Promoters vor einem Reportergen (hier: *ADE2, HIS3, LACZ*). Diese Bindung des Proteins an die DNA ist notwendig, aber nicht hinreichend für seine Funktion. Sollte das AD-Fusionsprotein nun mit dem DBD-Fusionsprotein interagieren, kommt es zu einer funktionellen Komplettierung des GAL4-Tanskriptionsfaktors, so dass dieser mit dem basalen Transkriptionsapparat interagiert und die Transkription der entsprechenden Reportergene initiiert.

In den hier aufgeführten Analysen wurden ARKADIA-Fragmente in pGBKT7 (*bait*) und TRPS1-Fragmente in pGADT7 (*prey*) inseriert. Mit diesen GAL4-Fusionskonstrukten wurden Hefezellen des Stamms AH109 transformiert und gemäß des modifizierten Protokolls von Gietz et al. mit jeweils 200 µl einer Hefezellsuspension auf zweifach selektiven (ohne Leucin und Tryptophan) mit YPD-Agar versehenen Zellkulturschalen (Platten) ausplattiert.
Nach dem Wachsen von Zellkolonien und einigen Tagen der Inkubation (30°C) wurden acht einzelne Klone auf eine weitere zweifach selektive Platte (ohne Leucin und Tryptophan) übertragen und diese dann auf eine vierfach negative (ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin) überimpft. Wuchsen die Hefezellen auf diesen Nährböden, war sowohl die Cotransformation der Hefezellen mit beiden GAL4-Fusionsplasmiden erfolgreich als auch eine Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen bestätigt.

2.5.6 β-Galaktosidase Hefe-*in vivo*-Assay

Für eine weitere semiquantitative Beurteilung der Bindungsfähigkeit zwischen Köder- und Beute-Fusionsplasmiden wurden im Anschluss β-Galaktosidase-Versuche nach dem Matchmaker 3-Handbuch von Clontech durchgeführt. Hierfür wurde erneut der Hefestamm AH109 verwendet. Dieser beinhaltet ein im Genom integriertes *LACZ*-Gen, welches von einem minimalen GAL4-Promoter, der mit multiplen GAL4-Bindestellen fusioniert ist, reguliert wird.
Die Hefen wurden mit den trunkierten, in den pGADT-Vektor (*prey*) inserierten, TRPS-Fragmenten und den, mit dem pGBKT7 (*bait*)-Vektor fusionierten, ARKADIA-Fragmenten transfiziert und auf SD-Platten ausplattiert.
Von den gewachsenen Zellkolonien wurden in 5 ml Zweifach-SD-Mangelmedium (-trp/-leu) Flüssigkulturen angeimpft und für ca. 3 Tage im Schüttelinkubator kultiviert.

Außerdem wurde die Expression mittels Westernblot und anti-GAL4-DNA-bindender-Domäne(DBD)-Antikörpern sowie anti-GAL4-Aktivierungsdomäne(AD)-Antikörpern nachgewiesen.

Am Tag des Experiments wurde ONPG in Z-Puffer bei einer Konzentration von 4 mg/ml für 1-2 Stunden bei 4°C und Über-Kopf-Rotation vorgelöst. Von den 3-Tage-SD-Flüssigkulturen wurde nach gründlichem Vortexen 1 ml in 4 ml YPD-(Voll-) Medium überführt und dies für 4 - 5 Stunden bei 30°C unter Schütteln (230-250 UpM) inkubiert.

Dann wurde von 1 ml jeder Flüssigkultur die OD_{600} bestimmt. Je zwei weitere 1,5 ml-Aliquots zentrifugierten 30 Sek. bei 10000g. Sorgfältig wurde der Überstand abgenommen und je 1,5 ml Z-Puffer auf das Sediment gegeben. Dieser Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und dann 300 µl Z-Puffer zugefügt.

Von jedem Ansatz wurden nun 100 µl-Aliquots in neue Reaktionsgefäße überführt und diese jeweils fünfmal abwechselnd zum Einfrieren in Flüssigstickstoff (30-60 Sek.) und zum Auftauen in ein 37°C-warmes Wasserbad (30-60 Sek.) gegeben, um die Hefezellen zu zerstören.

Alle Reaktionsgefäße wurden nun mit 700 µl Z-Puffer (mit Mercaptoethanol) versehen, die Zeit gestoppt und sofort je 160 µl der in Z-Puffer gelösten ONPG zugefügt. Diese wird durch die ß-Galaktosidase der Hefezellen in einen gelben Farbstoff umgesetzt, der colorimetrisch (OD_{420}) nachgewiesen werden kann.

Die weitere Inkubation fand bei 30°C über mehrere Stunden unter regelmäßiger Sichtkontrolle der sich entwickelnden Gelbfärbung statt. Als einige der Ansätze eine kräftige Farbe annahmen, wurde die Enzymreaktion mit je 400 µl $NaCO_3$ gestoppt und 10 Min. bei mind. 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Küvetten gegeben und die optische Dichte der Ansätze bestimmt. Die Kalibrierung des Photometers erfolgte mit einem Blindansatz ohne Hefezellen.

Nach folgender Gleichung wurde die Enzymaktivität der ß-Galaktosidase berechnet:

$$\text{Aktivität (U)} = \frac{1000 \times OD_{420}}{OD_{600} \times V \times t}$$

wobei: t = Reaktionszeit (Min)

V = 0,1 (ml) x Konzentrationsfaktor 5

$OD_{600} = A_{600}$ von 1 ml der Kultur

Z-Puffer:	16,1 g7L	$NaH_2PO_4 \times 7\ H_2O$
	5,5 g/L	$Na_2HPO_4 \times H_2O$
	0,75 g/L	KCl
	0,246 g/L	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$
	0,27 ml	β-Mercaptoethanol pro 100ml Z-Puffer, auf pH 7,0 einstellen und zugefügt, wenn oben angegeben
ONPG:	4 mg/ml	o-Nitrophenol Galaktose in Z-Puffer, pH 7,0 sterilfiltriert und als Aliquots bei -20 °C gelagert

2.6 Zellkultur

2.6.1 Zelllinien

COS-7:	Affennieren-Zelllinie, SV-40 transformiert (ATCC 1651, adhärent, DMEM)
HeLa:	humane Zervixkarzinom-Epithel-Zellinie (ATCC CCL2, adhärent, DMEM)
CHO:	Chinese Hamster Ovary, immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des Chinesischen Hamsters (Cricetulus griseus)
HEK293:	Human Embryonic Kidney-Zellen (HEK)

2.6.2 Zellkulturmedien

DMEM (Dulbeccos modified Eagle's Medium)	(pH 7,0)/ 4,5 g/l D-Glukose, 29,23 g/l L-Glutamin und 3,7 g/l NaHCO3
FBS (Fetales Rinder Serum (Life Technologies))	einmalig vor Gebrauch 30 Min. bei 56 °C Hitze inaktivieren
DMEM 101	(pH 7,0)/ 4,5 g/l D-Glukose, 29,23 g/l L-Glutamin und 3,7 g/l NaHCO3 + FBS und Penicillin/ Streptomycin

Trypsin/ EDTA (VT):	2 g/l 0,2 g/l	Trypsin EDTA in PBS (pH 7,2) ohne Ca2+/ Mg2+

Penicillin/ Streptomycin	6 g/l 10000 (µg/ml) 8,0 g/l 0,4 g/l 1,0 g/l 0,35 g/l	Penicillin Streptomycin in NaCl KCl Glukose NaHCO3

2.6.3 Kultivierung der Säugerzellen

Alle Säugerzelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C unter Begasung mit 5%igem CO_2 in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer Sterilbank durchgeführt. Sämtliche Geräte und Lösungen wurden vor der Benutzung sterilisiert.

2.6.4 Passagieren von Zellen

Zum Passagieren wurde das Kulturmedium von den adhärent wachsenden Zelllinien vollständig abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die subkonfluenten Zell-Monolayer durch eine 3-5-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA (bei 37°C,

5%-igem CO2) abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde auf neuen Zellkulturschalen (Nunc) mit DMEM101 verteilt.
Benötigten einige Experimente eine bestimmte Zelldichte, wurde diese mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.6.5 Transiente Transfektion von Zellen

Die Transfektion von Säugerzellen erfolgte, je nach der Zielsetzung des Experiments, durch zwei unterschiedliche Verfahren.

2.6.5.1 Elektroporation

Die Methode der Elektroporation wurde für die Transfektion von Säugerzellen angewendet, die sowohl für Expressions- also auch für Immunfluoreszenz-Studien benötigt wurden. Die Zahl der lebenden Zellen wurde mit Trypanblau-Ausschluss (0,2 % Trypanblau) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, um eine ausreichende Zellzahl sicher zu stellen.
Alle Transfektionsansätze einer Versuchsreihe enthielten 1 – 5 µg DNA und 1 – 3 x 10^6 Zellen (Expressionsstudien) bzw. 1,5 x 10^5 Zellen (Immunfluoreszenz) in 150 µl Elektroporationspuffer (BIORAD). Die Ansätze wurden in Elektroporationsküvetten (0,4 cm) einem auf die jeweilige Zellart angepassten Puls (z. B. 500 µF für COS-7-Zellen und 950 µF für HeLa-Zellen) ausgesetzt und nach einer 5-minütigen Inkubation auf 6- oder 10 cm Ø- messende Schalen (Nunc) mit DMEM101 überführt (für Immunfluoreszenz auf 12-well-Schalen). Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank (bei 37°C und 5 %-igem CO_2) wurden die Zellen geerntet.

2.6.5.2 Transfektion mittels FuGENE-HD (Roche)

Zum Erreichen hoher Transfektionseffizienzen bei der Verwendung mehrerer Plasmide (beispielsweise für funktionelle Luciferase-Reporter Experimente und Expressionsstudien), wurden HeLa-, HEK293-,CHO- bzw. COS7-Zellen mittels FuGENE-HD transfiziert. Hierzu wurden die entsprechenden Plasmide mit gleichen Mengen DMEM-Medium (50-250 µl pro Ansatz) vermischt. In einem zweiten

Eppendorfgefäß wurden ebenfalls 50-250 µl DMEM-Medium mit der zweifachen Menge an FuGENE-HD, bezogen auf die Menge der vorbereiteten zu transfizierenden Plasmide (w/v), versetzt. Darauf folgte das vorsichtige Überführen der in DMEM-Medium gelösten Plasmide in das FuGENE-HD/DMEM-Gemisch. Dem schloss sich eine 20 – 30-minütige Inkubation bei RT an, während der die Reaktionsgefäße gelegentlich leicht angestoßen wurden. Dann wurde der Ansatz tröpfchenweise auf mit Zellen vorbereitete 6- oder 12-well-Schalen verteilt und für 24- 48 Std. bei 37 °C inkubiert.

2.6.6 Luciferase-Reporter Assay

Alle Versuche wurden gemäß dem Dual Luciferase® Reporter Assay System-Handbuch mit den Substraten und Puffern von Promega durchgeführt.
In den jeweiligen Transfektionen wurden unterschiedliche Mengen (0,25 – 1 µg) des αD3-Reporterplasmids und des für den GATA-Transkriptionsfaktor codierenden XGATA4-Plasmids verwendet. Die Menge an eingesetztem TRPS1 und dem für den jeweiligen ARKADIA-Bindepartner kodierenden Plasmid variierte zwischen 0,25 – 1 µg. Als Transfektionskontrolle wurde der phRG-TK Renilla-Luciferase-Expressions-Vektor benutzt.
Um die Menge der verwendeten DNA innerhalb eines Experiments zu normieren, wurden die Ansätze bei Bedarf mit leerem Plasmid aufgefüllt.
Die Enzymaktivität wurde nach 48-stündiger Inkubation in einem GeniosPro Luminometer gemessen. Alle Untersuchungen wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten (Triplikat) bestätigt.

2.6.7 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenzstudien wurden 30000 - 50000 Zellen (COS-7) pro well (12-well-Platte) auf runde Objektträgergläschen (Ø 15 mm) ausgesät und 5-8 Std. später mit bis zu 1 µg DNA mittels der Elektroporations-Methode transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt bzw. der Hälfte der Ansätze Lactacystin-haltiges DMEM (10µM) zugefügt und die Zellen für weitere 24 Std.

inkubiert. Am Tag der Fixation wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und dann mit 100%igem Methanol 10 Min. fixiert. Anschließend folgte das zweimalige Waschen der fixierten Zellen mit PBS und die 30-minütige Äquilibrierung mit Immunfluoreszenz-Puffer (I-Puffer). Die so vorbereiteten Zellen wurden nun für eine Stunde mit dem entsprechenden Primär-Antikörper (0,1-1 µg αFLAG/ml I-Puffer) in insgesamt 200 µl/Objektträgergläschen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit I-Puffer wurden die Zellen mit der gleichen Menge (Konzentration 1:200 in I-Puffer) eines farbmarkierten Zweit-Antikörpers (α-Mouse) für weitere 30 Min. inkubiert. Die im Kern enthaltende DNA wurde mit DAPI, das im Konservierungsmittel Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes) enthalten war, blau gefärbt und die Präparate eingedeckelt. Alle Inkubationen fanden zur längeren Erhaltung der Fluoreszenz des GFP-Proteins im Dunkeln statt.

Immunfluoreszenz-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,05
	100 mM	NaCl
	0,05 %	Tween 20
	1 %	BSA (Fraktion V)

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden ein confokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM-Mikroskop, Leica TCS WP5) verwendet.

2.7 Proteine

2.7.1 Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Die Gewinnung von Gesamtzell-Extrakten erfolgte durch die Aufnahme adhärent gewachsener Zellen in eiskaltem PBS, die mit einem Gummispatel von der Kulturschale abgelöst wurden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500g, 5

Min.) sedimentiert und in eisgekühltem Flag-Lysis-Puffer oder RIPA-Lysepuffer resuspendiert.

Flag-Lysis-Puffer:	25 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 mM	$CaCl_2$
	1 %	Triton-X-100
	1:1000	DTT (1M)/ Proteinase-Inhibitoren (vor Gebrauch dazugeben)

RIPA-Lysepuffer:	50 mM	HEPES
	1 mM	EDTA
	1%	Nonidet-P40 (NP 40)
	0,5 M	LiCl
		PIC

PIC: Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)

Nach der Sedimentierung aller unlöslichen Zellbestandteile (1 Min. 10000g) wurde aus dem Überstand eine Analyse durch eine SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden, wenn nicht anders angegeben, 20-25 µg Protein (pro Spur) mit 4xSDS-Ladepuffer (angemischt mit Mercaptoethanol im Verhältnis 1:20) 5 Min. bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.7.2 Coimmunpräzipitation von Proteinen

Zum Nachweis von Protein-Interaktionen in eukaryotischen Zellen wurden Extrakte transfizierter Zellen immunchemisch analysiert.

Nach entsprechender Transfektion und 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, abgelöst, sedimentiert (max. 500g, 5 Min.) und pro 6-well-Platte in 500 µl RIPA-/Flag-Lysis-Puffer aufgenommen. Für die

FLAG-Immunpräzipitationen wurde die "M2-affinity-gel-suspension" (Sigma-Aldrich) verwendet, wobei in der Regel 600 µl M2-Gel für 12 Immunpräzipitationen eingesetzt wurden. Die Suspension wurde durch 5-maliges Waschen bei 4°C mit Flag-Lysis-Puffer (inklusive 0,5 %-igem BSA) und anschließender Resuspension in 1,8 ml Flag-Lysis-Puffer äquilibriert. Es wurden zu dem jeweiligen Zelllysat (100 µg Protein-Extrakt) 100 µl äquilibrierte "M2-affinity-gel-suspension" gegeben und über Nacht in einem Gesamtvolumen von 500 µl Flag-Lysis-Puffer bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (800 UpM, 0,5 Min.), das Pellet 4x mit TBS-Puffer (Flag-Lysis-Puffer (siehe 2.7.1) ohne Triton-X-100) gewaschen, in 50 - 100 µl 4x SDS-Ladepuffer (Zusammensetzung s. 2.7.3) aufgenommen und zur Analyse auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.7.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Proteine wurden in diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch in einer Mini-Proteingelapparatur aufgetrennt. Alle Proteinproben wurden für 5 Min. bei 95°C in 4x SDS-Probenpuffer denaturiert und anschließend in 1x SDS-Laufpuffer zunächst für 20 - 30 Min. bei 60 – 80 V und dann für weitere ca. 0,75 – 1,5 Std. bei 120 - 130 V aufgetrennt. Für den immunologischen Nachweis wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert.

10 % APS-Lösung:	10 %	Ammoniumpersulfat
Trenngelpuffer:	1,5 M 0,4 %	Tris-HCl, pH 8,8 SDS
Sammelgelpuffer:	0,5 M 0,4 %	Tris-HCl, pH 6,8 SDS
10x SDS-Laufpuffer:	1,25 M 2 M 1 %	Tris-Base Glycin SDS

4x SDS-Probenpuffer:	62 mM 2 % 10 % 5 % 5 % 0,025 %	Tris-HCl, pH 6,8 SDS Glycerin DTT ß-Mercaptoethanol Bromphenolblau
Rotiphorese Gel30:	30 % 0,8 %	Acrylamid Bisacrylamid
Fixierlösung:	10 % 30 %	Essigsäure Ethanol
Comassie-Färbelösung:	45 % 45 % 10 % 1,25 g/l	H2O Ethanol Essigsäure Comassie R250
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	

Sammelgel	für 2 Gele
Sammelpuffer	2.5ml
Acrylamid Rotiphorese Gel 30 (AA/BA)	1.3ml
Wasser	6.2ml
10% APS	150µl
TEMED	15µl

Trenngel	für 2 Gele	8%	10%	12%	15%
Trennpuffer		2.5ml			
AA/BA		2.8ml	3.3ml	3.9ml	5ml
Wasser		4.6ml	4.1ml	3.5ml	2.3ml
10% APS		150µl			
TEMED		15µl			

2.7.4 Proteintransfer und –nachweis (Westernblot)

Um Proteine auf Nylonmembranen zu transferieren, wurde das Semi-dry-Verfahren (Transfer-Apparatur von BIO-RAD) angewendet. Dazu wurde auf der (Graphit-)Anode ein Blot in folgender Reihenfolge aufgeschichtet: ein Whatman 3MM-Papier, eine HybondC-Membran (Amersham), die SDS-PAGE und abschließend ein Whatman 3MM-Papier (alle Komponenten getränkt/angefeuchtet in Transfer-Puffer). Dann wurde für 1,5 bis 2 Std. bei 60 mA (1 Gel) bzw. 100 - 110 mA (2 Gele) transferiert. Zum Nachweis der Proteine wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierlösung abgesättigt (Inkubationszeit 30 - 60 Min.) und hinterher zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurde der Blot mit dem ersten Antikörper (αFLAG, αGFP und αTRPS1 jeweils in der Verdünnung 1:1000) in PBS/Blockierlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde 4x für 15 Min. mit PBS gewaschen und für mind. 3 Std. mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Zweit-Antikörper (αRabbit für αGFP und αTRPS1 und αMouse für αFLAG; 1:1000 in PBS/Blockierlösung) bei 4°C inkubiert. Nach weiterem viermaligem Waschen mit PBS wurde der Westernblot entwickelt. Hierzu wurde die Membran in eine Röntgenfilmkassette gelegt, mit variierenden Mengen (1 – 1,5 ml) der zwei zuvor gemischten Komponenten des Rodeo Sensitive Western Blot Detection Kit benetzt und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Anschließend wurde ein Röntgen-Film (Kodak) aufgelegt und nach 30 Sek. bis 5 Min. in einer automatischen Entwicklungsmaschine entwickelt.

