

**Medizinische Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Expression und Charakterisierung von Ligand Receptor Interacting Factor 1 (LRIF1)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

von Thomas Schmidt  
geboren am 14.05.1984 in Lutherstadt Wittenberg

Betreuer\*in: Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Horstkorte  
Gutachter\*innen: 1. Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Horstkorte  
2. Prof. Dr. rer. nat. Stephan Hinderlich, Berlin  
3. PD Dr. rer. nat. Kerstin Danker, Berlin

02.06.2009

20.11.2018

## Referat

Die GNE-Myopathie ist eine weltweit auftretende Myopathie, die durch das klinische Bild einer langsam progredienten, sich von distal ausbreitenden Myopathie, gekennzeichnet ist. Diese Veränderung der quergestreiften Muskulatur spart charakteristischerweise den Musculus quadriceps femoris aus. Namensgeber der Erkrankung ist das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese, die UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE). Mehr als 150 Mutationen des GNE-Gens wurden im Zusammenhang mit der Erkrankung beschrieben, die sowohl die Epimerase-, als auch die Kinase-Domäne betreffen können.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in Yeast Two Hybrid-Untersuchungen der Ligand Receptor Interacting Factor 1 (LRIF1) als potentieller Interaktionspartner der GNE gefunden. In der hier vorgelegten Dissertation sollte eine mögliche Interaktion von GNE und LRIF1 im humanen System untersucht werden. Dafür wurde zunächst die Expression von LRIF1 in verschiedenen humanen Geweben analysiert. In allen untersuchten Geweben wurden entsprechende mRNA-Transkripte nachgewiesen. Im Anschluss konnte in Western-Blot-Analysen das Vorkommen von LRIF1 in einigen humanen Säuger-Zelllinien gezeigt werden. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurde LRIF1 durch Klonierung in entsprechende Expressionsvektoren an das Fluoreszenzprotein GFP gekoppelt und in Chinese-Hamster-Ovar(CHO)-Zellen exprimiert. In den anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde LRIF1 ausschließlich im Zellkern gefunden. Kolokalisationsstudien mit ebenfalls Fluoreszenzprotein-gekoppelter GNE zeigten, dass die Überexpression von LRIF1 keinen Einfluss auf die Lokalisation von GNE hat. Auch überexprimierte GNE stellt in CHO-Zellen keinen Migrationsreiz für LRIF1 dar. Auch in den Überexpressionsstudien wurde LRIF1 nur nukleär gefunden und GNE ausschließlich im Zytosol.

Somit konnte gezeigt werden, dass LRIF1 in allen hier untersuchten humanen Geweben zu finden ist. LRIF1 ein reines Zellkernprotein ist, während die GNE ausschließlich im Zytosol lokalisiert zu sein scheint. Dies steht im Einklang mit anderen Veröffentlichungen. Da LRIF1 und GNE nicht im selben Zellkompartiment lokalisiert sind, kann also nicht von einer Interaktion beider Proteine ausgegangen werden. Somit ist auch eine Beteiligung von LRIF1 an der Pathogenese der GNE-Myopathie mehr als unwahrscheinlich.

Schmidt, Thomas: Expression und Charakterisierung von Ligand-Receptor-Interacting-Factor1 (LRIF1), Halle (Saale), Univ., Med.Fak., Diss. 65 Seiten, 2018

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Ausgangspunkt der Arbeit .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Ligand Receptor Interacting Factor 1 (LRIF1).....</b>	<b>1</b>
1.2.1	Genetik des LRIF1.....	1
1.2.2	Agonisten von LRIF1.....	1
1.2.3	LRIF1 als Teil der Barr-Körperchen-Regulation .....	3
1.2.4	LRIF1-Anreicherung an Telomeren .....	4
<b>1.3</b>	<b>UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) .....</b>	<b>4</b>
1.3.1	Gen- und Proteinstruktur der GNE.....	4
1.3.2	Subzelluläre Verteilung der GNE .....	5
1.3.3	Bedeutung und Regulation der GNE .....	6
<b>1.4</b>	<b>Sialinsäuren .....</b>	<b>7</b>
1.4.1	Biosynthese der Sialinsäuren .....	7
1.4.2	Struktur und Funktion der Sialinsäuren .....	8
<b>1.5</b>	<b>Veränderung der Sialinsäurebiosynthese als Auslöser von Erkrankungen .....</b>	<b>10</b>
1.5.1	GNE-Myopathie.....	10
1.5.2	Sialurie.....	12
<b>2</b>	<b>Zielstellung .....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methodik .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>14</b>
3.1.1	Chemikalien und Zellkulturmaterialien .....	14
3.1.2	Prokaryotische Organismen .....	14
3.1.3	Eukaryotische Organismen .....	14
3.1.4	Vektoren.....	15
3.1.5	Primer.....	17
3.1.6	Antikörper .....	17
3.1.7	Enzyme .....	17
3.1.8	Inhibitoren .....	18
3.1.9	Medien .....	18

3.1.10	Medienzusätze .....	18
3.1.11	Kits.....	18
3.1.12	Membranen .....	18
3.1.13	Größenmarker.....	19
3.1.14	Geräte .....	19
<b>3.2</b>	<b>Methodik.....</b>	<b>20</b>
3.2.1	Behandlung von Lösungen und Geräten.....	20
3.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	20
3.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
3.2.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	21
3.2.5	Isolierung von DNA mittels Gelelektion.....	22
3.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	23
3.2.7	Colony-PCR.....	24
3.2.8	Mikrobiologische Methoden.....	24
3.2.9	Kultivierung von E. coli.....	24
3.2.10	Konservierung von Bakterien .....	25
3.2.11	Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA .....	25
3.2.12	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA .....	26
3.2.13	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	26
3.2.14	Plasmidisolierung aus Bakterien .....	27
3.2.15	DNA-Sequenzierung .....	29
3.2.16	Allgemeine zellbiologische Methoden .....	30
3.2.17	Kultivierung von Säugerzellen.....	30
3.2.18	Konservierung von Säugerzellen .....	31
3.2.19	Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA.....	31
3.2.20	Fixierung transfizierter Säugerzellen.....	32
3.2.21	Fluoreszenzmikroskopie.....	33
3.2.22	Biochemische Methoden .....	33
3.2.23	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	33
3.2.24	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot) .....	34
3.2.25	Immunchemischer Antigennachweis nach Elektrotransfer .....	35
3.2.26	Detektion von POD-konjugierten sekundären Antikörpern.....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Genexpressionsanalysen von LRIF1 in humanen Geweben mittels PCR .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Klonierung von LRIF1 in Expressionsvektoren .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Spezifität des Anti-LRIF1-Antikörpers .....</b>	<b>40</b>

<b>4.4</b>	<b>Expressionsanalyse von LRIF1 in Säugerzellen .....</b>	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Lokalisationsuntersuchungen von LRIF1 in CHO-Zellen .....</b>	<b>43</b>
4.5.1	LRIF1.1 in CHO-Zellen .....	43
4.5.2	LRIF1.2 in CHO-Zellen .....	44
<b>4.6</b>	<b>Kolokalisationsuntersuchungen von LRIF1 und GNE in CHO-Zellen .....</b>	<b>44</b>
4.6.1	LRIF1.1 und GNE .....	45
4.6.2	LRIF1.2 und GNE .....	46
<b>4.7</b>	<b>Kontrolluntersuchungen .....</b>	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Genexpressionsanalysen von LRIF1 in humanen Gewebe .....</b>	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Expressionsanalyse von LRIF1 in Säugerzellen .....</b>	<b>52</b>
<b>5.3</b>	<b>Lokalisationsuntersuchungen von LRIF1 in CHO-Zellen .....</b>	<b>53</b>
<b>5.4</b>	<b>Kolokalisationsstudien von LRIF1 und GNE in CHO-Zellen .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>Thesen .....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>VII</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung über frühere Promotionsversuche .....</b>	<b>VIII</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>IX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
BSA	Rinderserum-Albumin
C	Celsius
C2C12-Zellen	murine Myoblasten Zelllinie
CHO	Chinese Hamster Ovary
cDNA	komplementäre DNA
CMP	Cytidinmonophosphat
CK	Kreatinkinase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMRV	Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced-Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
EtOH	Ethanol
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fetal Calf Serum
H.pylori	Helicobacter pylori
HCl	Chlorwasserstoff
hIBM	hereditary Inclusion Body Myopathy
HeLa-Zellen	Helen-Lane-Zellen
H3K9me3	repressives Histon, Histon-Code
H3K27me3	repressives Histon, Histon-Code
HL60	Humane Leukämie-Zelllinie
HP1	Heterochromatin Protein 1
HBiX1	HP1-binding protein
IBM	Inclusion Body Myositis
GNE	UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	Knock Out
kPa	Kilopascal
LB	lysogeny broth
LRIF1	Ligand Receptor Interacting Factor 1
M	Mol
mA	Milliampere
ManNAc	N-Acetylmannosamin
MeWo	humane Melanomzelllinie
MEM	Minimum Essential Medium
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
Min	Minuten
MCF7	Michigan Cancer Foundation -7- Brustkrebs-Zelllinie
mRNA	messenger RNA
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
ORF	Open-Reading-Frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pEGFP	Plasmid enhanced green fluorescent protein
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Pyrococcus furiosus
pH	Potentia hydrogenii
POD	Peroxidase
RAR	Retinoic Acid Receptor
RIF1	Receptor Interacting Factor 1
RNA	Ribonucleic Acid
Rpm	Rounds per Minute
RXR	Retinoid X Rezeptor
SH-S5Y5	humane dopaminerge Neuroblastomzellen

SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
Sec	Sekunde
sIBM	Sporadic Inclusion Body Myositis
Sia	Sialinsäuren
SMCHD1	Structural maintenance of chromosomes hinge domain-containing Protein 1
SOC	SOB-Medium + Glucose (SOB = super optimal broth)
ST3Gal5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5
ST8Sia1ST8	Alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1
SxK	Schaf-Anti-Kaninchen-Antikörper
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
Taq	Thermus aquaticus
U	Units
UDP-GlcNAc	UDP-N-Acetylglucosamin
ÜN	Über Nacht
V	Volumen
V	Volt
w	Weight



## 1 Einleitung

### 1.1 Ausgangspunkt der Arbeit

Im Jahr 2006 wurde RIF1 von Weidemann et al. durch ein Yeast Two Hybrid-Screening als potentieller Interaktionspartner der UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) identifiziert. Dies war Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit und die Grundlage der Arbeitshypothese.

Um RIF1 seiner Funktion nach zu spezifizieren wurde es vom Human Genom Organisation Gene Nomenclature Committee (HGNC) in LRIF1 umbenannt ([http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?hgnc\\_id=HGNC:30299](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:30299), 19.06.2021). Zudem war es durch die Umbenennung besser vom Repressor/Activator Protein1 (Rap1)-Interacting-Protein1 (RIF1) zu unterscheiden. Dieses Protein ist auf Chromosom 2q23.3 lokalisiert und ist bei der Herunterregulierung der Transkription und der Regulierung der Telomerlänge beteiligt (Hardy et al., 1992).

### 1.2 Ligand Receptor Interacting Factor 1 (LRIF1)

#### 1.2.1 Genetik des LRIF1

Bisher ist nur wenig bekannt über den Ligand Receptor Interacting Factor 1 (LRIF1). Seine genomische DNA-Sequenz wurde im Rahmen des Humangenomprojektes als „C1orf103“ sequenziert und befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 (Gregory et al., 2006) am Genlokus 1p13.3. Die Länge des C1orf103-Gens beträgt 2310 Basenpaare (EMBLCDs:CAI17128).

Ähnliche Gensequenzen mit hoher Homologie konnten auch bei anderen Säugetieren, wie zum Beispiel Schimpansen (99.83%), Hunden (91.51%), Kühen (90.68%), Ratten (82.39%) und Mäusen (83.38%) gefunden werden (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LLRIF1>, 19.06.2021).

Das humane C1orf103-Gen kodiert für ein 769 Aminosäuren (AS) langes Protein. Mit einem Molekulargewicht von etwa 85 kDa (UniProtKB: Q5T3J3-1) und wird als Isoform 1 bezeichnet. Durch alternatives Spleißen am C-terminalen Teil entsteht die Isoform 2 mit einer Länge von 233 AS und einem Molekulargewicht von etwa 27 kDa (UniProtKB: Q5T3J3-2).

#### 1.2.2 Agonisten von LRIF1

Li et al. identifizierten 2007 in Yeast Two Hybrid-Screenings einen neuen Interaktionspartner des Retinsäurerezeptor  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ). Sie bezeichneten das vom C1orf103-Gen kodierte Protein als Receptor Interacting Factor 1 (RIF1) und zeigten, dass RIF1 in der nuklearen Matrix zu finden ist.

Bei  $\beta$ -Galaktosidase-Assays und Glutathion-S-Transferasen(GST)-Co-Präzipitationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von RIF1- und RAR $\alpha$ -Fusionsproteinen zu einer starken Aktivierung der Reporterexpression führt. RIF1 mindert hormonunabhängig die basale Transkriptionsaktivität von RAR $\alpha$  und hemmt so deren Transkriptionsaktivität *in vivo* und *in vitro* (Li et al., 2007). Die Repressionsdomäne des RIF1 interagiert mit Histon-Deacetylasen und trägt so zum Repressionsmechanismus bei. Histon-Deacetylasen haben Einfluss auf die epigenetische Repression und Transkription, außerdem auf Zellzyklus und Entwicklung (Gregoretto et al., 2004). Sie modifizieren Histone, sind Teil von großen Regulationskomplexen und können mit Nicht-Histon-Proteinen, wie zum Beispiel RIF1, interagieren.

RAR $\alpha$  sind Transkriptionsfaktoren, die als Liganden Retinsäuren binden (Giguère et al., 1987). RAR $\alpha$  gehören zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren (Petkovich et al., 1987), die in zwei große Gruppen unterteilt werden: Steroidrezeptoren und Nicht-Steroidrezeptoren (Mangelsdorf et al., 1995). Zu den Nicht-Steroidrezeptoren gehören unter anderem die Rezeptoren für Retinoide, Thyroidhormon und Vitamin D. Mittels DNA-Bindungsdomänen vermitteln sie somit physiologische Hormonwirkungen durch Beeinflussung der Transkriptionsaktivität (Berg, 1989). Li et al. konnten in weiteren GST-Co-Präzipitationsanalysen eine starke Wechselwirkung zwischen LRIF1 mit weiteren nukleären Hormonrezeptoren feststellen. Starke Wechselwirkung sahen sie mit dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), dem murinen Nuklearrezeptor  $\alpha$  (mROR $\alpha$ ) und dem Glukokortikoid-Rezeptor  $\alpha$  (GR $\alpha$ ). LRIF1 interagiert ebenfalls mit dem Thyroxinrezeptor  $\alpha$  (TR $\alpha$ ) und dem Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), dies jedoch nur schwach.

Neben dem RAR $\alpha$ -Rezeptor ist RXR $\alpha$  ein weiterer Retinsäurerezeptor. Auch dieser bildete im Yeast Two Hybrid-Screening ein Fusionsprotein. Im Unterschied zum RAR $\alpha$  konnte in den folgenden GST-Co-Präzipitationsanalysen jedoch kein Anhalt für eine Interaktion von RXR $\alpha$  mit RIF1 gefunden werden.

Durch Northern-Blot-Analysen konnten Li et al. zeigen, dass RIF1-Transkripte in den meisten humanen Geweben exprimiert und prozessiert werden. Sie fanden 2 Messenger-RNA (mRNA)-Transkripte. Mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) synthetisierten Li et al. eine komplementäre DNA (cDNA) und fanden eine 3,5 kb lange cDNA, welches der langen Isoform RIF1.1 entspricht und eine kürzere 1,8 kb lange cDNA, entsprechend RIF1.2. Beide Isoformen wurden in Hirn, Herz, Skelettmuskel, Dickdarm, Dünndarm, Thymus, Niere, Milz, Leber, Plazenta, Lunge und in peripheren Leukozyten gefunden. Die Expression von LRIF1-mRNA war besonders hoch in Herz, Leber und Plazenta. RIF1.1 war schwächer exprimiert in Skelettmuskel, während RIF1.2 sehr limitiert in Lunge und Kolon exprimiert wurde.

*In vivo*-Immunofluoreszenz-Färbungen in HeLa-Zellen haben gezeigt, dass LRIF1 im Zellkern lokalisiert ist. Anhand von Transfektion und Überexpression von LRIF1 in MCF7-Zellen konnte RIF1 als Bestandteil der nukleären Matrix dargestellt werden.

Um Verwechslungen mit dem Replication Timing Regulatory Factor 1 oder ehemals Rap1-Interacting Factor 1 Homolog (RIF1) (UniProtKB: Q5UIP0) zu umgehen wurde RIF1 (UniProtKB: Q5T3J3) in LRIF1 umbenannt. In der Folge wurden die Bezeichnungen LRIF1, RIF1 und C1orf103 teilweise synonym verwendet.

### 1.2.3 LRIF1 als Teil der Barr-Körperchen-Regulation

Im Jahre 2013 veröffentlichten Nozawa et al. neue Erkenntnisse zur komplexen Regulation des Barr-Körperchens. Sie führten ebenfalls ein Yeast Two Hybrid-Screening durch und fanden das Protein C1orf103 als potentiell Bindungsprotein von Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Nozawa et al., 2013). Dieser Funktion folgend bezeichneten sie C1orf103 als HP1-binding protein (HBiX1). Western Blot-Analysen bestätigten die Vermutung, dass HBiX1 mit seinem PXVXL-Bindungsmotiv durch die Aminosäuren 580-584 an alle HP1-Subtypen bindet. Dieses Bindungsmotiv befindet sich in der Nähe des C-terminalen Endes ist sowohl in der genomischen Isoform 1 als auch in der kürzeren Isoform 2 enthalten. Gemeinsam mit dem Structural maintenance of chromosomes hinge domain-containing Protein 1 (SMCHD1) ist HBiX1 im Barr-Körperchen, dem inaktivierten X-Chromosom, angereichert. SMCHD1 spielt eine Rolle bei dessen Inaktivierung und Hypermethylierung von CpG-Inseln (Blewitt et al., 2008). HBiX1 trägt somit zur Verdichtung des X-Chromosoms und zu dessen Inaktivierung bei. Western Blot-Analysen konnten eine Interaktion zwischen HBiX1 und SMCHD1 zeigen, welche zur Bindung des Histons H3K9me3 mit der H3K27me3-Domäne am X-Chromosom führt. Man kann also von einem HBiX1-SMCHD1-H3K9me3-Reaktionsweg sprechen. Dieser wird durch die Anwesenheit des X-inaktivierenden spezifischen Transkripts (Xist) reguliert.

Die Hochregulierung des X-inaktivierenden spezifischen Transkripts (Xist) ist der Startpunkt für die Inaktivierung des X-Chromosoms. Diese Xist-RNA besitzt die Schlüsselrolle bei der Formierung eines stillen Kernkompartiments, welches Transkriptionsfaktoren durch die Anreicherung von Proteinkomplexen ausschließt.

Somit konnten Nozawa et al. dem HBiX1, also LRIF1, eine entscheidende Rolle in der Organisation des Barr-Körperchens zuschreiben. Durch die Interaktionen im komplexen HBiX1-SMCHD1-H3K9me3-Reaktionsweg trägt es zur Inaktivierung des X-Chromosoms bei.

#### 1.2.4 LRIF1-Anreicherung an Telomeren

Grolimund et al. entwickelten 2013 ein Protokoll zur quantitativen Isolierung von Telomer-Chromatin. Die Zusammensetzung von Telomeren ändert sich während des Alterns, bei der Tumorigenes und auch bei einer Gruppe von Erkrankungen, den Telomeropathien.

Hierbei wurden sowohl LRIF1 als auch SMCHD1 in erhöhter Konzentration an Telomeren gefunden, genauer gesagt an den Shelterinen TRF1, TIN2, TPP1 und POT1. Shelterine befinden sich am Ende der Telomere und schützen diese und regulieren deren Länge (de Lange, 2005). Eine Rolle im telomeren Heterochromatin, also der verdichteten DNA im Zellkern, bestätigt somit die gefundene Interaktion mit SMCHD1 (Nozawa et al., 2013).

Interessanterweise sind LRIF1 und ebenso SMCHD1 in signifikant höheren Konzentrationen an längeren Telomeren zu finden. Ob beide Proteine damit eine Rolle beim Alterungsprozess spielen bleibt somit der Gegenstand weiterer Untersuchungen.

#### 1.3 UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE)

##### 1.3.1 Gen- und Proteinstruktur der GNE

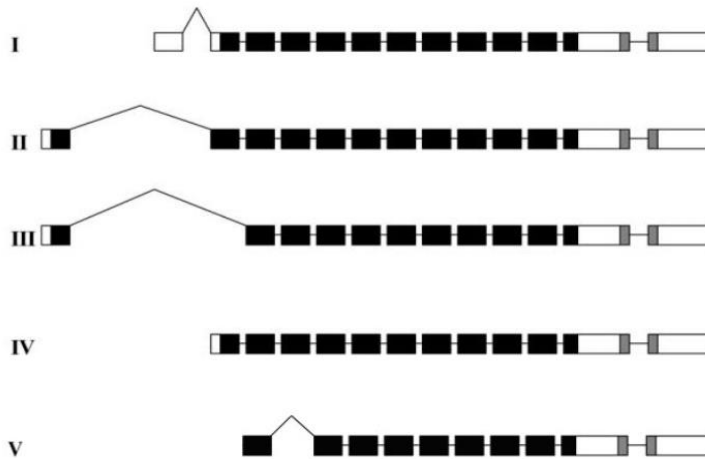
Die GNE ist das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese. Als bifunktionelles Enzym katalysiert es die ersten beiden Schritte zur Synthese der N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), dem Vorläufer aller Sialinsäuren (Hinderlich et al., 1997; Stäsche et al., 1997).

Zunächst gelang es, die Funktion der Epimerase-Domäne UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase (UDP-GlcNAc-2-Epimerase) zu charakterisieren (Cardini und Leloir, 1957; Comb und Roseman, 1958). Der anschließende Schritt der Phosphorylierung durch die N-Acetylmannosamin-Kinase (ManNAc-Kinase) wurde 1961 von Ghosh und Roseman und von Warren und Felsenfeld nachgewiesen.

Durch gezielte Punktmutationen konnte gezeigt werden, dass beide Domänen unabhängig voneinander arbeiten (Effertz et al., 1999). Die Nukleotidsequenz der humanen GNE befindet sich auf Chromosom 9p13.2 und enthält 14 Exons. Durch alternatives Spleißen der Exone entstehen fünf gewebsspezifische Transkriptionsprodukte (Tomimitsu et al., 2004). Variante vier stellt hierbei den kompletten Open-Reading-Frame (ORF) dar.



