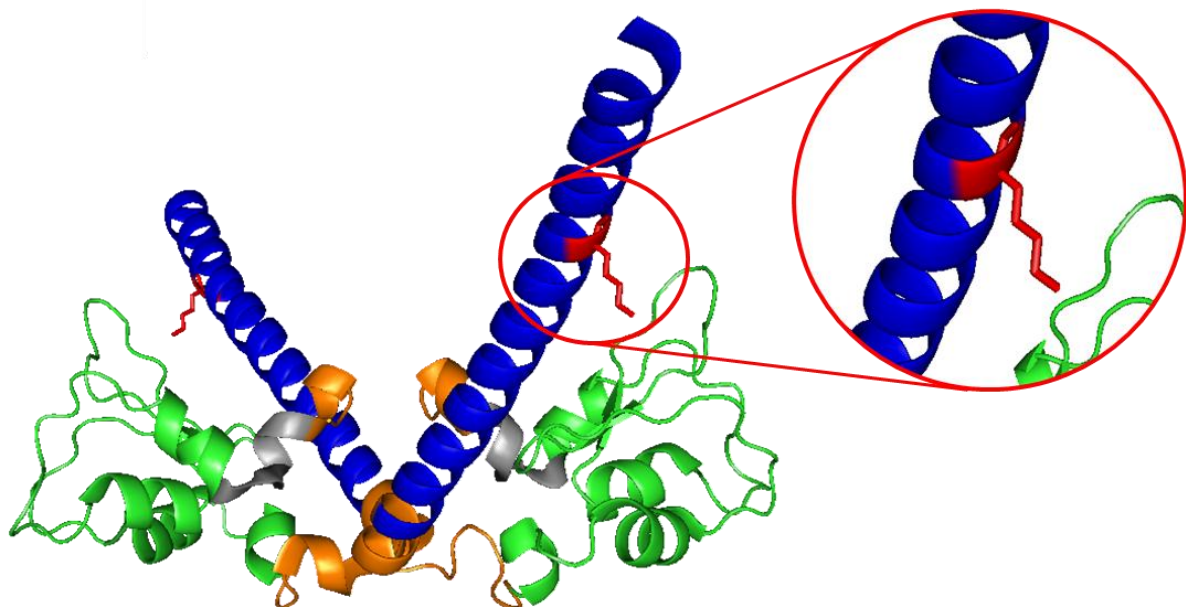


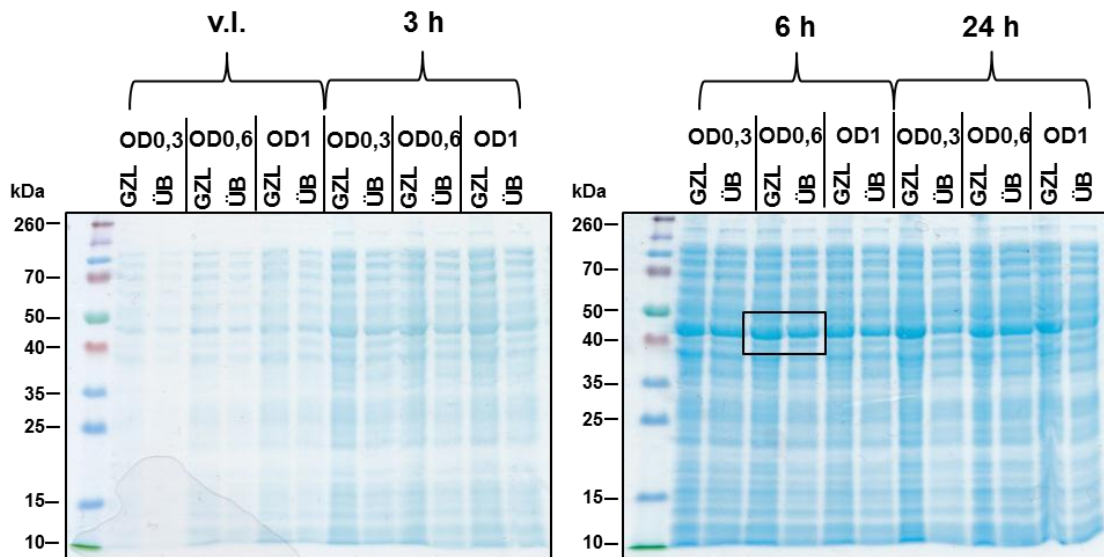
**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Domänenorganisation von Survivin**

Survivin weist eine N-terminale BIR-Domäne (grün) und eine C-terminale  $\alpha$ -Helix (blau) auf. Das intrinsische *nuclear export signal* (NES) (rot), welches die Interaktion mit dem Exportrezeptor Crm1 (grau) vermittelt, überlappt teilweise mit der Dimerisierungsstelle (rot). Survivin interagiert zudem mit den Mitgliedern des *Chromosomal Passenger Complex* (CPC): INCENP, Borealin und Aurora B (alle grau) und wird innerhalb der  $\alpha$ -Helix, am Thyrosin 117, durch die Aurora B-Kinase phosphoryliert (nach Elisabeth Schröder und Britta Unruhe).



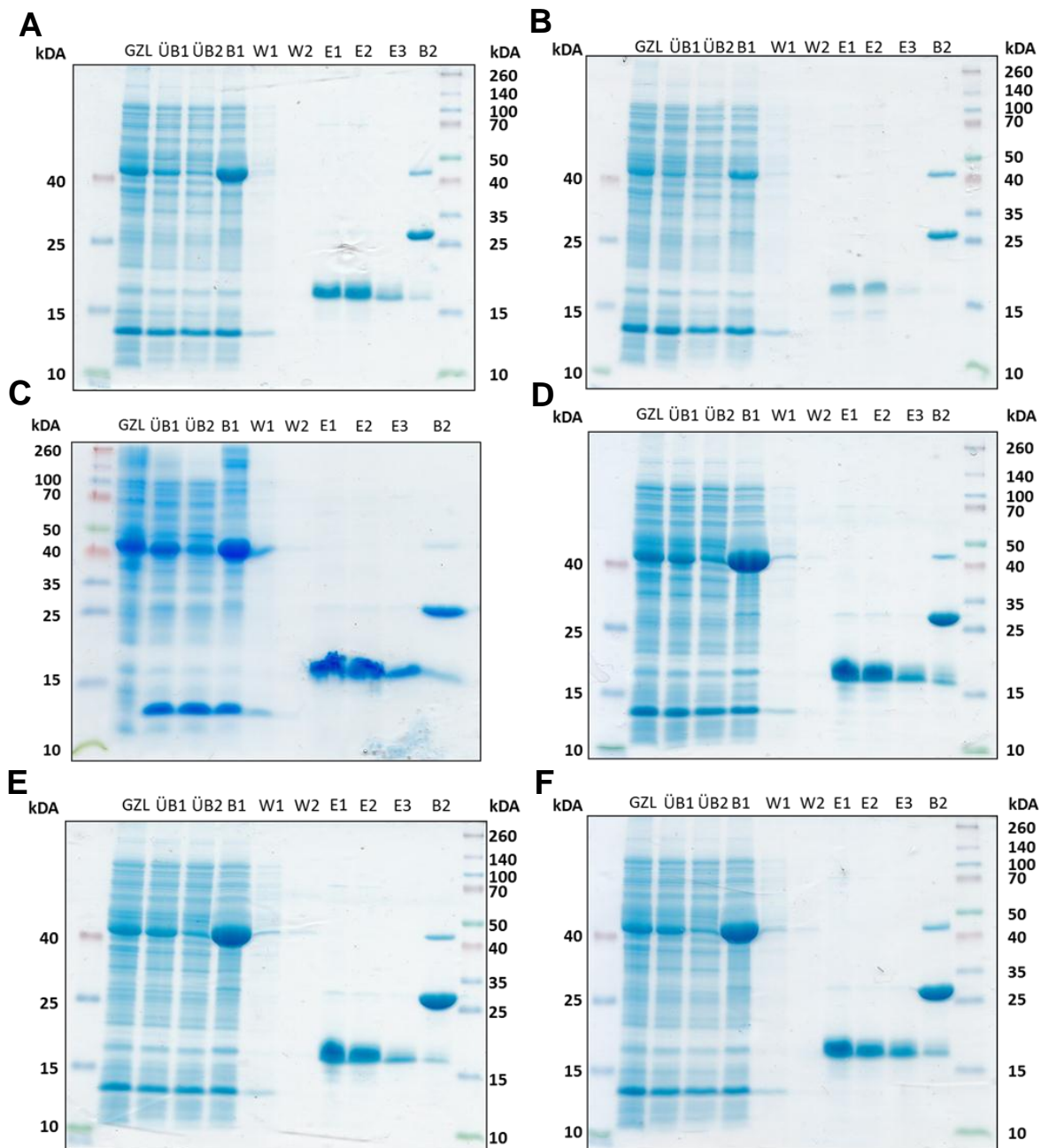
**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lysins an Position 129 im Survivin Homodimer**