Transfer-Puffer:	5,82 g/l 2,93 g/l 3,75 ml 200 ml	Tris-Base Glycin 10 % SDS Methanol ad 1000 ml A.d.
Blockierlösung:	4 %	Magermilchpulver in PBS
ECL-Entwicklerlösung	USB	

3 Ergebnisse

3.1 Der Transkriptionsfaktor TRPS1 interagiert mit dem Protein ARKADIA in Hefen

3.1.1 Erstellung der TRPS1- und der ARKADIA-Fragmente

In vorangegangenen Analysen der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Kaiser wurden mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems potentielle Bindepartner des Transkriptionsfaktors TRPS1 gesucht. Dabei ließen sich drei Klone identifizieren, welche Fragmente der Ubiquitin-Ligase ARKADIA codieren. Zur weiteren Analyse einer möglichen Interaktion von TRPS1 mit ARKADIA und zur Eingrenzung der jeweiligen Binderegionen innerhalb der Proteine wurden weitere Versuche in Hefen durchgeführt. Hierzu wurden folgende Fragmente von TRPS1 und ARKADIA erstellt:

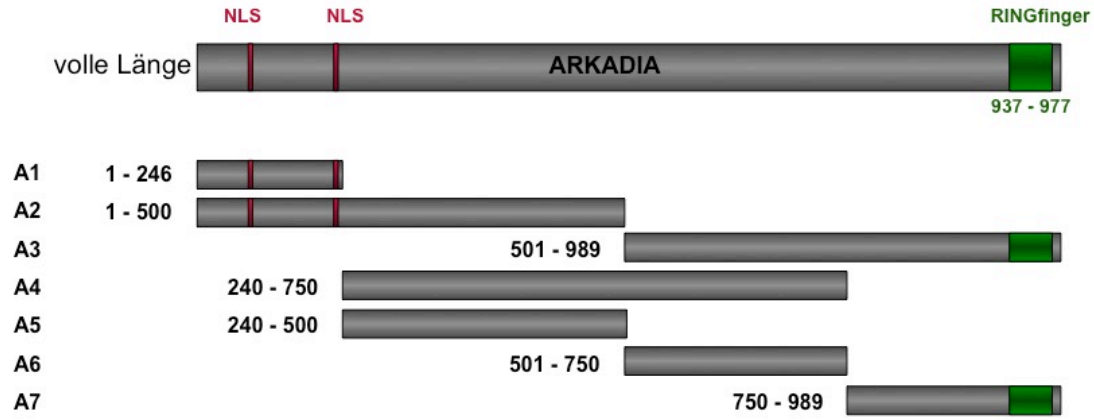

Abb. 3.1 ARKADIA-Konstrukte

Die Abbildung zeigt die erstellten ARKADIA-Fragmente A1 bis A7, die überlappende Teilbereiche des ARKADIA-Proteins codieren. Die entsprechenden Aminosäurepositionen sind durch Zahlen angegeben. Das ARKADIA-Protein umfasst 989 Aminosäuren. N-terminal enthält es zwei potentielle Kernlokalisierungssignale (NLS)(rot), C-terminal befindet sich die RINGfinger-Domäne (grün).

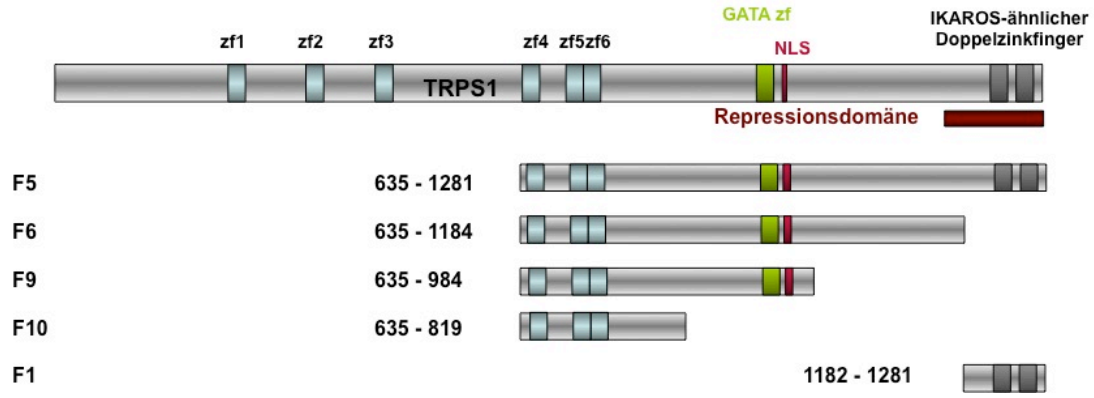

Abb. 3.2 TRPS1-Konstrukte

Die Abbildung stellt die unterschiedlichen TRPS1-Fragmente dar, die überschneidende Teilbereiche des TRPS1-Proteins codieren und deren Aminosäurepositionen durch Zahlen angegeben sind. Das TRPS1-Protein überspannt 1281 Aminosäuren. Es enthält neun potentielle Zinkfinger-Motive (zf) (hellblau, grün, grau) und ein potentielles Kernlokalisierungssignal (NLS) (rot). Am C-Terminus befindet sich eine 119-Aminosäure-große Domäne, die TRPS1 zur Transkriptionsrepressor-Funktion befähigt (dunkelrot).

Die ARKADIA-Fragmente (Abb. 3.1) amplifizierten wir an einem ARKADIA-FLAG-Plasmid mittels einer *Taq*-Polymerase, womit eine Insertion in einen sogenannten *T-Cloning*-Vektor ermöglicht wird. Zur Amplifikation der TRPS1-Fragmente (Abb. 3.2) diente ein humanes Volle-Länge-pcDNA-TRPS1 als Matrize.
Die Primer wurden so entworfen, dass die Fragmente Restriktionsschnittstellen flankierten (Primer s. Anhang). Die PCRs überprüften wir in Agarose-Gelelektrophoresen und isolierten die Banden entsprechender Größe aus dem Gel (2.3.4.2). Teilweise wurden die Produkte zusätzlich mittels eines Microcon-Filtersystems aufgereinigt (2.3.4.1). Die so erhaltenen Amplifikate wurden in einen *T-Cloning*-Vektor (pGEM®-T Easy) ligiert und hiermit kompetente DH5α-Bakterien transformiert.
Eine Selektion der das Plasmid enthaltenden Bakterien fand durch das im LB-Agar enthaltene Antibiotikum Ampicillin statt. Die Klone für die folgende DNA-Isolierung (2.3.7) wurden anhand der Blau-Weiß-Selektion ausgewählt. So erhaltene Plasmide wurden durch den enzymatischen Verdau mit spezifischen

Restriktionsendonukleasen in Fragmente gespalten und diese mittels der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die erhaltene plasmidäre DNA wurde sequenziert. Bestätigte sich eine fehlerfreie PCR und anschließende Insertion des jeweiligen Fragments in den Vektor, erfolgte eine erneute Kultivierung und Plasmid-/DNA-Isolierung in größerem Maßstab (2.3.8). Auch hier ließen wir die Plasmide durch spezifische Restriktionsendonukleasen spalten. Die erhaltene DNA wurde durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Fragmente aus dem Gel isoliert. Nach einer photometrischen Prüfung der DNA-Konzentration inserierten wir die DNA für weiterführende Versuche in die entsprechenden Expressionsvektoren pGBKT7 (*bait*) und pGADT7 (*prey*). Auch hiermit wurden DH5α-Bakterien unter gleichem Vorgehen transformiert, bis mittels der Midi-Präparation (2.3.8) eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA gewonnen werden konnte. Die Auswahl der jeweiligen Klone für die Midi-Präp wurde wieder nach Gelelektrophorese, Mini-Präp und Restriktionsverdau mit den spezifischen Enzymen getroffen.

ARKADIA-Protein
TRPS1-Protein
PCR der Fragmente
Agarose-Gelelektrophorese
Ligation in den pGEM®-T Easy-Vektor
Transformation von kompetenten DH5α-Bakterien
Über-Nacht-Kultur der transformierten DH5α-Bakterien
Mini-Präp
Restriktionsverdau mit EcoR1
Agarose-Gelelektrophorese
Sequenzierung
Midi-Präp
Agarose-Gelelektrophorese
Restriktionsverdau je nach Fragment mit Nco1 und Sal1; EcoR1 und BamH1;EcoR1 und Sal1
Restriktionsverdau mit EcoR1 und BamH1
Agarose-Gelelektrophorese mit Gelextraktion
Ligation in den pGBKT7-Vektor (bait) (geschnitten mit den Enzymen Nco1 und Sal1; EcoR1 und BamH1; EcoR1 und Sal1; EcoR1 und BamH1; EcoR1 und Sal1)
Ligation in den pGADT7-Vektor (prey)(geschnitten mit EcoR1 und BamH1)

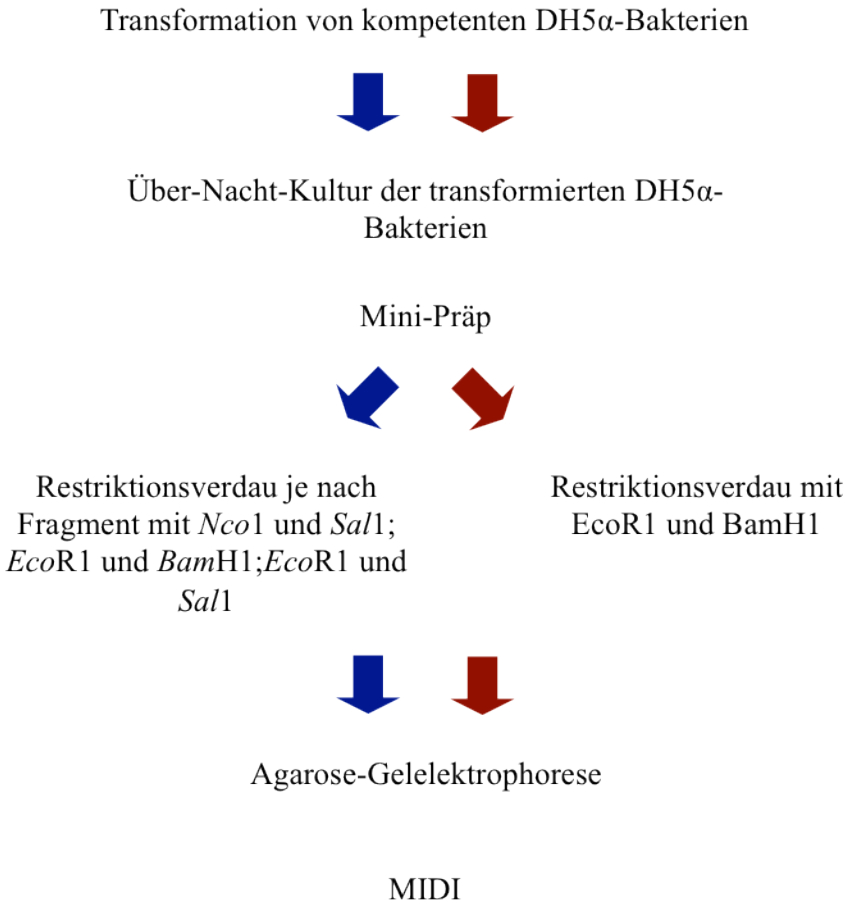

Abb. 3.3 Versuchsablauf Fragmenterstellung

3.1.2 Interaktionsstudien in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System

Die in diesem Teil beschriebenen Interaktionsstudien basieren auf dem von Fields und Song entwickelten Hefe-Zwei-Hybrid-System (Fields und Song, 1989). Es ermöglicht, Interaktionen von Proteinen mit Hilfe einfacher Klonierungs- und Transformationstechniken nachzuweisen. Die Grundlage dieses Systems bildet in unseren Versuchen das GAL4-Protein mit seinen beiden Struktur- bzw.

Funktionsdomänen – der DNA-bindenden Domäne (DBD) und der Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD). Gelangen beide in räumliche Nähe, sind sie in der Lage, die Transkription von Reportergenen zu aktivieren. Für unsere Versuche wurde jeweils ein ARKADIA-Fragment durch Insertion in den pGBKT7-Vektor (*bait*) mit der DBD und eines der TRPS1-Fragmente durch Insertion in den pGADT7-Vektor (*prey*) mit der AD fusioniert. Zusätzlich enthielten die Vektoren die Selektionsmarker *TRP1* (*bait*) und *LEU2* (*prey*), welche durch eine Kultivierung auf Selektionsmedien ohne Tryptophan und Leucin (-2-Platten) der Überprüfung einer erfolgreichen Transformation dienten.

3.1.2.1 Interaktionsnachweis durch Selektivmedien

Mit den erstellten ARKADIA- und TRPS1-Fusionskonstrukten wurden Hefezellen mittels einer modifizierten LiAc-Methode (Gietz et al.,1992) (2.5.3) transformiert, auf -2-Platten ausplattiert und bei einer erfolgreichen Cotransformation die gewachsenen Kolonien auf Medien ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin (-4-Platten) selektioniert. Konnten die Hefezellen auch auf diesen Nährböden kultiviert werden, bewies dies die Transkription der Reportergene *ADE2* und *HIS3* und damit eine Interaktion der untersuchten Fragmente (2.5.5).

Im ersten Schritt wurden die Hefezellen mit dem TRPS1-Fragment-5-*prey*-Konstrukt (F5) und jeweils einem der ARKADIA-Fragment-*bait*-Konstrukte (A1- bis A7) cotransformiert. Mit jedem Ansatz kultivierten wir sowohl acht Klone auf -2-Platten als auch auf -4-Platten.

Bei allen Hefeklonen wurde die Expression der Fusionskonstrukte mittels eines *Westernblots* und Anti-DBD- bzw. Anti-AD-Antikörpern (Santa Cruz) überprüft.

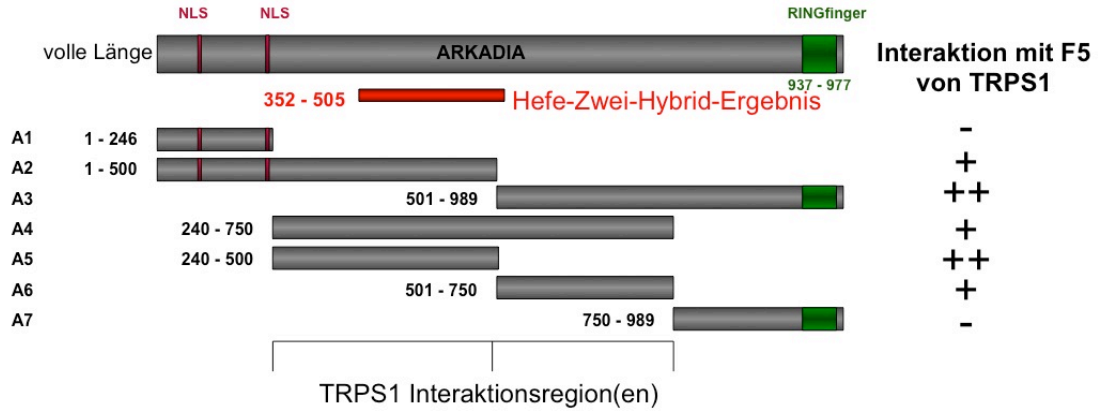

Abb. 3.4 Interaktion der ARKADIA-Fragmente mit dem Fragment 5 von TRPS1 auf (Nachweis auf Selektivmedien)

Das Wachstumsverhalten der mit den verschiedenen ARKADIA-Fragmenten und F5 von TRPS1 cotransformierten Hefezellen ist durch "–" für kein Wachstum, "+" für langsames Wachstum und "++" für gutes Wachstum gekennzeichnet. Die potentielle TRPS1-Interaktionsregion in ARKADIA umfasst die Aminosäuren 240 bis 750. Dieser Bereich wurde auch in Voruntersuchungen mit dem murinen Trps1-F5-Fragment bestimmt (Hefe-Zwei-Hybrid-Ergebnis) (rot). NLS: Kernlokalisierungssignal

Die mit den Fragmenten A3 und A5 des ARKADIA-Proteins und dem Fragment F5 des TRPS1-Proteins cotransformierten Hefezellen waren alle in der Lage, auf den Vierfach-Mangel-Medien zu wachsen (Abb. 3.4). Bei den mit den Fragmenten A2 und A4 des ARKADIA-Proteins und dem Fragment F5 des TRPS1-Proteins transformierten Zellen war ein teilweise verzögertes Wachstum erkennbar. Da die stärksten Interaktionen bei den Fragmenten A3 und A5 zu finden waren und diese zusammen bis auf die 240 N-terminalen Aminosäuren fast das gesamte ARKADIA-Protein überspannen, wurden weitere Hefetransformationen sowohl mit dem ARKADIA-Fragment A5 als auch mit A6 gemacht (Abb.3.5). Letzteres beinhaltet nur den N-terminalen Teil des Fragments A3 ohne die RING(*Really Interesting New Gene*)finger-Domäne und sollte zu einer genaueren Eingrenzung der Interaktionsregion in ARKADIA führen. Dazu wurde in einem zweiten Schritt

sowohl A5 mit einem der TRPS1-Fragmente F1 bis F10 als auch A6 mit allen TRPS1-Fragmenten cotransformiert (Abb.3.5).

Auch hier wurde die Expression der Fusionskonstrukte mittels eines Westernblots verifiziert.

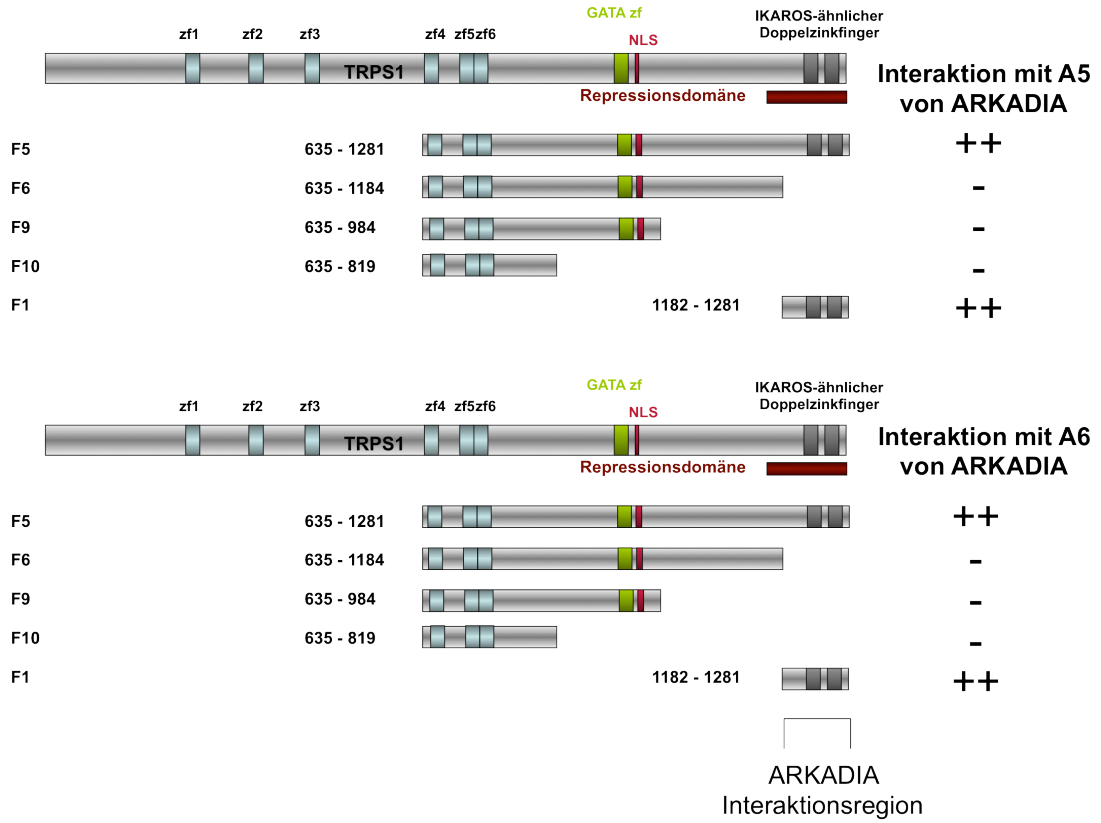

Abb. 3.5 Interaktion der TRPS1-Fragmente mit dem Fragment 5 (oben) bzw. dem Fragment 6 (unten) von ARKADIA (Nachweis auf Selektivmedien)

Das Wachstumsverhalten der mit den angegebenen Fragmenten cotransformierten Hefezellen ist durch "–" für kein Wachstum, "+" für langsames Wachstum und "++" für gutes Wachstum gekennzeichnet. Die potentielle ARKADIA-Interaktionsregion innerhalb des TRPS1-Proteins befindet sich im Bereich der Aminosäuren 1182 bis 1281 und somit innerhalb der Repressionsdomäne (dunkelrot). zf: Zinkfinger NLS: Kernlokalisierungssignal

Eine Bindung des Fragments 5 von TRPS1 zeigte sich auch hier mit den ARKADIA-Fragmenten A5 und A6. Darüber hinaus interagierte F1 mit beiden ARKADIA-Fragmenten (A5 und A6)(Abb. 3.5).