**Abbildung 1:** GNE-Exons mit einheitlichen Nummern, in Anlehnung an Tomimitsu et al., 2004



**Abbildung 2: gewebsspezifische Splicing-Varianten der GNE:** In Anlehnung an Watts et al, 2003, und Tomimitsu et al., 2004

Auf Proteinebene konnten bisher drei Isoformen der humanen GNE charakterisiert werden (Reinke et al., 2007). Die Isoform 1 der GNE (hGNE1) ist ubiquitär exprimiert und weist die höchste Expression in Leber und Plazenta auf (Horstkorte et al., 1999; Lucka et al., 1999). Nur der hGNE1 schreibt man die Funktion der Sialinsäureproduktion zu. Das gewebsspezifische Auftreten der Isoformen 2 und 3 weist auf eine regulierende Rolle dieser Isoformen bei der Sialylierung von Glykokonjugaten hin (Reinke et al., 2007).

Mehrere Arbeiten zeigten multimere Zustände der GNE. Das Auftreten von Mono-, Di- und größeren Oligomeren gilt als gesichert und *In vitro* Untersuchungen lassen auf die Existenz von Tri-, Tetra- und Hexameren schließen (Effertz et al., 1999; Noguchi et al., 2004; Ghaderi et al., 2007).

Die Oligomerisierung scheint einer gewissen Dynamik zu unterliegen, über deren Regulation noch nicht viel bekannt ist. Tong et al. konnten 2009 zeigen, dass die GNE überwiegend als Dimer in Lösung liegt und sich mit kleineren Populationen von Monomeren und größeren Oligomeren im Gleichgewicht befindet.

Konnten Campbell et al. 2000 zunächst nur die kristalline Struktur der UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase darstellen, so gelang es später die gesamte Tertiärstruktur der GNE zu entschlüsseln (Tong et al., 2009).

### 1.3.2 Subzelluläre Verteilung der GNE

Entsprechend ihrer Funktion bei der Synthese von Sialinsäuren, konnte die GNE im Zytoplasma verschiedener Gewebe nachgewiesen werden. Van Rimsum et al. 1983 zeigten GNE-Enzymaktivitäten in den löslichen Fraktionen der Sialoprotein-sekretierenden Gewebe Leber, Schilddrüse und intestinaler Mukosa von Ratten.

Weitere Lokalisationen im Zellkern und im Golgi-Apparat fanden Krause et al. im Jahr 2005. Mittels Immunoblotting konnte gezeigt werden, dass nukleäre GNE zellzyklusabhängig expriert wird. Die GNE könnte somit eine Funktion als nukleocytoplasmatisches Shuttleprotein haben oder an der Transkriptionskontrolle beteiligt sein. Kolokalisation der GNE mit einem Golgi-Marker weist auf eine Beteiligung an der Übertragung von Sialinsäuren auf Glykokonjugate und deren Transport zur Zellmembran hin.

Immunhistochemische Färbung von C2C12-Zellen zeigte eine Kolokalisation der GNE mit Emerin. Dies lässt auf ein Vorkommen der GNE innerhalb der Kernmembran schließen (Ishihara et al., 2008).

### 1.3.3 Bedeutung und Regulation der GNE

Mithilfe von gentechnisch veränderten Mäusen konnte die Bedeutung der GNE für Entwicklung und Überleben gezeigt werden. Während homozygote GNE(-/-) Knock-Out-Mäuse an Embryonaltag 8,5 sterben (Schwarzkopf et al., 2002), sind heterozygote GNE(+/-) Mäuse überlebensfähig. Sie weisen eine um 25% reduzierte Sialylierung auf, welche sich jedoch nicht auf Überleben und Fertilität auswirkt (Gagiannis et al., 2007).

Wesentlich für die Regulation der GNE ist die metabolische Feedback-Inhibierung durch die CMP-Neu5Ac, das Endprodukt der Sialinsäurebiosynthese, (Kornfeld et al., 1964; Seppala et al., 1999).

Phosphorylierung durch die Proteinkinase C erhöht die Aktivität der UDPGlcNAc-2-Epimerase-Aktivität (Horstkorte et al., 2000) ohne jedoch die ManNAc-Kinase-Aktivität zu beeinflussen.

Die Methylierung von CpG-Promotorregionen in den Tumorzelllinien Morris-hepatoma-Zellen (Oetke et al., 2003) und HIV-infizierten Lymphozyten (Giordanengo et al., 2004) vermindert die GNE-mRNA-Expression und die GNE-Enzymaktivität.

GM3- und GD3-Ganglioside scheinen ebenfalls einen Feedback-Kontrollmechanismus mit der GNE zu bilden und beeinflussen somit unter anderem Zellproliferation und -apoptose (Wang et al., 2006).

Des Weiteren wird die Regulation der GNE-Funktionen über das alternative Spleißen der Isoformen und das damit verbundene Gleichgewicht zwischen den multimeren Zuständen diskutiert (Reinke et al., 2007).

## 1.4 Sialinsäuren

### 1.4.1 Biosynthese der Sialinsäuren

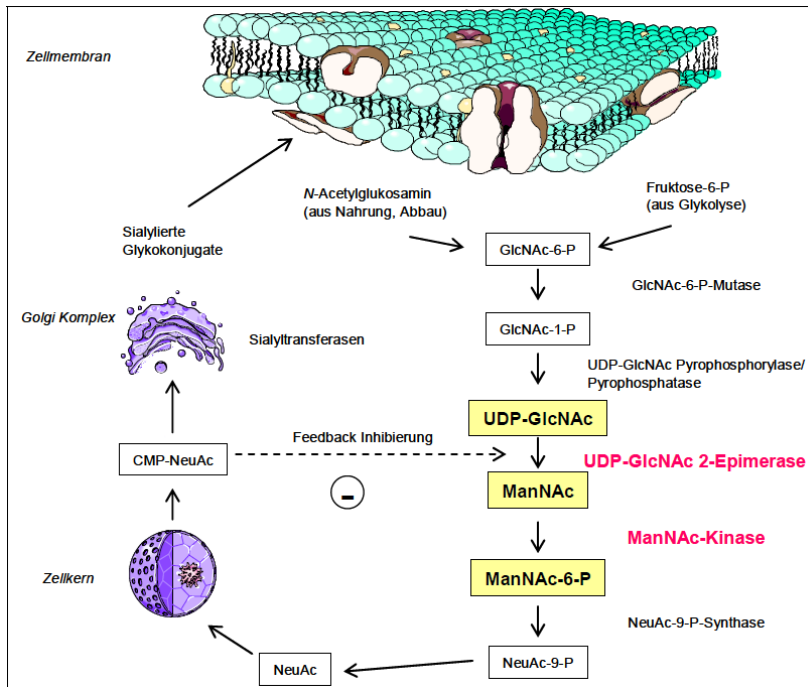
Als Schlüsselenzym katalysiert die GNE die ersten beiden Schritte der Sialinsäurebiosynthese. Das Ausgangssubstrat UDP-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) kann aus der Nahrung, durch den intrazellulären Abbau von Oligosacchariden oder aus der *denovo*-Biosynthese von Aminozyckern bereitgestellt werden (Gosh and Roseman, 1961; Datta, 1971; Pastuszak et al., 1996).

Bei Säugetieren erfolgt die Biosynthese von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) in vier Schritten im Zytosol (Walter, 1972). Die GNE katalysiert hier zunächst die irreversible Epimerisation von UDP-GlcNAc zu ManNAc und dann die Phosphorylierung von ManNAc zu ManNAc-6-Phosphat (Hinderlich et al., 1997; Stäsche et al., 1997). Im Anschluss wird dieses enzymatisch in Neu5Ac umgewandelt.

Die Aktivierung von Neu5Ac zu Cytidinmonophosphat-N-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) findet dann nach Transport in den Zellkern statt (Kean et al., 1969; Münster et al., 1998; Reinke et al., 2009).

Im Anschluss gelangt aktivierte Neu5Ac zum Trans-Golgi-Netzwerk und wird dort unter Abspaltung von CMP zu spezifischen Sialinsäuren modifiziert (Harduin-Lepers et al., 1995). Nach dieser Prozessierung werden die sialylierten Glykokonjugate in Transportvesikeln an ihren Bestimmungsort transportiert.

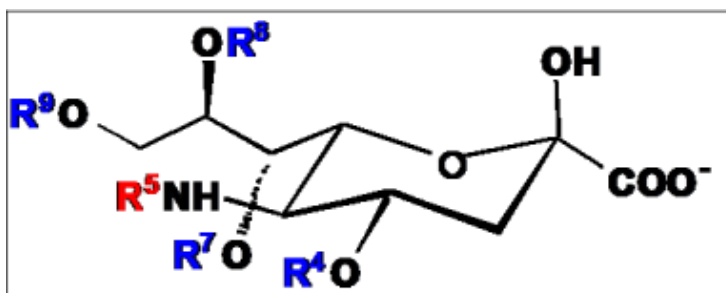
Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht die Syntheseschritte der Sialinsäuren und deren Lokalisation innerhalb der Zelle.



**Abbildung 3: Biosynthese der Sialinsäuren:** Schematische Darstellung einer Zelle mit Zellkern und Zytosol, das bifunktionale Enzym UDP-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) ist rot dargestellt, die Substrate beider Domänen, sowie das Produkt ist gelb dargestellt, nach Weidemann 2002

#### 1.4.2 Struktur und Funktion der Sialinsäuren

Sialin- oder auch Neuraminsäuren sind saure Amino Zucker. Typisch ist eine Grundstruktur aus neun Kohlenstoffatomen (Schauer et al., 1982) mit einer Carboxylgruppe am Kohlenstoffatom C<sub>2</sub> und einer acetylierten Aminogruppe am C<sub>5</sub> (Varki et al., 1992). Durch vielfältige Modifikationen an C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub> und C<sub>9</sub> entsteht ein breites Spektrum von über 50 Sialinsäuren (Schauer et al., 2000; Angata et al., 2002). Beispielhaft soll im Folgenden auf einige Funktionen von Sialinsäuren eingegangen werden.



**Abbildung 4: Struktur von Sialinsäuren:** Sialinsäuren sind N-acetyliert an R5 (Acetyl- und Glycolygruppen). Neu5Ac-Derivate tragen an R4,, R7-R9 O-Substituenten (Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Phosphonyl und Sulfonylgruppen). Beim Neu5Ac liegen die O-Substituenten unmodifiziert vor.



*(1) Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion*

Sialinsäuren sind durch ihre exponierte Stellung an den Glykokonjugaten von Zellmembranen an maßgeblichen Vorgängen, wie der Chemotaxis und bei der Entwicklung von Organogenese, aber auch von Tumoren und Entzündungen (Edelman und Crossin, 1991; Hynes und Lander, 1992) beteiligt.

Ein Beispiel hierfür ist das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM). NCAM ist ein Vermittler von homo- und heterophilen Zell-Zell-Interaktionen und trägt somit zur Plastizität von Nervengewebe bei (Hofman und Edelman, 1983; Brusés und Rutishauser, 2001).

*(2) Einfluss auf Struktur und Funktion von Glykokonjugaten*

Sialinsäuren sind groß, hydrophil und stark negativ geladen und besitzen dadurch eine hohe thermische und chemische Stabilität (Schauer, 1982). Nach Verlust ihrer Sialinsäure-haltigen Strukturen nimmt die Überlebensdauer von Erythrozyten und Thrombozyten deutlich ab. Sie werden schneller durch Makrophagen erkannt und phagozytiert (Schlepper-Schäfer et al., 1980; Kluge et al., 1992).

*(3) Maskierung von Antigenen*

Einige Krankheitserreger, aber auch Tumore, nutzen terminale Sialinsäuren zur Tarnung und entkommen somit der Erkennung des Immunsystems und der Phagozytose durch Natürliche Killerzellen (Colli et al., 1993; Dennis und Laferté, 1985). Erhöhte Expression von Selektin-E und Sialyl-Lewis<sup>a/x</sup> weist auf ein größeres Risiko hämatogener und lymphatischer Metastasierung von Lungen-, Brust-, Ovarial- und Gastro-Intestinal-Tumoren hin (Magnani et al., 1982; Takada et al., 1991; Wei et al., 2010).

*(4) Erkennung von Pathogenen*

Sialinsäuren sind bei der Bindung von Viren, Bakterien, Parasiten und Toxinen beteiligt (Schauer, 1985; Varki, 1992; Karlsson, 1995). Das Oberflächenprotein Hämagglutinin befähigt Influenza-Viren an sialylierte Strukturen der Wirtszelle zu binden, in diese einzudringen und eine Infektion auszulösen (Zimmer et al., 1994; Keppler et al., 1995).

## 1.5 Veränderung der Sialinsäurebiosynthese als Auslöser von Erkrankungen

### 1.5.1 GNE-Myopathie

Die Symptomatik einer Polymyositis mit dem Auftreten von umrandeten Vakuolen und filamentösen Einschlüssen im Muskelpräparat wurde erstmals von Chou im Jahr 1967 beschrieben. Wenig später wurde dann der Begriff der „Einschlusskörperchenmyositis“ (Inclusion Body Myositis; IBM) geprägt (Yunis und Samaha, 1971). Gemeinsam mit Dermatomyositis und Polymyositis umschließt die IBM die Gruppe der histologisch ähnlichen „immunogenen Myositiden“.

Unter dem Begriff der IBM wurde später die histologisch ähnlichen Erkrankungen sporadische Einschlusskörperchenmyositis (sIBM) und hereditäre Einschlusskörperchenmyopathie (hIBM) zusammengefasst.

Die hIBM, später als GNE-Myopathie bezeichnet, zeigt keine Entzündungszeichen und ist meist autosomal-rezessiv vererbt (Griggs et al., 1995; Askanas und Engel, 1995; Mitrani-Rosenbaum et al., 1996).

#### *(1) Genetische Ursachen der GNE-Myopathie*

Ursache der hIBM ist eine Mutation des GNE-Gens auf Chromosom 9q12-13 (Eisenberg et al., 1999). Dieser 700kb große Genlocus konnte mittels Kopplungsanalysen von 56 jüdischen h-IBM Patienten aus Afghanistan, dem Iran und dem Irak eingegrenzt werden. Den Genlocus 9q12-13 hat die hIBM mit der allelischen „Distal Myopathy with Rimmed Vacuoles“ (DMRV; Nonaka Distal Myopathy) gemein. Die DMRV wurde 1981 von Nonaka et al. als eine Erkrankung japanischer Patienten beschrieben und wie 2002 gezeigt werden konnte, ist die DMRV mit der hIBM identisch (Nishino et al., 2002). Um einer Verwirrung wegen der Doppelbenennung dieser Erkrankung zu vermeiden, einigten sich internationale Experten auf den Namen GNE-Myopathie (Hui-zing et al., 2014).

Mehr als 150 Mutationen des GNE-Gens konnten weltweit bislang ausgemacht werden (Mori-Yoshimura und Nishino, 2016). Sowohl das Spektrum, als auch der Mechanismus der Mutationen ist vielfältig. Neben Missense-Mutationen wurden Rasterschubmutationen mit Deletion und Insertion, Exon-Skipping, Stop-Mutationen, Einzelbasendeletion und -insertion gefunden (Nishino et al., 2002; Broccolini et al., 2009). Es konnten drei Ursprungsmutationen der GNE ausgemacht werden, von denen die M712T-Mutation am häufigsten bei persischen Juden vorkommt. Die V572L- und D176-Mutationen sind bei japanischen Patienten weit verbreitet.

### *(2) Histologie und Klinik der GNE-Myopathie*

Geriffelte Vakuolen „Rimmed Vacuoles“ und Einschlusskörperchen gelten als histologische Hauptmerkmale der GNE-Myopathie. Diese eosinophilen, zytoplasmatischen Einschlüsse enthalten z.B. Ubiquitin, Apolipoprotein E,  $\alpha$ -1-Antichymotrypsin, Presenilin-1, hyperphosphoryliertes Tau, Prion-Protein, sowie  $\beta$ -Amyloid und dessen Vorläufer (Askanas und Engel, 1995; Askanas et al., 1998). Die Rimmed Vacuoles zeigen autophagische Aktivität (Malicdan et al., 2007) und sind vermehrt in atrophem Muskelgewebe nachzuweisen (Lotz et al., 1989). Eine erhöhte Apoptoserate und eine verlangsamte Regeneration scheinen zum Fortschreiten der Erkrankung beizutragen (Singh und Arya, 2016).

Die GNE-Myopathie tritt in der Regel in der zweiten oder dritten Lebensdekade auf (Weihl et al., 2010). Argov und Yarom (1984) beschrieben die GNE-Myopathie als eine langsam progrediente, distal beginnende, im Verlauf auch proximale Muskelschwäche. Charakteristischerweise ist der Musculus quadriceps femoris nicht befallen. Im frühen Stadium sind schmerzlose Schwäche und Atrophie der Fingerbeuger und Fussheber zu beobachten, was Gangstörungen zur Folge hat. Im Verlauf breitet sich die Atrophie auf die Muskulatur des Schulter- und Beckengürtels und der oberen Extremität aus.

### *(3) Therapieansätze*

Alle bisherigen Therapieansätze sind von einer therapeutischen Anwendung weit entfernt und befinden sich in unterschiedlichen Teststadien. Solange die Pathogenese der GNE-Myopathie nicht endgültig aufgeklärt ist, dienen alle bisherigen Versuche der Symptomlinderung.

Die Supplementierung von Sialinsäuren, ManNAc oder Neu5Ac kann die Probleme bei der Sialinsäure-Synthese umgehen (Noguchi, 2004; Sparks et al., 2005). Am Mausmodell wurde durch orale Applikation von ManNAc eine deutliche Verbesserung von GNE-Enzymaktivität, Sialylierungsstatus und Überleben erreicht (Galeano et al., 2007; Yardeni et al., 2013). Derzeit wird weltweit eine Phase 3 Studie zur Medikamentenzulassung von oralen Sialinsäuremetaboliten durchgeführt (Mori-Yoshimura M1, Nishino, 2015).

Die intravenöse Gabe eines Sialinsäure-haltigen Immunglobulins konnte bisher keine Änderung der Sialylierung bewirken, jedoch besserten sich das subjektive Wohlbefinden und die Muskelfunktion der Patienten (Dalakas et al., 1997; Sparks et al., 2007).

Die intramuskuläre Injektion von GNE-Genen mittels DNA-Liposomen-Komplexen bei einem Patienten führte zur Hochregulation transgener GNE und zu lokaler Sialinsäure-Erhöhung im Biopsat (Nemunaitis et al., 2010).

Das fehlende Ansprechen auf immunregulatorische Therapien, mit zum Beispiel Kortikoiden oder Plasmapherese, zeigt die untergeordnete Rolle der Entzündung bei der Krankheitsgenese der GNE-Myopathie (Dalakas et al., 2001).

### 1.5.2 Sialurie

Die Sialurie ist eine extrem seltene, angeborene Stoffwechselstörung mit exzessiver Synthese freier Sialinsäuren, zytoplasmatischer Speicherung und vermehrter Ausscheidung im Urin (Thomas et al., 1985; Weiss et al., 1989; Seppala et al., 1991). Eine Mutation im GNE-Gen führt zum Defekt der Feedback-Inhibierung von GNE durch das Neu5Ac (Seppala et al., 1999) und ruft diese Überproduktion von Sialinsäuren hervor.

Von den weltweit bisher 5 bekannten Fällen weisen 4 eine Missense-Mutation in der allosterischen Bindungsstelle der GNE für CMP-Neu5Ac auf. Die mutierte Epimerase produziert ungenügend freie Sialinsäuren. Das gesunde zweite Allel weist auf einen autosomal-dominanten Erbgang hin.

Die Patienten weisen ein plumpes Erscheinungsbild und geistige Retardierung auf. Dysmorphien wie ein prominenter Vorderkopf, Hypertelorismus, epikanthische Falten, niedrige Ohren, eine breite Nasenbrücke, langes Philtrum und wenig hyper-extendierbare Glieder wurden beschrieben (Ferreira et al., 1999; Enns et al., 2001). Diese Veränderungen lassen sich aber nicht eindeutig der Sialurie zuordnen.

Eine Hepatomegalie und diskreter Transaminasen-Anstieg weisen auf eine Leberzellschädigung hin.

## 2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Charakterisierung des bisher wenig untersuchten Proteins Ligand Receptor Interacting Factor 1 (LRIF1) zu leisten.

Vor Beginn der Laborarbeiten zu dieser Dissertation im Jahre 2006 war die genomische DNA-Sequenz als Protein „C1orf103“ bekannt. Außerdem fanden Weidemann et al. 2006 „C1orf103“ als potentiellen Interaktionspartner der UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) in Yeast Two Hybrid-Screening-Untersuchungen. GNE ist das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese und Mutationen im GNE-Gen führen zur GNE-Myopathie. Diese ist eine seltene, weltweit auftretende und bislang nicht heilbare Muskeldystrophie.

Die genannten Untersuchungen waren Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit und die Grundlage der Arbeitshypothese. Eine mögliche Interaktion von GNE und LRIF1 im humanen System sollte untersucht werden. Grundlage einer Interaktion zweier Proteine ist die gemeinsame Lokalisation in einem zellulären Kompartiment. Mittels Fluoreszenzmikroskopie sollten zunächst Lokalisationsstudien von LRIF1 und GNE durchgeführt werden. Im Falle einer gemeinsamen Lokalisation sollten weitere Untersuchungen folgen.

Im Verlauf der Laborarbeiten zu der vorliegenden Dissertation identifizierten Li et al. 2007 „C1orf103“ als einen Interaktionspartner des Retinsäurerezeptors  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) und bezeichneten das Protein als Receptor Interacting Factor 1 (RIF1, später LRIF1). Des Weiteren zeigten sie, dass RIF1 in der nuklearen Matrix lokalisiert ist und fanden zwei Isoformen des LRIF1.

Somit sollten in den Studien auch die veröffentlichten Daten von Li et al. bestätigt werden. Mittels Genexpressionsanalysen sollte gezeigt werden, ob zwei Isoformen in humanen Geweben exprimiert werden. Anschließend sollten flourenszenzmikroskopische Untersuchungen die Lokalisation der gefundenen Isoformen LRIF1.1 und LRIF1.2 zeigen.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Zellkulturmaterialien

Die Laborarbeiten wurden mit Chemikalien höchster Qualitätsstufe der Unternehmen Merck (Darmstadt), ROTH (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg), Biochrom (Berlin), Gibco (Detroit) und Sigma (München) durchgeführt.

Weitere Chemikalien und Reagenzien anderer Hersteller sind entsprechend der für sie angewandten Methoden ausgewiesen.

Für die Arbeiten in der Zellkultur wurden Materialien der Unternehmen Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhäuser), Corning (New York) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Hierbei handelte es sich um sterile Einmal-Artikel.

##### 3.1.2 Prokaryotische Organismen

###### *Escherichia coli*

One Shot® TOP10 kompetente Zellen (Invitrogen, Carlsbad)

Genotyp: F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 deoR recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) end A1 nupG.