Dargestellt ist die 3D-Struktur des Survivin Homodimers. Survivin ist aus einer N-terminalen BIR-Domäne (AS 15-97, grün) und einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix (AS 99-142, blau) aufgebaut. Die mit dem nukleären Exportsignal überlappende Dimerisierungs-Stelle der beiden Survivin-Monomere ist in Orange dargestellt (AS 4-10 und 89-102). Der vergrößerte Ausschnitt zeigt das Lysin an Position 129 (rot) (verändert nach (80), PDB ID: 1E31).



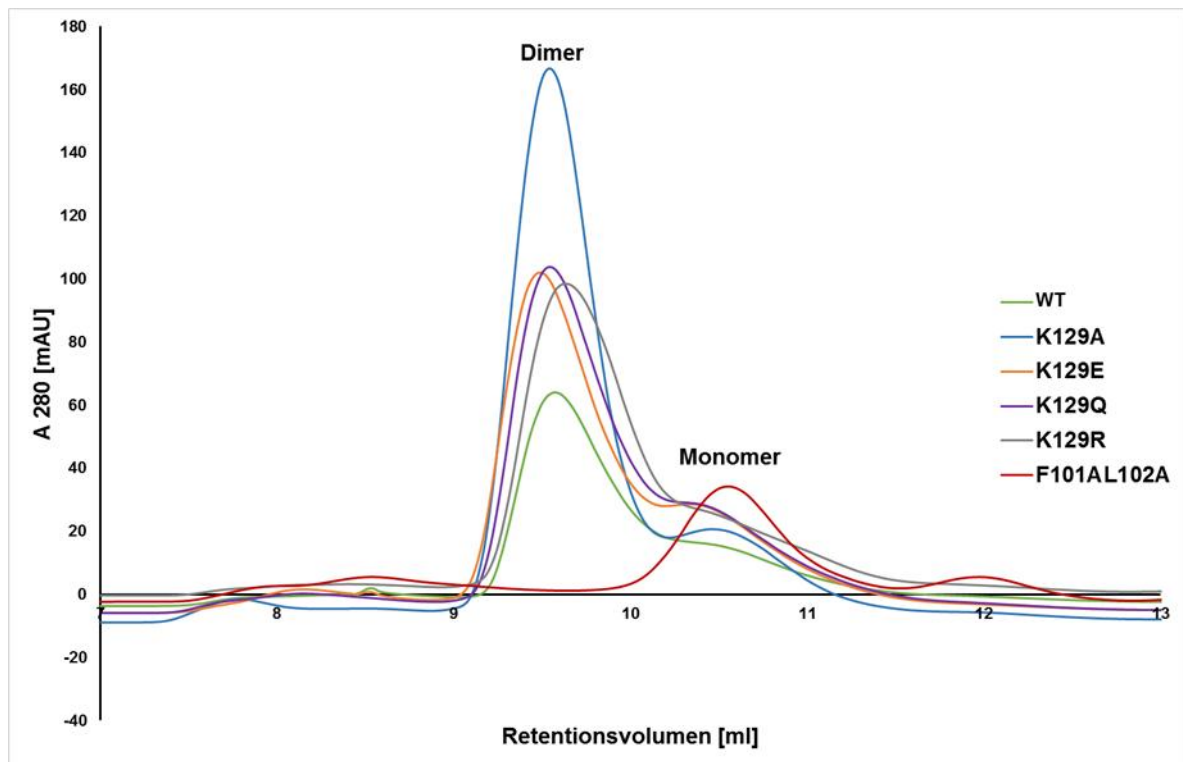
**Abbildung 3: Testexpression der Acetylierungs-Mutante K129E**

Die Abbildung zeigt, exemplarisch für alle getesteten K129-Mutanten, die Ergebnisse der Testexpression der Acetylierungs-Mutante K129E. Die Expression erfolgte in *E. coli* SoluBL21 Bakterien bei 30 °C. Die Induktion der Expression erfolgte mit 1 mM IPTG bei einer OD von 0,3, 0,6 und 1. Probenentnahmen erfolgen vor Induktion (v. l.) sowie 3 h, 6 h und 24 h nach Induktion jeweils vom Gesamtzelllysate (GZL) und dem Überstand (ÜB) nach Zentrifugation. Als beste Expressionsbedingungen für die Acetylierungs-Mutanten wurden eine Induktion bei einer OD von 0,6 und eine Expression über 6 h identifiziert (Kasten). Die Färbung der Gele erfolgte mit einer Coomassie-Lösung.



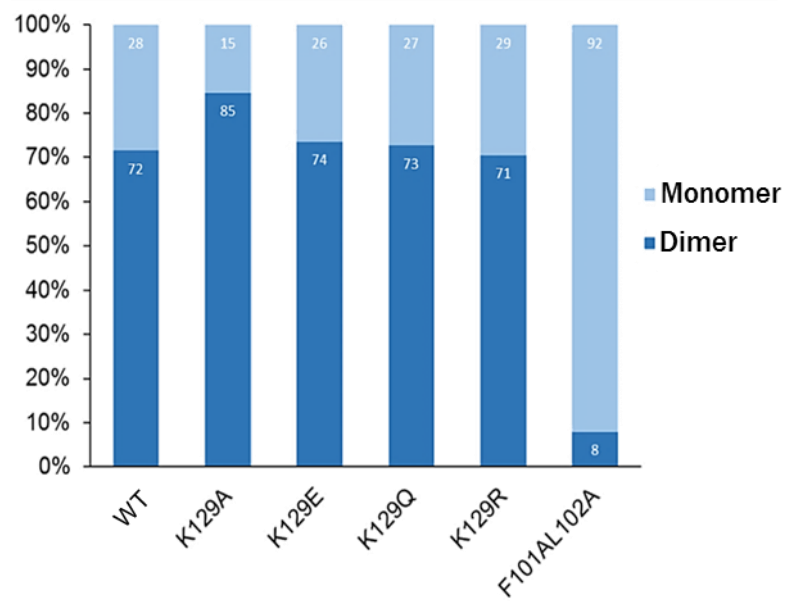
**Abbildung 4: Reinigung der rekombinant hergestellten Acetylierungs-Mutanten über Glutathion-Sepharose-Beads**

Die Proben der einzelnen Schritte der Proteinreinigung des Survivin-Wildtyps (A), der Dimerisierungs-Mutante (B) sowie der Acetylierungs-Mutanten K129A (C), K129E (D), K129Q (E) und K129R (F) wurden auf SDS-Gele aufgetragen. Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie-Lösung. Es wurden jeweils Proben des Gesamtzelllysats (GZL), des Überstands nach Zentrifugation des Gesamtzelllysats (ÜB1), des Überstands (ÜB2) und der Beads (B1) nach erfolgter Bindung der Proteine an die Beads, der beiden Waschfraktionen (W1, W2), der drei Eluatfraktionen (E1, E2, E3) sowie der Beads nach erfolgter Elution (B2) aufgetragen.



