

# **Charakterisierung der 11q23/MLL-Fusionspartnergene GRAF und FBP17**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

**Uta Fuchs**

aus Flörsheim/Main

Gießen, 2002

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Alfred Pingoud

2. Berichterstatter: PD Dr. Arndt Borkhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2002

## UNIVERSE NEXT DOOR

pity this busy monster, manunkind,  
  
not.        Progress is a comfortable disease:  
your victim (death or life safely beyond)  
  
plays with the bigness of his littleness  
-electrons deify one razorblade  
into a mountainrange; lenses extend  
  
unwish through curving wherewhen till unwish  
returns on its unself.  
              A world of made  
is not a world of born-pity poor flesh  
  
and trees, poor stars and stones, but never this  
fine specimen of hypermagical  
  
ultraomnipotence.    We doctors know  
  
a hopeless case if-listen: there's a hell  
of a good universe next door; let's go

E.E. Cummings (1944)

Meinen Eltern

# **Inhaltsverzeichnis**

|                                                                     |                |
|---------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>                                           | <b>Seite i</b> |
| <b>Abkürzungen</b>                                                  | <b>v</b>       |
| <b>Zusammenfassung</b>                                              | <b>1</b>       |
| <br>                                                                |                |
| <b>I. Einleitung</b>                                                | <b>2</b>       |
| <b>I.1 Leukämien im Kindesalter und ihre molekularen Grundlagen</b> | <b>2</b>       |
| I.1.1 Begriffsbestimmung                                            | 2              |
| I.1.2 Onkogene                                                      | 3              |
| I.1.3 Tumorsuppressorgene                                           | 6              |
| I.1.4 Leukämien im Kindesalter und ihre molekularen Ursachen        | 8              |
| I.1.5 MLL                                                           | 9              |
| <b>I.2 GRAF</b>                                                     | <b>13</b>      |
| I.2.1 Das GRAF-Protein                                              | 13             |
| I.2.2 Der GRAF-Promotor                                             | 15             |
| <b>I.3 FBP17</b>                                                    | <b>16</b>      |
| <b>I.4 Fragestellung</b>                                            | <b>19</b>      |
| <br>                                                                |                |
| <b>II. Methoden</b>                                                 | <b>20</b>      |
| <b>II.1 Bakterienkultur</b>                                         | <b>20</b>      |
| <b>II.2 Kultur eukaryonter Zellen</b>                               | <b>20</b>      |
| <b>II.3 Arbeiten mit Nucleinsäuren</b>                              | <b>21</b>      |
| II.3.1 Isolierung genomischer DNA                                   | 21             |
| II.3.2 Isolierung von RNA                                           | 21             |
| II.3.3 cDNA-Synthese                                                | 22             |
| II.3.4 PCR                                                          | 23             |
| II.3.5 Agarose-Gelelektrophorese                                    | 23             |
| II.3.6 Aufreinigung von DNA                                         | 24             |
| II.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA                     | 25             |
| II.3.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen                         | 25             |
| II.3.9 Klonierung                                                   | 26             |

|             |                                                                    |           |
|-------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| II.3.10     | Isolierung von Plasmid-DNA<br>(Mini-, Midi- und Maxipräparationen) | 28        |
| II.3.11     | Identifizierung positiver Klone nach Klonierung                    | 30        |
| II.3.12     | <i>in vitro</i> -Mutagenese                                        | 30        |
| II.3.13     | Sequenzierung                                                      | 31        |
| II.3.14     | Transfektion eukaryonter Zellen                                    | 33        |
| <b>II.4</b> | <b>Quantitative PCR</b>                                            | <b>34</b> |
| II.4.1      | Funktionsweise                                                     | 34        |
| II.4.2      | Behandlung von Zellen mit TSA und 5-AzadC                          | 36        |
| <b>II.5</b> | <b>Luciferase-Assay</b>                                            | <b>37</b> |
| II.5.1      | Transfektion für den dualen Luciferase Assay                       | 37        |
| II.5.2      | Dualer Luciferase-Assay                                            | 38        |
| <b>II.6</b> | <b>Pathway Profiling</b>                                           | <b>40</b> |
| <b>II.7</b> | <b>Arbeiten mit Proteinen</b>                                      | <b>41</b> |
| II.7.1      | Herstellung von Zellextrakten                                      | 41        |
| II.7.2      | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                | 42        |
| II.7.3      | Co-Immunopräzipitation                                             | 43        |
| II.7.4      | Western-Blot                                                       | 44        |
| II.7.5      | Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E.coli</i>               | 45        |
| II.7.6      | Reinigung von GST-Fusionsproteinen                                 | 46        |
| II.7.7      | <i>In vitro</i> -Transkription und Translation                     | 46        |
| II.7.8      | GST-Pull down-Experimente                                          | 47        |
| <b>II.8</b> | <b>Das One Hybrid System</b>                                       | <b>48</b> |
| II.8.1      | Hefekultur                                                         | 48        |
| II.8.2      | Transformation von Hefezellen                                      | 49        |
| II.8.3      | Herstellung eines einfachen bzw. doppelten Reporterstammes         | 50        |
| II.8.4      | Screening einer cDNA-Bibliothek                                    | 51        |
| II.8.5      | Colony Lift Filter Assay                                           | 51        |
| II.8.6      | Plasmid-DNA-Extraktion aus Hefe                                    | 52        |
| <b>II.9</b> | <b>Das Two Hybrid System</b>                                       | <b>53</b> |
| II.9.1      | Hefekultur                                                         | 54        |
| II.9.2      | Klonierung in Hefezellen mittels Rekombination                     | 55        |
| II.9.3      | Screening einer cDNA-Bibliothek                                    | 56        |
| II.9.4      | Herstellung von Hefeextrakten für Western-Blots                    | 58        |