##### 3.1.3 Eukaryotische Organismen

Die im Folgenden aufgeführten eukaryotischen Organismen wurden für Western-Blot-Analysen zur Identifizierung von RIF1 in nativen Zelllinien genutzt. Zudem wurden CHO-Zellen mit RIF-1- und GNE-Vektor-Konstrukten transfiziert. Sie dienen somit auch Lokalisationsstudien unter dem Fluoreszenzmikroskop.

###### (1) CHO-Zellen

CHO-Zellen sind eine immortalisierte Zelllinie, die aus chinesischen Hamsteroovarien isoliert wurde (Tijo und Puck, 1958; Puck et al., 1958).

###### (2) HeLa-Zellen

Diese Zelllinie wurde 1951 aus Zervixkarzinomzellen der Afroamerikanerin Henrietta Lacks gewonnen. HeLa-Zellen dienen ursprünglich der Untersuchung des Humanen-Papilloma-Virus

(Scherer et al., 1953). Eine vorausgegangene Infektion kann bei mindestens 70 % der Zervixkarzinome festgestellt werden.

**(3) HL60-Zellen**

HL60 ist eine humane promyelocytische Zelllinie, die spontan differenziert oder induziert werden kann, so z. B. durch Retinsäure oder DMSO (S.J. Collins et al., 1977, 1978 und 1979).

**(4) MEWO-Zellen**

MeWo-Zellen wurden aus einem humanen Melanom isoliert (Grose und Brunell, 1978).

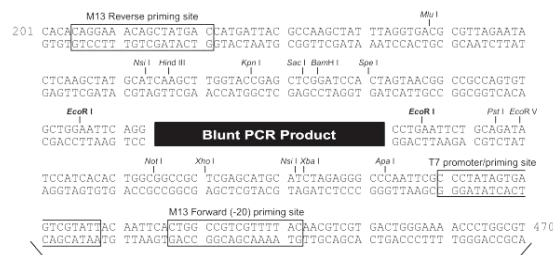
**(5) SH-SY5Y-Zellen**

Die Ursprungszelllinie SK-N-SH wurde aus der Knochenmarksbiopsie einer Patientin mit Neuroblastom gewonnen. Nach einer Reihe von Klonierungsschritten entstand die SH-SY5Y-Zelllinie, die erstmals 1978 von Biedler et al. beschrieben wurde.

**3.1.4 Vektoren**

**(1) pCR®-Blunt (Invitrogen)**

Dieser Vektor wurde für Zwischenschritte bei der Klonierung verwendet. In den pCR®-Blunt-Vektor können PCR-Fragmente oder andere DNA-Fragmente inseriert werden, die keine überhängenden Enden, also Blunt Ends, besitzen. Der Vektor besitzt das letale ccdB-Gen, welches durch die Insertion unterbrochen wird. Somit werden die positiven Rekombinanten direkt selektiert.



**Comments for pCR®-Blunt  
3512 nucleotides**

- Lac promoter/operator region: bases 95-216
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- LacZ-alpha ORF: bases 217-570
- T7 promoter priming site: bases 400-419
- M13 Forward (-20) priming site: bases 427-442
- Fusion joint: bases 571-579
- ccdB lethal gene ORF: bases 580-882
- Kanamycin resistance ORF: bases 1231-2025
- Zeocin resistance ORF: bases 2231-2605
- pUC origin: bases 2673-3386

Abbildung 5: pCR®-Blunt Vektorkarte

(2) *pEGFP-N3 (BD Biosciences)*

Für die Untersuchungen der Lokalisation von LRIF1 und dessen Kolo­kalisierung mit GNE mittels Immunfluoreszenzuntersuchung diente der Klonierungsvektor *pEGFP-N3*. Dieser enthält das Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP)-Gen und ermöglichte somit das Sichtbarmachen von LRIF1 in den CHO-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

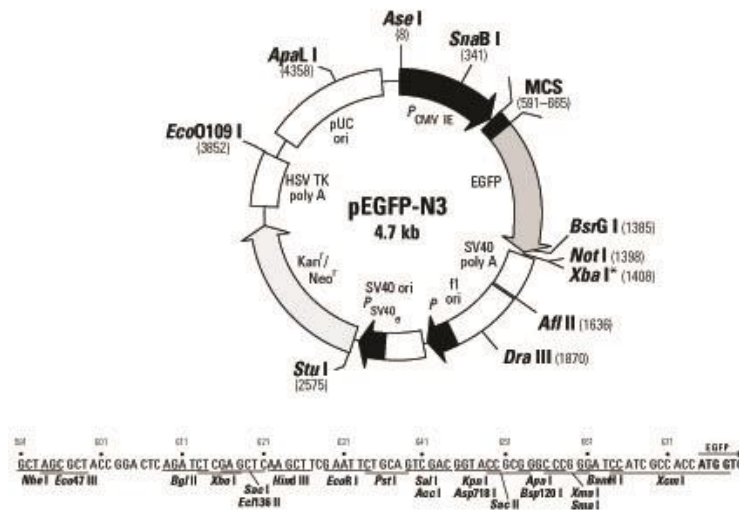


Abbildung 6: *pEGFP-N3* Vektorkarte

(3) *pCherry-C (BD Biosciences)*

In den *pCherry-C*-Vektor wurde ein GNE-Insert kloniert, um die GNE zu lokalisieren und eine mögliche Kolo­kalisierung zu untersuchen. Wird UV-Licht mit dem Fluoreszenzmikroskop auf die mit diesem Vektor transfizierten CHO-Zellen ausgesendet, so emittieren diese rotes Licht.

(4) *pCherry-N (BD Biosciences)*

Um eine Beeinflussung der C-terminalen Fusion von Cherry-Protein und GNE auf die Lokalisation in den Zellen und der Interaktion mit RIF-1 auszuschließen wurde die GNE auch in den *pCherry-N* kloniert und transfiziert.



### 3.1.5 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech bezogen.

#### *Primer für die Sequenzierung*

Für die Sequenzierung von LRIF1.1 wurden folgende Primer verwendet:

1 M13-Forward	(17mer)	5' - GTTTTCCCAGTCACGAC - 3'
2 LRIF1-1 BP 451-466	(15mer)	5' - GCGGTGCCGCCGAGC - 3'
3 LRIF1-2 BP 1001-1016	(15mer)	5' - TGCCGCCGCTGAGCA - 3'
4 LRIF1-3 BP 1451-1466	(15mer)	5' - CCGGCCATAACGCGC - 3'
5 M13- Reverse	(17mer)	5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'

Für die Sequenzierung von LRIF1.2 wurden folgende Primer verwendet:

M13-Forward	(17mer)	5' - GTTTTCCCAGTCACGAC - 3'
M13- Reverse	(17mer)	5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'

### 3.1.6 Antikörper

#### *(1) Primäre Antikörper*

Für die durchgeführten Experimente wurden 2 Kaninchen von der Firma Pineda immunisiert.

Für die Experimente wurde folgender primärer Antikörper genutzt:

LRIF1-Antikörper von Tier 1, 245. Immunisierungstag, Verdünnung 1:1000

Die genutzte Antikörperdomäne detektiert die Aminosäuren 616-631 der Isoform I von LRIF1.

Dies entspricht den Aminosäuren 80 bis 95 von LRIF1.2.

#### *(2) Sekundäre Antikörper*

Ziege-anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-Konjugat), Verdünnung 1:5000, (Dianova)

### 3.1.7 Enzyme

Benzonase	Novagen
DNase	Roche
PfxPolymerase	Invitrogen
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
RNase	Qiagen,
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
TaqPolymerase	MBI Fermentas
Trypsin	Viralex, PAA Laboratories

### 3.1.8 Inhibitoren

Protease Inhibitor Cocktail Sigma

### 3.1.9 Medien

$\alpha$ -MEM PAA Laboratories

DMEM PAA Laboratories

### 3.1.10 Medienzusätze

#### Aminosäuren

L-Glutamin Biowest

#### Antibiotika

Ampicillin Boehringer

Kanamycin Gibco

Penicillin PAA Laboratories

Streptomycin PAA Laboratories

#### Seren

FCS (Fötale Kälberserum) Gibco

### 3.1.11 Kits

Plasmid-DNA Purification-Kit Qiagen

Qiafilter Maxi Kit Qiagen

QIAprep® Minipräp-Kit Qiagen

QIAquick® PCR-Purification-Kit Qiagen

RNAesy® Mini-Kit Qiagen

Roti®-Lumin (Chemilumineszenz-Substrat) Roth

### 3.1.12 Membranen

Nitrocellulose Transfer Membran Whatman

Whatmanpapier Whatman

### 3.1.13 Größenmarker

#### DNA-Molekulargewichtsmarker

Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder MBI Fermentas

#### Protein-Molekulargewichtsmarker

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Bio-Rad

### 3.1.14 Geräte

Brutschrank (Bakterien)	B 6200, Heraeus, Kendro Laboratory Products
Brutschrank (Zellkultur)	Heracell, Heraeus, Kendro Laboratory Products
Digitalkamera	Coolpix 4500, Nikon
Elisa-Reader	Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem	C.B.S. Scientific
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf
Phospho-Imager	Chem Doc XRS System, Molecular Imager Model, Bio-Rad Laboratories
Kühlzentrifuge	Biofuge Fresco, Heraeus, Kendro Laboratory Products
Magnetrührer	FB 1500, Fisher Scientific
Mikroskop	Axiovert 100, Carl Zeiss Microscopy Telaval 31, Carl Zeiss, Microscopy
Mikrowelle	KOR-6305, Daewoo, Incheon
PCR-Thermo-Cycler	Mastercycler gradient, Eppendorf iQ5 icycler, Bio-Rad
Pipetten	Transferpette, Brand
Power Supply	Blue Power 500, Serva
Schüttelinkubator	innova 4300, New Brunswick Scientific
Spektralphotometer	Spectronic Genesys 10 Bio, Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	aura 2000 MAC, BIO AIR instruments
Tischzentrifuge	Biofuge Pico, Heraeus, Kendro Laboratory Products
Ultrazentrifuge	ZK 300, Hermle
Vortex	MS2 Minishaker, IKA

Waage

Denver Instrument

Wasserbad

Gesellschaft für Labortechnik

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Behandlung von Lösungen und Geräten

Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden durch Autoklavieren (20 min, 200 kPa, 120°C) und Erhitzen bei 180°C sterilisiert und gleichzeitig von DNase-Aktivität befreit. Hitzeinstabile Geräte und Arbeitsflächen wurden mit 70%igem Ethanol gereinigt. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

### 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

Im Folgenden sind die von uns angewandten molekularbiologischen Standardmethoden aufgeführt.

### 3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die exponentielle in-vitro-Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente (Saiki et al., 1985; Mullis und Faloona, 1987). Als Sequenz kann jeder DNA-Bereich ausgewählt werden, sofern dieser an seinen Enden bekannt ist. Zwei Oligonukleotidprimer hybridisieren in gegenläufiger Richtung zu beiden Seiten der zu amplifizierenden Sequenz. Die DNA-Polymerase synthetisiert die komplementären Stränge vom jeweiligen Primer aus in 5'→3' Richtung.

Die neu synthetisierten Stränge werden durch Erhitzen zu Einzelsträngen denaturiert, um ein erneutes Hybridisieren der Primer und anschließende DNA-Synthese im neuen Zyklus zu ermöglichen. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten: 1. Denaturierung der DNA, 2. Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge und 3. Synthese des komplementären Stranges. Diese Schritte werden 35-mal wiederholt und dabei erfolgt eine exponentielle Amplifikation der gewünschten DNA-Produkte.

Für die PCR werden hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien wie *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) verwendet, sodass die Kettenreaktion ohne erneute Zugabe von Polymerase nach jedem Denaturierungsschritt durchgeführt werden kann.

Die meisten DNA-Polymerasen machen während der Synthese Fehler, so dass falsche Nukleotide eingebaut werden. In diesen Fällen setzt die "Korrekturlesefunktion" der Polymerasen ein,

die von ihrer 3' → 5'-Exonukleaseaktivität abhängt. Die *Taq*-Polymerase besitzt diese Exonukleaseaktivität nicht. Daher liegt ihre Fehlerhäufigkeit schätzungsweise bei einer falschen Base je 9000 Nukleotide und ist vergleichsweise hoch.

Die *Pfx*-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* weist eine solche Exonukleaseaktivität auf und korrigiert ihre Synthesefehler somit selbstständig. Deshalb wurde die *Pfx*-Polymerase in dieser Arbeit für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet.

Zur Amplifizierung des LRIF1 wurde cDNA aus verschiedenen humanen Geweben verwendet.

#### *Pfx*-Polymerase-Reaktion (Fermentas)

50 µl Ansatz:	<i>Pfx</i> -Polymerase	(2,5 U/µl)	1,0 µl
	Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	(10×)	2,5 µl
	dNTP's	(10 mM)	1,0 µl
	sense Primer	(0,2 µM)	1,0 µl
	antisense Primer	(0,2 µM)	1,0 µl
	Template-DNA	(10-100 ng)	x µl
	H <sub>2</sub> O bidest.		y µl

#### PCR-Programm:

	Denaturierung	95°C	2 Min
35 Zyklen:	Denaturierung	95°C	15 sec
	Annealing	55°C	15 sec
	Extension	72°C	4 min
	Final Extension	72°C	4,5 min
		4°C	∞

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

### 3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Moleküle der Größe nach auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Moleküle verhält sich dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Je kleiner das DNA-Fragment, desto schneller

läuft es durch das Gel. Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte im Bereich von 700 bis 5000 bp mit 0,8 bis 1,5%igen Agarose-Gelen (w/v). Die Agarose wurde in TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA) aufgekocht und nach dem Abkühlen auf 50°C in die Gelschlitten gegossen. Die Probenaschen wurden durch einen Kamm geformt, welcher in das noch flüssige Gel gesteckt wurde.

Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wurde das abgekühlte Gel mit 0,001 % (v/v) Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht die einzelnen DNA-Banden durch rötliche Fluoreszenz unter UV-Bestrahlung sichtbar.

Nach dem Erstarren der Agarose wurden die Gelschlitten in die mit 1xTAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammern gelegt. Dann wurden die Proben mit 1/10 Bromphenolblau-Probenpuffer (v/v) versetzt und 5-25 µl pro Probentasche aufgetragen. Als Größenstandard wurden 3 µl GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas) aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde anschließend bei 70-80 V (5 V/cm) durchgeführt bis der Farbmarker die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hatte. Hierbei laufen die DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols.

#### Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer	40,0	mM	Tris-HCl, pH 8,5
	0,1	%	Essigsäure
	2,0	mM	EDTA
10× DNA-Probenpuffer	50,0	%	Glycerin
	50,0	mM	EDTA
	0,05	%	Bromphenolblau (läuft bei ca. 300 bp)
	0,05	%	Xylencyanol (läuft bei ca. 1000 bp)

#### 3.2.5 Isolierung von DNA mittels Gelelution

Mit EtBr versetzte, DNA-haltige Banden können unter UV-Licht ausgeschnitten und isoliert werden. Zur Isolation von DNA aus Agarose-Gelen wurde in dieser Arbeit ein Qiagen-Kit (QIAquick Gel Extraction Kit) verwendet. Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Gel erfolgte nach den Instruktionen des Herstellers. Zunächst wurden die ausgeschnittenen Gelstückchen in QG Puffer aufgenommen und bei 50°C geschmolzen. Dann wurden die Säulen mit den Gelfractionen beladen. Mittels Zentrifugieren wurden die Membranen beladen, gewaschen und eluiert. Hierbei entfernte der ethanolhaltige Puffer PE Verunreinigungen wie Nukleotide, Primer, Enzyme, Agarose, EtBr und Detergenzien.

Die DNA wurde schließlich mit 20-50 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest. eluiert.

### 3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle wird das zu klonende DNA-Fragment in einen geeigneten Vektor inseriert.

Bei der Ligation werden mit Hilfe einer Ligase DNA-Fragmente durch Ausbildung von Phosphodiesterasebindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden verknüpft. Diese DNA-Fragmente können entweder glatte oder überhängende Enden haben (Weiss et al 1968, Richardson et al 1968).

DNA-Ligasen werden von allen lebenden Zellen produziert und reparieren Brüche von doppelsträngigen DNA-Molekülen. Die verwendete T4-Ligase (Fermentas) entstammt aus E.coli-Bakterien, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert sind. Sie kann sowohl glatte als auch überhängende Enden verknüpfen.

Die *Pfx*-Polymerase synthetisiert PCR-Produkte mit glatten Enden, wobei die *Taq*-Polymerase PCR-Produkte mit einem überhängenden Adenosin herstellt. Die mit der *Pfx*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte wurden dementsprechend in einen Vektor mit blunt ends (pCRblunt, Invitrogen) ligiert, der als Zwischenklonierungsvektor diente. Um die Inserts in den eigentlichen Expressionsvektor (pEGFP-N3) gerichtet zu klonieren, wurden diese aus dem Zwischenvektor mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und in den geeigneten Expressionsvektor ligiert. Da das LRIF1.1-Molekül mit 2310 bp im Vergleich zu den verwendeten Vektoren relativ lang ist, wurde ein Überschuss von 10:1 gewählt, um die Ligationseffizienz zu steigern. Üblicherweise wird das kleinere DNA-Fragment (Insert) im 1:3 Überschuss eingesetzt.

#### Beispiel für einen Ligationsansatz

10 µl Ansatz	T4-DNA-Ligase (Fermentas, 10U/µl)	1 µl
	T4-Puffer (10x)	1 µl
	Vektor (100 ng)	x µl
	Insert (10facher molekularer Überschuss)	y µl
	H <sub>2</sub> O bidest.	z µl

Ligiert wurde über Nacht bei 16°C und die Reaktion im Anschluss zehn Minuten bei 65°C gestoppt.

### 3.2.7 Colony-PCR

Mit Hilfe der Colony-PCR wurden die Ergebnisse der Ligationen überprüft. Zunächst wurden die transfizierten *E. coli* OneShot®Top10-Klone nach der Inkubation gepickt. Um zu überprüfen, ob das gewünschte Insert auch enthalten ist, wurde nun eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Um das Insert zu reamplifizieren wurden spezifische LRIF1.1- oder LRIF1.2-Primer verwendet. Die Amplifikation erfolgte mittels *Pfx*-Polymerase und die PCR wurde entsprechend dem in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Programm durchgeführt. Die Bakterien-DNA wurde in der Denaturierungsphase freigesetzt und stand so der Amplifikation zur Verfügung. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese, wie im Kapitel 3.2.2.2 beschrieben, aufgetrennt oder sequenziert.

Für die später durchgeführten Kollokalisationsstudien von LRIF1 und GNE war eine sichere Funktionsfähigkeit von LRIF1 innerhalb der Zellen von großer Bedeutung. Um dies zu gewährleisten wurden einige Klone einer Sequenzier-PCR zugeführt, wie in Kapitel 3.2.3.6.3 beschrieben und im Anschluss sequenziert. Zeigten die Sequenzierungen intakte Konstrukte, so wurden die Plasmide in CHO-Zellen transfiziert und dienten weiteren Untersuchungen in der Zellkultur.

### 3.2.8 Mikrobiologische Methoden

Im Folgenden sind die von uns angewandten mikrobiologischen Standardmethoden aufgeführt.

### 3.2.9 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte in LB-Medium mit Zusatz von Ampicillin oder Kanamycin in Flüssigkultur oder auf Festmedium (1,5 % Agar in LB) bei 37°C. Die Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben von einer ÜN-Kultur bei 220 rpm angeimpft. Zur Herstellung einer ÜN-Kultur wurde am Vorabend eine einzelne Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Erlenmeyerkolben wurden groß genug gewählt, so dass die Gasphase über der Flüssigkeit mindestens zwei Drittel des Kolbens füllte. Dies gewährleistete eine ausreichende Versorgung der Bakterien mit Sauerstoff während der Inkubation.

#### Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium:	Pepton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g



H<sub>2</sub>O bidest.                      add 1 l  
LB-Agar:                              wie Flüssigmedium mit 15 g Agar

### 3.2.10 Konservierung von Bakterien

Bakterienkolonien sind auf Agarplatten bei 4°C für ca. 6 Wochen lagerbar. Für die längerfristige Konservierung von Bakterien können sogenannte Glycerolstocks angefertigt werden. Hierbei werden ÜN-Kulturen mit 20-50 % sterilem Glycerin (v/v) versetzt, gemischt, schockgefroren in flüssigem Stickstoff und bei -80°C aufbewahrt.

### 3.2.11 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation ist ein Standardverfahren zur Veränderung der genetischen Information von Bakterien durch Einbringen von Plasmid-DNA. Für die Transformation mittels Hitzeschockmethode (Sambrock et al., 1989) wurden zunächst 50 µl chemisch kompetenter Zellen (E. coli OneShot®Top10) auf Eis aufgetaut und mit dem halben oder ganzen Ligationsansatz bzw. 0,1-0,5 µg Plasmid-DNA gemischt. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte dann der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Dieser macht die Bakterienmembran durchlässig für die Plasmid-DNA. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und eine Stunde bei 37°C mit 225 rpm geschüttelt. Zuletzt wurden 50-200 µl des Transfektionsansatzes auf die Selektionsplatten (LB-Agarplatten mit Antibiotikum) ausplattiert und bei 37°C ÜN inkubiert.

#### Zusammensetzung SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5	%	(w/v) (5 g/l)
Trypton	2	%	(20 g/l)
Natriumchlorid	10	mM	(0,6 g/l)
Kaliumchlorid	2,5	mM	(0,2 g/l)
Magnesiumchlorid	10	mM	
Magnesiumsulfat	10	mM	

### 3.2.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Ultravioletabsorptionsspektrometrie ermöglicht die exakte Messung von DNA-Konzentrationen in Lösungen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml. Durch das Verhältnis der Extinktionen von 260 nm zu 280 nm kann außerdem die Reinheit der DNA bestimmt werden. Eine saubere DNA-Probe weist einen Extinktionsquotienten von 1,8 auf, kleinere Werte sprechen für eine Verunreinigung mit Proteinen.

Auch mittels Agarosegelelektrophorese lassen sich Reinheit und Menge von DNA-Proben bestimmen. Diese Methode ist jedoch ungenauer als die photometrische Messung und eignet sich nur zum Abschätzen von DNA-Mengen.

### 3.2.13 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Erzeugung rekombinanter DNA-Moleküle ist es wichtig, die DNA exakt und an spezifischen Stellen zu spalten (Brooks, 1987; Smith und Wilcox, 1970). Um ein DNA-Fragment in einen Expressionsvektor einfügen zu können, muss der Vektor an seiner so genannten Multiple Cloning Site (MCS) geöffnet werden. Das Insert muss in diese MCS im richtigen Leseraster zum Promotor und Fusionsanteil inseriert werden, damit es später exakt translatiert wird. Dabei nutzt man die so genannte wirtskontrollierte Restriktion. Einige Bakterien, Phagen, Archaeobakterien und Viren eukaryotischer Algen sind durch Restriktionsendonukleasen und Methylasen gegen die Infektion durch Bakteriophagen geschützt. Beide Enzyme erkennen Phagen-DNA, also Fremd-DNA, durch ihre unterschiedliche Methylierung und schützen die eigene DNA durch Methylierung.