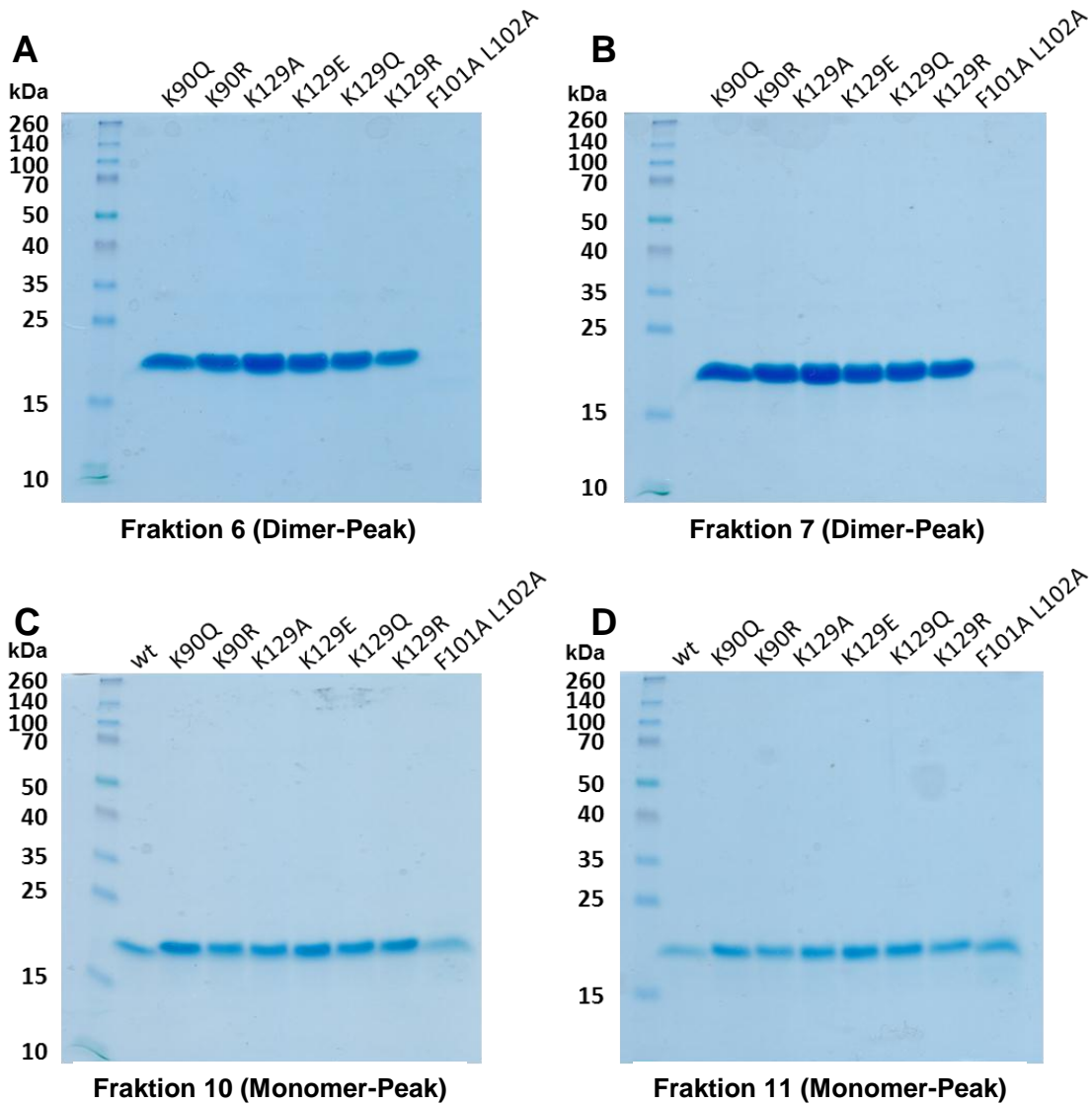
**Abbildung 5: Analyse des Dimerisierungs-Verhaltens der Acetylierungs-Mutanten mittels Gelfiltration**

Gezeigt sind die Chromatogramme des Wildtyps (WT, grün), der Dimerisierungs-Mutante (F101A L102A, rot) sowie der Acetylierungs-Mutanten K129A (blau), K129E (orange), K129Q (violett) und K129R (grau) zwischen einem Retentionsvolumen von 7 ml und 13 ml. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm.



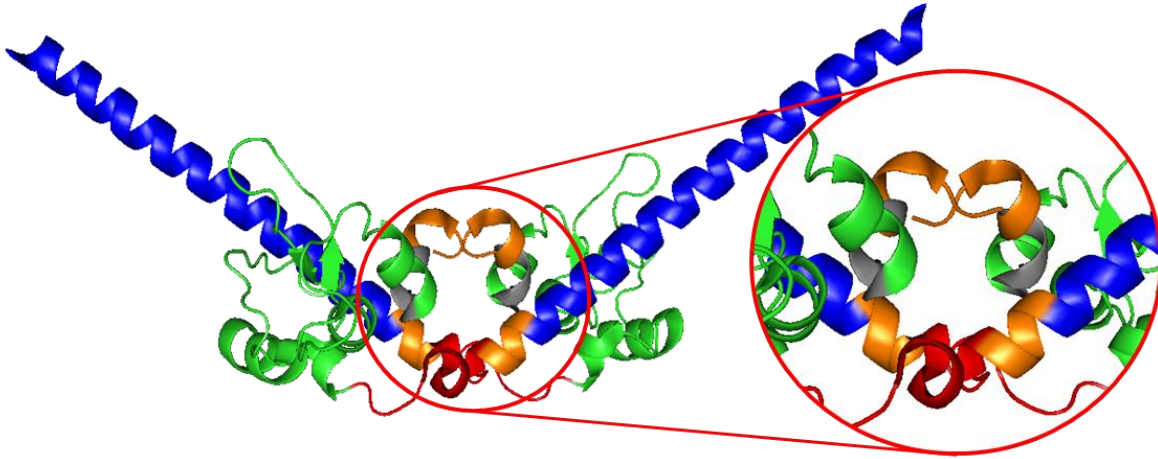
**Abbildung 6: Verhältnis zwischen monomerer und dimerer Form der Acetylierungs-Mutanten**

Durch die Integration des Monomer- und des Dimer-Peaks der Chromatogramme der Gelfiltration von Wildtyp, Dimerisierungs-Mutante sowie den Acetylierungs-Mutanten K129A, K129E, K129Q und K129R wurden die Verhältnisse zwischen den als Monomer (hellblau) und als Dimer (dunkelblau) vorliegenden Proteinen berechnet.



**Abbildung 7: Gelelektrophoretische Auftrennung der bei der Gelfiltration eluierten Fraktionen des Dimer- und des Monomer-Peaks**