|              |                                                                                |            |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------|
| II.9.5       | Identifikation falsch-positiver Klone                                          | 59         |
| <b>II.10</b> | <b>Datenbanken und Software</b>                                                | <b>60</b>  |
| <b>III.</b>  | <b>Ergebnisse</b>                                                              | <b>62</b>  |
| <b>III.1</b> | <b>Der GRAF-Promotor</b>                                                       | <b>62</b>  |
| III.1.1      | Ergebnisse der Luciferase-Assays                                               | 62         |
| III.1.2      | Ergebnisse der One Hybrid Screens                                              | 64         |
| <b>III.2</b> | <b>Die GRAF-Expression</b>                                                     | <b>70</b>  |
| III.2.1      | Einfluss von TSA                                                               | 70         |
| III.2.2      | Einfluss von 5-azadC                                                           | 75         |
| <b>III.3</b> | <b>Einfluss von GRAF auf Signaltransduktionswege</b>                           | <b>80</b>  |
| <b>III.4</b> | <b>GRAF-Interaktionspartner</b>                                                | <b>85</b>  |
| III.4.1      | Ergebnisse des Bibliothek-Screens                                              | 85         |
| III.4.2      | Klassifizierung der Interaktionspartner                                        | 89         |
| III.4.3      | GST-Pull down-Experimente                                                      | 91         |
| III.4.4      | Co-Immunopräzipitationen                                                       | 94         |
| III.4.5      | Co-Lokalisation der Interaktionspartner                                        | 96         |
| <b>III.5</b> | <b>FBP17-Interaktionspartner</b>                                               | <b>99</b>  |
| III.5.1      | FBP17 und Mitglieder der Rho-Proteinfamilie                                    | 99         |
| III.5.2      | Ergebnisse des Bibliothek-Screens                                              | 104        |
| III.5.3      | Bestätigung der Interaktion                                                    | 106        |
| III.5.4      | Funktionelle Charakterisierung der FBP17/TNKS-Interaktion                      | 107        |
| III.5.5      | Co-Lokalisation von FBP17 und SNX2 bzw. TNKS                                   | 112        |
| <b>IV.</b>   | <b>Diskussion</b>                                                              | <b>113</b> |
| <b>IV.1</b>  | <b>Das <i>MLL</i>-Gen</b>                                                      | <b>113</b> |
| <b>IV.2</b>  | <b>Der GRAF-Promotor</b>                                                       | <b>115</b> |
| <b>IV.3</b>  | <b>Abhängigkeit der GRAF-Expression von Chromatinstruktur und Methylierung</b> | <b>118</b> |
| <b>IV.4</b>  | <b>Einfluss von GRAF auf Signaltransduktionswege</b>                           | <b>122</b> |
| <b>IV.5</b>  | <b>GRAF-Interaktionspartner</b>                                                | <b>125</b> |
| <b>IV.6</b>  | <b>FBP17-Interaktionspartner</b>                                               | <b>129</b> |
| <b>V.</b>    | <b>Literatur</b>                                                               | <b>136</b> |

---

|                                             |            |
|---------------------------------------------|------------|
| <b>VI. Erklärung</b>                        | <b>151</b> |
| <b>VII. Danksagung</b>                      | <b>152</b> |
| <b>VIII. Anhang</b>                         | <b>153</b> |
| <b>VIII.1 GRAF-Promotorsequenz</b>          | <b>153</b> |
| <b>VIII.2 GRAF-Sequenz</b>                  | <b>154</b> |
| <b>VIII.3 FBP17-Sequenz</b>                 | <b>155</b> |
| <b>VIII.4 Geräte</b>                        | <b>156</b> |
| <b>VIII.5 Verbrauchsmaterialien</b>         | <b>157</b> |
| <b>VIII.6 Chemikalien</b>                   | <b>158</b> |
| <b>VIII.7 Komplettsysteme (Kits)</b>        | <b>159</b> |
| <b>VIII.8 Enzyme</b>                        | <b>160</b> |
| <b>VIII.9 Längenstandards</b>               | <b>161</b> |
| <b>VIII.10 DNA-Vektoren</b>                 | <b>162</b> |
| <b>VIII.11 Bakterienstämme</b>              | <b>162</b> |
| <b>VIII.12 Hefestämme</b>                   | <b>163</b> |
| <b>VIII.13 Zelllinien</b>                   | <b>164</b> |
| <b>VIII.14 Antikörper</b>                   | <b>165</b> |
| <b>VIII.15 PCR-Primer und TaqMan-Sonden</b> | <b>166</b> |

## **Abkürzungen**

|         |                                                             |
|---------|-------------------------------------------------------------|
| 3-AT    | 3-Amino-1,2,4-triazol                                       |
| 5-azadC | 5-Aza-2'-deoxycytidin                                       |
| Abb.    | Abbildung                                                   |
| AD      | Aktivierungsdomäne                                          |
| ALL     | akute lymphatische Leukämie                                 |
| AML     | akute myeloische Leukämie                                   |
| BD      | Bindungsdomäne                                              |
| bp      | Basenpaare                                                  |
| bzw.    | beziehungsweise                                             |
| cDNA    | (zu RNA) komplementäre DNA                                  |
| cfu     | colony forming unit                                         |
| DNA     | Desoxyribonucleinsäure                                      |
| dNTPs   | Desoxynucleotide                                            |
| DsRed   | rot fluoreszierendes Protein                                |
| ECL     | „enhanced chemoluminescence“                                |
| F       | forward                                                     |
| FAK     | fokale Adhäsionskinase                                      |
| FBP17   | Formin-bindendes Protein 17                                 |
| g       | Gravitationskonstante                                       |
| GFP     | grün fluoreszierendes Protein                               |
| GRAF    | GTPase-Regulator assoziiert mit der fokalen Adhäsionskinase |
| GST     | Glutathion-S-Transferase                                    |
| h       | Stunde                                                      |
| IP      | Immunopräzipitat                                            |
| kb      | Kilobasen                                                   |
| kD      | Kilodalton                                                  |
| l       | Liter                                                       |
| m       | Milli-                                                      |
| M       | molar; Mol/Liter                                            |
| MDS     | myelodysplastisches Syndrom                                 |
| min     | Minute                                                      |
| MLL     | mixed lineage leukemia-Gen                                  |

---

|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| OD           | optische Dichte                     |
| p            | Wahrscheinlichkeit                  |
| PCR          | Polymerase Kettenreaktion           |
| Prom         | Promotor                            |
| R            | reverse                             |
| RNA          | Ribonucleinsäure                    |
| RT           | Raumtemperatur                      |
| RT-PCR       | PCR nach reverser Transkription     |
| s            | Sekunde                             |
| SDS-PAGE     | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SNX2         | Sorting Nexin 2                     |
| Stabw.       | Standardabweichung                  |
| SV40         | Simian Virus 40                     |
| t            | Translokation                       |
| Tab.         | Tabelle                             |
| TNF $\alpha$ | Tumor Necrosis Faktor $\alpha$      |
| TNKS         | Tankyrase                           |
| TSA          | Trichostatin A                      |
| U            | Unit (Einheit)                      |
| WT           | Wildtyp                             |
| w/v          | Masse pro Volumen                   |
| z.B.         | zum Beispiel                        |
| ZE           | Zellextrakt                         |
| - Kontrolle  | Negativkontrolle                    |
| + Kontrolle  | Positivkontrolle                    |
| $\lambda$    | Wellenlänge                         |
| $\mu$        | Mikro-                              |

Alle weiteren verwendeten Abkürzungen stehen für Puffer oder Chemikalien, die sich in den entsprechenden Kapiteln des Anhangs finden.