Restriktionsendonukleasen werden hier zur gerichteten Spaltung von DNA genutzt. Sie erkennen und spalten spezifisch vier bis acht Basenpaare lange Erkennungssequenzen, welche meist einfache, unterbrochene oder mehrdeutige Palindrome darstellen. Dabei werden Phosphodiesterbindungen im Inneren der DNA hydrolysiert wodurch ein 5'-Phosphat- und ein 3'-Hydroxyl-Ende entsteht. Die Spaltung durch Endonukleasen lässt entweder glatte Enden (Blunt Ends) oder um zwei bis vier Nukleotide versetzte Enden entstehen. Diese kohäsiven oder klebrigen Enden (Sticky Ends) kleben durch Basenpaarungen bei z. B. Ligationen wieder zusammen. Da die meisten DNA-Sequenzen von mehreren Enzymen gespalten werden können, ist zu beachten, dass die entstehenden Enden nicht komplementär oder zu ähnlich zueinander sind. Sonst kann es zur Religation der DNA-Fragmente kommen. Es sollten also, besonders bei Doppelverdauen, Endonukleasen mit möglichst verschiedener Erkennungssequenz genutzt werden. Ein Doppelverdau kann durchgeführt werden, wenn zwei Enzyme zur DNA-Spaltung mit demselben Puffer arbeiten.

Viele Restriktionsendonukleasen arbeiten optimal bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert von 7,4 und benötigen Puffer mit spezifischen Ionenzusammensetzungen. Die verwendeten Enzyme (Fermentas/10 U) schneiden 10 µg DNA in einer Stunde. Es wurden normalerweise zwischen 1 und 5 µg DNA-Fragment verwendet, für Testverdaue hingegen nur etwa 200 ng. Die enzymatische Reaktion erfolgte meist bei 37°C für mindestens eine Stunde.

#### Beispiel für einen Doppelverdau

20 µl Ansatz:	Template-DNA (5 µg)	x µl
	2x Tango-Puffer (Fermentas, 10x)	4,0 µl
	HindIII (Fermentas, 10U/µl)	0,5 µl
	BamHI (Fermentas, 10U/µl)	0,5 µl
	H <sub>2</sub> O bidest.	y µl

Zum Stoppen der Reaktion wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 65°C erhitzt.

### 3.2.14 Plasmidisolierung aus Bakterien

#### *(1) Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse*

Die alkalische Lyse (Birnbohm und Doly, 1979) beruht darauf, dass in einem engen pH-Bereich nicht-überspiralisierte DNA (Bakterienchromosom) denaturiert wird, überspiralisierte Plasmide jedoch nicht. Bei pH-Werten von 12 bis 12,5 lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen in nicht-überspiralisierten DNA-Molekülen. Dadurch wird die Doppelhelix entwunden und die beiden Polypeptidketten werden getrennt. Setzt man anschließend Säure zu, lagern sich die denaturierten Stränge der Bakterien-DNA zu einer unlöslich verworrenen Masse zusammen, die sich durch Zentrifugieren leicht entfernen lässt. Im Überstand bleiben dann nur die Plasmide zurück. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens ist die gleichzeitige Entfernung von Proteinen und RNA. Diese werden bei der Zelllyse mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und der anschließenden NaAc-Neutralisationsreaktion unlöslich gemacht, so dass man sie ebenfalls leicht durch Zentrifugieren beseitigen kann.

Mittels Minipräparation wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert. Hierzu wurden 1,5 ml einer 4 ml Bakterien-ÜN-Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (13000 rpm, 3 min, RT). Das Bakterienpellet wurde anschließend in 200 µl Lösung A aufgenommen. In Lösung A enthaltenes EDTA entfernt Mg<sup>2+</sup>-Ionen, die für die Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur der Zellhülle unentbehrlich sind, und hemmt DNasen und andere DNA-abbauenden Enzyme.

Nach dem Hinzugeben von 200 µl Lösung B und vorsichtigem Durchmischen durch sechs bis achtmaliges Schwenken des Eppendorfgefäßes, wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In Lösung B ist das Detergenz SDS enthalten, welches das Auflösen der Zellmembran durch Entfernen von Lipidmolekülen unterstützt.

Anschließend wurden 200 µl Lösung C zugegeben, erneut durch Schwenken gemischt und etwa 10 Minuten auf Eis inkubiert. Das in Lösung C enthaltene NaAc dient zur Neutralisation des Inhaltes des Eppendorfgefäßes.

Beim letzten Schritt, der Neutralisation, fallen Bakterien-DNA, Proteine und RNA aus und lediglich die Plasmid-DNA bleibt als Überstand in der anschließenden Zentrifugation (13000 rpm, 10 min, RT) zurück. Dieser Überstand wurde in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert (2 bis 5 Minuten, RT). Bei einem erneuten Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde nun die Plasmid-DNA pelletiert. Dieses DNA-Pellet wurde abschließend mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 - 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen.

Durchschnittlich 2 – 4 µg Plasmid-DNA wurden mit dieser Methode aus 1 ml Bakterienkultur isoliert.

#### Lösungen für die Plasmidpräparation

Lösung A	50	mM	Tris-HCl, pH 8.0
	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	RNase A

Lösung B	200	mM	NaOH
	1	%	SDS (w/v)

Lösung C	3	M	NaAc
----------	---	---	------

mit Essigsäure auf einen pH von 5 einstellen

#### *(2) Chromatische Isolierung von Plasmid-DNA*

Die Präparation erfolgte nach Anweisung des QIAprep® Spin Miniprep-Kits der Firma Quiagen (Hilden). Auch diese Methode basiert auf der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

Zusätzlich schließt sich hier noch eine säulenchromatographische Aufreinigung der DNA an. Dabei wird die DNA an eine Silicagel-Membran gebunden und von Verunreinigungen wie Nukleotiden, Enzymen, Salzen, Ölen und Detergenzien getrennt. Diese binden nicht an die Membran und werden mit ethanolhaltigem Puffer ausgewaschen. Schließlich wurde die DNA am Ende der Präparation mit 20 bis 50 µl H<sub>2</sub>O bidest. eluiert und bei -20°C gelagert.

### 3.2.15 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977; Sanger und Coulson, 1975) werden zur Sequenzanalyse eingesetzt. Bei dieser Methode findet zunächst eine Synthese des komplementären Stranges statt, der den zu sequenzierenden DNA-Abschnitt enthält. Wie bei einer gewöhnlichen PCR werden hierfür ebenfalls Primer und Desoxynukleotide (dNTP) benötigt. Im Reaktionsansatz befindet sich jedoch zusätzlich noch ein abgewandeltes Nukleotid, welches gleich wirksam in den wachsenden Polynukleotidstrang eingebaut wird, jedoch zum Strangabbruch führt. Dieses Nukleotid ist ein fluoreszenzmarkiertes 2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat (ddNTP, z. B. ddATP), bei dem die Hydroxylgruppe in der 3'-Position des Zuckerteils fehlt. Da diese Gruppe für die Anheftung des folgenden Nukleotids benötigt wird, bricht die Kette also immer dann ab, wenn ein ddNTP eingebaut wird.

Anschließend werden die Polynukleotidstränge in einem 6 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und analysiert.

Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden ermöglicht die Analyse der einzelnen Polynukleotidstränge und somit der Sequenz des amplifizierten DNA-Abschnittes in einer automatischen Sequenziervorrichtung.

Außer mit veränderten Nukleotiden kann auch mittels infrarotfluoreszenzmarkierten Sequenzierprimern (IRD700 oder IRD800) markiert werden.

#### Sequenzierung mittels markierter Didesoxynukleotide

Es wurden 300 ng Template-DNA eingesetzt und mit 10 pmol eines Primers, 1,5 µl fünffach BigDye-Lösung und 1,5 µL BigDye-Sequenzierungspuffer des BigDye-™ Terminator-Cycle-Sequencing-Kits (Applied Biosystems, UK) in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt.

Da die Länge von LRIF1.1 über der maximalen Sequenzierlänge lag, erforderte die Sequenzierung die Verwendung von mehreren Ansätzen mit mehreren Primern. Nach der Sequenzierungs-PCR wurden die Proben durch Ethanolpräzipitation gereinigt. Die eluierte DNA wurde anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet und in dem Eppendorfgemäß zum Sequenzieren ans ZMG Halle weitergegeben.

#### Programm der Sequenzierungs-PCR:

	Denaturierung	95°C	2 min
25 Zyklen:	Denaturierung	95°C	10 sec
	Annealing	55°C	15 sec
	Extension	60°C	4 min

### 3.2.16 Allgemeine zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Säugerzellen wurden unter der sterilen Atmosphäre einer Zellkulturbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung. Es wurde ausschließlich bei 1100 rpm für 3 Minuten zentrifugiert.

### 3.2.17 Kultivierung von Säugerzellen

Ein Großteil der Arbeiten wurde mit CHO-Zellen durchgeführt, diese werden als permanente Zelllinie mit unbegrenzter Lebensdauer bezeichnet. CHO-Zellen stammen aus dem Ovar des chinesischen Hamsters (CHO) *Cricetulus griseus*, wachsen adhärent in Zellkulturflaschen und teilen sich durchschnittlich einmal in 24 Stunden. Je nach Zelldichte wurden die CHOs alle 3-4 Tage passagiert. Zunächst wurden sie mittels PBS/EDTA abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in neuem Medium aufgenommen. Hierbei wurden sie durch vorsichtiges Pipettieren vereinzelt. Schließlich wurden die CHO-Zellen 1:5 oder 1:10 wieder ausplattiert.

Für den Nachweis von LRIF1 in nativen, untransfizierten Zellen wurden neben CHO- auch HeLa-, HL60-, MeWo- und SH-SY5Y-Zellen verwendet. Diese humanen Zelllinien sind teils adhärent, teils in Suspension und wurden ebenfalls in Kultur gehalten und passagiert.

#### Medium für CHO-Zellen:

	10	% (v/v)	FCS (Fetal Calf Serum)
	5	ml	L-Glutamin (2 mM Endkonzentration)
	5	ml	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml Streptomycin Endkonzentration)
add	500	ml	α-MEM

#### Medium für HeLa-, MeWo- und SH-SY5Y-Zellen:

	10	% (v/v)	FCS
	5	ml	L-Glutamin (2 mM Endkonzentration)
	5	ml	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml Streptomycin Endkonzentration)
add	500	ml	DMEM

Medium für HL60-Zellen:

	20	% (v/v)	FCS
	5	ml	L-Glutamin (2 mM Endkonzentration)
	5	ml	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml Streptomycin Endkonzentration)
add	500	ml	DMEM

**3.2.18 Konservierung von Säugerzellen**

Säugerzellen können für längere Zeit in flüssigem Stickstoff konserviert werden. Hierfür wurden die Zellen in einem Gemisch aus zellkulturspezifischem Serum und 10 % DMSO resuspendiert, in Einfrierröhrchen überführt und eingefroren. Dies geschah schrittweise zunächst bei -20 °C, dann bei -80 °C und schließlich, zur Aufbewahrung, in flüssigem Stickstoff.

Der Auftauprozess erfolgte rasch, da die Zellen sonst zu platzen drohten. Die gefrorenen Proben wurden in vorgewärmtem Medium aufgenommen, abzentrifugiert und die in Medium resuspendierten Zellen ausplattiert.

**3.2.19 Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA**

Bei der Transfektion ist es möglich DNA in eine Vielzahl von Zellen gleichzeitig einzubringen und stabil oder transient zu exprimieren. In dieser Arbeit wurde das LRIF1-Protein in 2 Isoformen mittels Lipofectamine™ 2000 Reagenz (Invitrogen) in CHO-Zellen transient transfiziert.

Die Transfektion wurde zum einen in 8-Kammer-Objekträgern zur Vorbereitung der Fluoreszenzmikroskopie, und zum anderen in 6-Well-Platten für Western Blot-Analysen durchgeführt.

24 Stunden vor einer Transfektion wurden 20.000 Zellen in CHO-Medium ohne Antibiotika auf einen 8-Kammer-Objektträger ausplattiert. Für die Transfektion mussten die Zellen konfluent sein. Es wurde 0,4 µg DNA in 25 µl OPTI-MEM® I-Medium aufgenommen. Parallel wurde 1 µl Lipofectamine™ 2000 in 25 µl OPTI-MEM® I-Medium verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Vereinigung beider Lösungen wurde erneut 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch aus DNA, Lipofectamine™ 2000 und Opti-MEM® I wurde anschließend zum vorhandenen Medium in die Kammern des Objektträgers pipettiert und ÜN bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Für Natriumdodecylsulfat-(Sodium-Dodecyl-Sulfate, SDS)PAGE (Laemmli, 1970) und Western Blot-Analysen wurde eine größere Anzahl von Zellen transfiziert. Es wurden 6-Well-Kammern

genutzt und je 400.000 CHO-Zellen pro Well am Vortag der Transfektion in Zellmedium ohne Antibiotikum ausplattiert. Die Durchführung folgte dann dem oben beschriebenen Protokoll. Alle Volumina wurden entsprechend der höheren Zellzahl aufskaliert.

Am Folgetag der Transfektion wurde das Medium evakuiert, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und der Puffer wieder abgesaugt. Im Anschluss wurden 50 µl 5fach Probenpuffer mit einem 10 %igem Dithiotreitol(DDT)-Anteil auf den Wells aufgebracht und möglichst alle Zellen in dem Puffer aufgenommen. Die transient transfizierten Zellen wurden direkt in Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C gekocht und anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Ein hoher Gehalt an genomischer DNA macht die Probe zähflüssig. Durch die Behandlung mit Benzonase-Nuklease wurde die genomische DNA und RNA gespalten und die Proben wieder verflüssigt. Hierzu wurden 2 µl Benzonase (25 U/µl) hinzugeben und die Proben 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben mit den transfizierten CHO-Zellen wurden nun bei -20 °C weggefroren oder wie im Kapitel 3.2.5.1 beschrieben auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

### 3.2.20 Fixierung transfizierter Säugerzellen

Um die Lokalisation der GNE- und LRIF1-Konstrukte in den transfizierten CHO-Zellen fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen, ist es notwendig diese zu fixieren. Diese Fixierung wurde mit einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) durchgeführt.

Vor der Fixierung wurden die Zellen mit DAPI-Färbelösung behandelt und somit die Zellkerne der CHO-Zellen sichtbar gemacht.

Etwa 48 Stunden nach der Transfektion wurde in jede Kammer des Objektträgers 2 µl einer 1:4 Verdünnung von DAPI mit PBS-Puffer zum vorhandenen Nährmedium gegeben. Im Anschluss wurde der Objektträger für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Jede Kammer des 8-Kammer-Objektträgers wurde mit 100 µl eines PBS/4 % PFA-Gemisches versehen und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Weiteren wurde das Medium mit dem PFA evakuiert, die Kammer vom Objektträger getrennt und die Zellen wurden bei Raumtemperatur getrocknet.

Zum Eindeckeln der Präparate wurden 2 Tropfen Polyvinylalkohol (®Moviol) auf den Objektträger pipettiert und die Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt. Ab der Fixierung wurden alle Inkubationsschritte im Dunkeln ausgeführt, um die Fluoreszenz des Präparates zu schützen. Das Präparat wurde über Nacht getrocknet und am nächsten Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.



### 3.2.21 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Axiovert 100 von Zeiss durchgeführt und dokumentiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren es nach kurzer Zeit als Fluoreszenzlicht größerer Wellenlänge.

### 3.2.22 Biochemische Methoden

Im Folgenden sind die von uns angewandten biochemischen Standardmethoden aufgeführt.

### 3.2.23 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE, Laemmli, 1970) lassen sich Proteine nach ihrem Proteingewicht auftrennen. Da Proteine eine mitunter sehr komplexe räumliche Anordnung besitzen, werden sie zuvor mit dem Detergenz SDS denaturiert und von den Ionen des Puffersystems reduziert. Hierdurch wird die räumliche Struktur der Proteine aufgehoben und die Proteine erhalten eine stark negative Ladung. Um die Proteine zu denaturieren werden sie mit einem Viertel Volumen fünffach SDS-Probenpuffer für 5 Minuten gekocht. Danach tritt die eigene Proteinladung in den Hintergrund und es kann allein nach der Größe untersucht werden.

Variiert man den Acrylamid-Anteil in den Trenngelen (z. B.: 7.5, 10 oder 12.5 % Gele), erreicht man eine bessere Auftrennung größerer oder kleinerer Moleküle. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde darüber ein 10 % Sammelgel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Dieser Kamm bildete später die Taschen für die Probenaufnahme.

Für die vertikale Elektrophorese wurde die Gelapparatur der Firma C.B.S. Scientific mit Laufpuffer aufgefüllt und die Taschen mit den Proben beladen. Zum Einlaufen in das Sammelgel wurde eine Spannung von 40 V angelegt. Diese wurde zur Auftrennung der Proteine im Trenngel auf 100 bis 120 V erhöht.

#### Lösungen für die SDS-Page

Lösung A:	30,0	%	Acrylamid (w/v)
	0,8	%	N,N'Methylenbisacrylamid (w/v)
Lösung B:	0,2	%	SDS (w/v)
	1,5	M	Tris-HCl, pH 8,8

## Material und Methodik

Lösung C:	0,2	%	SDS (w/v)
	0,5	M	Tris-HCl, pH 6,8
10fach Laufpuffer:	1,92	M	Glycin
	0,25	M	Tris, pH 8,8 (kein HCl zum Titrieren)
	1,0	%	SDS (w/v)
5fach Probenpuffer:	12,5	%	SDS (w/v)
	0,3	M	Tris-HCl, pH 6,8
	50,0	%	Glycerin (v/v)
	0,015	M	Bromphenolblau (w/v)
10 %ige Trenngellösung	7,5	ml	Acrylamid
	5,6	ml	Lösung 1
	9,4	ml	H <sub>2</sub> O bidest.
	125,0	µl	APS (10 %)
	12,5	µl	TEMED
4 %ige Sammelgellösung	1,6	mL	Acrylamid
	3,0	mL	Lösung 2
	7,4	mL	H <sub>2</sub> O bidest.
	48,0	µL	APS (10 %)
	12,0	µL	TEMED

### 3.2.24 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Mittels Western Blot (Towbin, 1979; Burnette, 1981) können bei der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf proteinbindende Oberflächen übertragen werden.

In dieser Arbeit wurde eine Nitrocellulosemembran zur Bindung der Proteine genutzt. Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde nach dem Tank-Blot-Verfahren unter Verwendung der Blotapparatur von C.B.S. Scientific durchgeführt. Dabei wurde der Sandwichblot luftblasenfrei zusammgebaut und die Membran der Anode zugewandt. Der Transfer erfolgte bei 4 °C und einer konstanten Stromstärke von 250 mA für eine Stunde. Die Kontrolle des Trans-

fers erfolgte durch eine reversible Färbung der Membran mit Hilfe einer Ponceau-Rot-Färbelösung. Um die Banden sichtbar zu machen wurde etwa eine Minute gefärbt und die Membran im Anschluss mit 1 %iger Essiglösung gewaschen.

Zum Entfärben der Membran wurde diese in TBS-Tween geschwenkt, bis der Farbstoff von der Membran gewaschen war.

#### Lösungen für Western Blot

Transferpuffer:	150	mM	Glycin
	20	mM	Tris-HCl, pH 8,3
	10	%	Methanol (v/v)
Ponceau-Lösung:	2	%	Ponceau-Rot (w/v)
	30	%	TCA
	30	%	Sulfosalicylsäure (w/v)
			vor Gebrauch 1:4 mit H <sub>2</sub> O bidest. verdünnen
Ponceau-Entfärbelösung:	1	%	Essigsäure (v/v)
Waschpuffer TBS-Tween:	140	mM	NaCl
	10	mM	Tris-HCl, pH 7,6
	0,05	%	Tween 20 (v/v)

#### 3.2.25 Immunchemischer Antigennachweis nach Elektrotransfer

Mittels Western Blots übertragene Proteine können immunologisch mit spezifischen Antikörpern gekoppelt werden. Dies kann in einem Schritt mit einem primären Antikörper erfolgen, der direkt mit dem Antigen interagiert oder aber in zwei Schritten, wenn der primäre Antikörper noch an einen sekundären antigen-spezifischen Antikörper gekoppelt werden muss. Dieser sekundäre Antikörper reagiert dann mit dem Antigen.

Im Anschluss an den Western Blot wurde die Nitrocellulose-Membran blockiert, indem sie einer Suspension von 5 % Magermilchpulver (w/v) in TBS-Tween für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und geschüttelt wurde. Hiermit wurden alle bisher unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran besetzt.

Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden in TBS-Tween und bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach drei zehnmütigen Waschschrinen erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Dieser wurde entweder bei Raumtemperatur für eine Stunde oder ÜN bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde die Membran mit dem sekundären POD-gekoppelten Antikörper in der entsprechenden Verdünnung für mindestens eine Stunde inkubiert.

Im Anschluss an die letzten Waschschrine kann der Blot mit Luminol entwickelt werden.

#### Lösungen für den Immunoblot

Blockpuffer: 5-10 % Magermilchpulver (w/v)  
in TBS-Tween

Wasch- und Inkubationspuffer: TBS-Tween siehe Lösungen für Western Blot

#### 3.2.26 Detektion von POD-konjugierten sekundären Antikörpern

Die sekundären Antikörper sind an Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelt und die Blotmembran kann somit unter Anwendung des Enhanced-Chemiluminescence-Systems entwickelt werden. Die Peroxidase katalysiert eine Reaktion, die von Chemilumineszenz begleitet wird und somit detektiert werden kann. Nach dem Abtropfen der Membran wurde sie auf eine Kopierfolie gelegt und mit einer Mischung aus gleichen Volumina Luminol-Lösung A und Luminol-Lösung B des Roti®-Lumin (Chemilumineszenz-Substrat)-Kits für ca. eine Minute inkubiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Chem Doc XRS System des Molecular Imager Modells der Firma Bio-Rad.

## 4 Ergebnisse

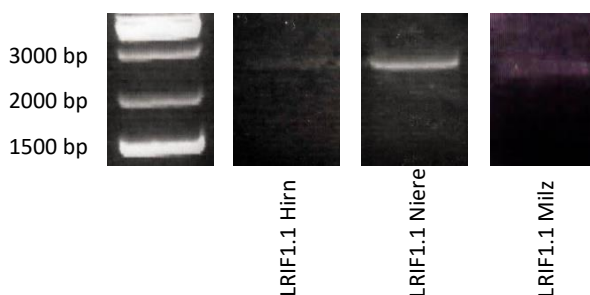
### 4.1 Genexpressionsanalysen von LRIF1 in humanen Geweben mittels PCR

Um mit der Charakterisierung des Proteins LRIF1 zu beginnen, wurde zunächst die Expression von LRIF1 untersucht. Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde LRIF1 aus humanen cDNAs amplifiziert.