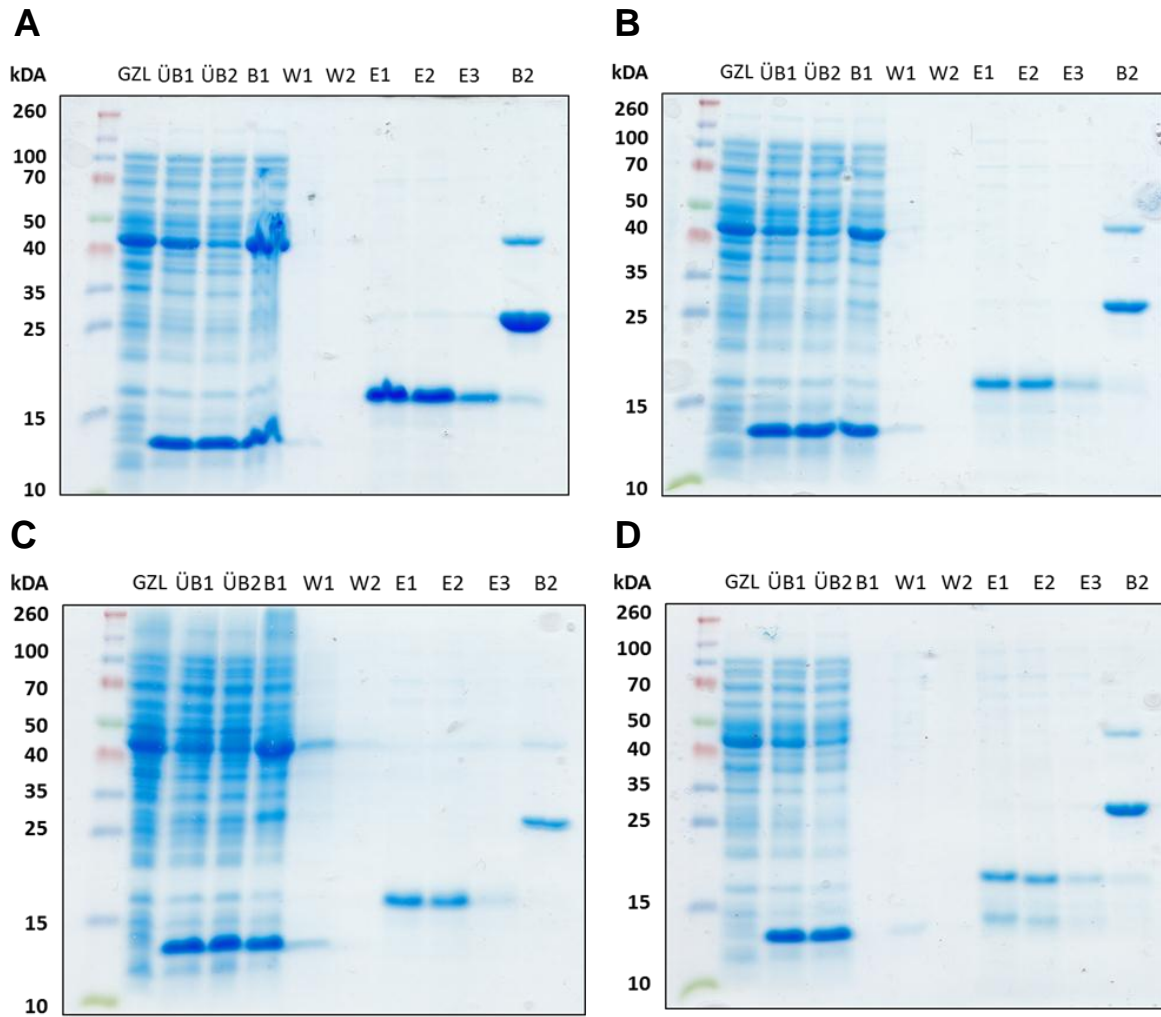
Die bei der Gelfiltration gewonnenen Fraktionen 6 (A) und 7 (B), die dem Dimer-Peak entsprechen, sowie 10 (C) und 11 (D), die dem Monomer-Peak entsprechen, wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die SDS-Gele wurden mittels Coomassie-Lösung gefärbt.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des NES und der Dimerisierungs-Stelle von Survivin**

Survivin besteht aus einer N-terminalen BIR-Domäne (AS 15-97, grün) und einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix (AS 99-142, blau). Der vergrößerte Ausschnitt zeigt das nukleäre Exportsignal (NES), welches die Interaktion mit dem Exportrezeptor Crm1 vermittelt (AS 89-98, rot) und mit der Dimerisierungs-Stelle (AS 4-10 und 89-102, rot bzw. orange) überlappt (verändert nach (80), PDB ID: 1E31).

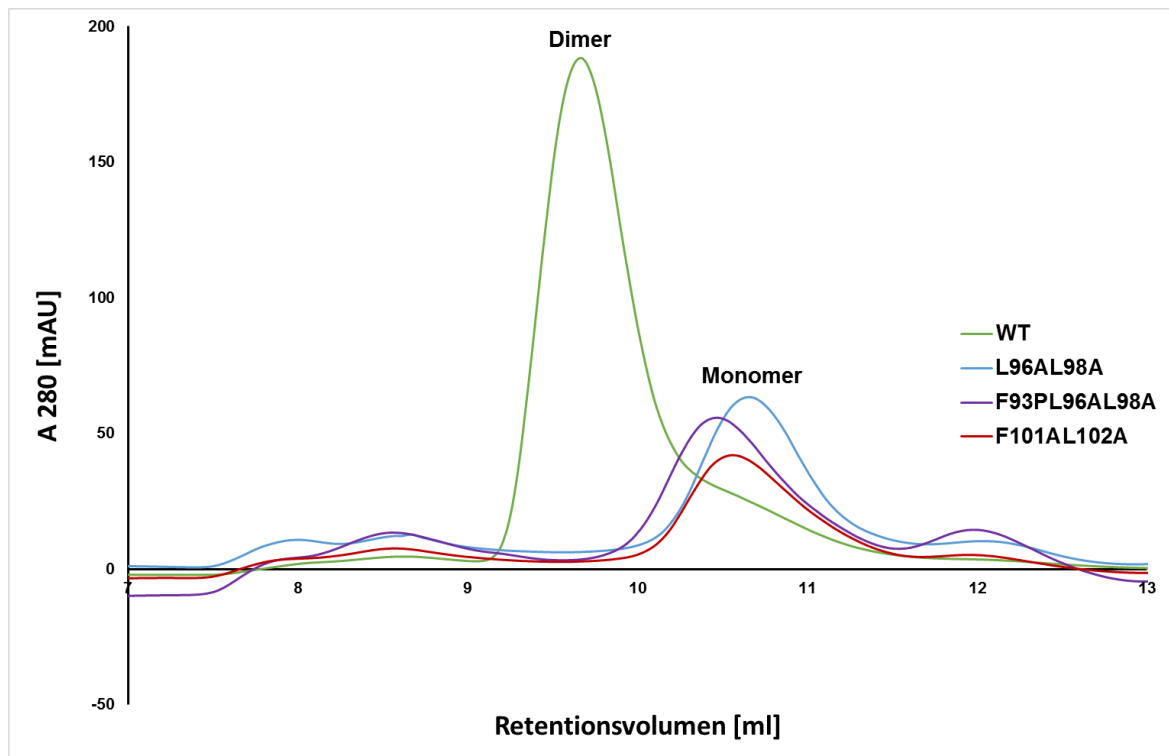




**Abbildung 9: Reinigung der rekombinant hergestellten NES-Mutanten über Glutathion-Sepharose-Beads**

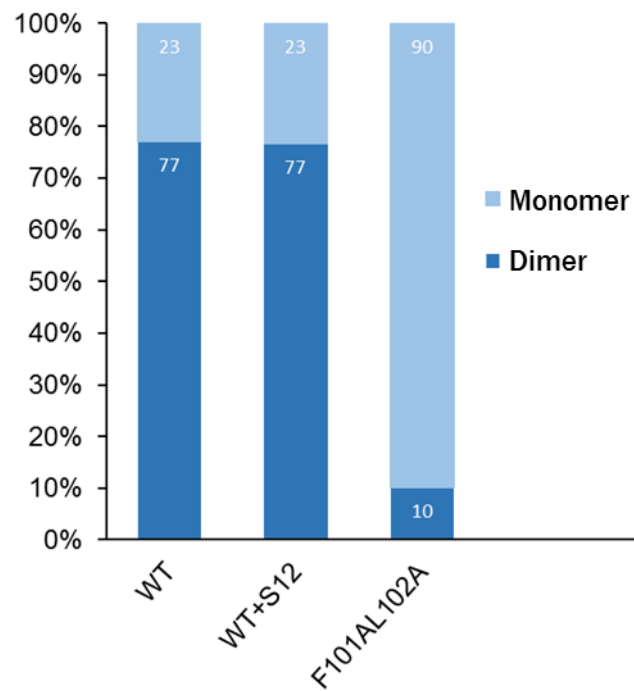
Die Proben der einzelnen Schritte der Proteinreinigung des Survivin-Wildtyps (A), der Dimerisierungs-Mutante (B) sowie der NES-Mutanten L96AL98A (C) und F93PL96AL98A (D) wurden auf SDS-Gele aufgetragen. Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie-Lösung. Es wurden jeweils Proben des Gesamtzelllysats (GZL), des Überstands nach Zentrifugation des Gesamtzelllysats (ÜB1), des Überstands (ÜB2) und der Beads (B1) nach erfolgter Bindung der Proteine an die Beads, der beiden Waschfraktionen (W1, W2), der drei Eluatfraktionen (E1, E2, E3) sowie der Beads nach erfolgter Elution (B2) aufgetragen.