F1 und F5 von TRPS1 beinhalten demnach die für die Interaktion mit ARKADIA kritische Region. Beide überspannen die 100 C-terminalen Aminosäuren (aa) des TRPS1-Proteins und damit große Teile der Repressionsdomäne (100 von 119aa) mit dem IKAROS-ähnlichen Doppelzinkfinger.

Die TRPS1-Bindungsregion(en) in ARKADIA befindet sich im Bereich des Fragments A4 (aa 240-750).

Diese Ergebnisse zeigten sich bereits in Voruntersuchungen in dem alternativen **LexA**-Hefe-Zwei-Hybrid-System: Dort wurde mit einem F5-*bait*-Konstrukt des murinen Trps1 eine Embryonale-Maus-cDNA-Beute-Bank (Hollenberg et al., 1995) auf mögliche Bindepartner analysiert und ein Teil des ARKADIA-Proteins (aa 352-505 von 990) als Bindepartner ermittelt. Weiterführende Versuche gaben erste Hinweise darauf, dass die für die Interaktion kritische Region innerhalb des TRPS1-Proteins in der C-terminalen IKAROS-ähnlichen Region lokalisiert ist.

3.1.2.2 Semiquantitative Analyse der Interaktion mittels β-Galaktosidase-Versuchen (*Liquid Assays)*

Um die nachgewiesene Interaktion von TRPS1 mit ARKADIA darüber hinausgehend zu analysieren, wurde ein weiteres System in Hefen verwendet. Dies beruht ebenfalls auf dem schon dargestellten Zwei-Hybrid-System, wobei hier das *LACZ*-Gen als Reporter verwendet wird. *LACZ* codiert das Enzym β-Galactosidase, das sein Substrat ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid) zu einem gelben Farbstoff umsetzt (2.5.6). Die Expressionsstärke des *LACZ*-Gens lässt sich somit indirekt durch seine Konzentration und damit Aktivität photometrisch messen und steht in diesem System in direktem Zusammenhang mit der Bindeintensität der beiden GAL4-AD- und BD-Fusionsproteine.

Alle *Liquid Assays* wurden unabhängig mit mindestens drei Hefeklonen und somit identischen Fragmentkonfigurationen durchgeführt, mit denen die Mangelmedien beimpft wurden. Die mit dem TRPS1-Fragment F5 und jeweils einem der ARKADIA-Fragmente (A1 bis A6) transformierten Hefen zeigten den stärksten Farbumschlag und damit die stärkste Interaktion zwischen den Fragmenten A3 und A5 mit F5 (Abb. 3.6 A). Cotransformationen von sowohl A5 mit einem der TRPS1-Fragmente F1 bis F5 (Abb. 3.6 B) als auch A6 mit allen TRPS1-Fragmenten (Abb. 3.6. C) wiesen wiederholt die höchste Enzymaktivität und damit Bindungsintensität zu den Fragmenten F1 und F5 von TRPS1 auf.

Sämtliche Versuche bestätigten somit die Interaktionsergebnisse der Selektion auf Mangelmedien/-4-Platten.

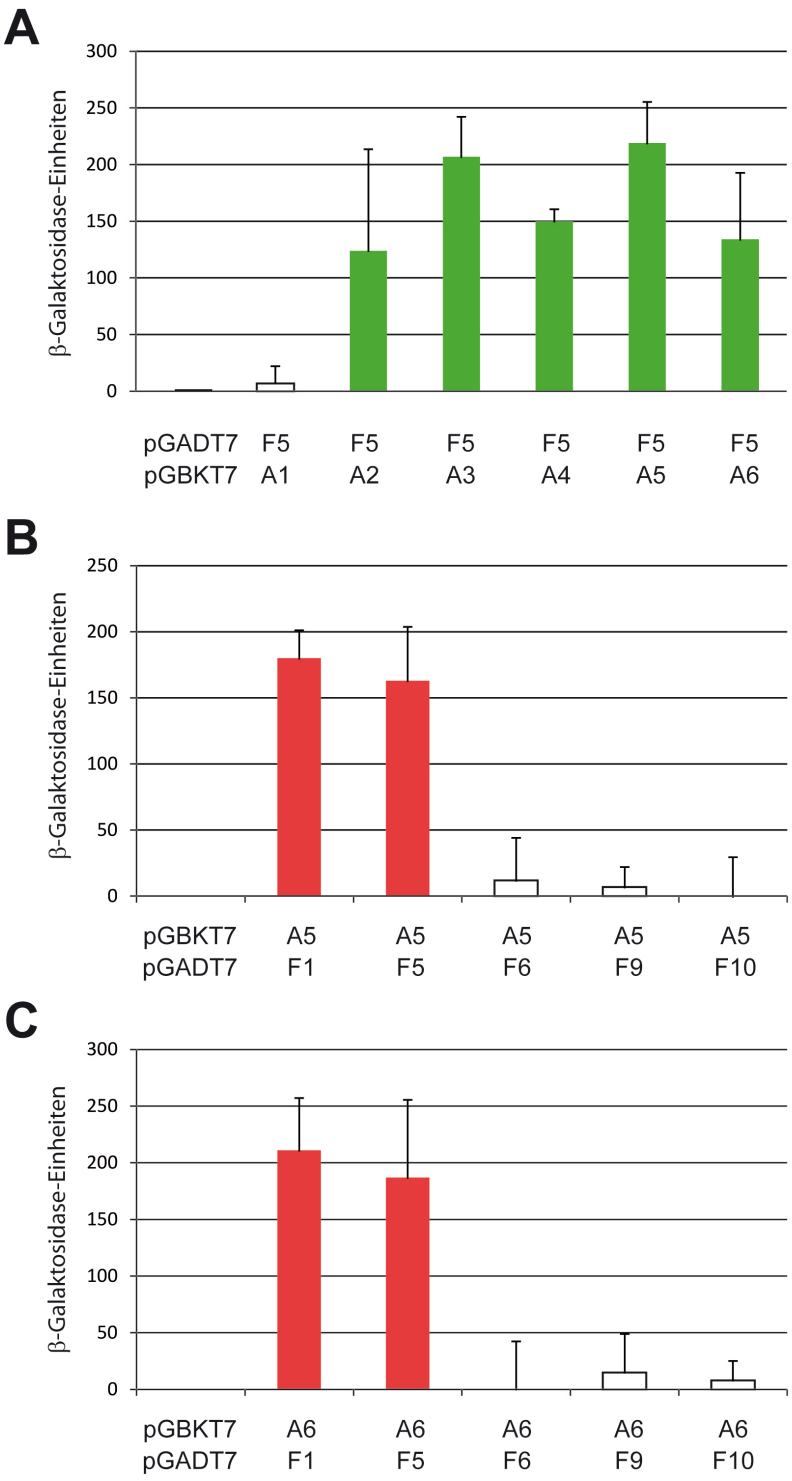
A
β-Galaktosidase-Einheiten
300
250
200
150
100
50
0
pGADT7 F5 F5 F5 F5 F5 F5
pGBKT7 A1 A2 A3 A4 A5 A6
B
β-Galaktosidase-Einheiten
250
200
150
100
50
0
pGBKT7 A5 A5 A5 A5 A5
pGADT7 F1 F5 F6 F9 F10
C
β-Galaktosidase-Einheiten
300
250
200
150
100
50
0
pGBKT7 A6 A6 A6 A6 A6
pGADT7 F1 F5 F6 F9 F10

Abb. 3.6

Abb. 3.6 Identifizierung und Eingrenzung der Binderegionen innerhalb des ARKADIA- und des TRPS1-Proteins (β-Galaktosidase-Assays)

Das Diagramm A zeigt das Bindeverhalten der ARKADIA-Fragmente A1-A7 an das Fragment F5 von TRPS1. In Diagramm B wird das Bindeverhalten der jeweiligen TRPS1-Fragmente zu dem Fragment A5 und in Diagramm C zu dem Fragment A6 von ARKADIA dargestellt. Die Höhe der Balken zeigt die β-Galaktosidase-Aktivität als (semi)-quantitative Analyse der Bindeintensitäten. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens sechs unabhängigen Experimenten dar.

3.2 Interaktion von TRPS1 und ARKADIA in Säugerzellen

Diese Analysen sollten die im Hefe-System gefundenen Interaktionen unabhängig in Säugerzellen verifizieren. Hierfür wurden erstmalig Versuche mit Expressionskonstrukten, welche die vollständigen ARKADIA- und TRPS1-Proteinsequenzen codieren, durchgeführt. Die codierende Sequenz des ARKADIA-Proteins amplifizierten wir mittels der PCR an einer cDNA-Bibliothek von fetalem Gehirn (Marathon-ready cDNA *human fetal brain*, Clontech). Die codierende Region von TRPS1 wurde an der Matrize pcDNA-TRPS1 generiert. In Agarose-Gelelektrophoresen überprüften wir die amplifizierte DNA, inserierten sie in den pGEM®-T Easy-Vektor und transformierten damit kompetente DH5α-Bakterien. Es schlossen sich DNA-Isolationen und spezifische Restriktionen an. *ARKADIA* und auch eine *ARKADIA*-Mutante (C937A)(3.2.1) ligierten wir mit den vorbereiteten Vektoren pFLAG-N3, pEGFP-N3 und pcDNA3.0-myc-his (kurz: myc-Plasmid). *TRPS1* wurde für nachfolgende Versuche in pEGFP-N3 und pFLAG-N3 inseriert.

3.2.1 Coimmunpräzipitierung von TRPS1 und ARKADIA

Um zunächst die Expression von TRPS1, ARKADIA und einer ARKADIA-Mutante (ARKADIA C937A, s.u.) in Säugerzellen zu untersuchen, wurden sowohl COS-7-Zellen als auch HeLa-Zellen mit dem ARKADIA-myc- bzw. ARKADIA C937A-myc-Plasmid und mit TRPS1-FLAG cotransfiziert. Zur Kontrolle fanden Transfektionen mit nur jeweils einem der Konstrukte und dem entsprechenden leeren Plasmid statt. Deren Expression stellten wir im Westernblot (2.7.2) mit spezifischen

Antikörpern (anti-myc, anti-TRPS1, anti-FLAG) dar. Beide Proteine konnten in den Lysaten spezifisch transfizierter Zellen nachgewiesen werden, ARKADIA bzw. deren Mutante bei ungefähr 108 kDa (Abb. 3.7 b Spur 1 und 3, e) und TRPS1 bei circa 165 kDa (Abb. 3.7 a Spur 1 und 2, d).

In der Coimmunpräzipitierung untersuchten wir die Interaktion der Fusionsproteine. Dazu wurden die Zellextrakte mit einer M2-αFlag-Sepharose („M2-affinity-gel-suspension“) inkubiert, gewaschen und die präzipitierten Proteinkomplexe im Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern untersucht (Abb. 3.7 c).

Nur in den COS-7-bzw. HeLa-Zell-Lysaten, die mit dem ARKADIA-myc-Plasmid und TRPS1-FLAG cotransfiziert waren, zeigte sich in der Westernblot-Analyse eine deutlich sichtbare ARKADIA-Bande (Abb. 3.7 c Spur 1, f Spur 1). Dadurch konnte eine unspezifische Bindung des ARKADIA-Proteins an das FLAG-Oligopeptid oder an andere Komponenten innerhalb des Systems ausgeschlossen und eine Interaktion der beiden Wildtyp-Proteine in Säugetierzellen nachgewiesen werden.

Da das ARKADIA-Protein als Interaktionspartner und RINGfinger-Ubiquitin-Ligase von u.a. SMAD-7 entdeckt wurde, sollte im Folgenden der Einfluss der Ubiquitin-Ligase-Funktion von ARKADIA auf die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor TRPS1 analysiert werden. Dazu wurde eine Ubiquitin-Ligase-defiziente Mutante von ARKADIA (C937A), bei der die Base Adenin an Stelle 937 durch die Base Cytosin ersetzt war, mittels *in vitro* Mutagenese (2.3.2) erstellt (Koinuma et al. 2003; Levy et al. 2007) und mit TRPS-FLAG cotransfiziert.

In der Coimmunpräzipitierung wurden COS-7- und HeLa-Zellextrakte erneut mit einer M2-αFlag-Sepharose („M2-affinity-gel-suspension“) inkubiert und die präzipitierten Proteinkomplexe mittels des Westernblots untersucht (Abb. 3.7 f).

Die Extrakte aus TRPS1-FLAG- und ARKADIA C937A-cotransfizierten Zellen zeigten genau wie auch die Lysate mit TRPS1-FLAG und dem Wildtyp-ARKADIA-Protein ein deutliches ARKADIA-Signal (Abb. 3.7 f Spur 2).

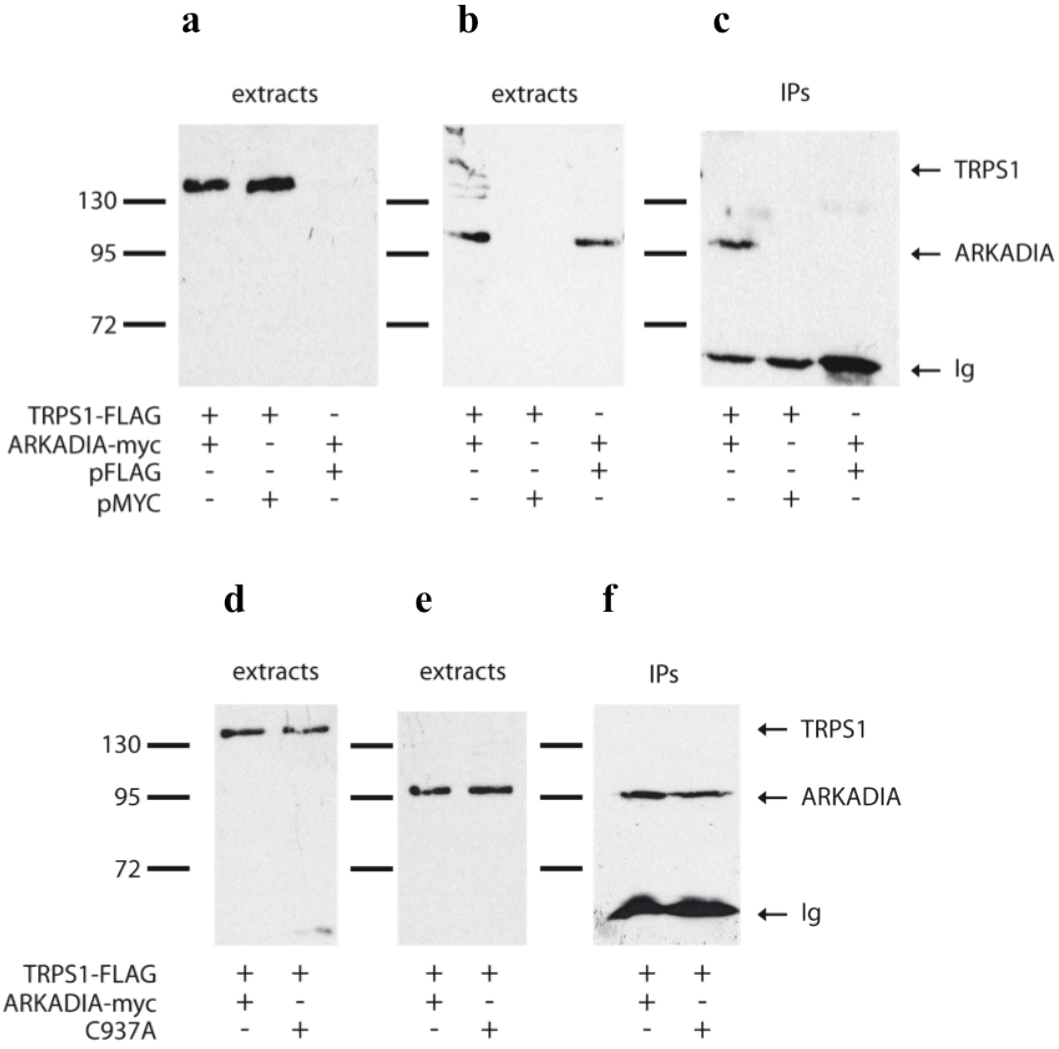
a
b
c
extracts
extracts
IPs
130
95
72
TRPS1
ARKADIA
Ig
TRPS1-FLAG + + - + + - + + -
ARKADIA-myc + - + + - + + - +
pFLAG - - + - - + - - +
pMYC - + - - + - - + -
d
e
f
extracts
extracts
IPs
130
95
72
TRPS1
ARKADIA
Ig
TRPS1-FLAG + + + + + +
ARKADIA-myc + - + - + -
C937A - + - + - +

Abb. 3.7

Abb. 3.7 Westernblot und Coimmunpräzipitierung von TRPS1 und ARKADIA bzw. ARKADIA C937A

Die Expression der TRPS1-FLAG- und ARKADIA-myc-Konstrukte wurde in Zellextrakten transfizierter HeLa-Zellen mittels *Westernblot*-Analysen überprüft. (a) Das TRPS1-FLAG-Protein wurde durch einen Anti-FLAG-Antikörper sowohl in ARKADIA-myc- (Spur 1) als auch mit leeren myc-Plasmid-cotransfizierten Zellen (Spur 2) detektiert. (b) Das ARKADIA-myc-Fusionsprotein konnte durch einen Anti-myc-Antikörper in TRPS1-FLAG- (Spur 1) und pFLAG-(Spur 3) cotransfizierten Zellen nachgewiesen werden. (c) Durch eine M2-αFlag-Matrix und einen Anti-myc-Antikörper konnte ARKADIA-myc in den TRPS1-Präzipitaten der spezifisch mit ARKADIA-myc und TRPS1-FLAG cotransfizierten Zellen nachgewiesen werden (Spur 1). Eine unspezifische Interaktion des ARKADIA-myc- Fusionsproteins oder eine unspezifische Detektion durch die verwendeten Antikörper konnte durch Kontrollexperimente mit dem jeweils leeren pmyc- oder pFLAG–Plasmid ausgeschlossen werden (Spuren 2 + 3). (d) TRPS1-FLAG wurde sowohl in ARKADIA-myc- (Spur 1) als auch ARKADIA C936A-myc-(Spur 2) cotransfizierten Zellen durch einen Anti-FLAG-Antikörper detektiert. (e) Die Expression von ARKADIA-myc (Spur 1) und ARKADIA C937A-myc (Spur 2) konnte in TRPS1-FLAG-cotransfizierten Zellen mit einem Anti-myc-Antikörper gezeigt werden. (f) Sowohl das Wildtyp-ARKADIA- als auch das mutierte ARKADIA-Protein C936A konnten in den TRPS1-Präzipitaten nachgewiesen werden.