## **Zusammenfassung**

Leukämien sind die häufigsten Krebserkrankungen im Kindesalter. Sie entstehen häufig aufgrund von chromosomalen Translokationen, die die Struktur und normale Funktion von Genen verändern, die in der gesunden Zelle Proliferations- und Differenzierungsprozesse kontrollieren. Ein wiederholt bei akuten myeloischen und lymphatischen Leukämien betroffener Locus ist das *MLL*-Gen auf Chromosom 11q23. Bislang sind über 40 verschiedene Translokationen unter *MLL*-Beteiligung identifiziert worden. Alle molekular charakterisierten Translokationen zeigten, dass sie zur Entstehung von Fusionsproteinen aus einem N-terminalen *MLL*-Anteil und einem C-terminalen Partnergenanteil führen.

Ziel dieser Arbeit war es, die kürzlich identifizierten *MLL*-Fusionspartner GRAF und FBP17 molekulargenetisch zu charakterisieren. Der GRAF-Promotor wurde mittels Reportergenassays auf regulative Elemente hin untersucht, und mit Hilfe des Yeast One Hybrid Systems wurde nach Bindungsproteinen in Promotorbereichen gesucht. Mittels quantitativer real-time PCR wurde der Einfluss der Chromatin-Methylierung und -Acetylierung auf die GRAF-Expression bestimmt. Darüber hinaus wurde die Wirkung des GRAF-Proteins auf verschiedene Signaltransduktionswege getestet. Schließlich erfolgte mit dem Yeast Two Hybrid System eine Suche nach potenziellen Interaktionspartnern des GRAF- und FBP17-Proteins.

Es konnte gezeigt werden, dass der GRAF-Promotor methylierungssensitive Bereiche enthält. Behandlung mit demethylierenden Reagenzien führte zu einer Steigerung der GRAF-Expression in 4 von 5 untersuchten Zelllinien, induzierte Hyperacetylierung steigerte die Expression in allen 5 Leukämiezelllinien. Expression des GRAF-Proteins in transfizierten Zellen führte zu einer Aktivierung der JNK- und NFκB-Signaltransduktionswege. Die GRAF-Interaktionspartner (z.B. FAK2) lassen eine Verbindung des Proteins zum Integrin-Signaltransduktionsweg vermuten und damit auch zur RAS-vermittelten Proliferationsregulation.

FBP17 interagiert mit dem Sorting Nexin SNX2 und Tankyrase, wobei die Interaktion mit Tankyrase spezifisch von der SH3-Domäne von FBP17 vermittelt wird. FBP17 könnte so eine integrierende Funktion erfüllen, die den SNX2-vermittelten endosomalen Proteintransport mit strukturellen und regulativen Fähigkeiten der an den Golgi-Apparat gebundenen Tankyrase verknüpft.

# **I. Einleitung**

## **I.1 Leukämien im Kindesalter und ihre molekularen Grundlagen**

### **I.1.1 Begriffsbestimmung**

Der Begriff „Neoplasie“ heißt wörtlich übersetzt „Neubildung“ und wird synonym zur Bezeichnung „Tumor“ verwendet. Er bezeichnet eine abnorme Vergrößerung eines Gewebes durch autonome, fortschreitende und ungebremste Proliferation körpereigener Zellen. Der Begriff „Krebs“ wird zur Bezeichnung maligner Neoplasien eingesetzt, die sich von benignen Erkrankungen durch ihr infiltratives und destruktives Wachstum und die Fähigkeit zur Metastasenbildung unterscheiden (WAGENER, 1996).

Bei Leukämien handelt es sich um Neoplasien des blutbildenden (hämatopoetischen) Systems, die durch klonale Expansion unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen gekennzeichnet sind. Die Leukämie entsteht im Knochenmark, sekundär können jedoch alle extramedullären Organe, insbesondere Leber, Milz, Gehirn, Hoden und Niere infiltriert werden. Durch Verdrängung der normalen Hämatopoese kommt es zur Knochenmarksinsuffizienz. Die Erkrankungen werden mittels morphologischer, zytochemischer, immunologischer und zyto-/molekulargenetischer Merkmale klassifiziert. Von einer akuten Leukämie spricht man, wenn mehr als 30% Blasten im Knochenmark nachweisbar sind. Diese lassen sich dann anhand ihres Immunophänotyps einer Entwicklungslinie zuordnen, der B- oder T-lymphatischen, bzw. der myeloischen. Eine weitere Charakterisierung ist dann nach immunologischen Subtypen und Reifegraden möglich (LUDWIG & THIEL, 1993).

Akute Leukämien entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des lymphoiden oder myeloischen Entwicklungsweges oder aber aus primitiven Stammzellen, die noch das Entwicklungspotential für beide Reihen besitzen (LOOK, 1997; BONNET & DICK, 1997). Die Entstehung der Tumorzellen aus gesunden Zellen wird als „maligne oder neoplastische Transformation“ bezeichnet (WAGENER, 1996). Damit eine normale Zelle maligne entartet, muss ihr Wachstum entweder von normalen Stimuli entkoppelt und somit dereguliert werden, oder hyperaktiv auf diese Stimuli reagieren. Dieses deregulierte Wachstum wird durch eine Anzahl von bestimmten Eigenschaften charakterisiert:

- unbeschränkte Fortführung des Zellzyklus,

- Unfähigkeit der Zellen, vollständig zu differenzieren und sich dem teilungsaktiven Zellpool zu entziehen,
- fehlende Apoptose bei Schäden am Genom, sowie
- Akkumulation von Mutationen, die einzelnen Zellklonen zu einem selektiven Wachstumsvorteil verhelfen (RILEY & LEE, 2002).

Zu diesem Wachstumsvorteil führen bei Leukämien oftmals chromosomale Aberrationen, die die normale Struktur und Funktion von Genen verändern, die in der gesunden Zelle Proliferations- oder Differenzierungsprozesse kontrollieren. Grundlage dieser Schlussfolgerung war die Erkenntnis, dass die Entwicklung eines Tumors auf genetischen Defekten basiert, worauf verschiedene Beobachtungen hinwiesen:

- es sind Tumorformen bekannt, die nach Mendelschen Gesetzen vererbt werden (KNUDSON, 1983);
- viele Neoplasien weisen spezifische Veränderungen im Genom auf (ROWLEY, 1984);
- Patienten mit einem gestörten DNA-Reparatursystem zeigen eine Prädisposition zur Krebsentwicklung (z.B. bei der Erbkrankheit Xeroderma pigmentosum; PONDER, 1980);
- viele Karzinogene induzieren Veränderungen in der DNA (AMES, 1979; KULOZIK *et al.*, 2000).