Zur Herstellung der Primer dienten die Nukleotidsequenzen von LRIF1 aus der ExPasy-Datenbank. Hier waren sowohl die Isoform 1 (LRIF1.1) als auch die Isoform 2 (LRIF1.2) zu finden. Die hergestellten Forward- und Reverse-Primer waren nicht länger als 30 Basenpaare, hatten einen GC-Anteil von 40-60 % und beinhalteten keine Palindrome. Da die kürzere Isoform 2 am 5'-Ende der genomischen Isoform 1 lokalisiert ist, konnte der Reverse-Primer zur Amplifizierung beider Isoformen verwendet werden.

Im ersten Schritt der Expressionsanalyse sollte die genomische Sequenz dargestellt werden. Nach der PCR-Amplifikation von humanen cDNAs mit den LRIF1.1-Primern zeigte sich im analytischen Gel neben der erwarteten Bande bei etwa 2300 bp auch ein kürzeres Amplifikat bei ca. 700 bp. Dieses hatte etwa die Größe von LRIF1.2. Mittels Ethidiumbromid und UV-Bestrahlung wurden die Amplifikate im Anschluss an PCR und Et.Br.-Agarose-Gelelektrophorese im UV-Imager dargestellt. Trotz des hohen Molekulargewichtes des längeren Fragmentes war die Intensität der Bande schwächer als die der kürzeren Bande, welche LRIF1.2 entspricht. Diese Beobachtung wurde in den anschließenden quantitativen Bestimmungen bestätigt. Es wurden geringere DNA-Konzentrationen von LRIF1.1 gemessen als von LRIF1.2.

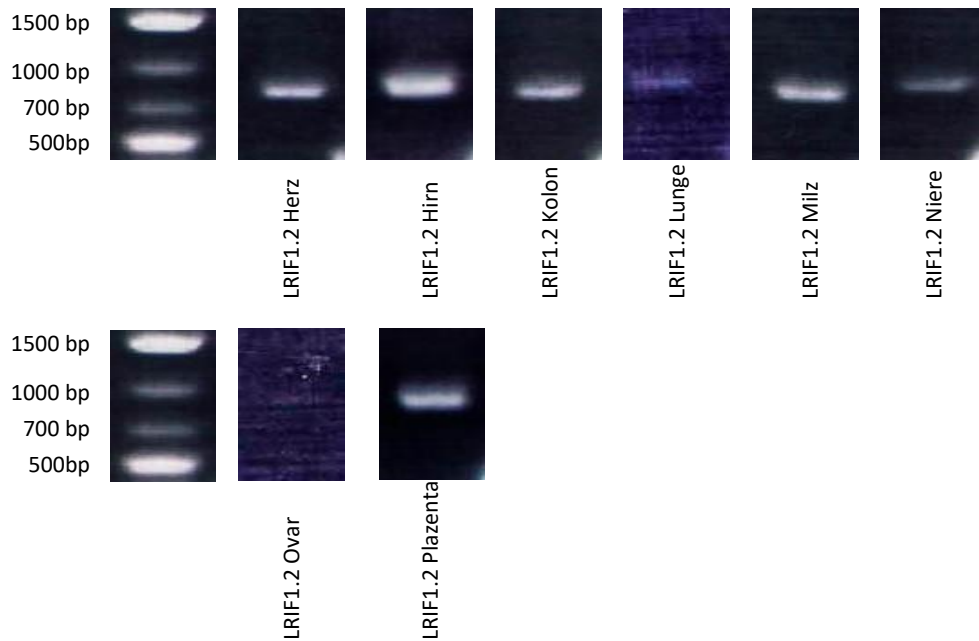
Wie in Abbildung 7 dargestellt, konnte das 2310 bp große LRIF1.1 in mehreren Geweben gefunden werden. Es konnte aus humanem Hirn, Niere und Milz amplifiziert werden.



**Abbildung 7: PCR des LRIF1.1-Gens aus humanen cDNAs.** Verwendet wurden spezifische LRIF1-Primer. Die PCR-Produkte wurden in 1,2%-Et.Br.-Agarose-Gelen analysiert.

Die LRIF1.2 codierten Transkripte konnten ebenfalls in mehreren Geweben detektiert werden. In einer cDNA-Untersuchung mit mehreren humanen cDNAs wurde LRIF1.2 amplifiziert aus Herz,

Hirn, Kolon, Lunge, Milz, Niere, Ovar, und Pankreas. Da in vorangegangenen PCRs mit LRIF1.1-Primern ein zweites etwa 700 bp langes DNA-Fragment gefunden wurde, nutzten wir diese Primer zur Amplifikation. Bei der anschließenden Darstellung im 1,2%-Et.Br.-Agarose-Gel wurden keine längeren Amplifikate entsprechend des LRIF1.1 gefunden. Wie in Abbildung 8 dargestellt ist, konnte das kürzere LRIF1.2 in Herz, Hirn, Kolon, Lunge, Milz, Niere, Ovar und Pankreas identifiziert werden.



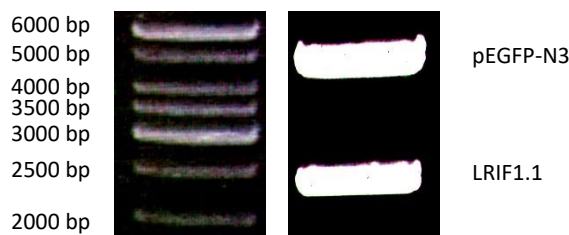
**Abbildung 8: PCR des LRIF1.2-Gens aus humanen cDNAs.** Verwendet wurden spezifische LRIF1-Primer. Die PCR-Produkte wurden in 1,2%-Et.Br.-Agarose-Gelen analysiert.

#### 4.2 Klonierung von LRIF1 in Expressionsvektoren

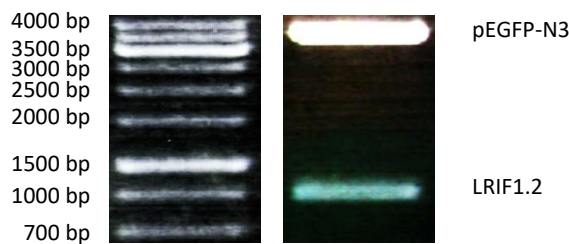
Die Überexpression von Genen ist eine probate Methode um die subzelluläre Verteilung sonst schwach exprimierter Proteine zu untersuchen. Diese Methode wurde für die Untersuchung der LRIF1-Lokalisation verwendet. Um die Überexpression des Zielgens zu erreichen, wurden die amplifizierten Sequenzen in Expressionsvektoren kloniert.

In dieser Arbeit wurde pEGFP-N3 als Expressionsvektor in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und beim Immunoblotting genutzt. Sowohl die Sequenzen von LRIF1.1 als auch LRIF1.2 wurden als Inserts in pEGFP-N3-Expressionsvektoren kloniert und an das verbesserte grün fluoreszierende Protein (eGFP) gekoppelt. Da LRIF1 nicht direkt in pEGFP-N3 kloniert werden konnte, musste die Klonierung in mehreren Schritten geschehen. Zunächst wurden die DNAs von LRIF1.1. und LRIF1.2 in den pCRBlunt-Vektor kloniert und in chemisch kompetente E.coli One Shot Top10 Zellen transformiert. Für die Klonierungsschritte wurden spezifische Primer mit

Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII designed. Die durch BamHI und HindIII entstandenen palindromischen Endstücke dienten hier der Umklonierung von LRIF1 von pCRBlunt in pEGFP-N3. In den Abbildungen 9 und 10 sind die Restriktionsanalysen von LRIF1.1/pEGFP-N3 und LRIF1.2/pEGFP-N3 dargestellt. In beiden Untersuchungen konnten saubere Banden identifiziert werden. Laut den Angaben des Herstellers besitzt der pEGFP-N3-Expressionsvektor eine Länge von etwa 4700 bp. Die veröffentlichten DNA-Sequenzen von LRIF1.1 und LRIF1.2 sind 2310 bp, beziehungsweise 702 bp lang. Somit entsprechen die in den Et.Br.-Agarose-Gelen identifizierten Banden den Erwartungen.



**Abbildung 9: Klonierung von LRIF1.1 in pEGFP-N3-Expressionsvektor** Restriktionsanalyse mit HindIII und BamHI. Die PCR-Produkte wurden in 1,2%-Et.Br.-Agarose-Gelen analysiert.



**Abbildung 10: Klonierung von LRIF1.2 in pEGFP-N3-Expressionsvektor** Restriktionsanalyse mit HindIII und BamHI. Die PCR-Produkte wurden in 1,2%-Et.Br.-Agarose-Gelen analysiert.

Neben den richtigen Schnittstellen musste beim Primer-Design auf die korrekte Ausrichtung des Inserts geachtet werden. Eine falsche Orientierung des Inserts im Vektor oder eine Veränderung des offenen Leserahmens kann einen Strangabbruch zur Folge haben.

Zur Kontrolle der Klonierungsversuche wurden Sequenzierungen durchgeführt. Diese Sequenzierungen erfolgten nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (1977). LRIF1.2 wurde mit M13-Forward- und Reverse-Primern amplifiziert. Da LRIF1.1 für die Sequenzierung mit nur zwei Primern zu lang ist, wurden drei weitere spezifische Primer zur Sequenzierung hergestellt. Diese sind in Kapitel 3.1.4.2 aufgelistet.

Sowohl LRIF1.1 als auch LRIF1.2 konnten vollständig sequenziert werden und somit die Konstrukte für die weiteren Untersuchungen genutzt werden. Die Sequenzen von LRIF1.1 und RIF1.2 mit den Schnittstellen im pEGFP-N3-Vektor sind dem Anhang beigefügt.

#### 4.3 Spezifität des Anti-LRIF1-Antikörpers

Weiterhin wurde die Expression von RIF-1 auf Proteinebene untersucht. Dies wurde mittels Western-Blot-Analysen von Protein in Geweben und Zelllinien durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war kein kommerzieller LRIF1-Antikörper verfügbar, sodass dieser erstmals von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Firma PINEDA hergestellt wurde. Um beide Isoformen zu detektieren, wurde ein N-terminales Epitop für die Bindung des Antikörpers ausgewählt. Das Epitop des Antikörpers sollte an die Aminosäuren 616 bis 631 der kompletten LRIF1-Aminosäuresequenz, also des LRIF1.1, binden. Dies entspricht den Aminosäuren 80 bis 95 von LRIF1.2.

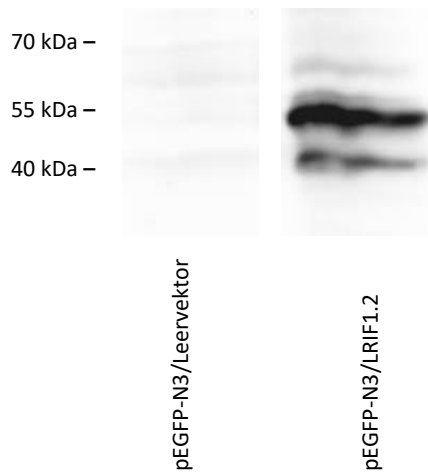
Zur Gewinnung des Antikörpers wurden zwei Kaninchen immunisiert und die produzierten Antikörper aus dem Kaninchenserum aufgereinigt. Der Antikörper wurde zunächst in Western-Blots von Zelllysaten nativer Zellen getestet. Da durch diese Analysen keine Banden detektiert werden konnten, wurde LRIF1 in CHO-Zellen überexprimiert. Hierzu wurden die von uns hergestellten pEGFP-N3-Expressionsvektoren mit den LRIF1-Inserts in CHO-Zellen transfiziert und überexprimiert. Die CHO-Zellen wurden geerntet und lysiert. In der anschließenden SDS-PAGE wurden die Zellproteine aufgetrennt und im Western-Blot mit dem Anti-LRIF1-Antikörper als primärem Antikörper inkubiert. Der sekundäre Schaf-Anti-Kaninchen-Antikörper (SxK) erkennt den synthetisierten primären Kaninchenantikörper und ermöglicht die Entwicklung am Phospho-Imager mittels Rotilumin. LRIF1.1 ist 85 kDa groß und gemeinsam mit pEGFP-N3 (26 kDa) konnte eine Bande bei ca. 110 kDa identifiziert werden (Abbildung 12).

LRIF1.2 (25 kDa) wurde mit pEGFP-N3 bei ca. 50 kDa detektiert (Abbildung 11).

Als Negativkontrolle dienten untransfizierte CHO-Zellen und die mit pEGFP-N3-Leer-Vektoren transfizierten Zellen. Die Spezifität des LRIF1-Antikörpers konnte somit nach Überexpression von LRIF1.1 und LRIF1.2 in CHO-Zellen nachgewiesen werden.

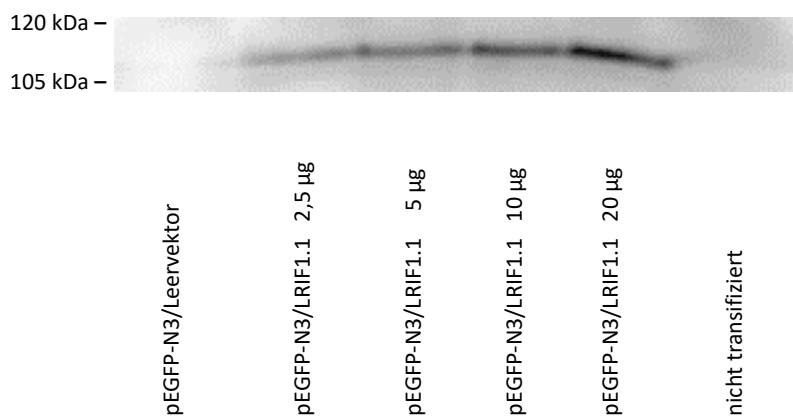


## Ergebnisse



**Abbildung 11: Western Blot von LRIF1.2** in pEGFP-N3-Expressionsvektor nach Transfektion und Überexpression in CHO-Zellen. Als Negativkontrollen diente der pEGFP-N3-Leervektor.

Des Weiteren konnte eine DNA-Konzentrationsabhängige Steigerung der Proteinexpression von LRIF1.1 gezeigt werden (Abbildung 12). In den vorausgegangenen Transfektionen wurden die CHO-Zellen mit pEGFP/LRIF1.1 mit einem DNA-Gehalt von 2,5 µg, 5 µg, 10 µg und 20 µg transfiziert.



**Abbildung 12: Western Blot von LRIF1.1** in pEGFP-N3-Expressionsvektor nach Transfektion und Überexpression in CHO-Zellen. Die DNA-Konzentration von LRIF1.1/pEGFP-N3 ist im Transfektionsansatz von links nach rechts ansteigend. Als Negativkontrollen dienten pEGFP-N3-Leervektor und nicht transfizierte Zellen.

### 4.4 Expressionsanalyse von LRIF1 in Säugerzellen

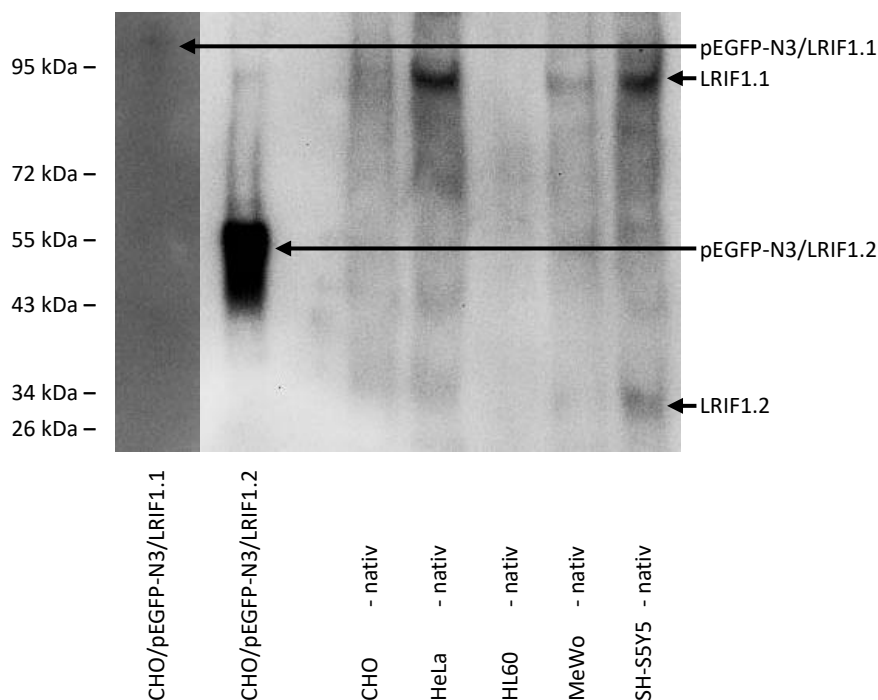
Um die Expression von LRIF1 in nativen Zelllinien zu untersuchen, wurden diese kultiviert, geerntet und lysiert. Mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurden die enthaltenen Proteine aufgetrennt und mit Anti-LRIF1-Antikörper inkubiert.

In der Annahme, dass das LRIF1-Protein gering exprimiert wird, wurden diese Untersuchungen mit verschiedenen Gewebemengen und Antikörper-Konzentrationen durchgeführt.

Zunächst wurden native CHO-Zellen auf ihre LRIF1-Proteinexpression untersucht. CHO-Zellen sind Zellen vom Ovar des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*), die hier auch zur Transfektion und Überexpression kultiviert wurden. Der Hamster steht dem Menschen als Säugetier genetisch nahe und als relativ anspruchsarme Zellen eignen sich CHO-Zellen gut zur Kultivierung in der Zellkultur. Wie in den Abbildungen 11 und 12 gezeigt, konnte eine Expression von LRIF1.1 und LRIF1.2 in CHO-Zellen gezeigt werden.

Im Anschluss wurde die Expression in den humanen Tumorzelllinien HeLa-Zellen, HL60-Zellen, MeWo-Zellen und SH-SY5Y-Zellen untersucht. HeLa-Zellen sind humane Epithelien aus einem Zervixkarzinom. HL60-Zellen wurden aus einer Patientin mit akuter promyeloischer Leukämie extrahiert. MeWo-Zellen stammen vom humanen Melanom ab. Sie produzieren Melanin und fördern das Wachstum von Varizella-Zoster-Viren. SH-SY5Y-Zellen sind humane Neuroblastomzellen.

In der Abbildung 13 ist ein Western Blot der Tumorzelllinien mit CHO-Zellen dargestellt. Als Positivkontrollen dienten mit pEGFP-N3/LRIF1.1 und pEGFP-N3/LRIF1.2 transfizierte CHO-Zellen.



**Abbildung 13: Western Blot von eukaryoten Tumorzelllinien** transfizierte CHO-Zellen mit LRIF1.1/pEGFP-N3 und LRIF1.2/pEGFP-N3 und native Zelllinien: CHO, HeLa, HL60, MeWo, SH-SY5Y

Die Positivkontrollen sind deutlich zu erkennen. Durch Kopplung an das eGFP (ca. 26 kDa) erscheint die Bande des LRIF1.1 (ca. 85 kDa) bei ungefähr 110 kDa und die Bande des LRIF1.2 (ca. 25 kDa) bei rund 50 kDa. Die LRIF1.2-Bande ist deutlich stärker als die LRIF1.1-Kontrolle. Durch

die sehr wahrscheinlich geringe Expression von beiden LRIF1-Isoformen sind die Banden in den Lysaten der nativen Zelllinien nur schwach sichtbar. Dennoch lässt sich LRIF1.1 in CHO-, HeLa-, MeWo- und SH-SY5Y-Zellen bei ca. 85 kDa identifizieren. Auch in diesen Zelllinien sind die ebenfalls schwachen LRIF1.2-Banden bei 25 kDa detektierbar.

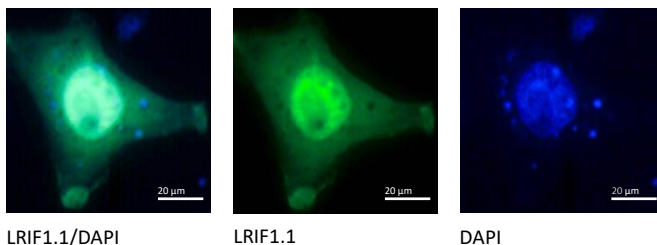
#### 4.5 Lokalisationsuntersuchungen von LRIF1 in CHO-Zellen

Die subzelluläre Lokalisation von LRIF1 beeinflusst eine mögliche Interaktion mit anderen Proteinen entscheidend. Der potentielle Interaktionspartner GNE (Weidemann et al., 2006) ist hauptsächlich in der Zellmatrix zu finden, wurde aber von Krause et al. 2005 auch im Golgi-Apparat und im Zellkern nachgewiesen.

Um die Lokalisation von LRIF1 *in vivo* zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit den von uns hergestellten LRIF1/pEGFP-N3-Vektoren transfiziert. Sowohl LRIF1.1 als auch LRIF1.2 wurden somit N-terminal an eGFP gekoppelt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten die Kopplungsproteine bei einer Wellenlänge von 395 nm angeregt werden. Zur Lokalisation der Zellkerne und als Kontrolle wurden die Zellen zum Teil mit 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid (DAPI) angefärbt. DAPI interkaliert mit der DNA und kann somit zur Darstellung von Zellkernen genutzt werden. Es lagert sich bevorzugt in AT-reichen Regionen der DNA im Nukleus an.

##### 4.5.1 LRIF1.1 in CHO-Zellen

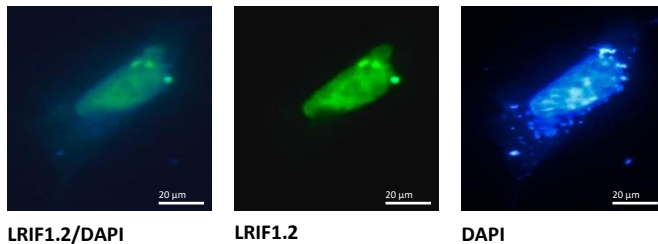
Zunächst wurde nach dem Kopplungsprotein LRIF1.1/pEGFP-N3 in CHO-Zellen gesucht. Unter dem Fluoreszenzmikroskop entspricht die grüne Fluoreszenz der Anwesenheit von LRIF1.1. LRIF1.1 wurde, wie in Abbildung 14 sichtbar, in höherer Konzentration im Nukleus gefunden. Weiterhin ist eine geringere Fluoreszenz im Zytosol zu beobachten.



**Abbildung 14: Expression von LRIF1.1 in CHO-Zellen:** Fluoreszenzmikroskopie nach Transfektion mit LRIF1.1/pEGFP-N3; nach DAPI-Färbung

#### 4.5.2 LRIF1.2 in CHO-Zellen

Analog zu den dargestellten LRIF1.1-Darstellungen zeigt Abbildung 15 mit LRIF1.2/pEGFP-N3 transfizierte CHO-Zellen. Das Kopplungsprotein ist ebenfalls stark im Zellkern exprimiert. Durch die UV-Anregung zeigt sich eine deutliche grüne Fluoreszenz in diesem Bereich. In der DAPI-Färbung kann auch hier eine Übereinstimmung der Fluoreszenzen gezeigt werden. Es gelingt somit der Nachweis der Kernlokalisierung von LRIF1.2.