3.2.2 Intrazelluläre Verteilung von TRPS1 und ARKADIA

Die intrazelluläre Lokalisierung der durch Immunfluoreszenz markierten ARKADIA- und TRPS1- Proteine wurde durch confokale Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Dazu wurden COS-7-, HEK293- und HeLa-Zellen mit TRPS1-GFP und ARKADIA-FLAG bzw. ARKADIA C937A-FLAG cotransfiziert. Das TRPS1-GFP-Protein fluoresziert grün. Die FLAG-Konstrukte wurden indirekt durch einen Maus-Anti-FLAG-Antikörper und einen Rhodamin-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper rot dargestellt. DAPI färbt die Zellkern-DNA blau (2.6.7).

Nur mit einem TRPS1-GFP-Konstrukt transfizierte Zellen zeigten das TRPS1-GFP-Protein homogen im Nukleus verteilt.

Dagegen konnten das ARKADIA-FLAG-Protein und auch die ARKADIA-Mutante sowohl im Kern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden.

Cotransfizierten wir Zellen mit ARKADIA und TRPS1, zeigten sich die gleichen Verteilungen beider Proteine wie bei den einzeln bzw. nur mit einem Konstrukt transfizierten Zellen, so dass eine Colokalisation beider Proteine - durch Überlagerung der grünen GFP- und der roten FLAG-Signale als weiß-gelbe Farbe - ausschließlich im Zellkern zu finden war (Abb. 3.8 c und f).

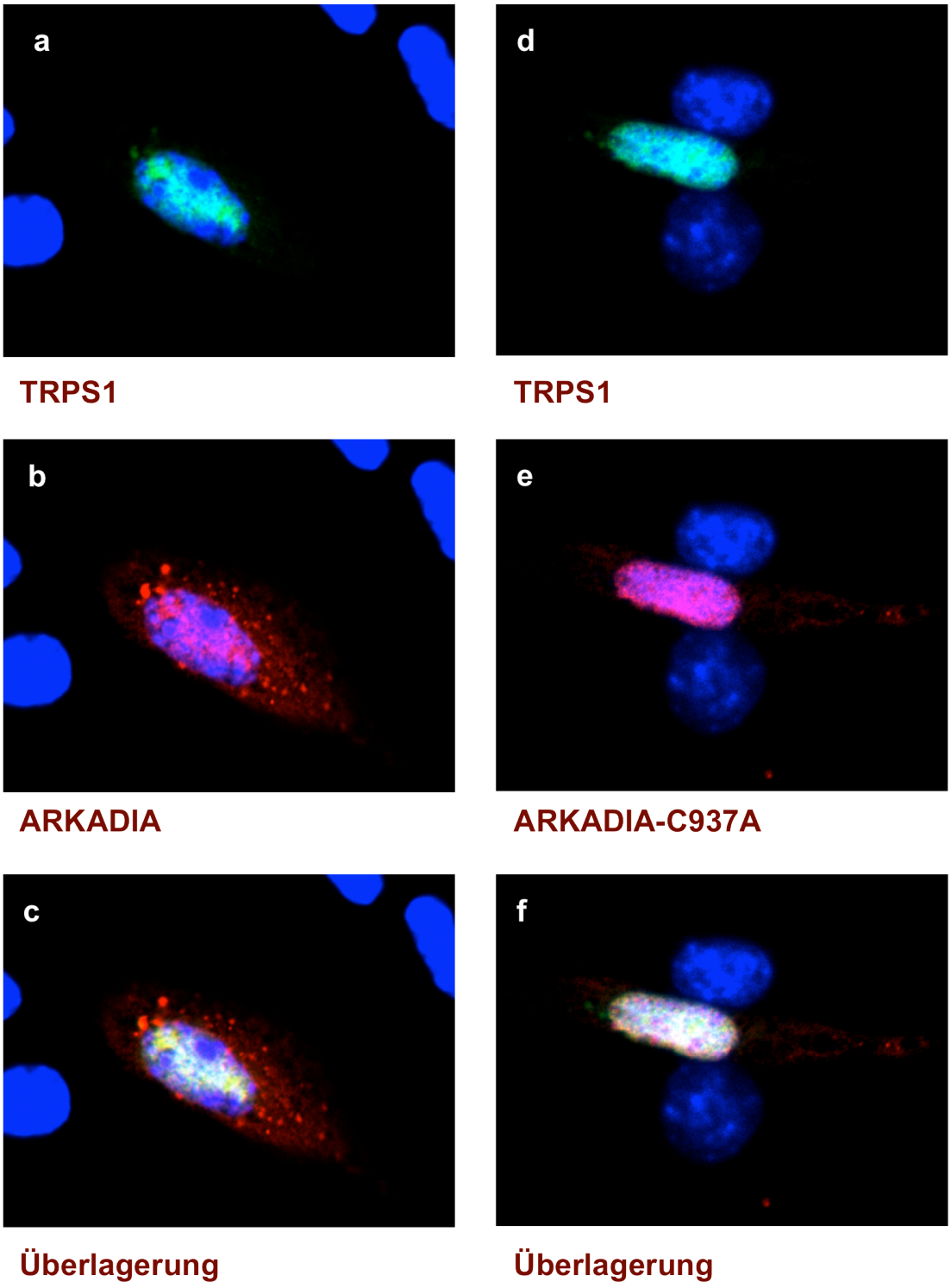
a
d
TRPS1
TRPS1
b
e
ARKADIA
ARKADIA-C937A
c
f
Überlagerung
Überlagerung

Abb. 3.8

Abb. 3.8 Intrazelluläre Lokalisation von TRPS1 und ARKADIA bzw. ARKADIA C937A in transfizierten HeLa-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit dem TRPS1-GFP- und dem ARKADIA-FLAG- bzw. ARKADIA C937A-FLAG- Konstrukt transfiziert. Das TRPS1-GFP-Genprodukt fluoresziert grün und die ARKADIA-/ARKADIA C937A-FLAG-Proteine wurden durch die Verwendung eines Maus-Anti-FLAG-Antikörpers und eines Rhodamin-gekoppelten Anti-Maus-Antikörpers rot dargestellt. DAPI färbt die Zellkerne blau. TRPS1-GFP ist in ARKADIA-FLAG- und ARKADIA C937A-FLAG-cotransfizierten Zellen ausschließlich im Kern nachweisbar (a und d). ARKADIA-FLAG ist sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma sichtbar (b). ARKADIA C937A-FLAG findet sich hpts. im Zellkern (e). Beide Proteine colokalisieren im Nukleus (c und f).

In weiteren Experimenten sollte die Relevanz der Ubiquitin-Ligasefunktion von ARKADIA für die Interaktion mit TRPS1 untersucht werden. Denn es wurde bereits gezeigt, dass ARKADIA u.a. SMAD7 ubiquitiniert, was zu einer Degradation durch das Proteasom führt. Dies lässt sich indirekt in Colokalisierungsstudien von SMAD7 und ARKADIA nach Inhibition der Proteasomenkomplexe durch Lactacystin darstellen (Koinuma et al. 2003). Um auch den Effekt von ARKADIA auf TRPS1 unter diesen Bedingungen beobachten zu können, wurden entsprechend transfizierte Zellen mit Lactacystin behandelt (2.6.7). Dies führte zu einer dramatischen Umverteilung der Proteine: Die mit TRPS1 und dem WT-ARKADIA cotransfizierten Zellen zeigten nun eine starke zytoplasmatische Anreicherung von TRPS1-GFP, wie man an der grünen Fluoreszenz auf Abb. 3.9 a, aber auch an der gelben Farbe als Überlagerung der grünen und roten Signale erkennt (Abb. 3.9 c).
Durch Cotransfektionen mit der E3-defizienten Mutante von ARKADIA (C937A) (3.2.1) sollte untersucht werden, ob die Ubiquitinierungsfunktion für diese zytoplasmatische Anreicherung von TRPS1 bei chemischer Inhibition des Proteasoms durch Lactacystin verantwortlich ist. Tatsächlich konnte unter diesen Bedingungen in keiner Zelle die zuvor gezeigte Anreicherung des TRPS1-Proteins im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 3.9 d), obwohl die Interaktionsfähigkeit von ARKADIA C937A und TRPS1 durch diese Mutation nachweislich nicht beeinträchtigt wurde (3.2.1).

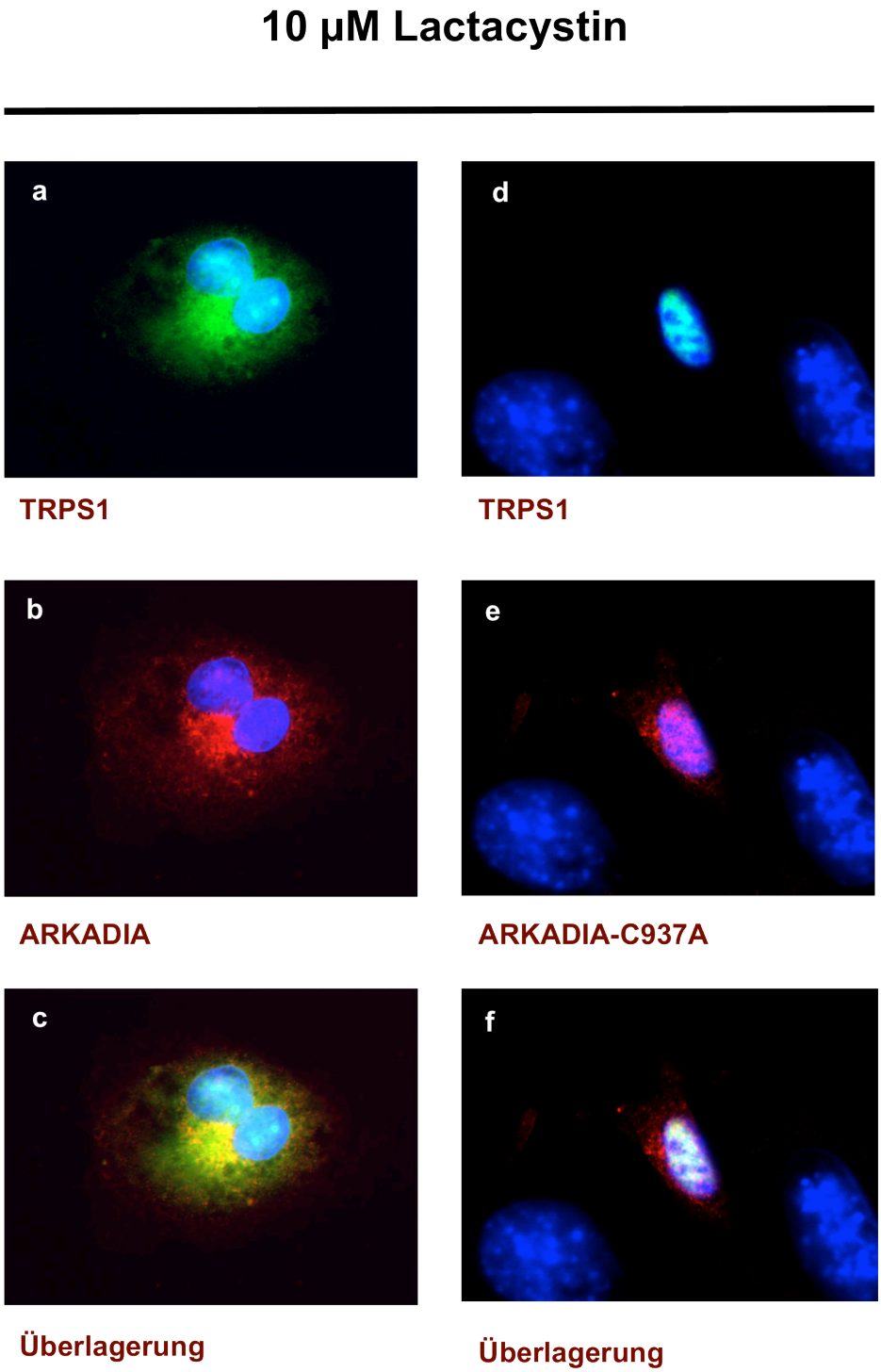
10 µM Lactacystin
a
TRPS1
d
TRPS1
b
ARKADIA
e
ARKADIA-C937A
c
Überlagerung
f
Überlagerung

Abb. 3.9

Abb. 3.9 Intrazelluläre Lokalisation von TRPS1 und ARKADIA bzw. ARKADIA C937A unter Inhibierung der Proteasomen

Die Abbildungen a-f zeigen Versuche, in denen die Proteasomenkomplexe mittels Lactacystin inhibiert wurden. Unter diesen Bedingungen fand in den TRPS1-GFP- und den ARKADIA-FLAG-cotransfizierten Zellen eine signifikante Umverteilung des TRPS1-GFP-Proteins statt. TRPS1 ist nun vor allem im Zytoplasma sichtbar (a). Beide Proteine colokalisieren im Zytoplasma (c). In ARKADIA C937A-FLAG- und TRPS1-GFP-cotransfizierten Zellen kann TRPS1-GFP ausschließlich im Nukleus nachgewiesen werden (d).

3.2.3 ARKADIA vermindert die Transkriptionsrepression von TRPS1

Das TRPS1-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der über seinen GATA-Zinkfinger an die GATA-Konsensussequenz bindet und die GATA-abhängige Aktivierung reprimiert (Malik et al., 2001). Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss die Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase ARKADIA bzw. deren Mutante ARKADIA C937A auf diese Funktion von TRPS1 hat. Dazu wurden nach dem etablierten Assay von Malik (2001) HEK293-, COS-7- und HeLa-Zellen mit αD3-Reporter-, GATA4-, ARKADIA- bzw. ARKADIA C937A- und TRPS1-Plasmid in unterschiedlichen Kombinationen transfiziert (2.6.6). Das αD3-Reporter-Konstrukt enthält das Luciferase-Gen unter der Kontrolle von acht AGATAA-Elementen. Als Referenzwert definierten wir die Luciferase-Aktivität der Zellen, die mit dem αD3-Reporter-Konstrukt und dem GATA4-Transkriptionsfaktor transfiziert wurden (Abb. 3.10 A, B, C, Säule 1).

Unter der Expression von TRPS1 reduzierte sich die Luciferase-Aktivität auf 19-30% des Ausgangswerts (Abb. 3.10 A, B, C, Säule 2). Wurden die Zellen außerdem mit ARKADIA transfiziert, konnte die durch TRPS1 vermittelte Repression stark abgeschwächt werden: Die GATA-vermittelte Transkription erreichte 83-87% ihres Ausgangswerts (Abb. 3.10 A, Säule 5; B, C, Säule 3). Dieser Effekt stand in direkter Beziehung zu der Konzentration an eingesetztem ARKADIA-Protein (Abb. 3.10 A, Säule 3, 4, 5). Dagegen zeigte die E3-Ligase-defiziente ARKADIA-Mutante C937A keinen signifikanten Effekt auf die reprimierende Wirkung von TRPS1 (Abb. 3.10 A,

Säule 6; B, C, Säule 4). In Kontrollexperimenten konnte ein direkter Einfluss von ARKADIA auf die GATA-vermittelte Transkription ausgeschlossen werden (3.10 A, Säule 7 und 8).

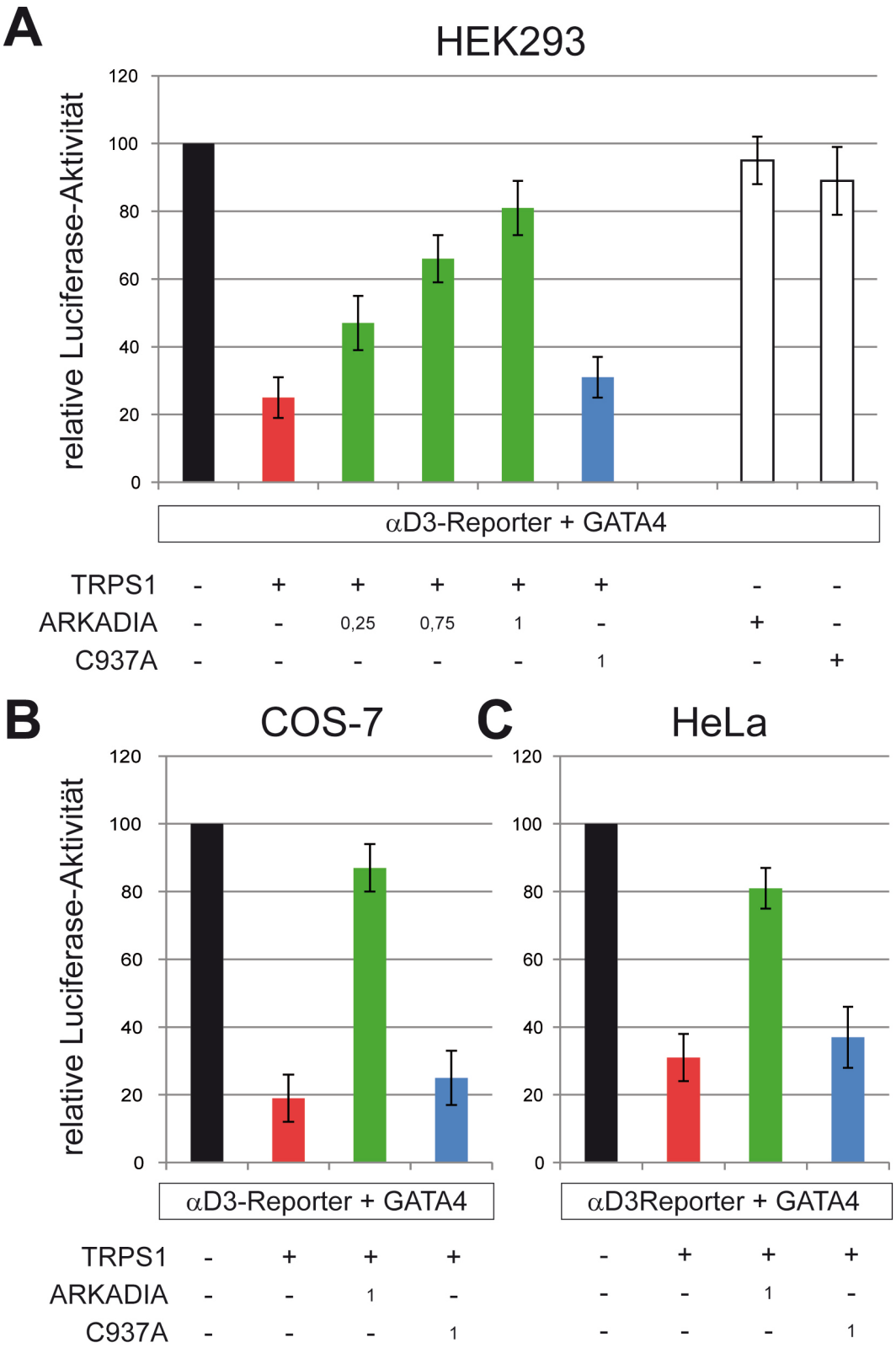
A
HEK293
relative Luciferase-Aktivität
120
100
80
60
40
20
0
αD3-Reporter + GATA4
TRPS1 - + + + + + - -
ARKADIA - - 0,25 0,75 1 - + -
C937A - - - - - 1 - +
B
COS-7
C
HeLa
relative Luciferase-Aktivität
αD3-Reporter + GATA4
αD3Reporter + GATA4
TRPS1 - + + + - + + +
ARKADIA - - 1 - - - 1 -
C937A - - - 1 - - - 1

Abb. 3.10

Abb. 3.10 Veränderung der Bindung von TRPS1 an die GATA Konsensussequenz durch ARKADIA

HEK293 (A) -, COS-7 (B) - und HeLa (C) -Zellen wurden mit dem GATA-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmid αD3 und dem GATA4-Transkriptionsfaktor transfiziert. Die so ermittelte Luciferase-Aktivität wurde als 100% definiert (A, B, C, Säule 1). TRPS1 reduzierte diese Aktivität (A, B, C, Säule 2). Die durch TRPS1 vermittelte Repression konnte durch ARKADIA konzentrationsabhängig (A, Säule 3, 4, 5) reduziert werden (B, C, Säule 3). Unter der Expression von ARKADIA C937A wurde dieser Effekt nicht beobachtet (A, Säule 6; B, C, Säule 4). ARKADIA alleine war nicht in der Lage, die GATA-abhängige Transkription signifikant zu verändern (A, Säule 7 und 8).

