

Inhaltsverzeichnis

Geleitwort	V
Institutsprofil	VII
Vorwort	IX
Inhaltsverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XV
Abbildungsverzeichnis	XIX
Tabellenverzeichnis	XXI
Symbole für die proteinogenen Aminosäuren	XXIII
1 Einleitung	1
1.1 Krebs	1
1.2 Apoptose	3
1.3 Zellzyklus	6
1.4 Kerntransport	8
1.5 Survivin	10
1.6 Zielsetzung	14
2 Material	15
2.1 Geräte	15
2.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.3 Chemikalien	18
2.4 Puffer und Lösungen	19
2.5 Antibiotika	22
2.6 Bakterienstämme	22
2.7 Zelllinien	22
2.8 Nährmedien und Medienzusätze	23
2.9 Plasmide	24
2.10 Primer	26
2.11 Enzyme	27
2.12 Antikörper	27
2.13 Größenstandards	28
2.14 Kits	28
2.15 Software	29
3 Methoden	30

3.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1	Polymerasekettenreaktion	30
3.1.2	Splice Overlap Extension PCR (SOE-PCR)	31
3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	31
3.1.4	Reinigung von PCR-Produkten	32
3.1.5	DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	32
3.1.6	Restriktionsverdau	32
3.1.7	Ligation	32
3.1.8	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	33
3.1.9	Sequenzanalyse	33
3.2	Mikrobiologische Methoden	33
3.2.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	33
3.2.2	Langfristige Lagerung transformierter <i>E. coli</i> Bakterien	34
3.2.3	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> Bakterien	34
3.2.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> Bakterien	34
3.3	Proteinbiochemische Methoden	35
3.3.1	Reinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen	35
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
3.3.3	SDS-Gelelektrophorese	38
3.3.4	Coomassie-Färbung	39
3.3.5	Western Blotting	40
3.3.6	Gelfiltration	41
3.3.7	CD-Spektroskopie	42
3.4	Zellbiologische Methoden	42
3.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	42
3.4.2	Zellpassage	43
3.4.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	43
3.4.4	Herstellung von Zelllysaten	44
3.5	Fluoreszenzmikroskopische Methoden	44
3.5.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	44
3.5.2	Föster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Auswirkungen der Acetylierung an Lysin 129 auf die Dimerisierung von Survivin	47

4.1.1	Testexpression der Acetylierungs-Mutanten in <i>E. coli</i> SoluBL21 Bakterien.....	48
4.1.2	Herstellung der Acetylierungs-Mutanten in <i>E. coli</i> SoluBL21 Bakterien.....	50
4.1.3	Analyse der Acetylierungs-Mutanten mittels Gelfiltration.....	53
4.2	Einfluss des nukleären Exportsignals (NES) auf die Dimerisierung von Survivin	58
4.2.1	Herstellung der NES-Mutanten in <i>E. coli</i> SoluBL21 Bakterien.....	59
4.2.2	Analyse der NES-Mutanten mittels Gelfiltration	62
4.2.3	CD-spektroskopische Analyse der NES-Mutanten	66
4.3	Effekt des Survivin-Antagonisten S12 auf die Dimerisierung von Survivin	68
4.4	Etablierung eines FRET-Assays zur Analyse der Dimerisierung von Survivin <i>in vivo</i>	71
4.4.1	Analyse der Expression der FRET-Konstrukte im eukaryotischen System	73
4.4.2	Testtransfektion der FRET-Konstrukte	75
4.4.3	<i>Sensitized Emission</i> FRET-Assay	77
5	Diskussion	80
5.1	Auswirkungen der Acetylierung an Lysin 129 auf die Dimerisierung von Survivin	80
5.2	Einfluss des nukleären Exportsignals (NES) auf die Dimerisierung von Survivin	84
5.3	Effekt des Survivin-Antagonisten S12 auf die Dimerisierung von Survivin	87
5.4	Etablierung eines FRET-Assays zur Analyse der Dimerisierung von Survivin <i>in vivo</i>	89
5.5	Ausblick.....	94
6	Literaturverzeichnis.....	95