**Abbildung 15: Expression von LRIF1.2 in CHO-Zellen:** Fluoreszenzmikroskopie nach Transfektion mit LRIF1.1/pEGFP-N3; nach DAPI-Färbung

In der Zusammenschau der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war bei den LRIF1.2/pEGFP-N3-transfizierten Zellen eine deutlich höhere Transfektionsrate zu beobachten. Auch die Letalität der CHO-Zellen mit dem kürzeren Konstrukt war geringer. Im Vergleich zu den Transfektionen mit LRIF1.1 wurde mehr UV-Licht in sichtbares Licht im Zytosol umgewandelt.

#### 4.6 Kolokalisationsuntersuchungen von LRIF1 und GNE in CHO-Zellen

Nach der Untersuchung der Lokalisation von LRIF1 sollte die Frage geklärt werden, ob LRIF1 in dem von uns verwendeten Zellsystem mit GNE kolokalisiert ist.

Nachdem CHO-Zellen mit LRIF1/pEGFP-N3-Konstrukten einzeln transfiziert wurden, sollte eine parallele Transfektion mit GNE/pCherry-Vektoren eine Aussage zur Interaktion treffen. Diese Vektoren existierten in unserer Arbeitsgruppe bereits und wurden bereitgestellt von Frau Dr. Wenke Weidemann. pCherry beinhaltet das mCherry-Protein, welches bei Anregung durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 610 nm sichtbares, rotes Licht emittiert. Wird das eGFP mittels UV-Licht angeregt, so emittiert es Licht mit der Wellenlänge von 509 nm und wird somit grün sichtbar.

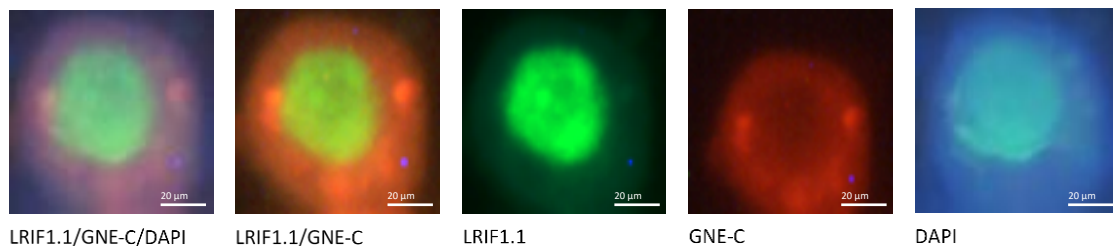
Um Auswirkungen der Expressionsvektoren auf eine mögliche Interaktion auszuschließen oder zumindest zu minimieren, wurde GNE C-terminal (GNE-C) und N-terminal (GNE-N) vom Cherry-

Protein kloniert. Findet die Interaktion von LRIF1 mit GNE C- oder N-terminal der GNE-Aminosäuresequenz statt, kann somit eine Beeinflussung durch den pCherry-Vektor ausgeschlossen werden.

Beide Konstrukte wurden in verschiedenen Ansätzen parallel mit LRIF1 in CHO-Zellen transfiziert.

#### 4.6.1 LRIF1.1 und GNE

In Zellen, in denen sowohl LRIF1.1, als auch GNE überexprimiert wurde, haben wir die LRIF1.1 im Zellkern und GNE im Zytoplasma beobachtet. Eine Veränderung der Lokalisation eines oder beider Proteine fand nicht statt. Auch eine Beeinflussung des Expressionsvektor auf die zelluläre Verteilung wurde nicht gesehen. Wie in den folgenden Abbildungen dargestellt, zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Transfektionen von GNE-C (Abbildung 16) und GNE-N (Abbildung 17) keine Unterschiede. Weder eine Veränderung der Expression im Sinne einer unterschiedlichen Intensität, noch eine veränderte intrazelluläre Verteilung waren auszumachen.



LRIF1.1/GNE-C/DAPI

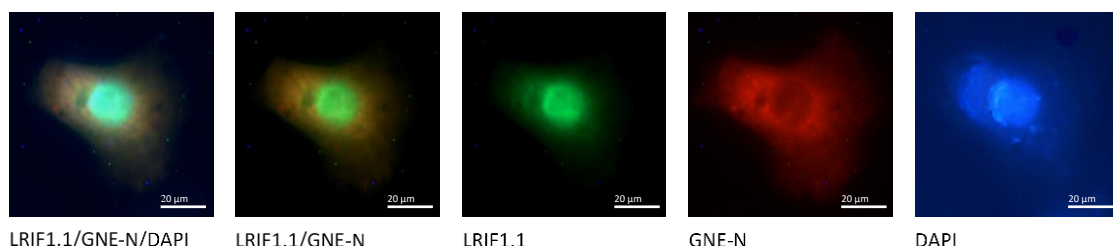
LRIF1.1/GNE-C

LRIF1.1

GNE-C

DAPI

**Abbildung 16: Kolokalisation von LRIF1.1 und GNE-C:** Fluoreszenzmikroskopie nach Koftransfektion von LRIF1.1 und GNE-C in CHO-Zellen; GNE ist C-terminal an pCherry gekoppelt; nach DAPI-Färbung



LRIF1.1/GNE-N/DAPI

LRIF1.1/GNE-N

LRIF1.1

GNE-N

DAPI

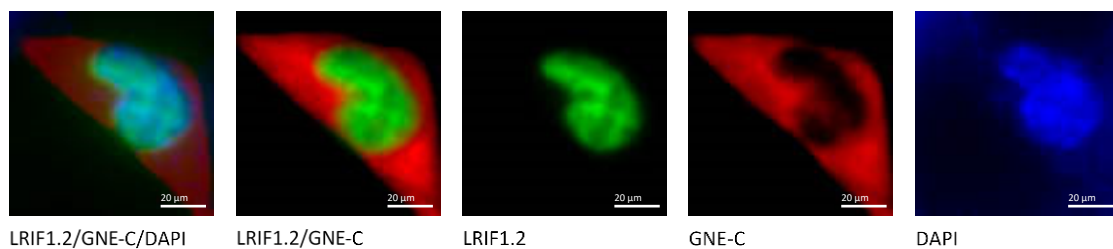
**Abbildung 17: Kolokalisation von LRIF1.1 und GNE-N:** Fluoreszenzmikroskopie nach Koftransfektion von LRIF1.1 und GNE-N in CHO-Zellen; GNE ist N-terminal an pCherry gekoppelt; nach DAPI-Färbung

#### 4.6.2 LRIF1.2 und GNE

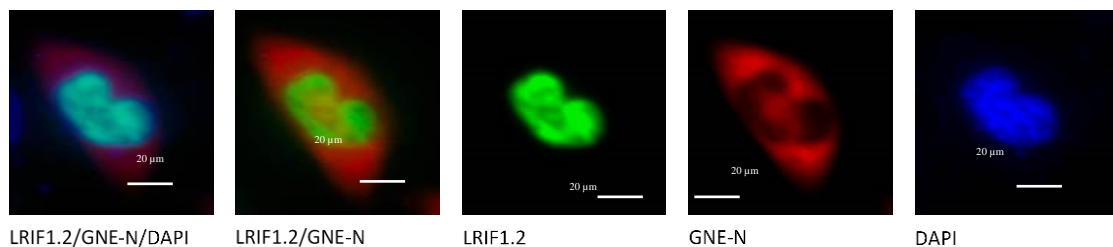
Parallel zu den Kolokalisationsuntersuchungen von LRIF1.1 und GNE wurden auch LRIF1.2 und GNE untersucht. Um die Vergleichbarkeit von LRIF1.1 und LRIF1.2 zu gewährleisten wurden die Zellen identisch behandelt, mit gleichen Mengen Vektoren transfiziert, in gleicher Weise fixiert und fluoreszenzmikroskopiert. LRIF1.2 wurde ausschließlich nukleär und GNE vor allem in Zytoplasma identifiziert. Äquivalent zu den Untersuchungen mit LRIF1.1 und GNE zeigte sich auch hier eine geringe Fluoreszenz der GNE im Zellkern. Ein Einfluss des Transvektionsvektors pCherry wurde durch die vergleichenden Transfektionen von GNE-C und GNE-N ausgeschlossen. Wie bereits beschrieben wurden beide DNA-Sequenzen in pCherry kloniert und anschließend in CHO-Zellen transfiziert. In den Abbildungen 18 und 19 veranschaulichen, dass beide Konstrukte eine identische Verteilung in CHO-Zellen zeigen. Auch bewirkt keines der GNE-Konstrukte eine Veränderung der Lokalisation von LRIF1.2.

Die Fluoreszenz von LRIF1.2 war nach beiden Kotransfektionen vergleichbar und auch GNE-C und GNE-N zeigten keine Unterschiede im Verhalten unter dem Mikroskop.

Wie auch in den Einzeltransfektionen von LRIF1.1. und LRIF1.2 zeigte sich eine deutlich stärkere Fluoreszenz LRIF1.2 in den CHO-Zellen.



**Abbildung 18: Kolokalisation von LRIF1.2 und GNE-C:** Fluoreszenzmikroskopie nach Kotransfektion von LRIF1.2 und GNE-C in CHO-Zellen; GNE ist C-terminal an pCherry gekoppelt; nach DAPI-Färbung

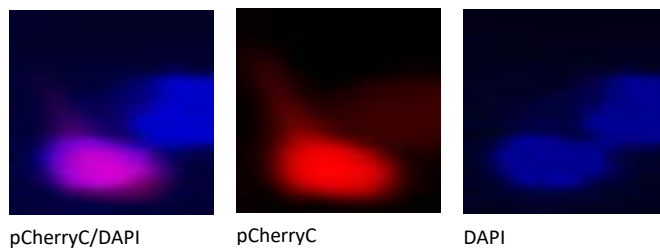


**Abbildung 19: Kolokalisation von LRIF1.2 und GNE-N:** Fluoreszenzmikroskopie nach Kotransfektion von LRIF1.2 und GNE-N in CHO-Zellen; GNE ist N-terminal an pCherry gekoppelt; nach DAPI-Färbung

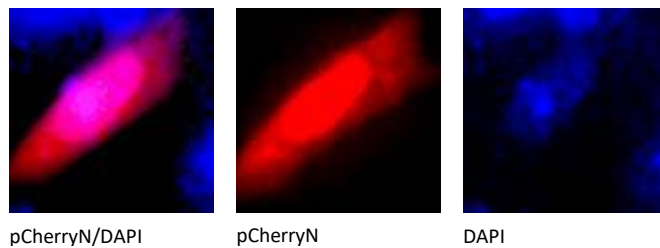
#### 4.7 Kontrolluntersuchungen

Um den Einfluss der Transfektionen auf die zelluläre Verteilung und das Verhalten unter dem Fluoreszenzmikroskop zu untersuchen wurden Kontrolltransfektionen durchgeführt.

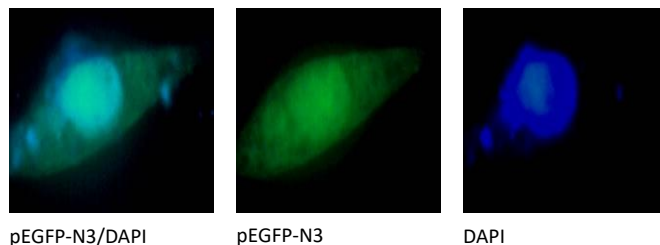
Die Vektoren pEGFP-N3, pCherryC und pCherryN wurden ohne Insert, also ohne GNE oder LRIF1, in die CHO-Zellen transfiziert. Diese Transfektionen wurden parallel zu den Kollisationsstudien der Insert-tragenden Vektoren durchgeführt. Somit wurde eine Verfälschung der Ergebnisse durch Ungleichbehandlung während Fixierung der Zellen und Mikroskopie ausgeschlossen. Wie in den Abbildungen 20 bis 22 dargestellt, zeigten die Vektoren eine ubiquitäre Verteilung in den CHO-Zellen. Es wurde eine gering erhöhte Expression im Zellkern beobachtet. Um den Zellkern zu lokalisieren wurden die Zellen mit DAPI behandelt.



**Abbildung 20:** Transfektion von Leervektor pCherryC in CHO-Zellen; nach DAPI-Färbung



**Abbildung 21:** Transfektion von Leervektor pCherryN in CHO-Zellen; nach DAPI-Färbung



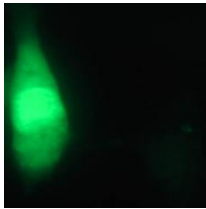
**Abbildung 22:** Transfektionen von Leervektor pEGFP-N3 in CHO-Zellen; nach DAPI-Färbung

Um den Einfluss der DAPI-Färbung auf die Einzeltransfektionen auszuschließen, wurden pEGFP-N3-transfizierte CHO-Zellen auch ohne DAPI fixiert und mikroskopiert. Hierbei zeigte sich weder

## Ergebnisse

eine veränderte Verteilung innerhalb der Zellen, noch eine offensichtliche Mehr- oder Minderfluoreszenz.

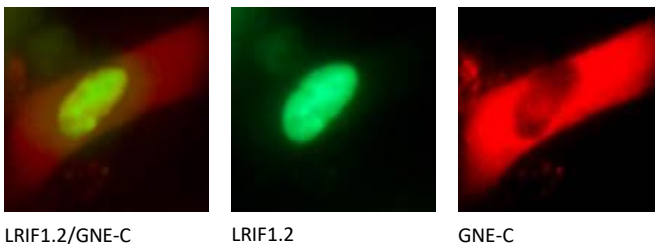
Da die DAPI-Färbung stets gleich auf die CHO-Zellen und deren Fixierung wirkt, wurde auf eine weitere Untersuchung von pCherry-transfizierten CHO-Zellen ohne DAPI verzichtet.



pEGFP-N3

**Abbildung 23: Transfektionen von Leervektor pEGFP-N3** in CHO-Zellen; ohne DAPI-Färbung

Auch die Kotransfektionen wurden auf einen möglichen Einfluss von DAPI untersucht. Diese sind in Abbildung 24 und Abbildung 25 gezeigt. Da sich LRIF1.1 und LRIF1.2 in den Kotransfektionen gleich verhielten, wurde lediglich LRIF1.2 dieser Kontrolle unterzogen. Auf eine Untersuchung mit LRIF1.1 wurde verzichtet.

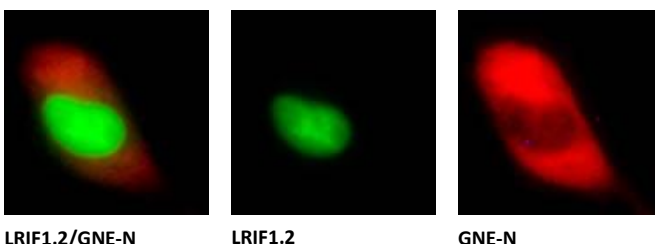


LRIF1.2/GNE-C

LRIF1.2

GNE-C

**Abbildung 24: Kolokalisation von LRIF1.2 und GNE-C; Kontrolle ohne DAPI-Färbung** nach Kotransfektion von LRIF1.2 und GNE-C in CHO-Zellen; GNE ist C-terminal an pCherry gekoppelt; in CHO-Zellen; ohne DAPI-Färbung



LRIF1.2/GNE-N

LRIF1.2

GNE-N

**Abbildung 25: Kolokalisation von LRIF1.2 und GNE-N; Kontrolle ohne DAPI-Färbung** nach Kotransfektion von LRIF1.2 und GNE-N in CHO-Zellen; GNE ist N-terminal an pCherry gekoppelt; in CHO-Zellen; ohne DAPI-Färbung

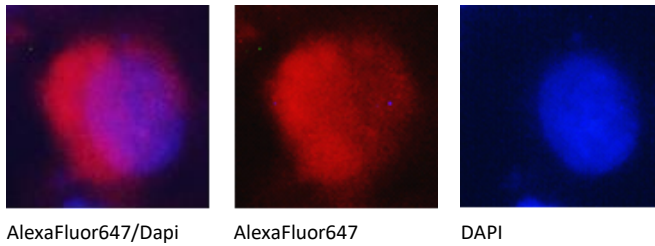
Um die nukleäre Anbindung von DAPI zu überprüfen wurden bei jeder Untersuchungsreihe untransfizierte CHO-Zellen unter Zusatz von DAPI fixiert und mikroskopiert. Hierbei zeigte sich eine zuverlässige Ankopplung an den Zellkern, wie Abbildung 26 beispielhaft zeigt. Zur Visualisierung



## Ergebnisse

des Zytoplasmas wurden die CHO-Zellen mit AlexaFluor647 inkubiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an F-Aktin, einen Bestandteil des Zytoskeletts. AlexaFluor647 emittiert rotes Licht bei Anregung durch Licht mit einer Wellenlänge von etwa 647 nm. Die fehlende Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 395 nm lässt auf eine für den Antikörper nicht detektierbare geringe Menge von LRIF1 schließen.

Der Einfluss von DAPI-Färbung auf LRIF1-transfizierte CHO-Zellen wurde bereits in den Kapiteln 4.5.1 und 4.5.2 ausgeschlossen.



**Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopie untransfizierter CHO-Zellen nach DAPI-Färbung**

## 5 Diskussion

### 5.1 Genexpressionsanalysen von LRIF1 in humanen Gewebe

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Betrag zur Charakterisierung des bisher wenig untersuchten Proteins LRIF1 geleistet werden.

Zu Beginn dieser Arbeit im Juni 2007 war lediglich die Sequenz von LRIF1 veröffentlicht (Gregory et al., 2006). Zudem fanden Weidemann et al. (2006) LRIF1 als potentiellen Interaktionspartner der GNE in einem Yeast Two Hybrid-Screening. Neben der bekannten zytosolischen Lokalisation der GNE (Van Rinsum et al., 1983) stellten Krause et al. 2005 Ergebnisse vor, die eine nukleäre Expression der GNE in Abhängigkeit des Zellzyklus zeigten. Diese beiden Veröffentlichungen bildeten die Arbeitsgrundlage der hier vorgelegten Dissertation. Die gezeigten Ergebnisse ließen die Annahme zu, dass eine Interaktion zwischen GNE und LRIF1 möglich ist. Eine Untersuchung dieser potentiellen Interaktion könnte einen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese der GNE-Myopathie leisten.

Eine aktuelle Pubmed-Datenbankrecherche nach dem LRIF1-codierenden Gen C1orf103 zeigt lediglich zwei Veröffentlichungen (Li et al., 2007; Nozawa et al., 2013).

Li et al. führten 2007, ebenso wie Weidemann et al., 2006, Yeast Two Hybrid-Screenings durch und fanden eine Interaktion von LRIF1 mit einer C-terminalen Domäne des RAR $\alpha$ -Rezeptors. In  $\beta$ -Galaktosidase-Assays und Glutathion-S-Transferasen(GST)-Co-Präzipitationsanalysen wurde gezeigt, dass LRIF1 neben RAR $\alpha$  an weitere nukleäre Rezeptoren, wie ER $\alpha$ , mROR $\alpha$ , GR $\alpha$ , TR $\alpha$  und PPAR $\alpha$  bindet. Mit dem RXR $\alpha$ -Rezeptor interagierte LRIF1 ebenfalls im Yeast Two Hybrid-System, in weiterführenden GST-Analysen konnte jedoch im Unterschied zum RAR $\alpha$ -Rezeptor keine Interaktion zwischen Protein und Rezeptor gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von LRIF1-DNA mittels PCR untersucht. Hierbei konnte LRIF1.1 aus humanem Hirn, Milz und Niere amplifiziert werden. LRIF1.2 wurde in Herz, Hirn, Kolon, Lunge, Milz, Niere, Ovar und Pankreas gefunden. In den durchgeführten Untersuchungen konnte LRIF1.1 somit trotz der Anwendung einer deutlich empfindlicheren Methode in weniger Geweben gefunden werden als von Li et al., 2007. Sie fanden eine Expression von LRIF1.1- und LRIF1.2-cDNA-Transkripten in Hirn, Herz, Skelettmuskel, Dickdarm, Dünndarm, Thymus, Niere, Milz, Leber, Plazenta, Lunge und in peripheren Leukozyten. Die Ursache für die differierenden Funde von LRIF1.1 kann eine wesentlich geringere oder fehlende Expression von LRIF1.1 in den gewählten Geweben sein oder aber an den Limitationen der gewählten Methode liegen.

Die Expression von LRIF1 in verschiedenen humanen Geweben wurde im Vorfeld nur mittels Northern Blotting untersucht und damit die Existenz von cDNA gezeigt (Li et al., 2007). Dennoch

ist davon auszugehen, dass LRIF1 ebenfalls mittels PCR amplifiziert wurde. Der Nachweis von cDNA zeigt neben dem Vorhandensein der Zielgene in Zellen und Geweben auch die Prozessierung der gesuchten Gene. Die Sensitivität des Northern Blots ist um mehrere Zehnerpotenzen niedriger als die Sensitivität PCR, die in dieser Arbeit genutzt wurde. Northern Blotting ist hoch spezifisch und liefert weniger falsch positive Ergebnisse (Green und Sambrook, 2012).

Der Nachweis von längeren DNA-Fragmenten mittels PCR, wie dem LRIF1.1 mit 2310 Basenpaaren, gilt als anfällig. Mit zunehmender Länge des Amplifikats erhöht sich die Gefahr des Strangabbruchs und der fehlerhaften Elongation. Dies könnte auch die reproduzierbar geringeren DNA-Konzentrationen von LRIF1.1 im Vergleich zu LRIF1.2 erklären. Um die Amplifikation zu präzisieren wurde deshalb *Pfx*-Polymerase genutzt. Die *Pfx*-Polymerase besitzt, ähnlich wie die *Pfu*-Polymerase, eine Korrekturlesefunktion und bricht die DNA-Kettenverlängerung beim fehlerhaften Einbau von Nukleinbasen ab. Somit entstehen weniger fehlerhafte Amplifikate (Costa und Weiner, 1994). Diese Korrekturlesefunktion verlangsamt die Syntheserate im Vergleich zur *Taq*-Polymerase, was beim Konfigurieren des PCR-Programms berücksichtigt wurde.

In den Untersuchungen zu dieser Arbeit sollten LRIF1.1 und LRIF1.2 nicht nur in verschiedenen Geweben nachgewiesen, sondern in der Folge auch sequenziert und für weitere Proteinexpressionsanalysen genutzt werden. Aus diesem Grunde wurden LRIF1.1 und LRIF1.2 stets komplett in der PCR amplifiziert. Eine Quantifizierung der Expression war nicht Ziel unserer Untersuchungen. Aus diesem Grunde wählten wir die Standard-PCR und nicht die aufwändigere Real-Time-PCR zur Amplifizierung.