4 Diskussion

Patienten mit Trichorhinophalangealem Syndrom (TRPS) zeigen u. a. spezifische Veränderungen an Haut, Haaren, Knorpel und Knochen. Das TRP-Syndrom wird durch Mutationen im *TRPS1*-Gen verursacht. Dieses Gen codiert für einen Transkriptionsfaktor (TF), dessen Zielgene noch größtenteils unbekannt sind. Seine Funktion in einem komplexen Regulationssystem der Genexpression wird durch Interaktionen mit unterschiedlichen Proteinen und posttransskriptionelle Modifikationen reguliert und nur langsam verstanden. Bisher konnten einige dieser Mechanismen für TRPS1 aufgedeckt werden. Die bisher bekannten TRPS1-Bindepartner wurden u. a. durch ein Hefe-Zwei-Hybrid-System oder Immunopräzipitationen von TRPS1-Proteinkomplexen identifiziert. Zu ihnen gehören das Leichte Dynein Seitenkette-Protein 8 (LC8a) (Kaiser et al., 2003a), die Ubiquitin-E3-Ligase RING-Finger-Protein 4 (Kaiser et al., 2003b), das Ubiquitin-Konjugationsenzym 9 (Kaiser et al., 2007) und das Krüppel Zinkfinger-Protein Gli3 (Wülling et al., 2009).

4.1 TRPS1 interagiert mit ARKADIA

4.1.1 ARKADIA

ARKADIA ist ein nahezu ubiquitär exprimiertes (Koinuma et al. 2003) 989 Aminosäuren-großes Protein. N-terminal enthält ARKADIA zwei vorhergesagte Kernlokalisierungssignale (Koinuma et al., 2003), C-terminal besitzt es ein weiteres putatives Kernlokalisierungssignal, eine konservierte Domäne und eine charakteristische RING-Domäne (Mavrakis, et al., 2003; Nagano et al., 2007). Sie verleiht ARKADIA E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität (Koinuma et al., 2003; Mavrakis et al., 2007; Chasapis et al., 2010).

ARKADIA vermittelt intrazellulär die Signale von Mitgliedern der TGF-β-Superfamilie wie NODAL, BMP und TGF-β, einer Gruppe multifunktionaler strukturell verwandter Zellregulationsproteine. Diese spielen eine fundamentale Rolle bei grundlegenden Prozessen wie der Regulation der Entwicklung, der Homöostase und des Immunsystems (Herpin et al., 2004). ARKADIA verstärkt ihre Signal- bzw. Transkriptionsaktivität. Diese Funktion ermöglicht es ARKADIA, im Zusammenhang mit NODAL und dessen Signalwegen die Bildung des Mesendoderms und des „Hensenschen Knotens“ im Embryo zu induzieren und ist notwendig, um die vorderen embryonalen Strukturen auszubilden (Episkopou et al., 2001; Niederländer et al., 2001; Patten und Placzek, 2001; Koinuma et al., 2003; Schier et al., 2003; Mavrakis et al., 2007). TGF-β kontrolliert die Proliferation und Differenzierung vieler Zelltypen sowohl in der Embryogenese als auch in reifen Geweben (Koinuma et al., 2011). Als intrazellulärer Modulator des TGF-β-Signals spielt ARKADIA somit u. a. eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Malignomen (Kleef et al., 1999; Shinagawa et al., 2000 und 2001; Imoto et al., 2001; Reed et al., 2001; Zhang et al., 2003; Buess et al., 2004; Fukuchi et al., 2004; Levy et al., 2007) und der Entwicklung der Organfibrose. Letzteres konnte am Herzen (Cunnington et al., 2009; Yuzawa et al., 2009) an der VHF-induzierten Vorhoffibrose (He et al., 2011), der renalen Fibrose (Liu und Li, 2006; Liu et al., 2006 und 2007; Gai et al., 2010) und der Sklerodermie (Dong et al., 2002) gezeigt werden.

4.1.1.1 Interaktionspartner von ARKADIA

Die Rolle von ARKADIA in der Signaltransduktion der TGF-β-Superfamilie wurde besonders am TGF-β-Signalweg untersucht, welcher sich durch eine große Anzahl verschiedener Signalmoleküle und Kontrollelemente auszeichnet. Um die genaue Funktion von ARKADIA in dieser komplexen Signalkaskade zu verstehen, wurde die funktionelle Relevanz der Interaktionen u.a. mit den Transkriptionsfaktoren R-SMAD 2 und 3, den I-SMADs 6 und 7 und den nukleären Corepressoren SNON und

c-SKI untersucht (Koinuma et al., 2003; Liu und Li, 2006; Choi et al., 2007; Levy et al., 2007; Nagano et al., 2007; Inoue und Imamura 2008). Dabei konnte gezeigt werden, dass ARKADIA mittels seiner E3-Ubiquitin-Ligase-Funktion eine Polyubiquitinierung sämtlicher Interaktionspartner initiiert und diese für eine Degradation über die Proteasomenkomplexe markiert.

4.1.2 TRPS1 und ARKADIA interagieren in Hefen und Säugerzellen

Die Interaktion von TRPS1 und ARKADIA wurde zunächst in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System mit einem murinen Trps1-Konstrukt als „Köder“ entdeckt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden zur Verifizierung ausschließlich die humanen Orthologe TRPS1 und ARKADIA verwendet. Die Binderegionen innerhalb beider Proteine spezifizierten wir durch Interaktionsstudien mit Fragmenten, welche Teilbereiche definierter Größe beider Proteine codierten. Innerhalb von TRPS1 grenzten wir die Interaktionsregion auf die 100 C-terminalen Aminosäuren (aa), die große Teile der Repressionsdomäne mit dem IKAROS-ähnlichen Doppelzinkfinger enthalten, ein. Innerhalb dieses Bereiches konnten auch die Interaktionen mit LC8a (Kaiser et al., 2003a), UBC9 (Kaiser et al., 2007) und der SUMO-E3-Ligase TOPORS (unveröffentlichte Daten) lokalisiert werden. Es verwundert nicht, dass in dieser funktionellen Proteindomäne bevorzugt Bindungen zu anderen Proteinen stattfinden, da Zinkfinger allgemein und die zwei C2H2-Zinkfinger in IKAROS speziell für Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der IKAROS-Familie bekannt sind. Die hohe Selektivität und Spezifität wird durch eine Dimerisierungsdomäne vermittelt, die auch TRPS1 in seinem IKAROS-ähnlichen Doppelzinkfinger enthält und die Homodimerisierungen mit Mitgliedern der IKAROS-Familie – wie AIOLOS, PEGASUS, EOS und HELIOS – ermöglicht (Perdomo und Crossley, 2002; Mc Carty et al., 2003). Darüber hinaus sind IKAROS-Zinkfinger in die Sequenz-spezifische DNA-Bindung involviert (Perdomo und Crossley, 2002). Über Interaktionen in diesem Bereich bieten sich daher vermutlich vielseitige

Regulationsmöglichkeiten. Weitere Hinweise darauf geben die Veränderungen der Repressoraktivität durch eine SUMOylierung innerhalb dieser Region, welche im weiteren Verlauf der Diskussion erörtert wird.

ARKADIA bindet über die Aminosäuren 240-750 an TRPS1. Da jedoch die Abschnitte aa 240-500 und aa 501-750 auch getrennt Interaktionen zeigen, sind zwei an einander angrenzende Bindeabschnitte wahrscheinlich (3.1.2.1). Eben diese(n) Bereich(e) identifizierte auch Koinuma für die Bindung mit SMAD7 (Koinuma et al., 2003). Er verwendete ähnliche Fragmente wie wir. Nagano dagegen machte Interaktionsstudien mit anderen Fragmenten und erhielt andere Ergebnisse für die Interaktion von ARKADIA mit SMAD7 (aa 1-291 und 772-936) (Nagano et al., 2007). Weitere Interaktionen mit diesem Abschnitt von ARKADIA (aa 240-500 und aa 501-750) zeigen sich auch zu AXIN (aa 241-404), einem Gerüstprotein, das zur Bindung mit SMAD7 benötigt wird (Liu et al., 2006). Mit SnoN und c-SKI bindet ARKADIA im Bereich der Aminosäuren 772-936 (Nagano et al., 2007). Alle diese Bereiche enthalten nicht den für die Ubiquitin-Ligase-Funktion entscheidenden RINGfinger (aa 937-977), obwohl auch RINGfinger als Protein-Protein-Interaktionsdomänen bekannt sind. Auch für TRPS1 konnte eine direkte Interaktion mit dem RINGfinger von ARKADIA ausgeschlossen werden. Lediglich für Interaktionen mit SMAD 2 und 3 wurden die 100 C-terminalen Aminosäuren (Mavrakis et al., 2007), die den RINGfinger enthalten, bestimmt. Da jedoch zahlreiche bekannte RINGfinger-Proteine E3-Ligase-Funktion zeigen (Lorick et al.,1999) und auch ARKADIA SMAD7, SNON und C-SKI ubiquitiniert, ohne dass eine Interaktion im RINGfinger-Bereich stattfindet, wurde die Relevanz der Ubiquitin-Ligase-Funktion für die Interaktion von ARKADIA mit TRPS1 genauer untersucht. Hierzu mutierten wir nur eine einzige - für die Funktion jedoch essentielle - Aminosäure (aa 937) und hoben die E3-Ligase-Aktivität auf (Koinuma et al., 2003; Levy et al., 2003; Chasapis et al., 2010). Diese geringfügige Veränderung sollte die Struktur des ARKADIA-Proteins nach Möglichkeit weitestgehend erhalten. Dann analysierten wir die Interaktion von TRPS1 mit eben

dieser E3-defizienten Mutante (C937A) und dem Wildtyp-ARKADIA in verschiedenen Säugerzellen. In allen getesteten Zelllinien konnte ein Einfluss der E3-Ligase-Aktivität von ARKADIA auf die Interaktion mit TRPS1 ausgeschlossen werden. Des Weiteren deutet der immunchemische Nachweis dieser Protein-Protein-Interaktion in unterschiedlichen Zelllinien (HEK294, HeLa, COS-7) darauf hin, dass für diese Interaktion keine hoch zellspezifischen Co-Faktoren erforderlich sind. Dies wiederum könnte ein Hinweis auf einen allgemeingültigen Mechanismus sein, der auf eine Zell- bzw. Gewebetyp-unabhängige Interaktion dieser beiden nahezu ubiquitär exprimierten Proteine hindeutet.

4.2 Ubiquitinierung

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen mit dem Polypeptid Ubiquitin ist in unzählige zelluläre Prozesse einbezogen. So spielt sie eine wichtige Rolle in der Zellzyklus-Progression, DNA-Reparatur, Transkriptionsregulation, Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Signaltransduktion, der Endozytose u. a. von Rezeptoren, Protein-Transport und -Lokalisation, proteasomalem und lysosomalem Abbau sowie der Inflammation, Antigen-Prozessierung und Stressantwort (Hershko und Ciechanover, 1998; Weissmann, Allan M., 2001; Muratani und Tansey, 2003; Haglund und Dikic, 2005; Hecker und Dikic, 2006). Die Spezifität ist zum Einen in der Vielzahl der E1-3-Enzyme (s. 1.4.3), die die Ubiquitinierung vermitteln, zum anderen in der Art der Modifikation angelegt. So können Proteine an einem oder mehreren Lysinresten kovalent an (das Glycin 76 von) Ubiquitin gebunden und mono-, oligo oder polyubiquitiniert werden (Hershko et al., 1998; Haglund et al., 2003a und b; Haglund und Dikic, 2005). „Ubiquitinketten“ entstehen, indem Ubiquitin-Moleküle an Lysin 48 oder 63 von bereits gebundenem Ubiquitin angehängt werden. Lysin 48-gebundene „Polyubiquitinierungsketten“ – mit vier oder mehr Ubiquitin-Molekülen – führen zur Erkennung und Degradation durch 26S-Proteasomen. Alle von ARKADIA bekannten Bindepartner wie SMAD7, c-SKI oder

SNON werden auf diese Weise polyubiquitiniert und zeigen einen dadurch vermittelten proteasomalen Abbau. Hierdurch ist ARKADIA in der Lage, den TGF-β-Signalweg zu modulieren und bestätigt damit die Wichtigkeit dieses Prozesses in der Regulation der Transkription spezifischer Zielgene. Ob dieser Prozess auch für die Regulation von TRPS1 von Bedeutung ist, sollte indirekt an der intrazelluären Lokalisation der Proteine in Immunfluoreszenzstudien in Säugerzellen untersucht werden. Dafür analysierten wir sowohl die Lokalisierung der einzeln als auch mit TRPS1 und ARKADIA bzw. der E3-defizienten ARKADIA-Mutante (ARKADIA C937A) cotransfizierten Zellen (3.2.2). Der Transkriptionsfaktor TRPS1 zeigte sich - wie bereits in der Literatur beschrieben (Malik et al., 2001; Kaiser et al., 2003) - als ein ausschließlich nukleär lokalisiertes Protein, dessen intrazelluläre Verteilung unabhängig von der (Über-)Expression von ARKADIA oder der C937A-Mutante war. ARKADIA verteilte sich sowohl mit als auch ohne TRPS1 in der ganzen Zelle (Koinuma et al., 2003; Liu et al., 2006), was auch durch die Mutation C937A nicht beeinflusst wurde. In früheren Studien konnte eine Abhängigkeit der intrazellulären Verteilung von ARKADIA durch die Anwesenheit des Axin-Proteins und das TGF-β-Signal beschrieben werden (Liu et al., 2006). Hier beobachteten wir eine Colokalisation beider Proteine im Zellkern. Untersuchungen zur Lokalisation und Interaktion von ARKADIA mit SMAD7 zeigten die gleiche Verteilung der Proteine wie TRPS1 und ARKADIA (Koinuma et al., 2003; Liu et al., 2006).

Um eine mögliche Veränderung der intrazellulären Verteilung von TRPS1, die durch eine ARKADIA-vermittelte Polyubiquitinierung von TRPS1 hervorgerufen wird, beobachten zu können, behandelten wir in weiteren Experimenten die cotransfizierten Zellen mit Lactacystin. Lactacystin inhibiert die für den Abbau polyubiquitinierter Proteine zuständigen Proteasomen, so dass es zu einer Akkumulation dieser mit Ubiquitin markierten Proteine im Bereich der Proteasomenkomplexe kommt.

Unter diesen Bedingungen ließ sich eine Anreicherung und – möglicherweise nur scheinbare - Umverteilung von TRPS1 (und auch ARKADIA) ins Zytoplasma

beobachten, was dem Verteilungsmuster der Proteasomenkomplexe entspricht. Eine geringe Menge des TRPS1-Proteins zeigte sich wie auch ohne Lactacystin-Behandlung weiterhin im Zellkern. Dieses Verhalten von TRPS1 ist nur nach der Cotransfektion mit dem ubiquitinierungsfähigen ARKADIA und nicht der E3-defizienten Mutante zu beobachten und gleicht der ARKADIA-abhängigen intrazellulären Verteilung von SMAD7 (Koinuma et al., 2003). Dies lässt vermuten, dass TRPS1 nicht nur wie in der Coimmunpräzipitierung bewiesen mit ARKADIA interagiert und sich deshalb im Zellplasma anhäuft, sondern dass es - wie auch SMAD7 - von der E3-Ligase polyubiquitiniert wird, aber durch die Inhibierung der Proteasomen nicht abgebaut werden kann. Da ohne Zugabe von Lactacystin kein zytoplasmatisches TRPS1 nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass der Abbau des TRPS1-Proteins an den zytoplasmatischen Proteasomenkomplexen sehr rasch, vielleicht sogar unmittelbar nach der Synthese an den Ribosomomen erfolgt. Wahrscheinlich wird im Zytoplasma synthetisiertes TRPS1 bei der Überexpression von ARKADIA zum großen Teil direkt dort ubiquitiniert und - ohne Proteasomeninhibition - degradiert und nur ein kleinerer nicht „abgefangener“ Anteil an TRPS1-Protein gelangt in den Kern. Diese Hypothese wird gestärkt durch unsere Schwierigkeiten, größere Mengen des TRPS1-Proteins unter Cotransfektion mit dem ubiquitinierungsfähigen ARKADIA im Westernblot nachzuweisen. Mit der E3-defizienten Mutante gelang dies dagegen problemlos.

Ein geringer Teil des TRPS1-Proteins ist allerdings auch bei der chemischen Inhibition der Proteasomen im Zellkern nachweisbar. Somit wäre aufgrund der dortigen Colokalisation auch eine durch ARKADIA-vermittelte Ubiquitinierung von TRPS1 im Zellkern möglich, auf die ein „Auswärtstransport“ (Nuclear-Export) erfolgt. Dagegen spricht jedoch die nur verstärkte zytoplasmatische nicht aber nukleäre Anreicherung von TRPS1 nach der Inhibierung der Proteasomen. Dieses Verhalten wurde bei der ARKADIA-vermittelten nukleären Ubiquitinierung von SNON beobachtet (Levy et al., 2007).

Kontrollexperimente mit der E3-Ligase-defizienten ARKADIA-Mutante führten unter Proteasomeninhibition nicht zu einer zytoplasmatische Akkumulation von TRPS1, so dass die Polyubiquitierung durch ein anderes endogenes E3-Enzym ausgeschlossen werden konnte.

Es wird angenommen, dass eine ARKADIA-vermittelte Ubiquitinierung durch verschiedene Cofaktoren (wie SMAD 2/3)(Levy et al., 2007), Gerüstproteine (wie Axin oder RB1CC1)(Liu et al., 2006; Koinuma et al., 2011), extrazelluläre Signale (wie TGF-β)(Liu et al., 2006), bestimmte Konzentrationen (Mavrakis et al., 2007) oder den Zellzyklus (Palmer et al., 1994) beeinflusst und determiniert wird.

4.2.1 ARKADIA inhibiert die TRPS1-vermittelte Repression

In seiner Funktion als Ubiquitin-E3-Ligase reguliert ARKADIA den Abbau verschiedener Transkriptionsfaktoren und somit indirekt die Expression zahlreicher Zielgene. So führt der ARKADIA-vermittelte proteasomale Abbau von SMAD 2, 3 und 7 sowie SNON und c-SKI zu einem Anstieg der Transkription spezifischer Ziegene der TGF-β-Signalkaskade (He et al., 2003; Koinuma et al., 2003; Liu und Li, 2006; Choi et al., 2007; Levy et al., 2007; Nagano et al., 2007; Inoue und Imamura 2008; Cunnington et al., 2009; Guzman-Ayala et al., 2009; Li et al., 2009). Darüber hinaus reguliert die ARKADIA-vermittelte Ubiquitinierung des Clathrin-Adapterprotein-2μ (Mizutani et al., 2010; Koinuma et al., 2011; Miyazono und Koinuma, 2011) den EGFR-Signalweg und damit die Transkription bestimmter EGFR-Zielgene, wie *CyclinD1* (Lin et al., 2001), *iNOS* (Lo et al., 2005a), *B-MYB* (Hanada et al., 2006), *AuroraA* (Hung et al., 2008) und *COX-2* (Lo et al., 2010).