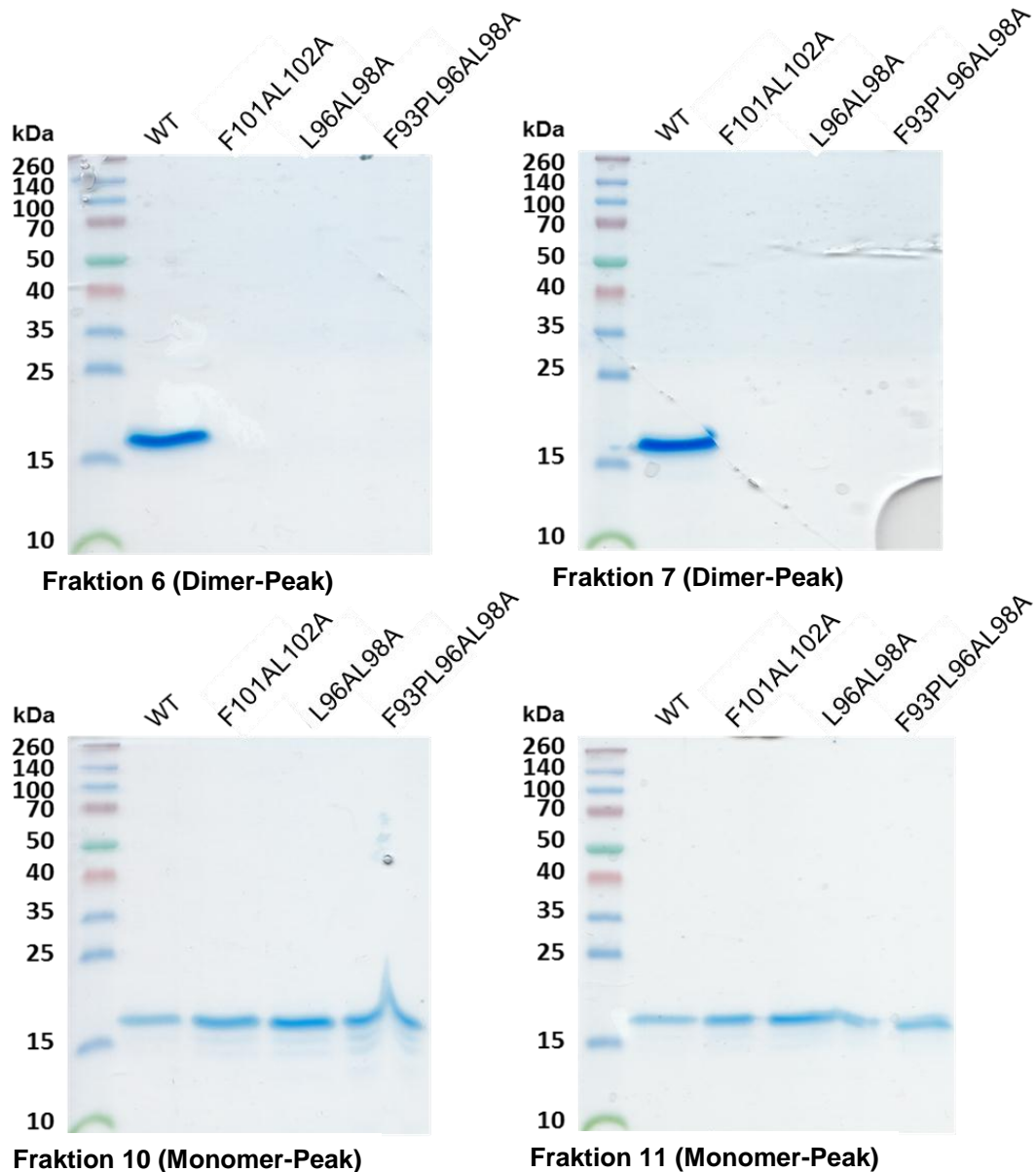
**Abbildung 10: Analyse des Dimerisierungs-Verhaltens der NES-Mutanten mittels Gelfiltration**

Gezeigt sind die Chromatogramme des Wildtyps (WT, grün), der Dimerisierungs-Mutante (F101A L102A, rot) sowie der NES-Mutanten L96AL98A (blau) und F93PL96AL98A (violett) im Retentionsvolumen-Bereich von 7 ml und 13 ml. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm.



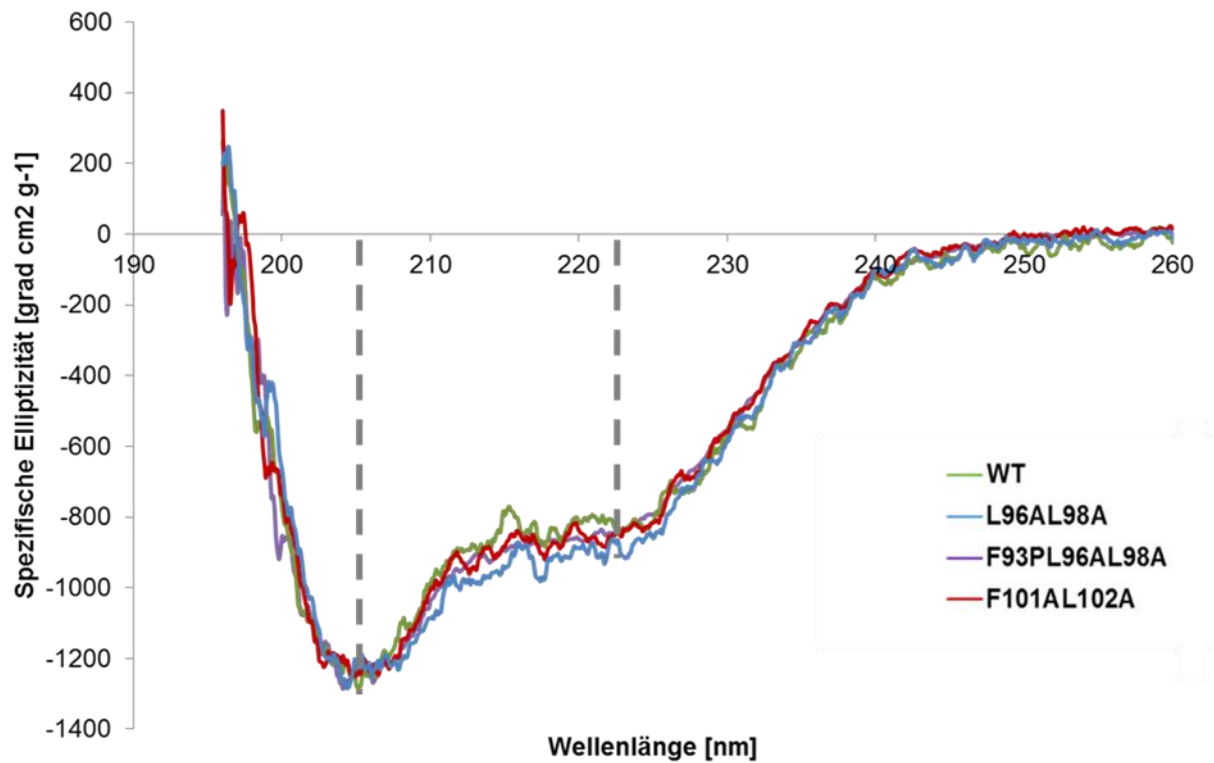
**Abbildung 11: Verhältnis zwischen monomerer und dimerer Form der NES-Mutanten**

Durch eine Integration des Monomer- und des Dimer-Peaks der Chromatogramme der Gelfiltration von Wildtyp, Dimerisierungs-Mutante sowie den NES-Mutanten L96AL98A und F93PL96AL98A wurden die Verhältnisse zwischen den als Monomer (hellblau) und als Dimer (dunkelblau) vorliegenden Proteinen berechnet.