Die von Li et al. gefundenen LRIF1.1 und LRIF1.2-cDNA-Transkripte entsprechen den in Datenbanken veröffentlichten, von uns durch Sequenzierung nachgewiesenen LRIF1.1- und LRIF1.2-DNA-Sequenzen. LRIF1.1-DNA besitzt eine Länge von 2310 Basenpaaren. Der Längenunterschied zur gezeigten 3,5 kb LRIF1.1-cDNA und der von uns gezeigten DNA ist erklärbar durch die Prozessierung von mRNA in Eukaryoten.

Li et al. konnten die mRNA von LRIF1.1 und LRIF1.2 in Hirn, Herz, Skelettmuskel, Dickdarm, Dünndarm, Thymus, Niere, Milz, Leber, Plazenta, Lunge und in peripheren Leukozyten nachweisen. Somit ist anzunehmen, dass LRIF1.1 im Gegensatz zu den hier gefundenen Ergebnissen in deutlich mehr Geweben exprimiert wird. LRIF1.1 war schwächer im Skelettmuskel und LRIF1.2 deutlich schwächer in Lunge und Kolon exprimiert als in anderen Geweben. Diese Unterschiede in der Expression konnten durch die hier präsentierten Untersuchungen nicht bestätigt werden. Im Anschluss an die Veröffentlichung von Li et al., 2007 wurden keine weiteren Daten oder Ergebnisse publiziert. Dies lässt vermuten, dass die Folgeuntersuchungen im Anschluss an den GST-Pull-Down ohne positive Ergebnisse blieben.

Nozawa et al. fanden 2013 bei Untersuchungen zur Organisation des Barr-Körperchens LRIF1, oder auch HBiX1, als Interaktionspartner von Heterochromatin Protein 1 (HP1). Sie schrieben HBiX1 eine entscheidende Rolle bei der Organisation des Barr-Körperchens zu. Durch Interaktionen im komplexen HBiX1-SMCHD1-H3K9me3-Reaktionsweg soll es zur Inaktivierung des X-Chromosoms beitragen.

LRIF1.1 wurde in der hier vorgelegten Arbeit in Hirn, Milz und Niere nachgewiesen. Ein Zusammenhang dieser Organe und der gefundenen Funktion bei der Barr-Körperchen-Inaktivierung lässt sich nach Ansicht des Autors nicht herstellen. Milz und Niere sind parenchymatöse Organe, die zwar benachbart im menschlichen Körper verortet werden, jedoch ohne funktionellen Zusammenhang sind. Die Niere dient vor allem der Produktion von Harn zur Entgiftung des Körpers, produziert aber auch Hormone, wie Erythropoetin zur Blutbildung und Renin zur Regulation des Blutdrucks. Die Milz ist ein lymphatisches Organ und dient unter anderem der Bildung von Lymphozyten und dem Abbau von alten Erythrozyten. Das Herz ist ein muskuläres Organ mit der lebenswichtigen Aufgabe den Körper mit Blut und damit mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. Darüber hinaus produziert es Peptidhormone bei pathologischer Vorhofdehnung und Herzinsuffizienz (Wambach, 1991).

Keines dieser Organe hat nach jetzigem Kenntnisstand eine Funktion bei der genetischen Regulation der Fortpflanzung. Somit ergibt sich weder im DNA-Nachweis eines einzelnen Organes, noch im Zusammenwirken dieser Organe ein Zusammenhang bei der Inaktivierung des Barr-Körperchens. Vielmehr ist anzunehmen, dass LRIF1.1, wie auch LRIF1.2, in deutlich mehr Organen und Geweben zu finden ist. LRIF1.1 könnte in anderen Organen in niedrigerer Konzentration vorhanden sein und deshalb nicht detektiert worden sein.

## 5.2 Expressionsanalyse von LRIF1 in Säugerzellen

Im Anschluss an die molekularbiologischen Untersuchungen zum Verhalten von LRIF1.1 und LRIF1.2 auf DNA-Ebene sollte nun die Expression von LRIF1-Proteinen in Zellkulturen untersucht werden. Die durchgeführten Western Blot-Analysen zeigten, dass sowohl LRIF1.1, als auch LRIF1.2 in CHO-Zellen exprimiert werden.

Wie bereits in Kapitel 4.2 dargestellt, wurde LRIF1-DNA in einen eGFP-Expressionsvektor ligiert und somit LRIF1.1 und LRIF1.2 an eGFP gekoppelt. Auf diese Weise konnten später beide Proteine gekoppelt exprimiert werden.

Die Kopplungsproteine eGFP/LRIF1.1 und eGFP/LRIF1.2 wurden in CHO-Zellen transfiziert und überexprimiert. CHO-Zellen sind inhumane, adhärenente Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster. Diese wurden verwendet, da sie als Säugerzellen human-kompatible Expressions- und

posttranslationale Modifikationsmechanismen besitzen. CHO-Zellen gelten als gut anpassungsfähig und waren in den vergangenen Jahrzehnten die meistgenutzte Zelllinie zur Herstellung von rekombinanten Antikörpern und synthetisierten Proteinen (Wurm, 2004). Sie werden heutzutage zur Herstellung von etwa 70% aller rekombinant hergestellten Pharmazeutika verwendet (Butler und Spearman, 2014).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der von unserer Arbeitsgruppe hergestellte LRIF1-Kaninchen-Antikörper eine hohe Sensitivität für beide LRIF1-Isoformen besitzt. Dies wurde bereits in Kapitel 4.3 ausführlich dargestellt.

Als weiteres Ergebnis der vorgelegten Arbeit konnte die DNA-konzentrationsabhängige Steigerung der Expressionsrate nachgewiesen werden. Es wurden 2,5 – 20 µg vom pEGFP-Vektor mit dem LRIF1.1-Insert in die CHO-Zellen transfiziert und LRIF1.1 auf diese Weise verschieden stark überexprimiert. In diesem gewählten Bereich war keine Hemmung der Expression von LRIF1.1, zum Beispiel durch einen Feedback-Mechanismus, sichtbar. Auch scheinen die Plasmide die zelleigenen Biosynthesemechanismen nicht zu beeinflussen. Die CHO-Zellen zeigten sich unter dem Mikroskop betrachtet unverändert vital und es war keine erhöhte Mortalität festzustellen. Ähnliche Untersuchungen wurden für LRIF1.2 nicht durchgeführt. Dies bliebe Gegenstand weiterer Untersuchungen.

### 5.3 Lokalisationsuntersuchungen von LRIF1 in CHO-Zellen

In den durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen konnten LRIF1.1 und LRIF1.2 ausschließlich im Zellkern nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Lokalisationsstudien von Li et al., 2007, die LRIF1 ebenfalls im Zellkern von CHO-Zellen fanden.

In dieser Arbeit wurden zur Untersuchung der Lokalisation von LRIF1 beide Gene der Isoformen an eGFP gekoppelt und das Kopplungsprotein in CHO-Zellen überexprimiert. LRIF1.1 und LRIF1.2 wurden N-terminal an das Fluoreszenzprotein gekoppelt, um eine Beeinflussung mit den C-terminal liegenden potentiellen Interaktionsstellen zu verhindern. Sowohl das genomische LRIF1.1, als auch das kürzere, N-terminale LRIF1.2 besitzen am C-terminalen Ende eine Heptat-Repeat-Region. Diese Regionen bilden  $\alpha$ -Helices, welche typisch für Protein-Protein-Interaktions-Domänen sind. Auch wenn die dreidimensionale Struktur von LRIF1 noch nicht aufgeklärt ist, ist eine Beeinflussung potentieller Interaktionen durch N-terminal gekoppeltes eGFP damit eher unwahrscheinlich.

Die Lokalisation von Proteinen lässt sich auch anhand Ihrer Aminosäuresequenzen vorhersagen. LRIF1 trägt eine bipartite Kernlokalisationssequenz in sich. Kernlokalisationssequenzen sind kurze Aminosäuresequenzen, die für eine nukleäre Ansammlung von Proteinen erforderlich sind

(Kalderon et al., 1984; Dingwall et al., 1988). Im Jahre 2009, also deutlich nach Beginn der Laborarbeiten zu dieser Arbeit, entwickelten Kosugi et. al. ein Computerprogramm, um die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle vorher zu sagen. Die Basis ihrer Überlegungen bildete der nukleärer Transport in und aus dem Zellkern. Dieser wird durch die Interaktion nukleärer Lokalisationssignale (NLS) mit dem Transportrezeptor Importin- $\alpha$  vermittelt. Anhand der Aktivität dieser Interaktion wurden 6 Hauptgruppen gebildet, welche die Lokalisation zuverlässig vorhersagen können. Entsprechend dieser cNLS wurde das entwickelte Computerprogramm cNLS- Mapper genannt. Diese Hauptgruppen werden die klassischen NLS (cNLS) genannt und mit Aktivitätsscores von 1 bis 10 versehen. Die Werte 1 bis 2 entsprechen einer eindeutig zytoplasmatischen Lokalisation und Werte von 8 bis 10 zeigen ein ausschließliches Vorkommen im Zellkern. Zahlenwerte zwischen 3 und 7 sind nicht eindeutig der zytoplasmatischen oder nukleären Fraktion zuzuordnen. Fügt man die Aminosäuresequenz von LRIF1 den cNLS-Mapper ein, so ergibt sich ein Wert von 9,6. Somit ist LRIF1 laut seines Aktivitätsscores ausschließlich im Zellkern zu erwarten. Der cNLS-Mapper war jedoch zu Beginn unserer Arbeit nicht veröffentlicht und kann somit nur im Nachhinein zum Unterstreichen der Untersuchungsergebnisse herangezogen werden.

Während der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen war bei den LRIF1.2/pEGFP-N3-transfizierten Zellen eine deutlich höhere Transfektionsrate im Vergleich zu den LRIF1.1/pEGFP-Zellen zu beobachten. Bei einer Pubmed-Datenbanksuche konnte kein Zusammenhang zwischen der Plasmidlänge und der Transfektionsrate gefunden werden.

Die unterschiedliche Länge der Inserts LRIF1.1 und LRIF1.2 scheint keinen Einfluss auf die Transfektion zu haben. Da aber in dem von uns verwendeten Protokoll mit identischen DNA-Mengen von LRIF1.1/pEGFP-N3 und LRIF1.2/pEGFP-N3 transfiziert wurde, könnte aufgrund des kürzeren Inserts eine etwas höhere Anzahl von Plasmiden transfiziert worden sein. Das dies zu einer sichtbar höheren Transfektionsrate führt, ist jedoch eher unwahrscheinlich. Unterschiedliche DNA-Mengen im Transfektionsansatz oder eine geringfügige Abweichung vom Protokoll könnten ebenso eine Rolle spielen.

#### 5.4 Kolokalisationsstudien von LRIF1 und GNE in CHO-Zellen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Interaktion von LRIF1 mit der GNE zu beschreiben. Voraussetzung für eine Interaktion beider Proteine ist die gemeinsame Lokalisation in Kern oder Zytosol. Zur Detektion einer möglichen Kolokalisation wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die konfokale Mikroskopie gilt hierfür als eine sehr zuverlässige Methode zur Identifizierung von *in vivo* Kolokalisationen (Miyashita, 2004).

Die Kolokalisation von LRIF1 und GNE setzt eine Migration von LRIF1 durch die nukleäre Membran in das Zytosol oder von GNE in den Zellkern voraus. Die Beeinflussung von LRIF1 auf einen nukleären Rezeptor, wie von Li et al., 2007 beschrieben, könnte eine solche Rekrutierung bewirken.

Wie bereits in Kapitel 5.3 beschrieben, ergab der Abgleich der Aminosäuresequenz von LRIF1 im cNLS-Mapper einen Aktivitätsscore von 9,6 (Kosugo et al., 2009). Das Vorhandensein einer bipartiten Kernlokalisationssequenz weist somit auf ein rein nukleäres Protein hin. Dies widerspricht den vorherigen Überlegungen und unterstreicht die hier gezeigten Ergebnisse.

Nutzt man den cNLS-Mapper bei der Suche nach einer Kernlokalisationssequenz in der GNE, so erhält man einen Aktivitätsscore von 6. Somit könnte die GNE Anhand der Aminosäuresequenz neben seiner erwiesenen zytoplasmatischen Lokalisation potentiell auch im Zellkern zu finden sein kann. Dies schließt eine Interaktion im Zellkern nicht grundsätzlich aus.

Die GNE wurde zuerst in den löslichen Fraktionen von Leber, Schilddrüsen und intestinaler Mukosa von Ratten gefunden (van Rinsum et al., 1983). Nachdem man zunächst der Annahme war, die GNE sei ein rein zytoplasmatisches Protein, veröffentlichten Krause et al. 2005 Ergebnisse, die GNE auch im Kern und im Golgi-Apparat zeigten. Somit schließt die nukleäre Lokalisation von LRIF1.1 und LRIF1.2 eine Interaktion mit GNE nicht aus. Die im Yeast Two Hybrid-System gefundene Interaktion beider Proteine (Weidemann et al., 2006), lässt das tatsächliche Zusammenwirken in Säugetierorganismen möglich erscheinen.

Im Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit keine veränderte Verteilung eines oder beider Proteine in den LRIF1- und GNE-überexprimierten CHO-Zellen detektiert werden. LRIF1.1 und LRIF1.2 wurden ausschließlich im Nukleus und GNE nur im Cytosol gefunden. Wie zuvor in den Lokalisationsstudien gezeigt werden konnte, ist LRIF1 ein reines Kernprotein. Dies steht in Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Li et al., (2007), die LRIF1 ebenfalls ausschließlich im Zellkern fanden.

Um die Kernlokalisierung zu verdeutlichen, wurde die Kolokalisierung mit dem Kernfarbstoff DAPI gezeigt. DAPI war in den Untersuchungen stets mit LRIF1.1, beziehungsweise LRIF1.2 kolokalisiert und somit im Zellkern anzutreffen. Eine Kolokalisation zwischen DAPI und GNE wurde nicht beobachtet. GNE wurde stets ausschließlich im Zytosol gefunden.

Die Überexpression von Proteinen kann zu einer Umverteilung anderer Proteine innerhalb der Zelle führen (Miyashita, 2004). Hiervon muss in den durchgeführten Untersuchungen von LRIF1 und GNE nicht ausgegangen werden, da die hier gefundenen Lokalisationen die zuvor publizierten Ergebnisse (Li et al., 2007) widerspiegeln.

Somit kann nicht von einer Interaktion von LRIF1 und GNE in CHO-Zellen ausgegangen werden. Die GNE ist nicht in der Lage in den Kern zu migrieren. Außerdem scheint die Überexpression

von LRIF1 kein ausreichender Reiz für ein verändertes Verteilungsmuster der GNE zu sein. Auch emigrierten weder LRIF1.1 noch LRIF1.2 durch Überexpression von GNE in das Zytosol. Im Unterschied zu den LRIF1-Untersuchungen mit RAR $\alpha$ -Rezeptoren (Li et al., 2007) lässt sich somit nicht auf eine stattgefundenen Interaktion von LRIF1.1 oder LRIF1.2 und GNE in dem von uns verwendeten Modell der CHO Zelllinie schließen. Demzufolge konnte die von Weidemann et al. 2006 im Yeast Two Hybrid-Screening gefundene Interaktion nicht für Säugerzellen bestätigt werden. Im Allgemeinen weisen Yeast Two Hybrid-Screenings etwa 40-80% falsch negative und etwa 30% falsch positive Ergebnisse auf (Berggård et al., 2007). Hierzu ist wohl auch die gefundene LRIF1-GNE-Interaktion zu zählen. Dem gegenüber steht eine in Relation geringe Zahl an tatsächlichen, also *in vitro* stattgefundenen Interaktionen, die durch präzisere Untersuchungen im Anschluss an solche Screens bestätigt wurden.

Die von Krause et al. (2005) mikroskopisch gezeigte Lokalisation von GNE im Zellkern konnte in dem von uns verwendeten System nicht bestätigt werden. Es wurden auch keine weiteren Untersuchungen veröffentlicht, die die These der nukleären Lokalisation der GNE stützen. Es muss also davon ausgegangen werden, dass GNE ein zytoplasmatisches Enzym ist.

Einschränkend muss angefügt werden, dass für die Untersuchungen in dieser Arbeit CHO-Zellen verwendet wurden. Im Vergleich zu humanen Zelllinien gibt es bei CHO-Zellen andere posttranslationale Modifizierungen. Da CHO-Zellen keine  $\alpha$ 2,6 Sialyltransferase exprimieren, kommt es im Vergleich zu humanen Zellen zu einer veränderten Sialylierung. Für einige Proteine kann eine veränderte posttranslationale Modifizierung signifikante Effekte haben. Eine differente Glykosylierung kann Auswirkungen auf die funktionelle Aktivität oder die Halbwertszeit haben (Walsh und Jefferis, 2006). Somit könnte es trotz der negativen Ergebnisse der hier durchgeführten Kollokalisationsstudien doch zu einer Interaktion von LRIF1 und GNE beim Menschen kommen. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich. Eine Möglichkeit diesen Zweifel auszuräumen wären weitere Untersuchungen an humanen Zelllinien.

Abschließend lässt sich sagen, dass zu Beginn der Laborarbeiten im Jahre 2007 eine Interaktion von LRIF1 und GNE möglich schien. Grundlage dieser Hypothese waren die zu diesem Zeitpunkt vorgelegten Veröffentlichungen zu LRIF1 und GNE (Krause et al., 2005; Li et al., 2007; Weidemann et al., 2006). Die hier dargelegten Ergebnisse zeigten jedoch keine Kollokalisation von LRIF1 und GNE in CHO-Zellen. Auch eine Überexpression eines der beiden Proteine konnte die Lokalisation des anderen Proteins nicht beeinflussen. Die Isoformen LRIF1.1 und LRIF1.2 wurden nur im Zellkern gefunden und GNE war nur im Zytosol detektierbar. Auch wenn eine Kollokalisation kein Beweis für eine Interaktion gewesen wäre, so ist das gemeinsame Vorkommen in einem



## Diskussion

zellulären Kompartiment Grundvoraussetzung einer Protein-Protein-Interaktion. Das Fehlen einer Kolo­kalisierung wie hier gezeigt, lässt also nicht auf eine Interaktion von LRIF1 mit GNE schließen. Weitere Untersuchungen hierzu scheinen wenig erfolgsversprechend.

LRIF1 trägt also nicht zur Pathogenese der GNE-Myopathie bei.

## 6 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Dissertation sollte ein Beitrag zur Charakterisierung des bisher wenig untersuchten Proteins Ligand Receptor Interacting Factor 1 (LRIF1) geleistet werden.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde LRIF1 als potentieller Interaktionspartner der UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase/N-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) in Yeast Two Hybrid-Screenings gefunden. Die GNE ist das Schlüsselenzym der Sialinsäurebiosynthese und Mutationen im GNE-Gen führen zur GNE-Myopathie. Diese ist eine seltene, weltweit auftretende Erkrankung der quergestreiften Muskulatur.

In ersten Untersuchungen wurde die Expression von LRIF1 in verschiedenen humanen Geweben analysiert. Durch alternatives Spleißen kodiert das humane C1orf103-Gen für die Isoformen 1(LRIF1.1) und 2(LRIF1.2), wobei das kürzere LRIF1.2 am C-terminalen Ende entsteht. Mittels PCR konnte LRIF1.1 aus humanem Hirn, Niere sowie Milz und LRIF1.2 aus humanem Herz, Hirn, Kolon, Lunge, Milz, Niere, Ovar und Pankreas amplifiziert werden. Somit konnte die Genexpression beider LRIF1-Isoformen in allen hier untersuchten Geweben nachgewiesen werden.

Mittels eines von unserer Arbeitsgruppe hergestellten LRIF1-Antikörpers gelang es im nächsten Schritt, die Expression von LRIF1.1 und LRIF1.2 in den humanen Tumorzelllinien CHO, HeLa, HL60, MeWo und SH-SY5Y nachzuweisen. Somit waren auch die Proteine LRIF1.1 und LRIF1.2 in allen hier untersuchten Zelllinien exprimiert.

Die potentielle Interaktion von LRIF1 und GNE im humanen System wurde nun im Weiteren untersucht. Die Grundlage einer Interaktion beider Proteine ist die gemeinsame Lokalisation in einem zellulären Kompartiment. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden zunächst Lokalisationsstudien mit LRIF1 durchgeführt. Hierfür wurden beide Isoformen an Fluoreszenzproteine gekoppelt und in CHO-Zellen überexprimiert. LRIF1.1 und LRIF1.2 konnten ausschließlich im Zellkern von CHO-Zellen nachgewiesen werden.

Abschließend sollten Kolokalisationsstudien von LRIF1 und GNE den Einfluss der Überexpression des einen Proteins auf die Lokalisation des anderen Proteins klären. Hierbei zeigte sich keine Beeinflussung der Lokalisation oder eine Kolokalisation von LRIF1.1 beziehungsweise LRIF1.2 und GNE. Die GNE war ausschließlich im Nukleus detektierbar und LRIF1.1 sowie LRIF1.2 wurden nur im Cytosol gefunden.