Sowohl die in dieser Arbeit untersuchte Interaktion von TRPS1 mit ARKADIA als auch die sich anschließenden Experimente zur ARKADIA-abhängigen Anreicherung von TRPS1 an den Proteasomenkomplexen legten eine Polyubiquitinierung von TRPS1 durch ARKADIA nahe.

In sich anschließenden funktionellen Analysen sollte untersucht werden, ob auch die Aktivität von TRPS1 als Transkriptionsfaktor durch ARKADIA reguliert bzw.

moduliert werden kann. Hierzu analysierten wir in Luciferase-Reporter-Versuchen die reprimierende Wirkung von TRPS1 in der GATA-abhängigen Transkription. ARKADIA zeigte dabei einen konzentrationsabhängigen inhibierenden Effekt auf die TRPS1-vermittelte Repression. Um zu prüfen, ob diese Wirkung nicht nur auf (allo-)sterische Effekte durch die Interaktion zurückzuführen ist, wurden die gleichen Experimente mit der zwar interaktionsfähigen jedoch nicht ubiquitinierungsfähigen ARKADIA-Mutante C937A durchgeführt. Hier zeigte sich kein Einfluss auf die Funktion von TRPS1 als Transkriptionsfaktor. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die inhibierende Wirkung auch hier von der E3-Ligasefunktion abhängt. Ein direkter Einfluss von ARKADIA auf die GATA-abhängige Transkription in diesem Reportergen-System konnte durch Kontrollexperimente ohne TRPS1 ausgeschlossen werden.

4.2.2 Bedeutung der posttranslationalen Modifikation von TRPS1

In der hier vorliegenden Arbeit konnte mit ARKADIA ein weiterer Interaktionspartner von TRPS1 identifiziert werden, welcher über eine mögliche Ubiquitinierung und somit posttranslationale Modifikation die Aktivität von TRPS1 als Transkriptionsfaktor reguliert. Leider war es uns nicht möglich, die Ubiquitinierung von TRPS1 durch ARKADIA direkt nachzuweisen: Vielfältige Versuchsansätze zur Coimmunpräzipitierung von TRPS1 mit ARKADIA und einer Analyse der gewonnen TRPS1-Präzipitate mit einem Ubiquitin-Antikörper misslungen. Der schnelle Abbau des durch ARKADIA ubiquitinierten TRPS1 bei der Überexpression von ARKADIA ist eine mögliche Erklärung. Denkbar ist auch, dass nur ein geringer Teil von TRPS1 in Versuchen mit den endogenen TRPS1- und ARKADIA-Proteinen mit Ubiquitin modifiziert wird. Versuche unter zusätzlichem Einsatz von Lactacystin schlugen fehl, da die Präzipitierung im Gegensatz zu den Colokalisierungsexperimenten große Zellzahlen erforderte. Die Zellen waren jedoch nach der Zugabe des chemischen Proteasomen-Inhibitors in größeren Volumina nicht kultivierbar. Auch Experimente von akkumulierten kleineren Ansätzen der Zellen für

die Immunpräzipitierung waren nicht erfolgreich, da wahrscheinlich auch hier die Gesamtproteinmenge nicht ausreichte.

Allerdings deuten alle unsere Experimente eindeutig auf die ARKADIA-vermittelte Polyubiquitinierung von TRPS1 als funktionellen Mechanismus hin: Denn sowohl die Hemmung der Transkriptionsrepression von TRPS1 als auch die Translokation und Akkumulation am Proteasom nach Lactacystin-Zugabe ließen sich nur durch ein ubiquitinierungsfähiges Wildtyp-ARKADIA-Protein hervorrufen. Darüber hinaus war TRPS1 ausschließlich bei Überexpression des Wildtyp-ARKADIA schwer mittels immunchemischer Verfahren (Westernblot) nachweisbar.

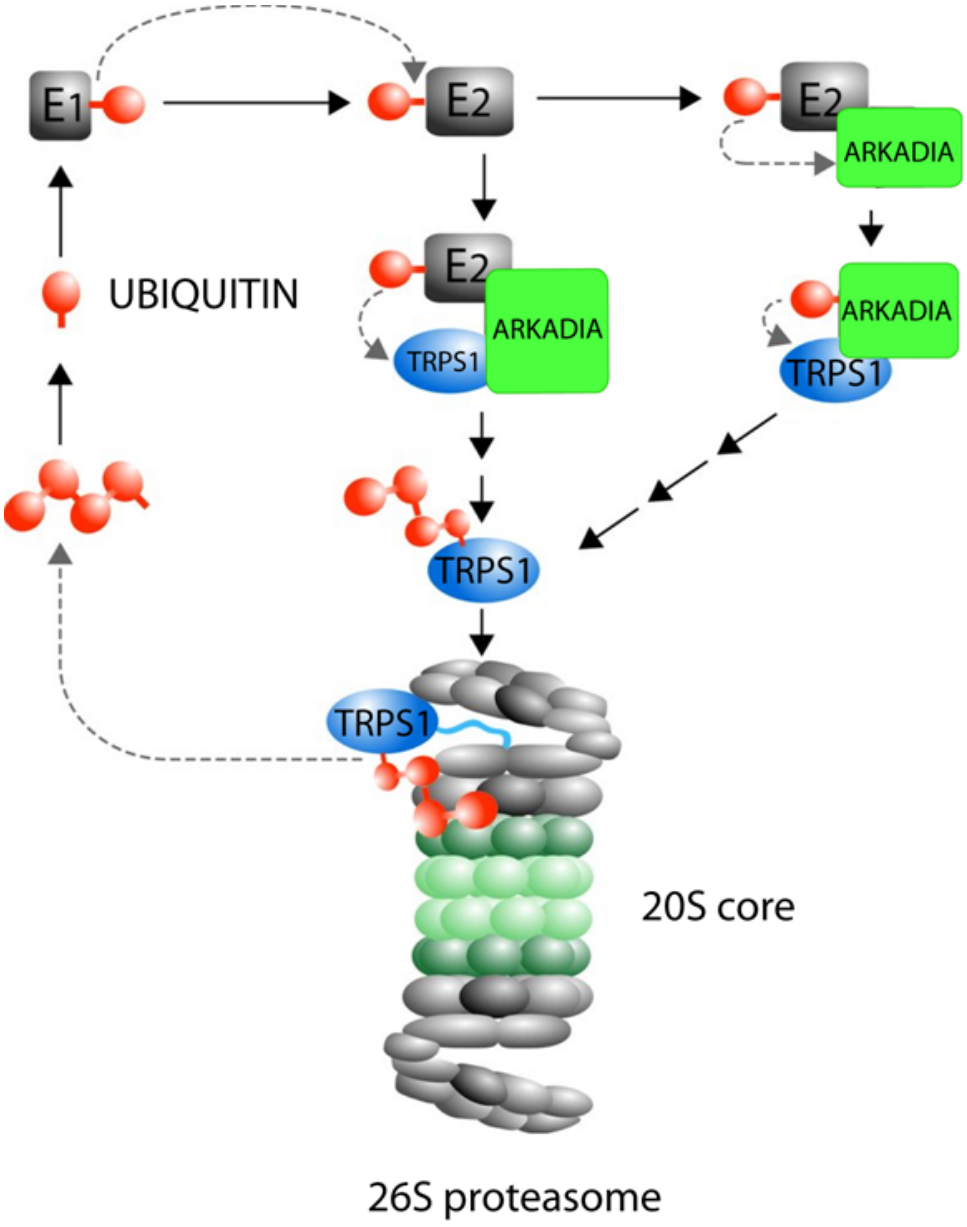

Abb. 4.1 Modell der ARKADIA-vermittelten Polyubiquitinierung von TRPS1

ARKADIA interagiert mit TRPS1, nachdem es durch spezifische Aktivierungs (E1)- und Konjugierungsenzyme (E2) „vorbereitet“ wurde, und induziert als E3-Ubiquitinligase die Polyubiquitinierung von TRPS1. Das polyubiquitinierte TRPS1 wird durch das Proteasom erkannt und degradiert (nach Kostova und Wolf, 2003).

Neben ARKADIA wurde mit RNF4 bereits 2003 ein RINGfinger-Protein mit Ubiquitin-Ligase-Funktion als TRPS1-Bindepartner beschrieben (Kaiser et al., 2003b). Auch RNF4 verringerte die Funktion von TRPS1 als Transkriptionsfaktor. Allerdings war die E3-Ligase-Funktion von RNF4 zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt, so dass die RNF4-vermittelten Ubiquitinierung von TRPS1 bis heute nicht untersucht worden ist. Im Gegensatz zu unseren Expressions- und Interaktionsstudien hatte die RNF4-Expression jedoch keinen Einfluss auf den Nachweis des TRPS1-Proteins im Westernblot und somit die Stabilität von TRPS1. Dies könnte durch die verschiedenen möglichen Arten der Ubiquitinierung - wie die singuläre oder multiple Mono-, die Oligo- und Polyubiquitinierung - begründet sein: So kann die Monoubiquitinierung zu einer Konformations- und Aktivitätsänderung ihrer Substrate - insbesondere der von Transkriptionsfaktoren – führen (Haglund und Dikic, 2005) und damit die inhibierende Wirkung von RNF4 auf die Funktion von TRPS1 als TF erklären.

Die verschiedenen Formen der Ubiquitinierung mit ihren ganz unterschiedlichen funktionellen Konsequenzen geben einen Eindruck von der Komplexität posttranslationaler Modifikationen. Hinzu tritt noch der Ubiquitin-ähnliche Mechanismus der SUMOylierung. Wie bei der Ubiquitinierung werden Lysine - meist innerhalb einer bestimmten SUMO-Zielsequenz – mit SUMO (small ubiquitin-related modifier) modifiziert und konkurrieren dadurch oftmals um die selben Akzeptorstellen zur Ubiquitinierung. Die SUMOylierung beeinflusst ebenfalls auf viele Arten u. a. die zelluläre Lokalisation und Aktivität ihrer Substrate. Allerdings zeigt sie keinen direkten Einfluss auf deren proteasomale Degradation. Auch für TRPS1 wurde die posttranslationale Modifikation mit SUMO als ein wichtiger unterstützender Mechanismus bei dessen Funktion als Transkriptionsfaktor nachgewiesen (Kaiser et al., 2007). Wie jedoch die SUMOylierung und die Ubiquitinierung im Fall von TRPS1 in Wechselwirkung stehen, ist bislang nicht bekannt und Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

4.2.3 Bedeutung der Interaktion von TRPS1 mit ARKADIA

Bindepartner regulieren die Funktion von Proteinen bzw. Transkriptionsfaktoren. Die Expression solcher Bindepartner ist oftmals entwicklungs- und gewebespezifisch. Auch im Fall von TRPS1 wurden bereits einige Regulationsmechanismen durch Interaktionen aufgedeckt: So wird TRPS1 z. B. durch die Interaktion mit LC8a reguliert. Darüber hinaus führt die vermittelte posttranslationale Modifikation mit SUMO oder - wie hier gezeigt - mit Ubiquitin durch ARKADIA zu einer Funktionsveränderung von TRPS1. Dass eine verhinderte Ubiquitinierung durch *TRPS1*-Mutationen im Bereich von Ubiquitin-Bindungstellen zur Pathogenese des TRP-Syndroms beiträgt, ist jedoch eher unwahrscheinlich, da TRPS1 multiple – möglicherweise alternative - Ubiquitin-Bindungsstellen aufweist und Versuche mit vorhergesagten mutierten Ubiquitin- bzw. SUMO-Akzeptorstellen nicht zu einer Funktionsveränderung von TRPS1 führten (Kaiser et al., 2007).

Für die Funktion von TRPS1 als Transkriptionsfaktor scheint jedoch der C-Terminus mit den IKAROS-ähnlichen Zinkfingern bedeutsam zu sein: Hier findet sich zum Einen eine klare Prädilektionsstelle für die Interaktion mit Bindepartnern – wie auch hier gezeigt mit ARKADIA - zum anderen liegen die für das TRP-Syndrom relevanten Missense-Mutationen auch ausschließlich in der IKAROS-Region bzw. im Bereich des GATA-Zinkfingers und des Kernlokalisierungssignals. (Lüdecke et al. 2001 und nicht veröffentlichte Daten). Ob Mutationen die Interaktion zu spezifischen Bindepartnern beeinflussen, wurde bisher nicht detailliert untersucht und bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Möglicherweise ist die Interaktion von ARKADIA und TRPS1 bei der Entstehung der renalen Fibrose, die auch bei einigen Patienten mit TRPS beobachtet wird, von Bedeutung. Denn TRPS1 inhibiert das TGF-β-Signal - einen Schlüsselmediator der renalen Fibrose - indem es die Expression von ARKADIA als intrazellulären Verstärker des TGF-β-Signals vermindert. Eine ARKADIA-vermittelte Ubiquitinierung und ein so induzierter Abbau von TRPS1 würde somit zu einem Anstieg der Expression von *ARKADIA* führen.

Des Weiteren ist eine funktionelle Relevanz der Interaktion von TRPS1 und ARKADIA in der Onkogenese nicht auszuschließen. Bei einigen Tumoren – wie dem Brust- und Prostata-Karzinom – konnten „Fehlexpressionen“ von *TRPS1* oder *ARKADIA* beobachtet werden: Mamma-Karzinome zeigen häufig eine Überexpression von *TRPS1* (Chen et al., 2010; Litton et al., 2011). Die besonders bösartigen Androgen-unabhängigen Prostata-Karzinome weisen dagegen meist verminderte TRPS1-Konzentrationen auf (Chang et al., 2002, 2004, 2007; Van den Bemd et al., 2003). ARKADIA ist in vielen untersuchten Malignomen ebenfalls in verringerter Konzentration bzw. nicht vorhanden (Levy et al., 2007). Die Analyse eines Zusammenhangs fand bisher nicht statt, erscheint jedoch aufgrund unserer Ergebnisse, der von Gai (2010, 2011) sowie der potentiellen Funktion beider Proteine als Tumorsuppressorgene (Levy et al., 2007; Chen et al., 2010; Nagano et al., 2010) vielversprechend.

5 Zusammenfassung

Mutationen im *TRPS1*-Gen verursachen das Trichorhinophalangeale Syndrom. *TRPS1* codiert für einen Transkriptionsfaktor (TF), dessen Aktivität sowohl durch Interaktionspartner als auch die posttranslationale Modifikation reguliert wird. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von TRPS1 mit der Ubiquitin-Ligase ARKADIA nachgewiesen. Durch den Einsatz unterschiedlich großer TRPS1- und ARKADIA-Fragmente grenzten wir die Interaktionsregion innerhalb von TRPS1 auf die Repressionsdomäne mit dem IKAROS-ähnlichen Zinkfinger und innerhalb von ARKADIA auf zwei Regionen, die jedoch nicht im Bereich der RINGfinger-Domäne liegen, ein. ARKADIA als RINGfinger-Ubiquitin-Ligase induziert über die Polyubiquitinierung ihrer Substrate – insbesondere TFs - deren proteasomale Degradation und reguliert dadurch u. a. den TGF-ß-Signalweg.

In Analysen der intrazellulären Lokalisation der Wildtyp-TRPS1- und ARKADIA-Proteine sowie der nicht ubiquitinierungsfähigen ARKADIA-Mutante ließ sich unter Inhibition der Proteasomenkomplexe ausschließlich durch das E3-fähige ARKADIA eine Anreicherung von TRPS1 im Zytoplasma im Bereich der Proteasomen nachweisen. Dieses auffällige Verteilungsmuster von TRPS1 sowie die schwierige Nachweisbarkeit von TRPS1 in der Coimmunpräzipitierung bei der Überexpression des Wildtyp-ARKADIA-Proteins weisen stark auf eine ARKADIA-vermittelte Polyubiquitinierung und dadurch proteasomale Degradierung von TRPS1 hin.

Auch in Luciferase-Reporter-Studien zeigte nur das ubiquitinierungsfähige ARKADIA einen inhibierenden Effekt auf die TRPS1-vermittelte Repression und damit die Funktion von TRPS1 als TF.

Mit ARKADIA wurde hier ein weiterer Bindepartner und mit der (ARKADIA-vermittelten) Ubiquitinierung ein neuer Mechanismus zur Regulation der Funktion von TRPS1 als TF identifiziert. Ob diese Interaktion durch die für das TRP-Syndrom ursächlichen Mutationen beeinflusst wird und damit für dessen Pathogenese physiologisch relevant ist, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

6 Literaturverzeichnis

Ahn, S., Joyner, A. L.: Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling
during mouse limb patterning. *Cell.* **118**, 505-516 (2004)

Alonso, C., Miskin, J., Fernández-Zapatero, P., Hernáez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Cantó, C., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L. and Escribano, J.E.: African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol*. **75**, 9819-9827 (2001)

Bies, J., Markus, J., Wolff, L.: Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem.* **277**, 8999-9009 (2002)

Buess, M., Terracciano, L., Reuter, J., Ballabeni, P., Boulay, J.-L., Laffer, U., Metzger, U., Herrmann, R., Rochlitz, C.: STRAP is a strong predictive marker of adjuvant chemotherapy benefit in colorectal cancer. *Neoplasia.* **6**, 207-212 (2004)

Chang, G. T., Steenbeek, M., Schippers, E., Blok, L. J., van Weerden, W. M., van Alewijk, D. C., Eussen, B. H., van Steenbrugge, G. J. and Brinkmann, A. O.: Characterization of a zinc-finger protein and its association with apoptosis in prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. **92**, 1414-1421 (2000)

Chang, G. T., van den Bemd, G.J., Jhamai, M. and Brinkmann, A.O.: Structure and function of GC79/TRPS1, a novel androgen-repressible apoptosis gene. *Apoptosis.* **7**, 13-21 (2002)

Chang, G. T., Jhamai, M., Weerden, W. M. v., Jenster, G., Brinkmann, A. O.: The TRPS1 transcription factor: androgenic regulation in prostate cancer and high expression in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* **11 (4)**, 815-22 (2004)

Chang, G. T., Camble, S. C., Jhamai, M., Wait, R., Bevan, C. L., Brinkmann, A. O.: Proteomic analysis of proteins regulated by TRPS1 transcription factor in DU145. *Biochim Biophys Acta.***1774 (5)**, 575-582 (2007)

Chasapis, C. T., Loutsidou, A. K., Orkoula, M. G., Spyroulias, G.A.: Zinc Binding Properties od Engineered RING Finger Domain of Arkadia E3 Ubiquitin Ligase. *Bioinorg Chem Appl.*pii: 323152, PMID: 20689703 (PubMed) (2010)

Chen, J. Q., Litton, J., Xiao, L., Zhang, H.-Z., Warneke, C. L., Wu, Y., Shen, X., Wu, S., Sahin, A., Katz, R.: Quantitative Immunohistochemical Analysis and Prognostic Significance of TRPS-1, a New GATA Transcription Factor Family Member, in Breast Cancer. *Horm Cancer.* **1 (1)**, 21-33 (2010)

Chen, J. Q., Bao, Y., Litton, J., Xiao, L., Zhang, H.-Z., Warneke, C. L., Wu, Y., Shen, X., Wu, S., Katz, R. L.: Expression and Relevance of TRPS-1: A New GATA Transcription Factor in Breast Cancer. *Horm Cancer.* **2 (2)**, 132-143 (2011)

Choi, S.-H., Seo, G.-Y., Nam, E.-H., Jeon, S.-H., Kim, H.-A., Park, J.-B., Kim, P.-H.: Opposing Effects of Arkadia and Smurf on TGFβ-induced IgA-Isotype Expression. *Mol Cells.* **24 (2)**, 283-287 (2007)

Crépieux, P., Kwon, H., Leclerc, N., Spencer, W., Richard, S., Lin, R. and Hiscott, J.: IκBα physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain. *Mol Cell Biol.* **17**, 7375-7385 (1997)