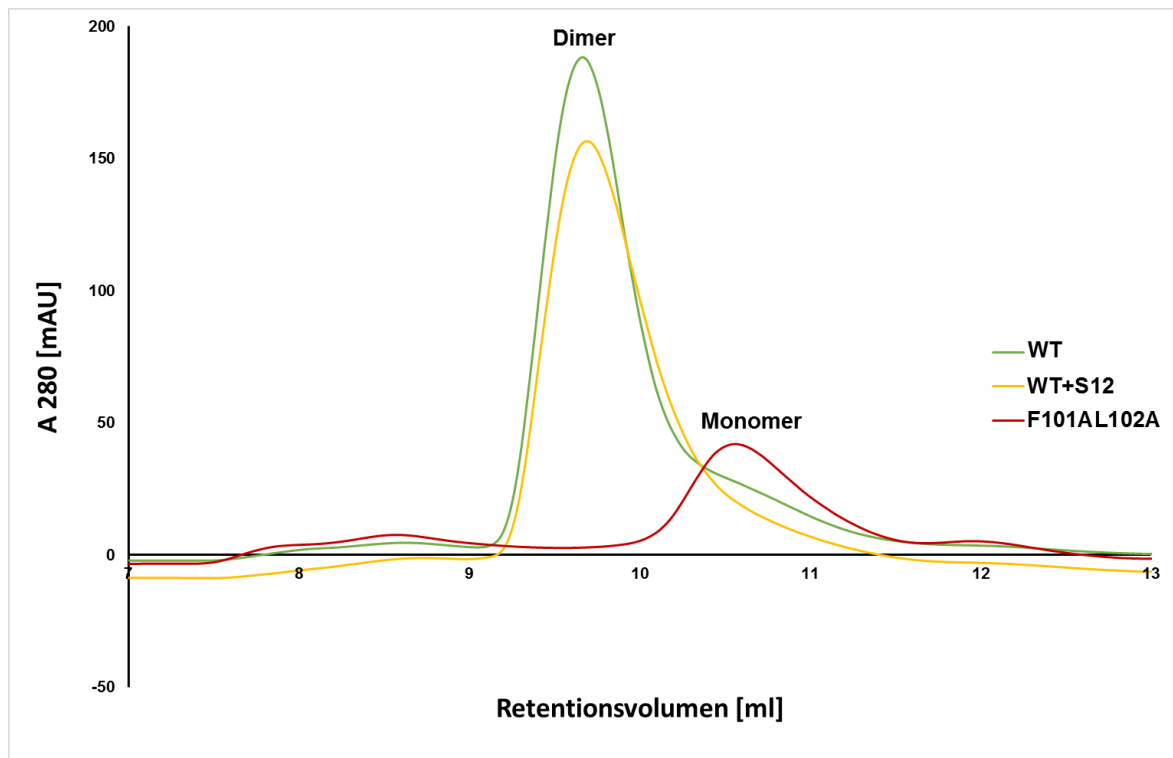
**Abbildung 12: Gelelektrophoretische Auftrennung der bei der Gelfiltration eluierten Fraktionen des Dimer- und des Monomer-Peaks**

Die bei der Gelfiltration gewonnenen Fraktionen 6 (A) und 7 (B), die dem Dimer-Peak entsprechen, sowie 10 (C) und 11 (D), die dem Monomer-Peak entsprechen, wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die SDS-Gele wurden mittels Coomassie-Lösung gefärbt.



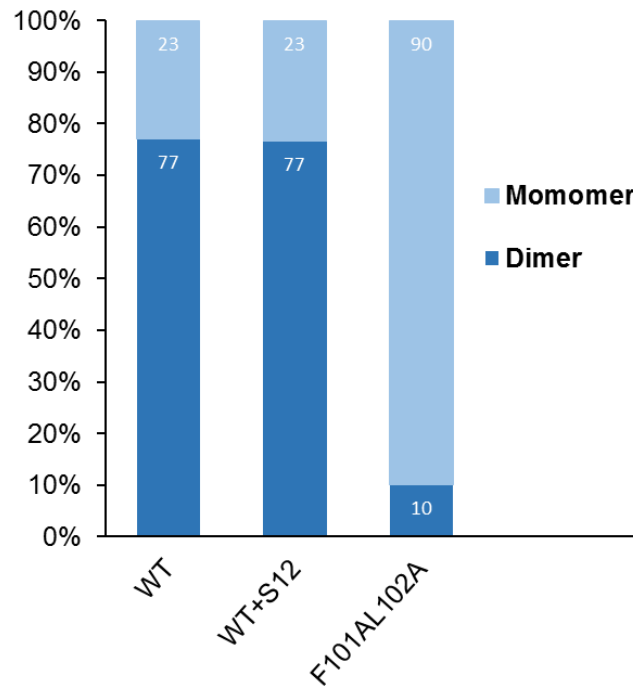
**Abbildung 13: CD-spektroskopische Analyse der NES-Mutanten**

Dargestellt sind die CD-Spektren des Wildtyps (grün), der Dimerisierungs-Mutante (rot) sowie der NES-Mutanten L96AL98A (blau) und F93PL96AL98A (violett). Die Aufnahme der CD-Spektren erfolgte im fernen UV-Bereich. Als Puffer wurde ein 20 mM Phosphat-Puffer mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Spektren auf das Spektrum der NES-Mutante F93PL96AL98A normalisiert.



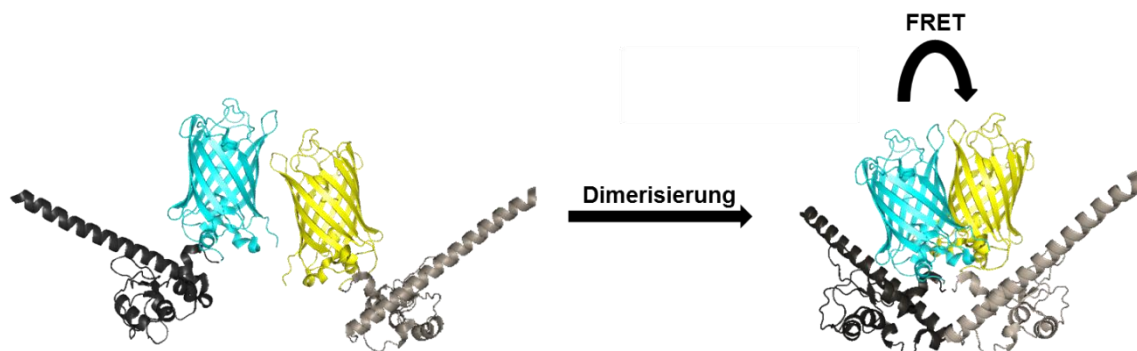
**Abbildung 14: Analyse des Dimerisierungs-Verhaltens von Survivin nach Behandlung mit dem Survivin-Antagonisten S12**

Gezeigt sind die Chromatogramme des Wildtyps (WT, grün), der Dimerisierungs-Mutante (F101AL102A, rot) sowie des Wildtyps nach 2-stündiger Inkubation mit 100 mM des Survivin-Antagonisten S12 (orange). Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm.



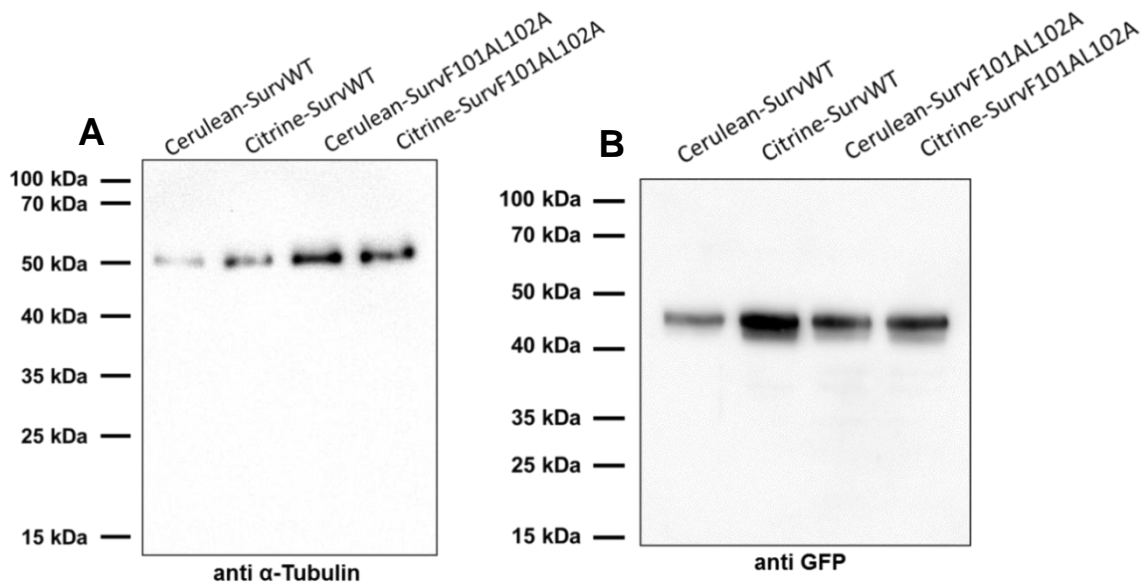
**Abbildung 15: Verhältnis zwischen monomerer und dimerer Form nach Behandlung mit dem Survivin-Antagonisten S12**

Durch eine Integration des Monomer- und des Dimer-Peaks der Chromatogramme der Gelfiltration des Survivin Wildtyp-Proteins vor und nach zweistündiger Inkubation mit 100 mM des Survivin-Antagonisten S12 sowie der als Kontrolle mitgeführten Dimerisierungs-Mutante wurden die Verhältnisse zwischen den als Monomer (hellblau) und als Dimer (dunkelblau) vorliegenden Proteinen berechnet.