Die genetischen Veränderungen in Tumoren lassen sich grundsätzlich in zwei Typen untergliedern. Beim ersten Typ sind Gene durch Mutationen oder Fehlregulationen aktiv an der malignen Transformation beteiligt. Derartige Gene bezeichnet man als „Onkogene“. Beim zweiten Typ trägt der Verlust eines oder beider Allele eines Gens zur neoplastischen Transformation bei. Solche Gene werden „Tumorsuppressorgene“ genannt (WAGENER, 1996).

### **I.1.2 Onkogene**

Unter einem Onkogen versteht man ein Gen, das den malignen Phänotyp induzieren kann (SEYFFERT *et al.* 1998), es zeigt also eine dominante Wirkung auf die maligne Transformation. Zur Entdeckung der Onkogene führte die Beobachtung, dass neoplastisches Wachstum durch bestimmte retrovirale Gene hervorgerufen werden kann. Darüber hinaus zeigte sich, dass diesen viralen Onkogenen homologe Sequenzen auch im menschlichen Genom vorkommen. Diese Gene wurden daraufhin als zelluläre Onkogene bezeichnet (VARMUS, 1984; BISHOP, 1991; HUNTER, 1991). Weitere Untersuchungen ergaben, dass diese Gene nicht viralen Ursprungs sind, sondern bei der Exzision des Virusgenoms dem Wirtsgenom entnommen und in das Virusgenom integriert worden waren. Prototypen der

viralen Onkogene finden sich im Genom aller Wirbeltiere und werden als Proto-Onkogene bezeichnet. Bei einigen dieser Gene konnte eine Beteiligung an der Entstehung humaner Tumore nachgewiesen werden, so wurde z.B. für *c-MYC* eine auslösende Rolle beim Burkitt-Lymphom bewiesen (MAGRATH, 1990) und für *ABL* unter anderem eine Rolle bei chronisch myeloischer Leukämie (DE KLEIN *et al.* 1982).

Die Identifikation von Onkogenen beim Menschen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen:

- Klonierung von zellulären Äquivalenten retroviraler Onkogene aufgrund von Sequenzhomologien;
- Klonierung von Genen, die durch Insertionsmutagenese aktiviert wurden. Hierzu kommt es, wenn Retroviren ohne Onkogenesequenzen zufällig in das Wirtsgenom integriert werden und dadurch ein in der Nachbarschaft gelegenes Gen aktiviert wird, was zur malignen Transformation führt;
- Identifikation von transformierenden Genen in DNA-Transfektionsassays. Hierzu wird aus Tumorgewebe DNA gewonnen und in Testzellen eingeführt. Nimmt eine Zelle dabei ein DNA-Molekül auf, das aktivierte Onkogenesequenzen enthält, führt dies zur Transformation dieser Zelle, was morphologisch nachweisbar ist;
- Charakterisierung amplifizierter DNA-Sequenzen in Tumorzellen;
- Klonierung von Bruchpunkten tumorspezifischer Chromosomenanomalien (KULOZIK *et al.*, 2000).

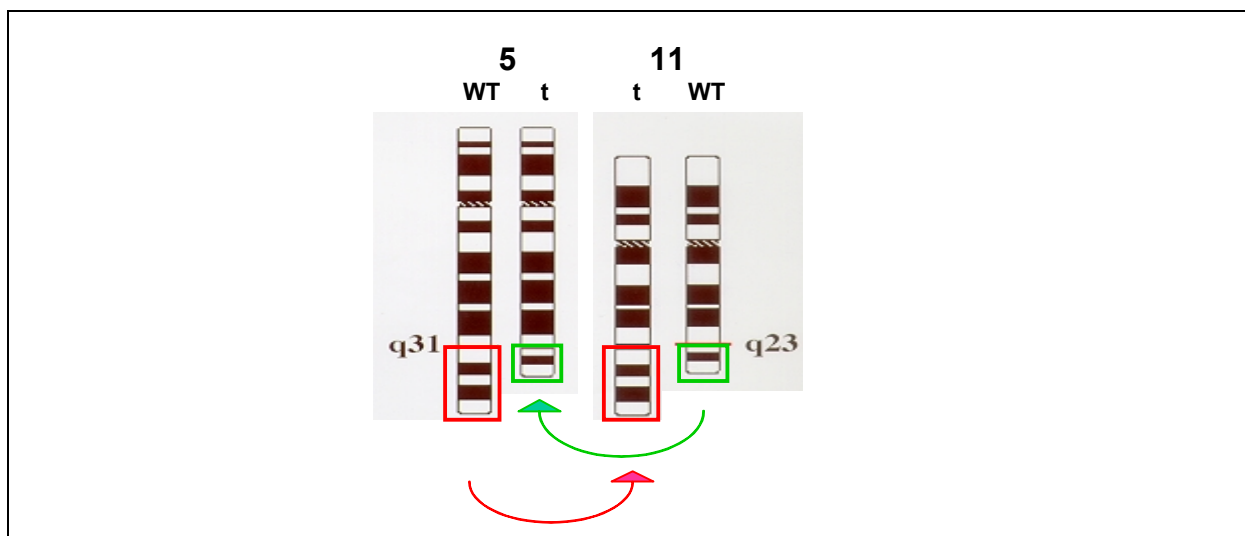
Die Aktivierung von Onkogenen kann dabei auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Durch Punktmutationen beispielsweise werden Vertreter der *RAS*-Genfamilie aktiviert, was sich besonders häufig bei soliden Tumoren, aber auch bei akuten lymphatischen Leukämien bei Kindern findet (BOS, 1989). Auch 15 bis 30% der myelodysplastischen Syndrome (MDS) bei Kindern weisen derartige Mutationen auf (LÜBBERT *et al.*, 1992).

Einen weiteren Mechanismus stellt die Amplifikation von Proto-Onkogenen dar. Die Aktivierung beruht hier auf der erhöhten Menge an Genprodukt, das von den zahlreichen zusätzlichen Genkopien ausgehend synthetisiert werden kann. Diese Form der Onkogen-Aktivierung findet man beispielsweise beim Neuroblastom, bei dem das *N-MYC*-Gen amplifiziert vorliegen kann. Dabei lässt das Ausmaß der Amplifikation auch Rückschlüsse auf das Stadium der Erkrankung und die Prognose für den Patienten zu (COWELL, 1982; BRODEUR *et al.*, 1984).