Aufgrund der divergierenden Lokalisation beider Proteine kann somit nicht von einer Interaktion ausgegangen werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Angata T, Varki A (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* 102:439-469.
- Argov Z, Yarom R (1984) „Rimmed vacuole myopathy" sparing the quadriceps. A unique disorder in Iranian Jews. *J Neurol Sci* 64:33-43.
- Askanas V, Engel WK (1995) New advances in the understanding of sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 7:486-496.
- Askanas V, Engel WK, Yang CC, Alvarez RB, Lee VM, Wisniewski T (1998) Light and electron microscopic immunolocalization of presenilin 1 in abnormal muscle fibers of patients with sporadic inclusion-body myositis and autosomal-recessive inclusion-body myopathy. *Am J Pathol* 152:889-895.
- Berg JM (1989) DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57:1065-1068.
- Berggård T, Linse S, James P (2007) Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics* 16:2833-2842.
- Blewitt ME, Gendrel AV, Pang Z, Sparrow DB, Whitelaw N, Craig JM, Apedaile A, Hilton DJ, Dunwoodie SL, Brockdorff N, Kay GF, Whitelaw E (2008) SmcHD1, containing a structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain, has a critical role in X inactivation. *Nat Genet.* 40:663-669.
- Broccolini A, Gidaro T, Morosetti R, Mirabella M (2009) Hereditary inclusion-body myopathy: clues on pathogenesis and possible therapy. *Muscle Nerve* 40:340-349.
- Brusés JL, Rutishauser U (2001) Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie* 83:635-643.
- Campbell RE, Mosimann SC, Tanner ME, Strynadka NCJ (2000) The structure of UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase reveals homology to phosphoglycosyl transferases. *Biochemistry* 39:14993-15001.
- Cardini CE, Leloir LF (1957) Enzymatic formation of acetylgalactosamine. *J Biol Chem* 225:317-324.
- Chou SM (1967) Myxovirus-like structures in a case of human chronic polymyositis. *Science* 158:1453-1455.
- Colli W (1993) Trans-sialidase a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Faseb J* 7:1257-1264.
- Comb DG, Roseman S (1958) Enzymic synthesis of N-acetyl-D-mannosamine. *Biochim Biophys Acta* 29:653-654.
- Costa GL, Weiner MP (1994): Polishing with T4 or Pfu polymerase increases the efficiency of cloning of PCR fragments. *Nucleic acids research* 22:2423
- Dalakas MC, Sonies B, Dambrosia J, Sekul E, Cupler E, Sivakumar K (1997) Treatment of inclusion-body myositis with IVIg: a double-blind, placebo-controlled study *Neurology* 48:712-716.
- Dalakas MC (2001) The molecular and cellular pathology of inflammatory muscle diseases. *Curr Opin Pharmacol* 1:300-306.
- Datta A (1971) Studies on hog spleen N-acetylglucosamine kinase. II. Allosteric regulation of the activity of N-acetylglucosamine kinase. *Arch Biochem Biophys* 142:645-650.
- Dennis JW, Laferté S (1985) Recognition of asparagine-linked oligosaccharides on murine tumor cells by natural killer cells. *Cancer Res* 45:6034-6040.
- Dingwall C, Robbins J, Dilworth SM, Roberts B, Richardson WD (1988): The nucleoplasmic nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *J Cell Biol.* 107:841-849.
- Edelman GM, Crossin KL (1991) Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu Rev Biochem* 60:155-190.
- Effertz K, Hinderlich S, Reutter W (1999) Selective loss of either the epimerase or kinase activity of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase due to site-directed mutagenesis based on sequence alignments. *J Biol Chem* 274:28771-28778.
- Eisenberg I, Thiel C, Levi T, Tiram E, Argov Z, Sadeh M, Jackson CL, Thierfelder L, Mitrani-Rosenbaum S (1999) Fine-structure mapping of the hereditary inclusion body myopathy locus. *Genomics* 55:43-48.
- Eisenberg I, Avidan N, Potikha T, Hochner H, Chen M, Olender T, Barash M, Shemesh M, Sadeh M, Grabov-Nardini G, Shmilevich I, Friedmann A, Karpati G, Bradley WG, Baumbach L, Lancet D, Asher EB, Beckmann JS, Argov Z, Mitrani-

- Rosenbaum S (2001) The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* 29:83-87.
- Enns GM, Seppala R, Musci TJ, Weisiger K, Ferrell LD, Wenger DA, Gahl WA, Packman S (2001) Clinical course and biochemistry of sialuria. *J Inher Metab Dis* 24:328-336.
- Ferreira H, Seppala R, Pinto R, Huizing M, Martins E, Braga AC, Gomes L, Krasnewich DM, Sa Miranda MC, Gahl WA (1999) Sialuria in a Portuguese girl: clinical, biochemical, and molecular characteristics. *Mol Genet Metab* 67:131-137.
- Gagiannis D, Orthmann A, Danssmann I, Schwarzkopf M, Weidemann W, Horstkorte R (2007) Reduced sialylation status in UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE)-deficient mice. *Glycoconj J* 24:125-130.
- Galeano B, Klootwijk R, Manoli I, Sun M, Ciccone C, Darvish D, Starost MF, Zervas PM, Hoffmann VJ, Hoogstraten-Miller S, Krasnewich DM, Gahl WA, Huizing M (2007) Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine. *J Clin Invest* 117:1585-1594.
- Ghaderi D, Strauss HM, Reinke S, Cirak S, Reutter W, Lucka L, Hinderlich S (2007) Evidence for dynamic interplay of different oligomeric states of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase by biophysical methods. *J Mol Biol* 369:746-758.
- Ghosh S, Roseman S (1961) Enzymatic phosphorylation of N-acetyl-D-mannosamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 47:955-958.
- Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM (1987) Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629.
- Giordanengo V, Ollier L, Lanteri M, Lesimple J, March D, Thyss S, Lefebvre JC (2004) Epigenetic reprogramming of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) in HIV-1-infected CEM T cells. *FASEB J* 18:1961-1963.
- Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, Kaul R, Swarbreck D, Dunham A, Scott CE, Howe KL, Woodfine K, Spencer CC, Jones MC, Gillson C, Searle S, Zhou Y, Kokocinski F, McDonald L, Evans R, Phillips K, Atkinson A, Cooper R, Jones C, Hall RE, Andrews TD, Lloyd C, Ainscough R, Almeida JP, Ambrose KD, Anderson F, Andrew RW, Ashwell RI, Aubin K, Babbage AK, Bagguley CL, Bailey J, Beasley H, Bethel G, Bird CP, Bray-Allen S, Brown JY, Brown AJ, Buckley D, Burton J, Bye J, Carder C, Chapman JC, Clark SY, Clarke G, Clee C, Copley V, Collier RE, Corby N, Coville GJ, Davies J, Deadman R, Dunn M, Earthrowl M, Ellington AG, Errington H, Frankish A, Frankland J, French L, Garner P, Garnett J, Gay L, Ghorri MR, Gibson R, Gilby LM, Gillett W, Glithero RJ, Grafham DV, Griffiths C, Griffiths-Jones S, Grocock R, Hammond S, Harrison ES, Hart E, Haugen E, Heath PD, Holmes S, Holt K, Howden PJ, Hunt AR, Hunt SE, Hunter G, Isherwood J, James R, Johnson C, Johnson D, Joy A, Kay M, Kershaw JK, Kibukawa M, Kimberley AM, King A, Knights AJ, Lad H, Laird G, Lawlor S, Leongamornlert DA, Lloyd DM, Loveland J, Lovell J, Lush MJ, Lyne R, Martin S, Mashreghi-Mohammadi M, Matthews L, Matthews NS, McLaren S, Milne S, Mistry S, Moore MJ, Nickerson T, O'Dell CN, Oliver K, Palmeiri A, Palmer SA, Parker A, Patel D, Pearce AV, Peck AI, Pelan S, Phelps K, Phillimore BJ, Plumb R, Rajan J, Raymond C, Rouse G, Saenphimmachak C, Sehra HK, Sheridan E, Shownkeen R, Sims S, Skuce CD, Smith M, Steward C, Subramanian S, Sycamore N, Tracey A, Tromans A, Van Helmond Z, Wall M, Wallis JM, White S, Whitehead SL, Wilkinson JE, Willey DL, Williams H, Wilming L, Wray PW, Wu Z, Coulson A, Vaudin M, Sulston JE, Durbin R, Hubbard T, Wooster R, Dunham I, Carter NP, McVean G, Ross MT, Harrow J, Olson MV, Beck S, Rogers J, Bentley DR, Banerjee R, Bryant SP, Burford DC, Burrill WD, Clegg SM, Dhami P, Dovey O, Faulkner LM, Gribble SM, Langford CF, Pandian RD, Porter KM, Prigmore E (2006) The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature* 441:315-321.
- Green MR und Sambrook J: *Molecular Cloning A Laboratory Manual*.: 4.Auflage Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2012, Seite fehlt.
- Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, Engel A, Karpati G, Mendell JR, Rowland LP (1995) Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* 38:705-713.
- Harduin-Lepers A, Recchi MA, Delannoy P (1995) 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology* 5:741-758.
- Hinderlich S, Stasche R, Zeitler R, Reutter W (1997) A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 272:24313-24318.
- Hoffman S, Edelman GM (1983) Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:5762-5766.
- Horstkorte R, Nöhling S, Danker K, Effertz K, Reutter W, Lucka L (2000) Protein kinase C phosphorylates and regulates UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *FEBS Lett* 470:315-318.
- Huizing M, Carrillo-Carrasco N, Malicdan MC, Noguchi S, Gahl WA, Mitrani-Rosenbaum S, Argov Z, Nishino I (2014) GNE myopathy: new name and new mutation nomenclature. *Neuromuscul Disord*. 24:387-389.

Huizing M, Krasnewich DM (2009) Hereditary inclusion body myopathy: a decade of progress. *Biochim Biophys Acta* 1792:881-887.

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LLRIF1>,19.06.2021.

[http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?hgnc\\_id=HGNC:30299](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=HGNC:30299),19.06.2021.

Hynes RO, Lander AD (1992) Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68:303-322.

Ishihara S, Tomimitsu H, Fujigasaki H, Saito F, Mizusawa H (2008) UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase in nuclei and rimmed vacuoles of muscle fibers in DMRV (distal myopathy with rimmed vacuoles). *J Med Dent Sci* 55:181-187.

Jayapal KP, Wlaschin KF, Yap MGS, Hu WS (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.* 7:40-47.

Karlsson KA (1995) Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* 5:622-635.

Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984): A short amino acid sequence able to specify nuclear location, *Cell* 39:499-509.

Kean EL (1969) Sialic acid activating enzyme in ocular tissue. *Exp Eye Res* 8:44-54.

Kepler OT, Stehling P, Herrmann M, Kayser H, Grunow D, Reutter W, Pawlita M (1995) Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses. *J Biol Chem* 270:1308-1314.

Kluge A, Reuter G, Lee H, Ruch-Heeger B, Schauer, R (1992) Interaction of rat peritoneal macrophages with homologous sialidase-treated thrombocytes in vitro: biochemical and morphological studies. Detection of N-(O-acetyl)glycolylneuraminic acid. *Eur J Cell Biol* 59:12-20.

Kornfeld S, Kornfeld R, Neufeld EF, O'Brien PJ (1964) The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 52:371-379.

Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H (2009) Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10171-10176

Krause S, Hinderlich S, Amsili S, Horstkorte R, Wiendl H, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S, Lochmuller H (2005) Localization of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase (GNE) in the golgi complex and the nucleus of mammalian cells. *Exp Cell Res* 304:365-379.

Krause S, Aleo A, Hinderlich S, Merlini L, Tournev I, Walter MC, Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S, Lochmüller H (2007) GNE protein expression and subcellular distribution are unaltered in HIBM. *Neurology* 69:655-659.

Lasky LA (1995) Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem* 64:113-139.

Li H, Chen Q, Liu F, Zhang X, Liu T, Li W, Liu S, Zhao Y, Wen B, Dai T, Lin P, Gong Y, Yan C (2011) Clinical and molecular genetic analysis in Chinese patients with distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Hum Genet* 56:335-358.

Li HJ, Haque ZK, Chen A, Mendelsohn M (2007) RIF-1, a novel nuclear receptor corepressor that associates with the nuclear matrix. *J Cell Biochem* 102:1021-1035.

Lotz BP, Engel AG, Nishino H, Stevens JC, Litchy WJ (1989) Inclusion body myositis. Observations in 40 patients. *Brain* 112:727-747.

Lu X, Pu C, Huang X, Liu J, Mao Y (2011) Distal myopathy with rimmed vacuoles: clinical and muscle morphological characteristics and spectrum of GNE gene mutations in 53 Chinese patients. *Neurol Res* 33:1025-1031.

Magnani JL, Nilsson B, Brockhaus M, Zopf D, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V (1982) A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. *J Biol Chem* 257:14365-14369.

Malicdan MC, Noguchi S, Nishino I (2007) Autophagy in a mouse model of distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Autophagy* 3:396-398.

Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nishino I (2008) Muscle weakness correlates with muscle atrophy and precedes the development of inclusion body or rimmed vacuoles in the mouse model of DMRV/hIBM. *Physiol Genomics* Sep 35:106-115.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.

- Mitrani-Rosenbaum S, Argov Z, Blumenfeld A, Seidman CE, Seidman JG (1996) Hereditary inclusion body myopathy maps to chromosome 9p1-q1. *Hum Mol Genet* 5:159-163.
- Miyashita T (2004) Confocal microscopy for intracellular co-localization of proteins. *Methods Mol Biol*. 261:399-410.
- Münster AK, Eckhardt M, Potvin B, Mühlhoff M, Stanley P, Gerardy-Schahn R (1998) Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9140-9145.
- Nemunaitis G, Maples PB, Jay C, Gahl WA, Huizing M, Poling J, Tong AW, Phadke AP, Pappen BO, Bedell C, Templeton NS, Kuhn J, Senzer N, Nemunaitis J (2010) Hereditary inclusion body myopathy: single patient response to GNE gene Lipoplex therapy. *J Gene Med* 12:403-412.
- Nishino I, Noguchi S, Murayama K, Driss A, Sugie K, Oya Y, Nagata T, Chida K, Takahashi T, Takusa Y, Ohi T, Nishimiya J, Sunohara N, Ciafaloni E, Kawai M, Aoki M, Nonaka I (2002) Distal myopathy with rimmed vacuoles is allelic to hereditary inclusion body myopathy. *Neurology* 59:1689-1693
- Noguchi S, Keira Y, Murayama K, Ogawa M, Fujita M, Kawahara G, Oya Y, Imazawa M, Goto Y, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I (2004) Reduction of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase activity and sialylation in distal myopathy with rimmed vacuoles. *J Biol Chem* 279:11402-11407.
- Nozawa RS, Nagao K, Igami KT, Shibata S, Shirai N, Nozaki N, Sado T, Kimura H, Obuse C (2013) Human inactive X chromosome is compacted through a PRC2-independent SMCHD1-HBIX1 pathway. *Nat Struct Mol Biol* 20:566-573.
- Oetke C, Hinderlich S, Reutter W, Pawlita M (2003) Epigenetically mediated loss of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase expression in hyposialylated cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 308:892-898.
- Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, Leung WY, Haugland RP (1999) Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J Histochem Cytochem* 47:1179-1188.
- Pastuszak I, Drake R, Elbein AD (1996) Kidney N-acetylgalactosamine (GalNAc)-1-phosphate kinase, a new pathway of GalNAc activation. *J Biol Chem* 271:20776-20782.
- Penner J, Mantey LR, Elgavish S, Ghaderi D, Cirak S, Berger M, Krause S, Lucka L, Voit T, Mitrani-Rosenbaum S, Hinderlich S (2006) Influence of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase mutant proteins on hereditary inclusion body myopathy. *Biochemistry* 45:2968-2977.
- Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330:444-450.
- Reinke SO, Hinderlich S (2007) Prediction of three different isoforms of the human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *FEBS Lett* 581:3327-3331.
- Reinke SO, Lehmer G, Hinderlich S, Reutter W (2009) Regulation and pathophysiological implications of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase (GNE) as the key enzyme of sialic acid biosynthesis. *Biol Chem* 390:591-599.
- Rothbard JB, Brackenbury R, Cunningham BA, Edelman GM (1982) Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J Biol Chem* 257:11064-11069.
- Saechao C, Valles-Ayoub Y, Esfandiari S, Haghighatgoo A, No D, Shook S, Mendell JR, Rosales-Quintero X, Felice KJ, Morel CF, Pietruska M, Darvish D (2010) Novel GNE mutations in hereditary inclusion body myopathy patients of non-Middle Eastern descent. *Genet Test Mol Biomarkers* 14:157-162.
- Schauer R (1982) Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 40:131-234.
- Schauer R (1985) Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem Sci* 10:357-360.
- Schauer R (2000) Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconj J* 17:485-499.
- Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V (1991) A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 65:1117-1125.
- Schlepper-Schäfer J, Kolb-Bachofen V, Kolb H (1980) Analysis of lectin-dependent recognition of desialylated erythrocytes by Kupffer cells. *Biochem J* 186:827-831.
- Schwarzkopf M, Knobloch KP, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, Lucka L, Horak I, Reutter W, Horstkorte R (2002) Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5267-5270.
- Seppala R, Tietze F, Krasnewich D, Weiss P, Ashwell G, Barsh G, Thomas GH, Packman S, Gahl WA (1991) Sialic acid metabolism in sialuria fibroblasts. *J Biol Chem* 266:7456-7461.

- Seppala R, Lehto VP, Gahl WA (1999) Mutations in the human UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase gene define the disease sialuria and the allosteric site of the enzyme. *Am J Hum Genet* 64:1563-1569.
- Sparks SE, Ciccone C, Lalor M, Orvisky E, Klootwijk R, Savelkoul PJ, Dalakas MC, Krasnewich DM, Gahl WA, Huizing M (1999) Use of a cell-free system to determine UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase and N-acetylmannosamine kinase activities in human hereditary inclusion body myopathy. *Glycobiology* 15:1102-1110.
- Sparks SE, Rakocevic G, Joe G, Manoli I, Shrader J, Harris-Love M, Sonies B, Ciccone C, Dorward H, Krasnewich DM, Huizing M, Dalakas MC, Gahl WA (2007) Intravenous immune globulin in hereditary inclusion body myopathy: a pilot study. *BMC Neurol* 7:3.
- Stäsche R, Hinderlich S, Weise C, Effertz K, Lucka L, Moormann P, Reutter W (1997) A bifunctional enzyme catalyzes the first two steps in N-acetylneuraminic acid biosynthesis of rat liver. Molecular cloning and functional expression of UDP-N-acetyl-glucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase. *J Biol Chem* 272:24319-24324.
- Stober A, Aleo A, Kuhl V, Bornemann A, Walter MC, Lochmüller H, Lindner A, Krause S (2010) Novel missense mutation p.A310P in the GNE gene in autosomal-recessive hereditary inclusion-body myopathy/distal myopathy with rimmed vacuoles in an Italian family. *Neuromuscul Disord* 20:335-336.
- Takada A, Ohmori K, Takahashi N, Tsuyuoka K, Yago A, Zenita K, Hasegawa A, Kannagi R (1991) Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A. *Biochem Biophys Res Commun* 179:713-719.
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J* 9:866-873.
- Thomas GH, Reynolds LW, Miller CS (1985) Overproduction of N-acetylneuraminic acid (sialic acid) by sialuria fibroblasts. *Pediatr Res* 19:451-455.
- Tomimitsu, H, Shimizu J, Ishikawa K., Ohkoshi N, Kanazawa I, Mizusawa H (2004) Distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV): new GNE mutations and splice variant. *Neurology* 62:1607-1610.
- Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U, Nussenzweig V (1995) The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology* 110:547-554.
- Tong Y, Tempel W, Nedyalkova L, Mackenzie F, Park HW (2009) Crystal structure of the N-acetylmannosamine kinase domain of GNE. *PLoS ONE* 4:e7165.
- Van Rinsum J, Van Dijk W, Hooghwinkel GJ, Ferwerda W (1983) Subcellular localization and tissue distribution of sialic acid precursor-forming enzymes. *Biochem J* 210:21-28.
- Varki A (1992) Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2:25-40.
- Wambach G (1991) Cardiac peptides and their importance in heart failure. *Z Kardiol* 80:41-46
- Wang Z, Sun Z, Li AV, Y KJ (2006) Roles for UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc 6-Kinase outside of Sialic Acid Biosynthesis: Modulation of sialyltransferase and BiP expression, GM3 and GD3 biosynthesis, proliferation, and apoptosis, and ERK1/2 phosphorylation. *J Biol Chem* 281:27016-27028.
- Watts GDJ, Thorne M, Kovach MJ, Pestronk A, Kimonis V (2003) Clinical and genetic heterogeneity in chromosome 9p associated hereditary inclusion body myopathy: exclusion of GNE and three other candidate genes. *Neuromuscul Disord* 13:559-567.
- Wei J, Cui L, Liu F, Fan Y, Lang R, Gu F, Guo X, Tang P, Fu L (2010) E-selectin and Sialyl Lewis X expression is associated with lymph node metastasis of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Int J Surg Pathol* 18:193-200.
- Weidemann W, Klukas C, Klein A, Simm A, Schreiber F, Horstkorte R (2010) Lessons from GNE-deficient embryonic stem cells: sialic acid biosynthesis is involved in proliferation and gene expression. *Glycobiology* 20:107-117.
- Weidemann W, Stelzl U, Lisewski U, Bork K, Wanker EE, Hinderlich S, Horstkorte R (2006) The collapsin response mediator protein 1 (CRMP-1) and the promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) bind to UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE), the key enzyme of sialic acid biosynthesis. *FEBS Lett* 580:6649-6654.
- Weihl CC, Miller SE, Zaidman CM, Pestronk A, Baloh RH, Al-Lozi M (2011) Novel GNE mutations in two phenotypically distinct HIBM2 patients. *Neuromuscul Disord* 21:102-105.
- Weiss P, Tietze F, Gahl WA, Seppala R, Ashwell G (1989) Identification of the metabolic defect in sialuria. *J Biol Chem* 264:17635-17636.
- Wurm FM (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22:1393-1398.

## Literaturverzeichnis

Yardeni T, Jacobs K, Niethamer TK, Ciccone C, Anikster Y, Kurochkina N, Gahl WA, Huizing M (2013) Murine isoforms of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc kinase: Secondary structures, expression profiles, and response to ManNAc therapy. *Glycoconj J* 30:609-618.

Yunis EJ, Samaha FJ (1971) Inclusion body myositis. *Lab Invest* 25:240-248.

Zimmer G, Suguri T, Reuter G, Yu RK, Schauer R, Herrler G (1994) Modification of sialic acids by 9-O-acetylation is detected in human leucocytes using the lectin property of influenza C virus. *Glycobiology* 4:343-349.



## 8 Thesen

1. LRIF1.1 und LRIF1.2 werden ubiquitär exprimiert.
2. LRIF1 ist ein Kernprotein.
3. Überexpression von LRIF1 verändert seine zelluläre Lokalisation nicht.
4. Überexpression von LRIF1 führt nicht zur Migration von GNE in den Zellkern.
5. Überexpression von GNE führt nicht zur Migration von LRIF1 in das Zytosol.
6. LRIF1 ist kein Interaktionspartner von GNE.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Thomas Schmidt

Potsdam, 19.06.2021

10 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich bestätige bisher keine Promotionsversuche durchgeführt zu haben.

Thomas Schmidt

Potsdam, 19.06.2021

## 11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte für die Bereitstellung des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken. Seine ausdauernde, freundschaftliche Begleitung hat sehr zur Beendigung dieser Dissertation beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Wenke Weidemann für ihre Betreuung der Laborarbeiten, die zahlreichen fachlichen Diskussionen und Hilfestellungen und nicht zuletzt die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Horstkorte für die Hilfsbereitschaft, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen netten Abende und nicht-fachlichen Aktivitäten inner- und außerhalb des Labors. Besonderer Dank gilt hier Nicole Glaubitz und Annett Thate für die praktische Unterstützung meiner Arbeiten.

Auch bei meinen Eltern Dr. Renee Schmidt und Dr. Henning Schmidt möchte ich mich herzlich bedanken. Sie ermöglichten mir mein Studium, glaubten stets an mich und ermutigten mich die langwierigen Arbeiten fortzusetzen und zu beenden.

Außerdem danke ich Frau Dr. Katja Sygnecka für die langjährige Freundschaft, die Begleitung bei dieser Arbeit und das fleißige Korrekturlesen.

Zu guter Letzt gilt mein größter Dank meiner lieben Frau Bettina für ihre Geduld, die Unterstützung beim Layout und die vielen Anregungen beim Korrekturlesen. Besonders danke ich ihr für ihre bedingungslose Liebe, die stabile und spannende Partnerschaft und für mein größtes Glück: unsere Tochter Johanna.