Cunnington, R. H., Nazari, M., Dixon, I. M.: c-Ski, Smurf2 and Arkadia as regulators of TGF-β-signaling: new targets for managing myofibroblast function and cardiac fibrosis. *Can J Physiol Pharmacol*. **87 (10)**, 764-772 (2009)

Dick, T., Ray, K., Salz, H. K. and Chia, W.: Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in Drosophila melanogaster. *Mol Cell Biol.* **16**, 1966-1977 (1996)

Dong, C., Zhu, S., Wang, T., Yoon, W., Li, Z., Alvarez, R.J., ten Dijke, P., White, B., Wigley, F. M., Goldschmidt-Clermont, P. J.: Deficient Smad7 expression: a putative molecular defect in scleroderma. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 3908-3913 (2002)

Elson, E., Perveen, R., Donnai, D., Wall, S., Black, G. C. M.: De novo GLI3 mutation in acrocallosal syndrome: broadening the Phenotypic spectrum of GLI3 defects and overlap with murine models. *J Med Genet.* **39**, 804-806 (2002)

Episkopou, V., Arkell, R., Timmons, P. M., Walsh, J. J., Andrew, R. L., Swan, D.: Induction of the mammalian node requires Arkadia function in the extraembryonic lineages. *Nature.* **410 (6830)**, 825-830 (2001)

Epstein, E., Sela-Brown, A., Ringel, I., Kilav, R., King, S. M., Benashski, S. E., Yisraeli, J. K., Silver, J. and Naveh-Many, T.: Dynein light chain binding to a

3'-untranslated sequence mediates parathyroid hormone mRNA association with microtubules. *J Clin Invest*. **105**, 505-512 (2000)

Fan, J., Zhang, Q., Tochio, H., Li, M. and Zhang, M.: Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain. *J Mol Biol.* **306**, 97-108 (2001)

Fantauzzo, K. A., Bazzi, H., Jahoda, C. A., Christiano, A. M.: Dynamic expression of the zinc-finger transcription factor Trps1 during hair follicle morphogenesis and cycling. *Gene Expr Patterns.* **8 (2)**, 51-57 (2008a)

Fantauzzo, K. A., Tadin-Strapps, M., You, Y., Mentzer, S. E., Baumeister, F. A., Cianfarani, S., Van Maldergem, L., Warburton, D., Sundberg, J. P., Christiano, A. M.: A position effect on TRPS1 is associated with Ambras syndrome in humans and the Koala phenotype in mice. *Hum Mol Genet.* **17**, 3539-3551 (2008b)

Fedele, M., Benvenuto, G., Pero, R., Macello, B., Battista, S., Lembo, F., VolloSno, E., Day, P. M., Santoro, M., Lania, L., Bruni, C. B., Fusco, A. and Chiaritoti, L.: A novel member of the BTB/POZ family, PATZ, associates with the RNF4 RING finger protein and acts as a transcriptional repressor. *J Biol Chem*. **275**, 7894-7901 (2000)

Felman, A.H., Frias, J.L.: The trichorhinophalangeal syndrome: study of 16 patients in one family. *AJR Am J Roentgenol*. **129(4)**, 631-638 (1977)

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

Fukushi, M., Nakajima, M., Fukai, Y., Miyazaki, T., Masuda, N., Sohda, M., Manda, R., Tsukada, K., Kato, H., Kuwano, H.: Increased expression of c-Ski as a co-repressor in transforming growth factor-beta signaling correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* **108**, 818-824 (2004)

Gai, Z., Zhou, G., Gui, T., Itoh, S., Oikawa, K., Uetani, K., Muragaki, Y.: Trps1 Haploinsufficiency Promotes Renal Fibrosis by Increasing Arkadia Expression. *J Am Soc Nephrol*. **21 (9)**, 1468-1476 (2010)

Gai, Z., Gui, T., Muragaki, Y.: The function of TRPS1 in the development and differentiation of bone , kidney and hair follicles. Histol Histopathol. **26**, 915-921 (2011)

Galili, N., Nayak, S., Epstein, J. A. and Buck C. A.: Rnf4, a RING protein expressed in the developing nervous and reproductive systems, interacts with Gscl, a gene within the DiGeorge critical region. *Dev Dyn*. **218**, 102-111 (2000)

Geiss-Friedlander, R., Melchior, F.: Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8 (12)**, 947-956 (2007)

Giedion, A., Burdea, M., Fruchter, Z., Meloni, T.; Trosc, V.: Autosomal dominant transmission of the tricho-rhino-phalangeal syndrome. Report of 4 unrelated families, review of 60 cases. *Paediatr Acta*. **28**, 249-259 (1973)

Gill, G.: Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on trancription factor activity. *Cur Opin Genet Dev.* **13 (2)**, 108-113 (2003)

Gocke, C. B., Yu, H., Kang, J.: Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates. *J Biol Chem.* **280 (6)**, 5004-5012 (2005)

Göttsch, S., Bayer, P.: Structural attributes in the conjugation of ubiquitin, SUMO and RUB to protein substrates. *Front Biosci.* **7**, 148-162 (2002)

Gomez-del Arco, P., Koipally, J., Georgopoulos, K.: Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol.* **25**, 2688-2697 (2005)

Guzman-Ayala, M., Lee, K. L., Mavrakis, K. J., Goggolidou, P., Norris, D. P.; Episkopou, V.: Graded Smad2/3 Activation Is Converted Directly into Levels of Target Gene Expression in Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE.* **4 (1),** e4268 (2009)

Häkli, M., Lorick, K. L., Weissman, A. M., Jänne, O. A., Palvimo, J. J.: Transcriptional coregulator SNURF (RNF 4) possesses ubiquitin E3 ligase activity. *FEBS Lett.* **560 (1-3)**, 56-62 (2004)

Häkli, M., Karvonen, U., Jänne, O. A., Palvimo, J. J.: SUMO-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Exp Cell Res.* **304 (1)**, 224-233 (2005)

Haglund, K., Di Fiore, P. P., Dikic, I.: Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci*. **28**, 598-603 (2003a)

Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P., Dikic, I.: Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol.* **5**, 461-466 (2003b)

Hall, B. D., Langer, L. O., Giedion, A., Smith, D. W., Cohen, M. M. Jr., Beals, R. K. and Brandner, M.: Langer-Giedion syndrome. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* **10**, 147-164 (1974)

Hamers, A., Jongbloet, P., Peeters, G., Fryns, J. P., Geraedts, J.: Severe mental retardation in a patient with tricho-rhino-phalangeal syndrome type I and 8q deletion. *Eur J Pediatr.* **149**, 618-620 (1990)

Hanada, N., Lo H.-W., Day, C. P., Pan, Y., Nakajima, Y., Hung, M. C.: Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Mol Carcino.* **45**, 10-17 (2006)

He, J., Tegen, S. B., Krawitz, A. R., Martin, G. S., Luo, K.: The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of Smad proteins. *J Biol Chem.* **278 (33)**, 30540-30547 (2003)

He, X., Gao, X., Peng, L., Wang, S., Zhu, Y., Ma, H., Lin, J., Duan, D. D.: Atrial fibrillation induces myocardial fibrosis through angiotensin II type 1 receptor-specific Arkadia-mediated downregulation of Smad7. *Circ Res.* **108 (2)**, 164-175 (2011)

Haglund, K., Dikic, I.: Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.* **24**, 3353-3359 (2005)

Hecker, C.-M-, Dikic, I.: Spezifität der Ubiquitin- und SUMO-Bindungsdomänen. *BioSpekt.* **2**, 154-157 (2006)

Herpin, A., Lelong, C., Favrel, P.: Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol.* **28 (5)**, 461-485 (2004)

Hershko, A., Ciechanover, A.: The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* **67**, 425-479 (1998)

Herzig, R. P., Andersson, U. and Scarpulla, R. C.: Dynein light chain interacts with NRF-1 and EWG, structurally and functionally related transcription factors from humans and drosophila. *J Cell Sci.* **113**, 4263-4273 (2000)

Hietakangas, V., Ahlskog, J. K., Jakobsson, A. M., Hellesuo, M., Sahlberg, N. M., Holmberg, C. I., Mikhailov, A., Palvimo, J. J., Pirkkala, L., Sistonen, L.: Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol.* **23**, 2953-2968 (2003)

Hilton, M. J., Tu, X., Cook, J., Hu, H., Long, F.: Ihh controls cartilage development by antagonizing Gli3, but requires additional effectors to regulate osteoblast and vascular development. *Development.* **132**, 4339-4352 (2005)

Hirano, Y., Murata, S., Tanaka, K., Shimizu, M., Sato, R.: Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway. *J Biol Chem.* **278**, 16809-16819 (2003)

Hirvonen-Santti, S. J., Sriraman, V., Anttonen, M., Savolainen, S., Palvimo, J. J., Heikinheimo, M., Richards, J. S., Jänne, O. A.: Small nuclear RING finger protein expression during gonad development: regulation by gonatropins and estrogen in the postnatal ovary. *Endocrinology.* **145 (5)**, 2433-2444 (2004)

Hollenberg, S. M., Sternglanz, R., Cheng, P. F. and Weintraub, H.: Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol Cell Biol.* **15**, 3813-3822 (1995)

Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Mayhew, C. N., Goodson, M. L., Park-Sarge, O. K., Sarge, K. D. and Goodson, M.: Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem*. **276**, 40263-40267. Erratum in: *J Biol Chem.* **277**, 26708 (2001)

Huang, T. T., Wuerzberger-Davis, S. M., Wu, Z. H., Miyamoto, S.: Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell.* **115**, 565-576 (2003)

Hung, L. Y., Tseng, J. T., Lee, Y. C., Xia , W., Wang, Y. N., Wu, M. L., Chuang, Y. H., Lai, C. H., Chang, W. C.: Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleid Acids Res.* **36**, 4337-4351 (2008)

Imoto, I., Pimkhaokham, A., Fukuda, Y., Yang, Z.-Q., Shimada, Y., Nomura, N., Hirai, H., Imamura, M., Inazawa, J.: SNO is a probable target for gene amplification at 3q26 in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Biochem Biophys Res Commun.* **286**, 559-565 (2001)

Inoue, Y., Imamura, T.: Regulation of TGF-β family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci.* **99(11)**, 2107-12 (2008)

Itoh, S., Kanno, S., Gai, Z., Suemoto, H., Kawakatsu, M., Tanishima, H., Morimoto, Y., Nishioka, K., Hatamura, I., Yoshida, M., Muragaki, Y.: Trps1 plays a pivotal role downstream of Gdf5 signaling in promoting chondrogenesis and apoptosis of ATDC5 cells. *Genes Cells.* **13 (4)**, 355-363 (2008)

Jacob, Y., Badrane, H., Ceccaldi, P.-E., and Tordo, N.: Cytoplasmic dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. *J Virol*. **74**, 10217–10222 (2000)

Jaffrey, S. R. and Snyder, S. H.: PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science.* **274**, 774-777 (1996)

Jentsch, S., Pyrowolakis, G.: Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol.* **10 (8)**, 335-342 (2000)

Johnson, E. S.: Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem.* **73**, 355-382 (2004)

Johnson, E. S. and Blobel, G.: Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem*. **272**, 26799-26802 (1997)

Johnson, E. S., Gupta, A. A.: An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*. **106**, 735-744 (2001)

Johnson, E. S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J., Blobel, G.: The ubiquitin-like protein Smt3q is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *EMBO J.* **16**, 5509-5519 (1997)

Johnston, J. J., Olivos-Glander, I., Killoran, C., Elson, E., Turner, J. T., Peters, K. F., Abbrott, M. H., Aughton, D. J., Aylsworth, A. S., Bamshad, M. J., Booth, C., Curry, C. J., David, A., Dinulos, M. B., Flannery D. B., Fox, M. A., Graham, J. M., Grange, D. K., Guttmacher, A. E., Hannibal, M. C., Henn, W., Hennekam, R. C., Holmes, L. B., Hoyme, H. E., Leppig, K. A., Lin, A. E., Macleod, P., Manchester, D. K., Marcelis, C., Mazzanti, L., McCann, E, McDonald, M. T., Mendelsohn, N. J., Moeschler J. B., Moghaddam, B., Neri, G., Newbury-Ecob, R., Pagon, R. A., Phillips, J. A., Sadler, L. S., Stoler, J. M., Tilstra, D., Walsh Vockley, C. M., Zackai, E. H., Zadeh, T. M., Brueton, L., Black, G. C.: Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet.* **76 (4)**, 609-622 (2005)

Kahyo, T. Nishida, T., Yasuda, H.: Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell.* **8**, 713-718 (2001)

Kaiser, J. F., Tavassoli, K., Bemd, G.-J. V. d., Chang, G. T. G., Horsthemke, B., Möröy, T., Lüdecke, H.-J.: Nuclear interaction of the dynein light chain LC8a with the TRPS1 transcription factor supresses the transcriptional repression activity of TRPS1. *Hum Mol Gen.***12**, 1349-1358 (2003a)

Kaiser, J. F., Möröy, T., Chang, G. T. G., Horsthemke, B., Lüdecke, H.-J.: The RING Finger Protein RNF4, a Co-regulator of Transcription, Interacts with the TRPS1 Transcription Factor. *J Biol Chem.* **278**, 38780-38785 (2003b)

Kaiser, J. F., Brega, P., Raff, M. L., Byers, P. H., Gallati, S., Taylor Kay, T., Almeida, S. de, Horsthemke, B., Lüdecke, H.-J.: Novel missense mutations in the TRPS1 transcription factor define the nuclear localization signal. *Eur J Hum Genet.* **12**, 121-126 (2004)

Kaiser, J. F., Lüdecke, H.-J., Weger, S.: SUMOylation modulates transcriptional repression by TRPS1. *Biol Chem.* **388**, 381-390 (2007)

Kajii, T., Gonzalez, I. F., Matsuura, S.: Tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. *Am J Med Genet.* **49**, 349-350 (1994)

Kalff-Suske, M., Wild, A., Topp, J., Wessling, M., Jacobsen, E. M., Bornholdt, D., Engel, H., Heuer, H., Aalfs, C. M., Ausems, M. G., Barone, R., Herzog, A., Heutink, P., Homfray, T., Gillessen-Kaesbach, G., König, R., Kunze, J., Meinecke, P., Möller, D., Rizzo, R., Strenge, S., Superti-Furga, A., Grzeschik, K. H.: Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Hum Mol Genet.* **8 (9)**, 1769-1777 (1999)

Kim, K.I., Baek, S. H., Chung, C. H.: Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *J Cell Physiol*. **191**, 257-268 (2002)

Kleef, J., Ishiwata, T., Maruyama, H., Friess, H., Truong, P., Büchler, M. W., Falb, D., Korc, M.: The TGF-β-signaling inhibitior Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene.* **18**, 5363-5372 (1999)

Koinuma, D., Shinozaki, M., Komuro, A., Goto, K., Saitoh, M., Hanyu, A., Ebina, M., Nukiwa, T., Miyazawa, K., Imamura, T., Miyazono, K.: Arkadia amplifies TGFβ-superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J.* **22 (24)**, 6458-6470 (2003)

Koinuma, D., Shinozaki, M., Nagano, Y., Ikushima, H., Horiguchi, K., Goto, K., Chano, T., Saitoh, M., Imamura, T., Miyazono, K., Miyazawa, K.: RB1CC1 protein positively regulates transforming growth factor-β signaling through the

modulation of Arkadia E3 ubiquitin ligase activity. *J Biol Chem.* **286 (37)**, 32502-32512 (2011)

Kunath, M., Ludecke, H-J. and Vortkamp, A.: Expression of Trps1 during mouse embryonic development. *Gene Expr. Patterns.* **2**, 119-122 (2002)

Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., de Thé, H.: Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol.* **10 (5)**, 547-555 (2008)

Langer, L.O.: The thoraco-pelvic-phalageal dystrophy. Clinical delineation of birth defects. Part IV. Skeletal dysplasia. *Birth Defects.* **IV**, 55-64 (1969)

Lei, Q., Zelman, A. K., Kuang, E., Li, S., Matise, M. P.: Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli 2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development.* **131**, 3593-3604 (2004)

Levy, L., Howell, M., Das, D., Harkin, S., Episkopou, V., Hill, C. S.: Arkadia Activates Smad3/Smad4-Dependent Transcription by Triggering Signal-Induced SnoN Degradation. *Mol Cell Biol.* **27 (17)**, 6068-6083 (2007)

Li, X. Z., Feng, J. T., Hu, C. P., Chen, Z. Q., Gu, Q. H., Nie, H. P.: Effects of Arkadia on airway remodeling through enhancing TGF-β-signaling in allergic rats. *Lab Invest.* **90 (7)**, 997-1003 (2010a)

Li, X. Z., Feng, J. T., Hu, C. P., Chen, Z. Q.: Does Arkadia contribute to TGF-β-induced IgA expression through up-regulation of Smad signaling in IgA nephropathy? *Int Urol Nephrol.* **42 (3)**, 719-722 (2010)

Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon L., Hung M. C.: Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* **3**, 802-808 (2001)

Liu, B., Shuai, K.: Regulation of the sumoylation system in gene expression. *Curr Opin Cel Biol.* **20 (3)**, 288-293 (2008)

Liu, F.-Y., Li, X.-Z.: The roles of Arkadia in renal tubular epithelial to mesenchymal transition. *Med Hypotheses.* **67 (5)**, 1205-1207 (2006)

Liu, F.-Y., Li, X.-Z., Peng, Y.- M., Liu, H., Liu, Y.-H.: Arkadia-Smad7-Mediated Positive Regulation of TGFβ Signaling in a Rat Model of Tubolointerstitial Fibrosis. *Am J Nephrol.* **27**, 176-183 (2007)

Liu, W., Rui, H., Wang, J., Lin, S., He, Y., Chen, M., Li, Q., Ye, Z., Zhang, S., Chan, S. C., Chen, Y.-G., Han, J., Lin, S.-C.: Axin is a scaffold protein in TGFβ signaling that promotes degrad# of Smad7 by Arkadia. *EMBO J.* **25**, 1646-1658 (2006)

Litton, J. K., Chen, J. Q., Warneke, C. L., Zhang, H., Berinstein, N., Sahin, A. A., Bondy, M. L., Hortobagyi, G. N., Murray, J. L., Radvanyi, L.: Abstract No. 50. *Breast Cancer Symposium 2008, Detection/Diagnosis, Predictive and Prognostic Factors*

Lo, H.-W., Hsu, S.-C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Yia, W., Wei, Y., Bartholomeusz, G., Shih J.-Y., Hung, M.-C.: Nuclear Interaction of Egfr and STAT3 in the Activation of iNOS/NO Pathway. *Cancer Cell.* **7**, 575-589 (2005a)

Lo, H.-H.: EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. *Curr Mol Pharmacol.* **3**, 37-53 (2010)

Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., Weissman, A. M.: RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2-) dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96 (20)**, 11364-11369 (1999)

Low, W. C., Wang, C., Pan, Y., Huang, X. Y., Chen, . K., Wang, B.: The decoupling of Smoothened from Galphai proteins has little effect on Gli3 protein processing and Hedgehog-regulated chick neural tube patterning. *Dev Biol.* **321**, 188-196 (2008)

Lüdecke, H-J., Schaper, J., Meinecke, P., Momeni, P., Gross, S., von Holtum, D., Hirche, H., Abramowicz, M.J., Albrecht, B., Apacik, C., Christen, H.J., Claussen, U., Devriendt, K., Fastnacht, E., Forderer, A., Friedrich, U., Goodship, T.H., Greiwe, M., Hamm, H., Hennekam, R.C., Hinkel, G.K., Hoeltzenbein, M., Kayserili, H., Majewski, F., Mathieu, M., McLeod, R., Midro, A.T., Moog, U., Nagai, T., Niikawa, N., Orstavik, K.H., Plochl, E., Seitz, C., Schmidtke, J., Tranebjaerg, L., Tsukahara, M., Wittwer, B., Zabel, B., Gillessen-Kaesbach, G. and Horsthemke B.: Genotypic and phenotypic spectrum in tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. *Am J Hum Genet*. **68**, 81-91 (2001)

Lyngsø, C., Bouteiller, G., Damgaard, C. K., Ryom, D., Sanchez-Munoz, S., Nørby, P. L., Bonven, B. J., Jørgensen, P.: Interaction between the transcription factor SPBP and the positive cofactor RNF4. An interplay between protein binding zinc fingers. *Chem.* **275**, 26144-26149 (2000)

Malik, T.H., Shoichet, S.A., Latham, P., Kroll, T.G., Peters, L.L. and Shivdasani, R.A.: Transcriptional repression and developmental functions of the atypical vertebrate GATA protein TRPS1. *EMBO J.* **20**, 1715-1725 (2001).