Die Entkopplung eines Proto-Onkogens von seinen Regulatorsequenzen durch Translokationen kann ebenfalls zu einer Aktivierung führen. So zeigen sich beim Burkitt-Lymphom regelmäßig Translokationen, die das *c-MYC*-Gen auf Chromosom 8 unter die

Kontrolle von Ig-Loci auf den Chromsomen 2, 14 und 22 bringen. Dadurch kommt es zu einer deregulierten *c-MYC*-Expression, die die maligne Transformation der Zellen auslöst (BOEHM *et al.*, 1989; RABBITS & BOEHM, 1991). Sowohl Amplifizierung als auch solch deregulierte Genexpression stellen sog. gain-of-function-Mutationen dar, da es zu einem Funktionszugewinn kommt.

Translokationen können aber auch die Expression eines Fusionsgens verursachen (siehe **Abb. I.1**). Hierzu kann es beispielsweise dann kommen, wenn die interchromosomale Rekombination innerhalb von Intron-Sequenzen der beteiligten Gene stattfindet, ohne die für den Spleißmechanismus notwendigen Erkennungssequenzen zu schädigen.



**Abb. I.1:** Mechanismus einer reziproken Translokation am Beispiel einer  $t(5;11)(q31;q23)$ . Chromosom 5 bricht in Bande q31, der distale Abschnitt (rot) wird auf Chromosom 11 übertragen, das in Bande q23 gebrochen war. Im Gegenzug wird der distale Abschnitt von Chromosom 11 (grün) auf Chromosom 5 übertragen. Die Translokation führt zur Entstehung des *MLL-GRF*-Fusionsgens.  
WT: Wildtyp; t: aberrantes Chromosom

Diese Fusionsproteine können einzigartige biochemische Fähigkeiten aufweisen, die keiner der Translokationspartner im Wildtyp zeigt, und so zur malignen Transformation der Zelle beitragen (CLEARY, 1991). Ein Beispiel hierfür ist das *MLL-ENL*-Fusionsprotein, das bei einer  $t(11;19)(q23;p13.1)$  in Fällen von AML gebildet wird. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein für die maligne Entartung der Zellen verantwortlich ist, nicht aber die beteiligten Partner allein (LAVAU *et al.*, 1997; SLANY *et al.* 1998).

Alternativ kann es aber durch eine Translokation auch nur zu einem Funktionsverlust der involvierten Gene kommen (loss-of-function-Mutationen). Handelte es sich bei einem der betroffenen Gene um einen Tumorsuppressor, kann dies die Entstehung einer Neoplasie bedingen.

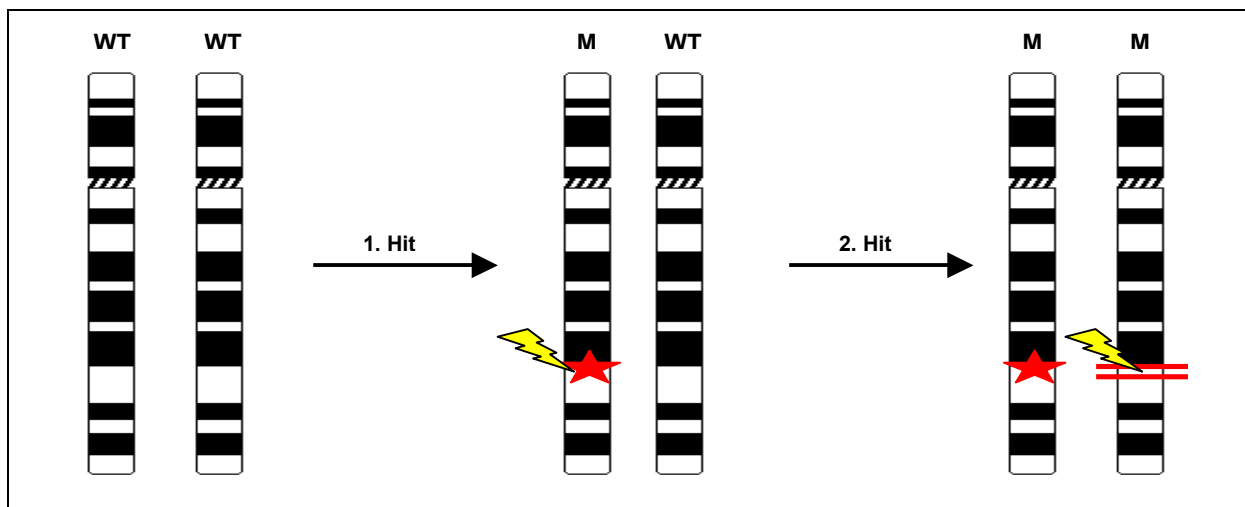
Auch ist es möglich, dass die Hypermethylierung des Promotors eines Tumorsuppressors zu dessen Expressions- und Funktionsverlust führt. Dies konnte beispielsweise für die Gene *RB* (OHTANI-FUJITA *et al.*, 1993; GREGER *et al.*, 1994), *VHL* (HERMAN *et al.*, 1994) und *p15INK4B* (HERMAN *et al.*, 1996) nachgewiesen werden.

### **I.1.3 Tumorsuppressorgene**

Als Tumorsuppressorgene werden Gene bezeichnet, die negativ regulierend auf Proto-Onkogene wirken (WEINBERG, 1991). Bei der Krebsentstehung sind diese Gene dadurch charakterisiert, dass ein Verlust ihrer Funktion (loss-of-function) zur neoplastischen Transformation der Zelle führt. Dabei unterscheidet ein wichtiges Charakteristikum Tumorsuppressorgene von Onkogenen: für das Tumorstadium muss der Funktionsausfall der Suppressorgene auf beiden Allelen eintreten, während die Aktivierung schon eines Allels der Onkogene Tumorstadium hervorruft (BORKHARDT, 2002). Zur Entdeckung der Tumorsuppressorgene führte die Beobachtung, dass einige Tumore durch spezifische chromosomale Deletionen charakterisiert sind. Dies stellte die Grundlage für die Hypothese dar, dass in den deletierten Bereichen Gene liegen, deren Verlust die Entstehung des Tumors begünstigt. Über Heterozygotitätsverlust-Analysen mit Hilfe eng benachbart liegender polymorpher DNA-Marker ist es möglich, den deletierten Bereich, der ein solches Gen enthält, auch auf submikroskopischer und somit mit herkömmlichen cytogenetischen Methoden nicht weiter analysierbarer Ebene einzugrenzen. Denn je näher ein solcher DNA-Marker am gesuchten Locus des Krankheitsgens liegt, desto häufiger ist er in Tumorgewebe homozygot deletiert. Ausgehend von diesen Markern kann dann benachbarte genomische DNA aus gesunden Zellen des gleichen Gewebes isoliert und als Sonde zur Hybridisierung mit mRNA in Northern Blots eingesetzt werden. Vergleicht man anschließend die Hybridisierungsmuster zwischen RNA aus krankem und gesundem Gewebe, kann man die Tumorsuppressor-mRNA durch ihr Fehlen im kranken Gewebe identifizieren (WAGENER, 1996).