**Abbildung 16: Schema der FRET-Aktivität bei der Dimerisierung von Cerulean-Survivin und Citrine-Survivin**

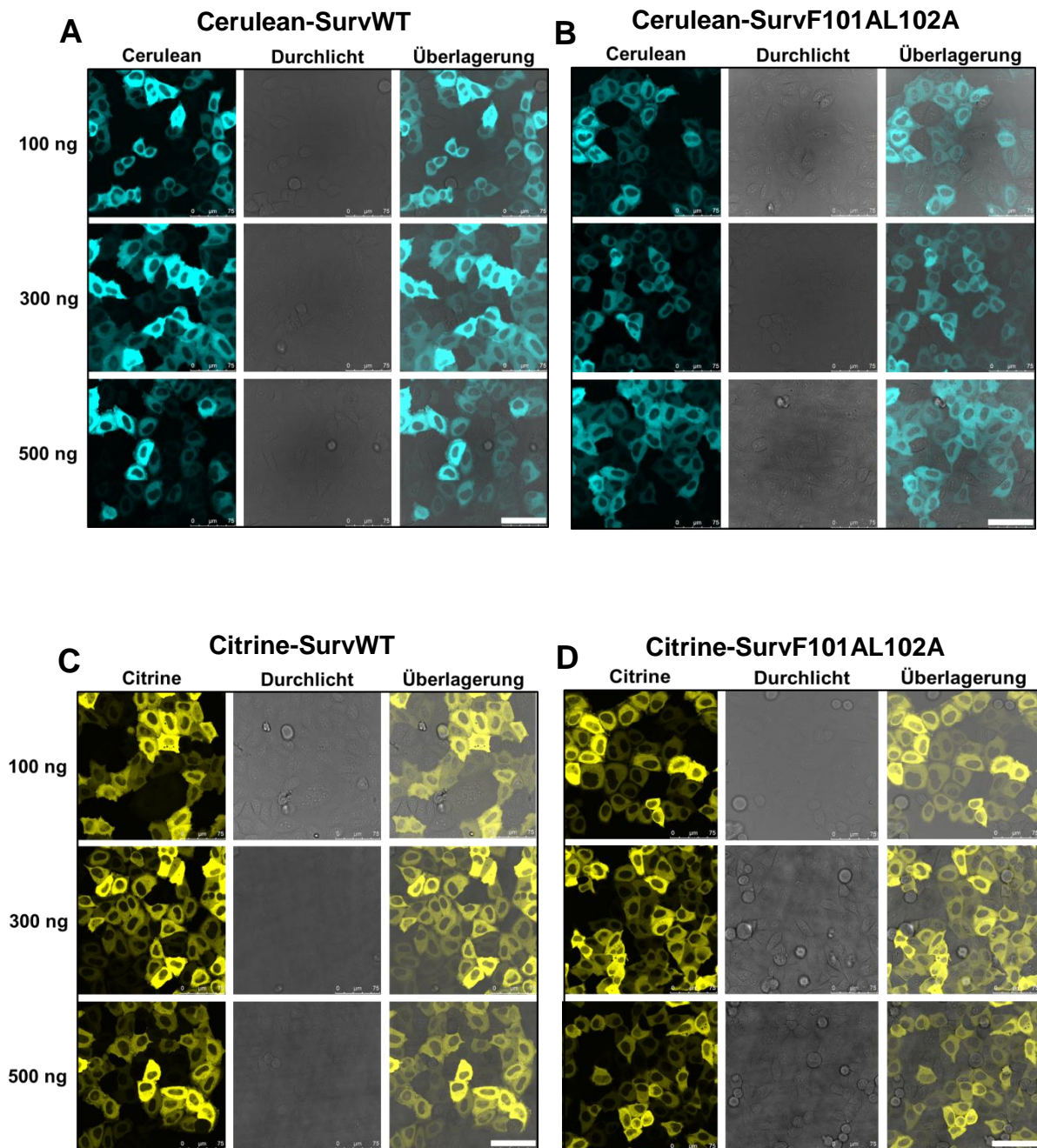
Bei der Dimerisierung von Cerulean-Survivin (cyan/dunkelgrau; links) und Citrine-Survivin (gelb/hellgrau; rechts) kommt es zu einer strahlungsfreien Energieübertragung zwischen den Fluorophoren Cerulean und Citrine (verändert nach (80), (85) und (86). PDB ID Survivin: 1E31; PDB ID Cerulean: 2WSO; PDB ID Citrine: 3DPW).



#### Abbildung 17: Kontrolle der Expression der FRET-Konstrukte mittels Western Blot

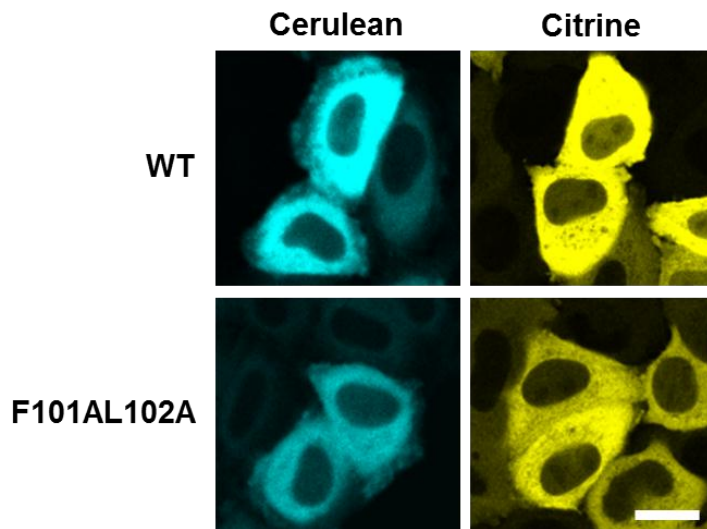
Die FRET-Konstrukte Cerulean-SurvWT, Citrine-SurvWT, Cerulean-SurvF101AL102A und Citrine-SurvF101AL102A wurden in 293T-Zellen transfiziert, von denen nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Zelllysate hergestellt wurden. Nach Zentrifugation der Lysate wurde die Proteinmenge im Überstand bestimmt. Jeweils 20 µg des Proteingemischs wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der FRET-Konstrukte und der Ladekontrolle  $\alpha$ -Tubulin erfolgte mittels anti-GFP-Primärantikörper (A) bzw. anti- $\alpha$ -Tubulin-Primärantikörper (B) und einem an HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Entwicklung erfolgte für 10 min mit ECLPlus.