Malik, T. H., Stechow, D. v., Bronson, R. T., Shivdasani, R. A.: Deletion of the GATA domain of TRPS1 causes an absence of facial hair and provides new insights into the bone disorder in inherited tricho-rhino-phalangeal syndromes. *Mol Cell Biol.* **22 (24)**, 8592-8600 (2002)

Martin, S., Wilkinson, K. A., Nishimune, A., Henley, J. M.: Emerging extranuclear roles of protein SUMOylation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. **8 (12)**, 948-959 (2007)

Mavrakis, K. J., Andrew, R. L., Lee, K. L., Petropoulou, C., Dixon, J. e., Navaratnam, N., Norris, D. P., Episkopou, V.: Arkadia Enhances Nodal/TGF-β Signaling by Coupling Phospho-Smad2/3 Activity and Turnover. *PLoS Biol.* **5 (3)**, 586-603 (2007)

Mc Carty, A. S., Kleiger, G., Eisenberg, D., Smale, T.: Selective Dimerization of a C2H2 Zinc Finger Subfamily. *Mol Cell.***11**, 459-470 (2003)

Miyazono, K., Koinuma, D.: Arkadia—beyond the TGF-β pathway. *J Biochem.* **149 (1)**, 1-3 (2011)

Mizutani, A., Saitoh, M., Imamura, T., Miyazawa, Miyazono, K.: Arkadia complexes with clathrin adapter AP2 and regulates EGF singalling. *J Biochem.* **148 (6)**, 733-741 (2010)

Mo, R., Freer, A. M., Zinyk, D. L., Crackower, M. A., Michaud, J., Heng, H. H., Chik, K. W., Shi, X. M., Tsui, L. C., Cheng, S. H., Joyner, A. L., Hui, C.: Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development.* **124**, 113-123 (1997)

Moilanen, A. M., Poukka, H., Karvonen, U., Hakli, M., Janne, O. A. and Palvimo, J. J.: Identification of a novel RING finger protein as a coregulator in steroid receptor-mediated gene transcription. *Mol Cell Biol*. **18**, 5128-5139 (1998)

Momeni, P., Glöckner, G., Schmidt, O., Holtum, D. v., Albrecht, B., Gillessen-Kaesbach, G., Hennekam, R., Meinecke, P., Zabel, B., Rosenthal, A., Horsthemke, B., Lüdecke, H.-J.: Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Natur Gen*. **24**, 71-74 (2000)

Muller, J. L., Ruiz i Altaba, A.: Growth, hedgehog and the price of GAS. *BioEssays.* **24**, 22-26 (2002)

Muratani, M., Tansey, W. P.: How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol cell Biol.* **4**, 192-201 (2003)

Nagano, Y., Mavrakis, K. J., Lee, K. L., Fujii, T., Koinuma, D., Sase, h., Yuki, K., Isogaya, K., Saitoh, M., Imamura, T., Episkopou, V., Miyazono, K.: Arkadia induces Degradation of SnoN and c-Ski to Enhance Transforming Growth Factor-β Signalling. *J Biol Chem.* **282 (28)**, 20492-20501 (2007)

Napierala, D., Garcia-Rojas, X., Sam, K., Wakui, K., Chen, C., Mendoza-Londono, R., Zhou, G., Zheng, Q., Lee, B.: Mutations and promoter SNPs in RUNX2, a transcriptional regulator of bone formation. *Mol Genet Metab.* **86 (1-2)**, 257-268 (2005)

Napierala, D., Sam, K., Morello, R., Zheng, Q., Munivez, E., Shivdasani, R. A. Lee, B.: Uncoupling of chondrocyte differentiation and perichondrial mineralization underlies the skeletal dysplasia in trichi-rhino-phalangeal syndrome. *Hum Mol Genet.* **17 (14)**, 2244-2254 (2008)

Napierala, D., Sun, Y., Maciejewska, I., Munivez, E., Dawson, B., D´Souza, R., Qin, C., Lee, B.: Role of the Trps1 transcription factor in odontoblasts. AADR Annual Meeting. Mündliche Präsentation. 3.6. 2010

Napierala, D., Dawson, B., Bertin, T., Shaw, C., Poliard, A., Kellermann, O., Lee, B.: 64 Identification of Trps1-Regulated Genes in Odontoblast Differentiation and Dentin Formation. AADR General Session, San Diego Convention Center. Mündliche Präsentation. 16.3. 2011

Niederländer, C., Walsh, J. J., Episkopou, V. and Jones, C. M.: Arkadia enhances nodal-related signalling to induce mesendoderm. *Nature.* **410**, 830-834 (2001)

Niikawa, N. and Kamei, T.: The Sugio-Kajii syndrome, proposed tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. *Am J Med Genet*. **24**, 759-760 (1986)

Nishioka, K., Itoh, S., Suemoto, H., Kanno, S., Gai, Z., Kawakatsu, M., Tanishima, H., Morimoto, Y., Hatamura, I., Yoshida, M., Muragaki, Y.: Trps1 deficiency enlarges th proliferative zone of growth plate cartilage by upregulation of Pthrp. *Bone.* **43 (1)**, 64-71 (2008)

Ouyang, J., Valin, A., Gill, G.: Regulation of transcription factor activity by SUMO modification. *Methods Mol Biol.* **497**, 141-152 (2009)

Palmer, A., Mason, G. G., Paramio, J. M., Knecht, E., Rivett, A. J.: Changes in proteasome localization during the cell cycle. *Eur J Cell Biol*. **64 (1)**, 163-174 (1994)

Pan, Y., Wang, B.: A novel protein-processing domain in Gli 2 and Gli 3 differentially blocks complete protein degradation by the proteasome. *J Biol Chem.* **282**, 10846-10852 (2007)

Patten, I., Placzek, M.: Vertebrate development: Et in Arkadia. *Curr Biol.* **11**, 616-619 (2001)

Perdomo, J., Crossley, M.: The Ikaros family protein Eos associates with C-terminal-binding protein corepressors. *Eur J Biochem.* **269**, 5885-5892 (2002)

Poisson, N., Real, E., Gaudin, Y., Vaney, M.C., King, S., Jakob, Y., Tordo, N. and Blondel, D.: Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J Gen Virol*. **82**, 2691-2696 (2001)

Poukka, H., Aarnisalo, P., Santti, H., Janne, O. A. and Palvimo, J. J.: Coregulator small nuclear RING finger protein (SNURF) enhances Sp1- and steroid receptor-mediated transcription by different mechanisms. *J Biol Chem*. **275**, 571-579 (2000)

Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M. and Strasser, A.: The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell.* **3**, 287-296 (1999)

Radhakrishna, U., Bornholdt, D., Scott, H. S., Patel, U. C., Rossier, C., Engel, H., Bottani, A., Chandal, D., Blouin, J.-L., Solanki, J. V., Grzeschik, K.-H., Antonarakis, S. E.: The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydaktyly type-IV and postaxial polydactyly type A/B; no phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet.* **65**, 645-655 (1999)

Raux, H., Flamand, A., and Blondel, D.: Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain. *J Virol.* **74**, 10212-10216 (2000)

Reed, J. A., Bales, E., Xu, W., Okan, N. A., Bandyopadhyay, D., Medrano E. E.: Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res.***61**, 8074- 8078 (2001)

Rodríguez-Crespo, I., Straub, W., Gavilanes, F., F. and Ortiz de Montellano, P.R.: Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition. *Arch Biochem Biophys.* **395**, 297-304 (1998)

Ross, S., Best, J. Ö., Zon, L. I., Gill, G.: SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell.* **10**, 831-842 (2002)

Rossi, A., Devirgiliis, V., Panasati, V., Borroni, R. G., Carlesimo, M., Gentile, M., Cariola, F., Calvieri, S.: Missense mutation in exon 7 of TRPS1 gene in an Italian family with a mild form of trichorhinophalangeal syndrome type I. *Br J Dermatol.* **157 (5)**, 1021-1024 (2007)

Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. and Grosschedl, R.: PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev*. **15**, 3088-3103 (2001)

Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F., Suske, G.: Transcription factor Sp3 in silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J*. **21**, 5206-5215 (2002)

Schier, A. F.: Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **19**, 589-621 (2003)

Schinzel, A.: Postaxial polydaktyly, hallux duplication, absence of the corpus callosum, macrencephaly and severe mental retardation: a new syndrome? *Helv paediatr Acta.* **34 (2)**, 141-146 (1979)

Schmidt , D., Muller, S.: Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99** 2872-2877 (2002)

Shinagawa, T., Dong, H.-D., Xu, M., Maekawa, T., Ishii, S.: The sno gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice. *EMBO J.* **19**, 2280-2291 (2000)

Shinagawa, T., Nomura, T., Colmenares, C., Ohira, M., Nakagawara, A., Ishii, S.: Increased susceptibiliy to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice. *Oncogene.* **20**, 8100-8108 (2001)

Suemoto, H., Muragaki, Y., Nishioka, K., Sato, M., Ooshima, A., Itoh, S., Hatamura, I., Ozaki, M., Braun, A., Gustafsson, E., Fässler, R.: Trps1 regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes through Stat3 signaling. *Dev Biol.* **312 (2)**, 572-581 (2007)

Takahashi, Y., Dulev, S., Liu, X., Hiller, N. J., Zhao, X., Strunnikov, A.: Cooperation of sumoylated chromosomal proteins in rDNA maintenance. *PLoS Genet.* **4 (10)**, e1000215 (2008)

Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C. M.: Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**, 94-102 (2000)

Ungureanu, D., Vanhatupa, S., Kotaja, N., Yang, J., Aittomaki, S., Janne, O. A., Palvimo, J. J., Silvennoinen, O.: PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood.* **102**, 3311-3313 (2003)

Van den Bemd, G. J., Jhamai, M., Brinkmann, A. O., Chang, G. T.: The atypical GATA protein TRPS1 represses androgen-induced prostate-specific antigen expression in LNCaP prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **312 (3)**, 578-584 (2003)

Wang, B., Fallon, J. F., Beachy, P. A.: Hedgehog-regulated processing of Gli 3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**, 423-434 (2000)

Weisshaar S. R., Keusekotten, K., Krause, A., Horst, C., Springer, H. M., Göttsche K., Domen, R. J., Praefcke, G., J.: Arsenic trioxide stimulates SUMO-2/3 modification leading to RNF 4-dependent proteolytic targeting of PML. *FEBS Lett.* **582 (21-22)**, 3174-3178 (2008)

Weissman, A. M.: Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2 (3)**, 169-178 (2001)

Wild, A., Kalff-Suske, M., Vortkamp, A., Bornholdt, D., Koenig, R., Grzeschik, K.-H.: Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome. *Hum Mol Genet.* **6**, 1979-1984 (1997)

Wilson, M. J., Salata, M. W., Susalka, S. J. and Pfister, K. K.: Light chains of mammalian cytoplasmic dynein: Identification and characterization of a family of LC8 light chains. *Cell Motil Cytoskeleton.* **49**, 229-240 (2001)

Wülling, M., Kaiser, F., Bülens, L. A., Braunholz, D., Shivdasani, R. A., Depping, R., Vortkamp, A.: Trps1, a regulator of chondrocyte proliferation and

differentiation, interacts with the activator form of Gli3. *Dev Biol.* **328 (1)**, 40-53 (2009)

Wu, S. M., Kuo, W. C., Hwu, W.L., Hwa, K. Y., Montovani, R., Lee, Y. M.: RNF4 is a coactivator for nuclear factor Y on GTP cyclohydrolase I proximal promoter. *Mol Pharmacol.* **66 (5)**, 1317-1324 (2004)

Yamamoto, Y., Oguro, N., Miyao, M., Yanagisawa M., Ohsawa, T.: Prometaphase chromosomes in the tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Am J Med Genet.* **32**, 524-527 (1989)

Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y., Kikuchi, A.: Sumoylation is involved in β-catenin-dependent activation of Tcf-4. *EMBO J*. **22**, 2047-2059 (2003)

Yang, S. H., Jaffray, E., Hay, R. T., Sharrocks, A. D.: Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell.* **12**, 63-74 (2003)

Yeh, E. T., Gong, L., Kamitani, T.: Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene*. **248 (1-2)**, 1-14 (2000)

Yu, J., Yu., L., Chen, Z., Zheng, L., Chen, X., Wang, X., Ren, D. and Zhao, S.: Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase interacts with protein kinase A inhibitors. *Brain Res Mol Brain Res*. **99**, 145-149 (2002)

Yuzawa, H., Koinuma, D., Maeda, S., Yamamoto, K., Miyazawa, K., Imamura, T.: Arkadia represses the expression of myoblast differentiation markers through degradation of Ski and the Ski-bound Smad complex in C2C12 myoblasts. *Bone.* **44 (1)**, 53-60 (2009)

Zhang, F., Lundin, M., Ristimäki, A., Heikkilä, P., Lundin, J., Isola, J., Joensuu, H., Laiho, M.: Ski-related novel protein N (SnoN), a negative controller of transforming growth factor-beta signaling, is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast carcinomas. *Cancer Res.* **63**, 5005-5010 (2003)

Zhao, J.: Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci.* **64 (23)**, 3017-3033 (2007)

Zhou, H., Kim, S., Ishii, S., Boyer, T. G.: Mediator modulates Gli3-dependent Sonic hedgehog signaling. *Mol Cell Biol.* **26**, 8667-8682 (2006)

7 Anhang

ARKADIA-Primer/Oligonukleotide

ARKADIA volle Länge	Restriktion Not vorwärts	5´gcg gcc gca tgt ctc aat gga ctc 3´	Restriktion Xho rückwärts	5´ct gag act ttc act tgg cag ctg g 3´
ARKADIA volle Länge (open reading frame)	Restriktion XhoI vorwärts	5´ctc gag atg tct caa tgg act cct g 3´	Restriktion NotI rückwärts	5´gcg gcc gcc aac ttt cac ttg gc 3´
ARKADIA volle Länge	Position 1 vorwärts	5´cca tgg tgt ctc aat gga ctc ctg 3´	Position Ende rückwärts	5´ gga tcc tca act ttc act tgg c 3´

ARKADIA A1	Position 1 vorwärts	5´cca tgg tgt ctc aat gga ctc ctg 3´	Position 738 rückwärts	5´gtc gac ttt tct tcg agc taa c 3´
ARKADIA A2	Position 1 vorwärts	5´cca tgg tgt ctc aat gga ctc ctg 3´	Position 1500 rückwärts	5´gtc gac agg atg tcc taa tgc atg 3´
ARKADIA A3	Position 1504 vorwärts	5´ gaa ttc aca agt tgc ttt cag c 3´	Position Ende rückwärts	5´ gga tcc tca act ttc act tgg c 3´
ARKADIA A4	Position 718 vorwärts	5´gaa ttc gaa gtg tta gct cga ag 3´	Position 2250 rückwärts	5´ gga tcc cac ttc atg agg atg c 3´
ARKADIA A5	Position 718 vorwärts	5´gaa ttc gaa gtg tta gct cga ag 3´	Position 1500 rückwärts	5´gtc gac agg atg tcc taa tgc atg 3´
ARKADIA A6	Position 1505 vorwärts	5´ gaa ttc aca agt tgc ttt cag c 3´	Position 2250 rückwärts	5´ gga tcc cac ttc atg agg atg c 3´

ARKADIA C937A	C937A vorwärts	5´ gga aaa atg tac tat cgc ttt gtc tat ttt aga gg 3´	C937A rückwärts	5´cct cta aaa tag aca aag cga tag tac att ttt cc 3´

TRPS1- Primer/Oligonukleotide

TRPS1 volle Länge (open reading frame)	Restriktion EcoRI vorwärts	5´gaa ttc acc atg gtc cgg aaa aag aac 3´	Restriktion BamHI rückwärts	5´ gga tcc tct tta ggt ttt cc 3´

TRPS1 F1	F1 vorwärts	5´gaa ttc gcc tcc aag gag aaa acg 3´	F1 rückwärts	5´gga tcc tta ctc ttt agg ttt tcc 3´
TRPS1 F5	F5 vorwärts	5´gaa ttc agt gtg cat gag tcc c 3´	F5 rückwärts	5´gga tcc tta ctc ttt agg ttt tcc 3´
TRPS1 F6	F6 vorwärts	5´gaa ttc agt gtg cat gag tcc c 3´	F6 rückwärts	5´ gga tcc ttt ctc ctt gga ggc ac 3´
TRPS1 F9	F9 vorwärts	5´gaa ttc agt gtg cat gag tcc c 3´	F9 rückwärts	5´ gga tcc tga cct cct ctc taa c 3´
TRPS1 F10	F10 vorwärts	5´gaa ttc agt gtg cat gag tcc c 3´	F10 rückwärts	5´gga tcc gcc aga cac agg cgt c 3´

Danksagung

Ich danke Dr. Frank Kaiser für die Überlassung dieses spannenden, anspruchsvollen und vielseitigen Themas und Frau Prof. Dr. Gillessen-Kaesbach für den eigenen Arbeitsplatz und ihr persönliches Interesse.

Dr. Frank Kaiser danke ich außerdem für die umfassende und kompetente wissenschaftliche Betreuung sowie für seine große Motivation, Initiative, fortwährende gute Laune und das freundschaftliche Miteinander.

Melanie Albrecht danke ich für ihre geduldige und exakte Einführung in sämtliche Labortechniken, ihre hilfreichen Tipps, die vielen Sequenzierungen und nicht zuletzt für ihr immer offenes Ohr - auch in persönlichen Belangen.

Dr. Manuela Wülling (Entwicklungsbiologie, ZMB, Essen) und Herrn Dr. Hermann-Josef Lüdecke (Humangenetik, Essen) danke ich für ihre Unterstützung bei den Luciferase-Versuchen.

Ein großer Dank gilt meinem Bruder, der mir - nicht nur bei PC-Problemen - zu jeder Tages- und Nachtzeit mit seiner Hilfe zur Seite stand.

Besonders danke ich meinen beiden Eltern für ihre enorme Unterstützung in allen Lebenslagen, ohne die diese Arbeit und mein Studium nicht möglich gewesen wären.

Christiane Will

Lebenslauf

Persönliche Daten	Name	Christiane Will
	Adresse	Fleischhauerstraße 26
		23552 Lübeck
	Geburtsort	Neumünster
	Geburtsdatum	20.07.1978
	Staatsangehörigkeit	deutsch
	Familienstand	ledig

Schulausbildung	1985 – 1989	Grundschule Gadeland, Neumünster
	1989 – 1998	Holstenschule Neumünster, Allgemeine Hochschulreife

Musikstudium	1998-2003	Musikhochschule Lübeck
	2003	Diplom im Fach Musikerziehung mit Hauptfach Klavier

Lebenslauf

Medizinstudium	2003-2011	Medizinische Universität zu Lübeck
	03/2006	Physikum
	09/07-09/2008	Experimentelle Arbeiten der Dissertation
	04/2011	Staatsexamen, Approbation als Ärztin