Diese Methode wurde erstmals erfolgreich beim *RB*-Gen eingesetzt, das bei Retinoblastomen mutiert vorliegt (FRIEND *et al.*, 1987; FUNG *et al.*, 1987). Bei etwa 40% aller Kinder mit dieser Erkrankung liegt eine genetische Disposition vor, die Erkrankung wird autosomal-dominant vererbt. Bei den betroffenen Patienten treten die Retina-Tumore daher in beiden Augen auf und nicht, wie bei fehlender Disposition, nur in einem. Auf dieser Grundlage formulierte A.G. Knudson seine „Two Hit“-Hypothese, in der er postuliert, dass zwei

voneinander unabhängige Ereignisse für die neoplastische Transformation der Retinazelle verantwortlich sind (KNUDSON, 1971, **Abb. I.2**). Im Falle des *RB*-Gens würde dies bedeuten, dass ein Allel des Gens bei den Fällen mit genetischer Disposition bereits durch eine Keimbahnmutation defekt ist (COMINGS, 1973), das zweite Allel dann durch eine zusätzliche somatische Mutation seine Funktion verliert. In den Fällen ohne genetische Disposition wären hingegen zwei somatische Mutationen am *RB*-Locus in der gleichen Zelle für die Entwicklung des Tumors notwendig. Tatsächlich sind in allen untersuchten Retinoblastomen beide Allele des *RB*-Gens funktionsunfähig (LEE *et al.*, 1987).

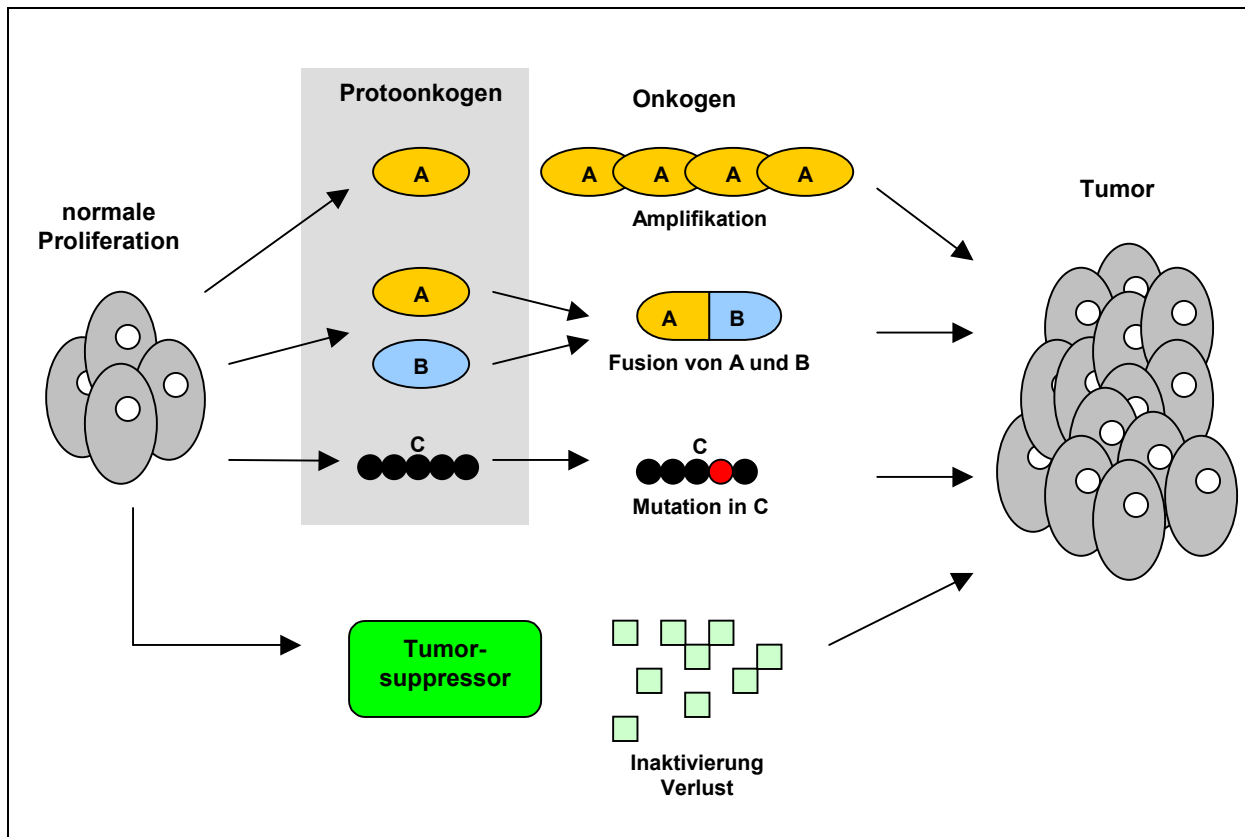


**Abb. I.2:** „Two Hit“-Hypothese nach Knudson (1971). In zwei voneinander unabhängigen Schritten mutieren beide Allele eines Gens nacheinander, wodurch es zum Funktionsverlust kommt. WT = Wildtyp; M = mutiert

Tumorsuppressorgene greifen auf verschiedenen Ebenen in die Signaltransduktionswege der Zelle ein, so z.B. als

- GTPase-stimulierende Proteine, die in den RAS-Signaltransduktionsweg eingreifen wie z.B. NF1 (INGRAM *et al.*, 2001);
- Proteinphosphatasen als Antagonisten zu Proteinkinasen, die in praktisch allen Signaltransduktionskaskaden eine zentrale Rolle spielen. Als Beispiel hierfür lässt sich PTEN nennen, die als Antagonist der PI3-Kinasen wirkt (SEMINARIO & WANGE, 2002);
- Inhibitoren von Kinasen, die den Zellzyklus vorantreiben (z.B. p16; ROCCO & SIDRANSKY, 2001);
- Transkriptionsfaktoren blockierende Proteine, z.B. RB (CHELLAPPAN *et al.*, 1991);
- Transkriptionsfaktoren wie p53 (LEVINE *et al.*, 1991; PRIVES, 1994);
- Antagonisten der RNA-Synthese wie VHL (YANG & KAELEN, 2001; KULOZIK *et al.* 2000).