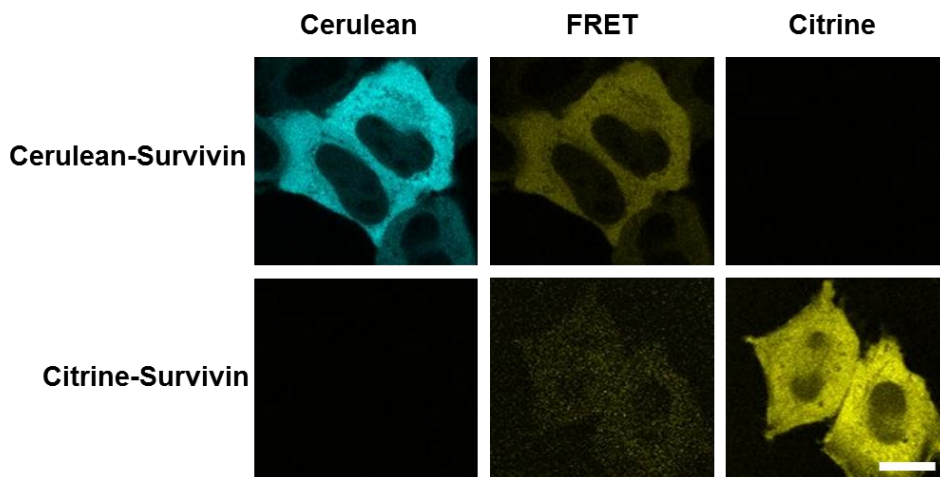
**Abbildung 18: Testtransfektion der FRET-Konstrukte unter Einsatz verschiedener Mengen Plasmid-DNA**

100 ng, 300 ng oder 500 ng Plasmid-DNA der FRET-Konstrukte Cerulean-SurvWT (A), Cerulean-SurvF101AL102A (B), Citrine-SurvWT (C) und Citrine-SurvF101AL102A (D) wurden in HeLa-Zellen transfiziert und die Zellen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop TCS SP5 (Leica). Maßstabsbalken: 75 μm



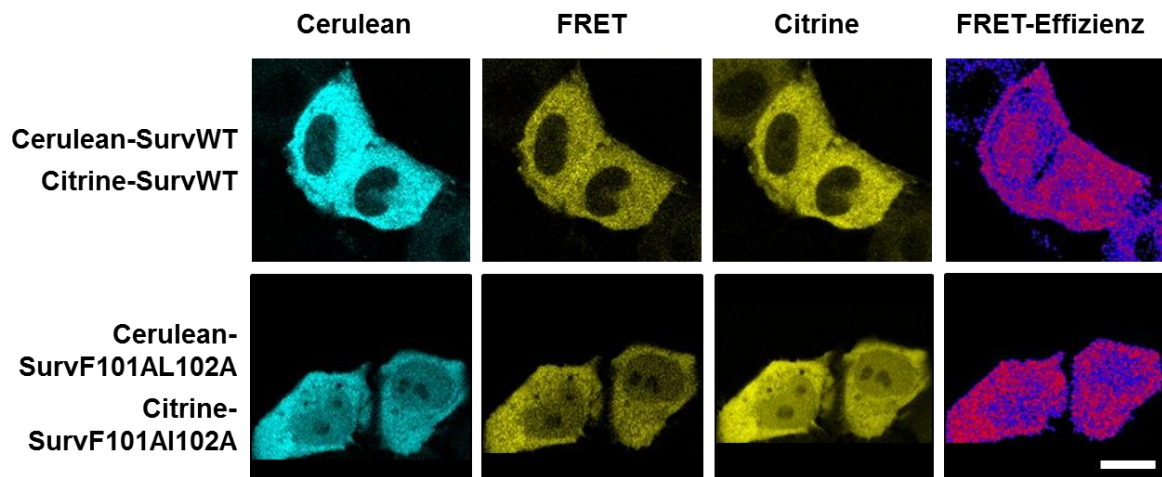
**Abbildung 19: Darstellung der intrazellulären Lokalisation der FRET-Konstrukte**

Vergrößerte Aufnahme der mit den FRET-Konstrukten Cerulean-SurvWT, Citrine-SurvWT (WT), Cerulean-SurvF101AL102A und Citrine-SurvF101AL102A (DIM) transfizierten HeLa-Zellen. Maßstabsbalken: 12  $\mu\text{m}$



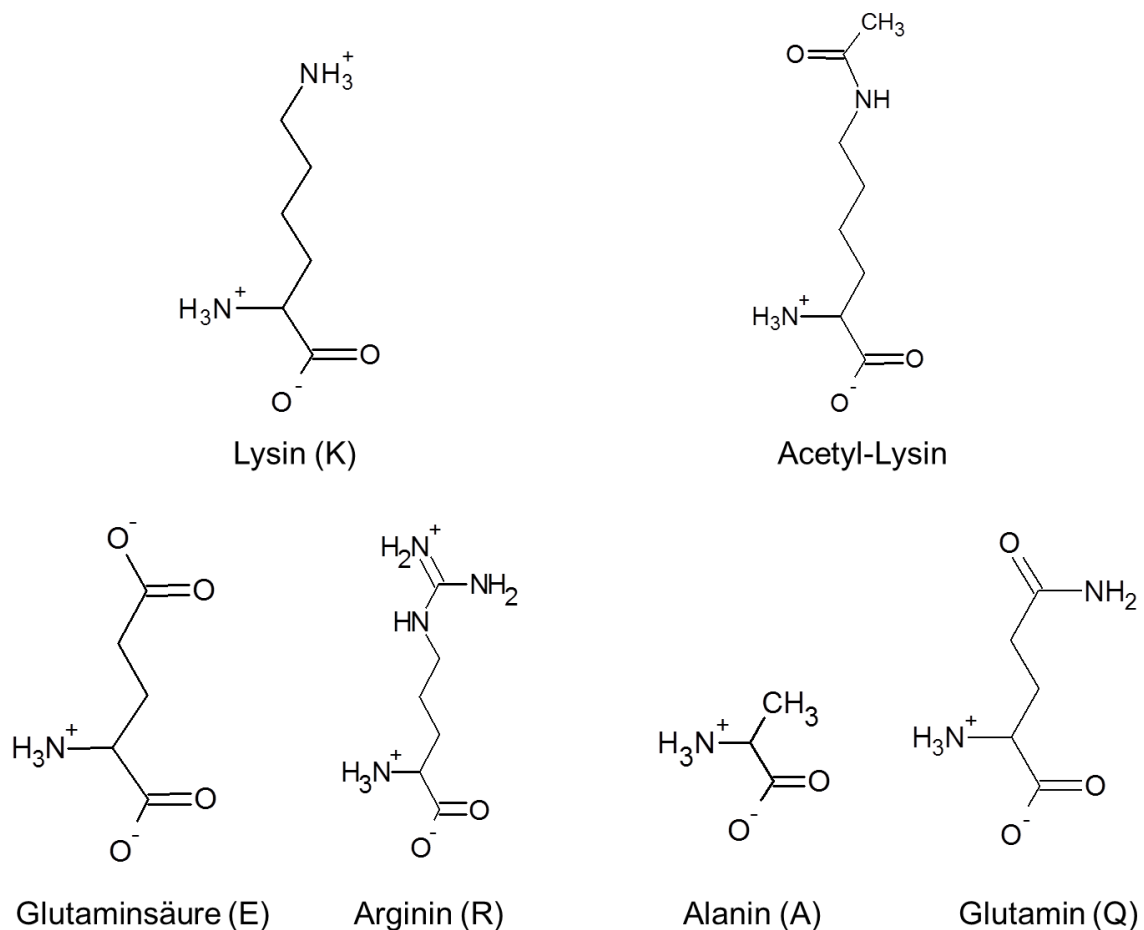
**Abbildung 20: Separate Transfektion der Konstrukte Cerulean-Survivin und Citrine-Survivin**

HeLa-Zellen wurden mit 125 ng Cerulean-Survivin bzw. Citrine-Survivin transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Analyse durch den *Sensitized Emission* FRET-Assay. Maßstabsbalken: 15  $\mu\text{m}$



**Abbildung 21: Ergebnisse des Sensitized Emission FRET-Assays zur Untersuchung des Dimerisierungs-Verhaltens von Survivin**

HeLa-Zellen wurden mit 125 ng Cerulean-SurvWT und 125 ng Citrine-SurvWT bzw. 125 ng Cerulean-SurvF101AL102A und 125 ng Citrine-SurvF101AL102A ko-transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Analyse der FRET-Effizienz (rot) durch den *Sensitized Emission* FRET-Assay. Maßstabsbalken: 12 µm



**Abbildung 22: Schematische Darstellung der Aminosäuren Lysin, Acetyl-Lysin, Alanin, Glutaminsäure, Glutamin und Arginin**

Strukturformeln der Aminosäure Lysin und des Acetyl-Lysins sowie der durch Wang *et al.* zur Nachahmung des nicht-acetylierten Lysins eingesetzten Aminosäuren Glutaminsäure und Arginin und der zur Nachahmung eines acetylierten Lysins eingesetzten Aminosäuren Alanin und Glutamin (64).

Analyse des tumorrelevanten Proteins Survivin  
Molekulare Charakterisierung der Dimerisierung  
Vallet, C.

2015, XXIII, 100 S. 35 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-08540-7