Zusammenfassend lassen sich also vier grundlegende molekulare Mechanismen der Tumorentstehung postulieren, die **Abb. I.3** schematisch wiedergibt.



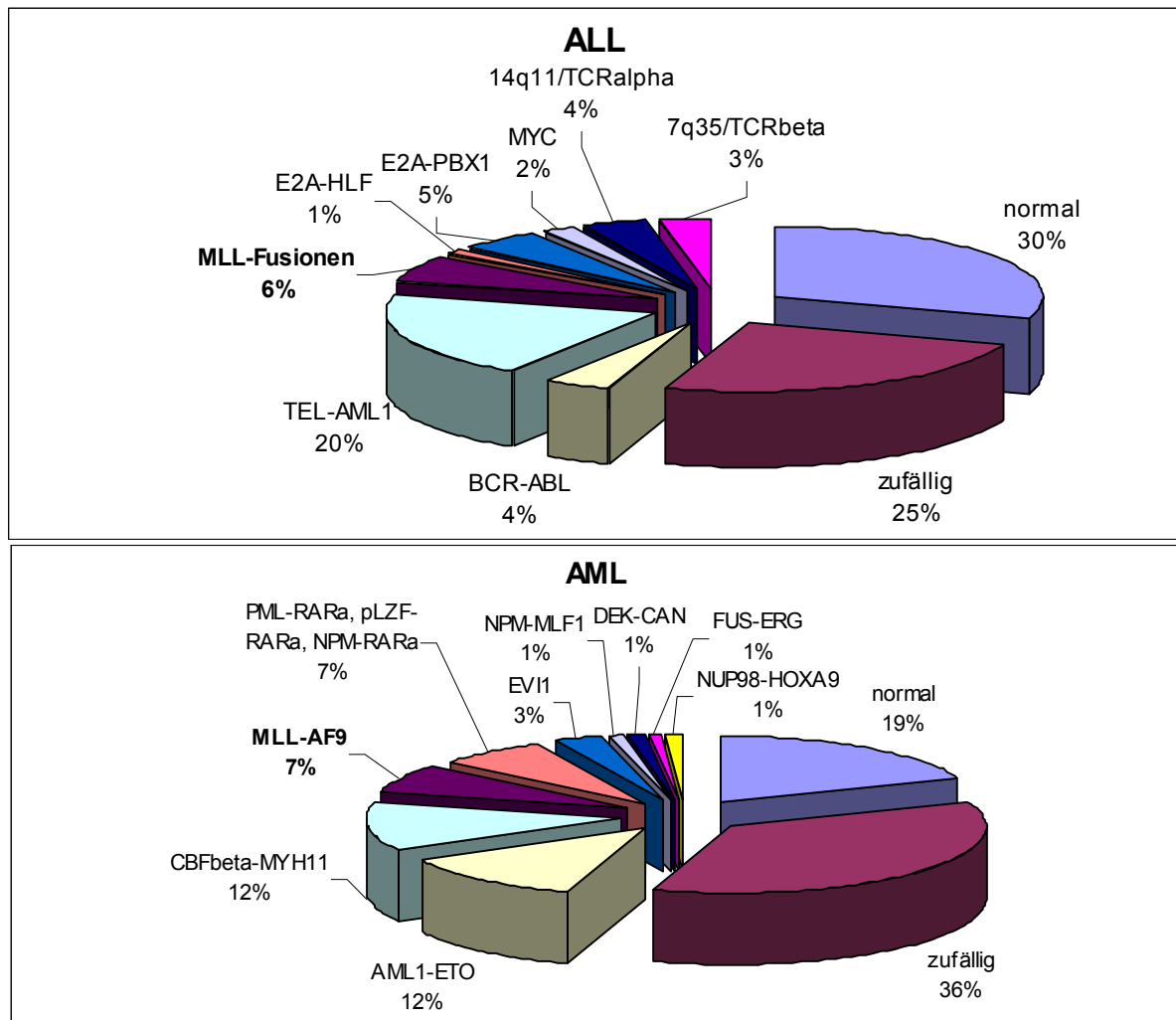
**Abb. I.3:** Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung (nach BORKHARDT, 2002)

#### I.1.4 Leukämien im Kindesalter und ihre molekularen Ursachen

Leukämien stellen mit 34,7% aller Fälle maligner Erkrankungen im Kindesalter die häufigste Krebsart in dieser Lebensphase dar. In 79% aller Fälle handelt es sich um akute lymphatische Leukämien (ALL), akute myeloische Leukämien (AML) findet man in 19% der Fälle und 2% aller erkrankten Kinder weisen eine chronische myeloische Leukämie auf (Deutsches Kinderkrebsregister 2000, <http://www.kinderkrebsregister.de>).

Bei den chromosomalen Aberrationen, die die Entstehung einer Leukämie nach sich ziehen, handelt es sich in 65% aller akuten Leukämien um Translokationen, die zur Fusion zweier Gene führen (LOOK, 1997). Diese Translokationen erfolgen nicht zufällig, vielmehr treten einige gehäuft auf und sind für einen bestimmten Leukämie-Typus charakteristisch (RABBITS, 1994). **Abb. I.4** verdeutlicht dies für die akuten Leukämien. Bei den durch die chromosomalen Aberrationen betroffenen Genen handelt es sich oftmals um Transkriptionsfaktoren, die zum Teil einen nachweislichen Einfluss auf die Hämatopoese

haben, wie für TAL1, AML1 und CBF $\beta$  durch Genmanipulation in Mäusen („knock out“-Mäuse) gezeigt werden konnte (SHIVADSANI & ORKIN, 1996).



**Abb. I.4:** Häufigkeit bestimmter Translokationen bei akuten Leukämien (nach LOOK, 1997)

Auffällig ist, dass sowohl bei akuten lymphatischen als auch bei akuten myeloischen Leukämien das *MLL*-Gen häufig in Translokationen involviert ist.

### I.1.4      *MLL*

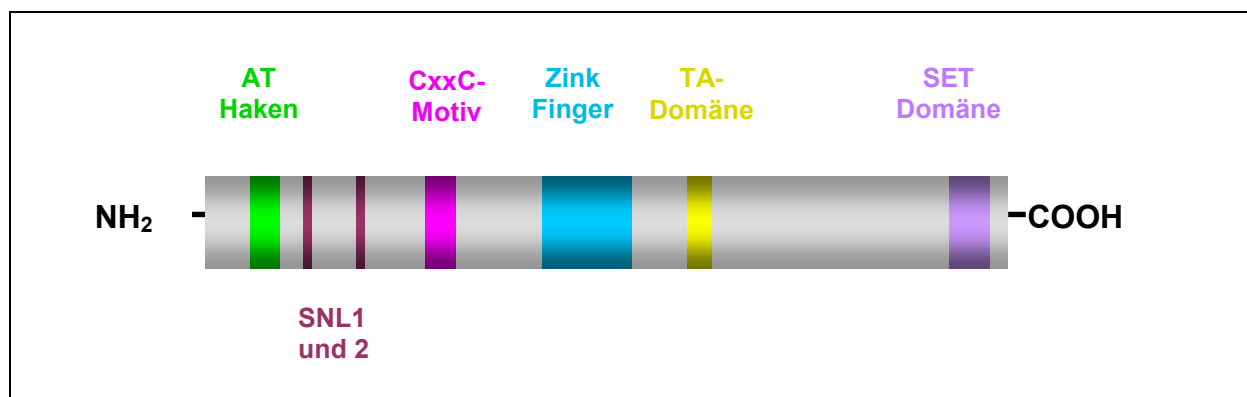
*MLL* (Synonyme: *ALL1*, *HRX*) steht für *Mixed Lineage Leukemia*, womit zum Ausdruck kommt, dass Beeinträchtigungen dieses Gens für die Entstehung akuter Leukämien unterschiedlicher Zellreihen verantwortlich sein können. Das Gen liegt auf Chromosom 11q23 und kodiert für ein Protein mit 3969 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 431kD (GenBank Accession NM\_005933 und NP\_005924). Es handelt es sich bei diesem Gen um das humane Homolog des *Drosophila trithorax*-Gens.

*Trithorax* gehört zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die Homeobox-Gene regulieren. Analysen hämatopoetischer Vorläuferzellen bei Mäusen und Menschen ergaben, dass die eine Homeobox enthaltenden Transkriptionsfaktoren der HOX-Gruppe eine funktionelle Rolle bei der Kontrolle des Wachstums und der zellreihenspezifischen Differenzierung während der Hämatopoese spielen (THORSTEINSDOTTIR *et al.*, 1997). Im humanen Genom finden sich Cluster von HOX-Genen, die große Ähnlichkeiten mit den HOM-C-Genen bei *Drosophila* aufweisen, wo sie den Segmentierungsplan der Fliege festlegen (MACONOCHE *et al.*, 1996). Im hämatopoetischen System werden diese Gene in einem Stadien- und Zellreihen-spezifischen Muster exprimiert, das strikt reguliert wird (SAHA *et al.*, 1998). Bei *Drosophila* wird der HOM-C-Genkomplex durch zwei Gruppen von Transkriptionsfaktoren reguliert. Eine negative Regulation, also eine Reprimierung der HOM-C-Genexpression, erfolgt durch Transkriptionsfaktoren, die der *polycomb*-Gruppe (PcG) angehören. Eine positive Regulation, d.h. eine Aufrechterhaltung des aktiven Zustands wird durch Mitglieder der *trithorax*-Gruppe (TrG) von Transkriptionsfaktoren erreicht (Simon, 1995). Auf dieser Grundlage wurde ein Modell entwickelt, nach dem die fortschreitende Differenzierung hämatopoetischer Zellen mit einer Abnahme der HOX-Genexpression einhergeht. Die Abnahme der Genexpression würde dabei durch eine dosisabhängige Interaktion der humanen Vertreter der PcG und TrG gesteuert. Dabei wäre der TrG-Komplex für die Aufrechterhaltung der Differenzierung zuständig, während der PcG-Komplex die Reprimierung von Zielgenen steuert (SAHA *et al.*, 1998). Dieses Modell bleibt jedoch spekulativ, da mit Ausnahme von *MLL* über die Funktion der Mitglieder des humanen TrG/PcG-Komplexes wenig bekannt ist (BROWN *et al.* 1998).

Obwohl *MLL* als humanes *trithorax*-Homolog somit möglicherweise eine Wirkung auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen ausübt, ist die Funktion des Wildtyp-*MLL*-Proteins für die myeloische Differenzierung einer Zelle nicht unbedingt notwendig. Allerdings könnte sie die Proliferation und/oder das Überleben multipotenter Vorläuferzellen ermöglichen (AYTON & CLEARY, 2001). Eine nicht unerhebliche Bedeutung von *MLL* für die Entwicklung weißer Blutzellen belegt die Beobachtung, dass ein Verlust der *MLL*-Funktion in erythroiden Zellen keinen Effekt auf Anzahl der Zellen und ihre Differenzierung zeigt, und *MLL* im gesamten erythroiden Entwicklungsweg nicht exprimiert wird (Hess *et al.*, 1997). Ein Problem bei der Untersuchung der *MLL*-Funktion stellt die Tatsache dar, dass homozygot *MLL*-defiziente Mäuse (knock out-Mäuse) embryonale Lethalität in einem frühen Entwicklungsstadium zeigen. Die betroffenen Embryonen weisen eine Vielzahl an Musterbildungsdefekten auf, was den Einfluss von *MLL* auf die *HOX*-Geneexpression

deutlich macht. Tatsächlich wird die Expression einer Reihe untersuchter HOX-Gene in diesen Embryonen korrekt initiiert, jedoch nicht aufrechterhalten, was für die durch die *HOX*-Gene gesteuerten Musterbildungsprozesse essenziell notwendig wäre (YU *et al.*, 1995 und 1998).

Die Wirkung von MLL als Transkriptionsfaktor schlägt sich auch in der Domänenstruktur des Proteins nieder (**Abb. I.5**). Nahe dem N-Terminus des Proteins finden sich drei AT-Haken, Proteinmotive, die eine Bindung an die kleine Furche AT-reicher DNA ermöglichen (TKACHUK *et al.*, 1992). Darüber hinaus dient dieses Motiv auch der Regulation, da es in Zellzyklus-abhängiger Weise phosphoryliert werden kann, wahrscheinlich durch die cdc2-Kinase (NISSEN *et al.*, 1991; REEVES *et al.*, 1991). Eine weitere typische Domäne für Transkriptionsfaktoren stellen die sog. Zink-Finger dar, Proteinmotive, die die Bindung an bestimmte DNA-Zielsequenzen ermöglichen. Ebenso findet sich eine Transaktivierungsdomäne (TA).



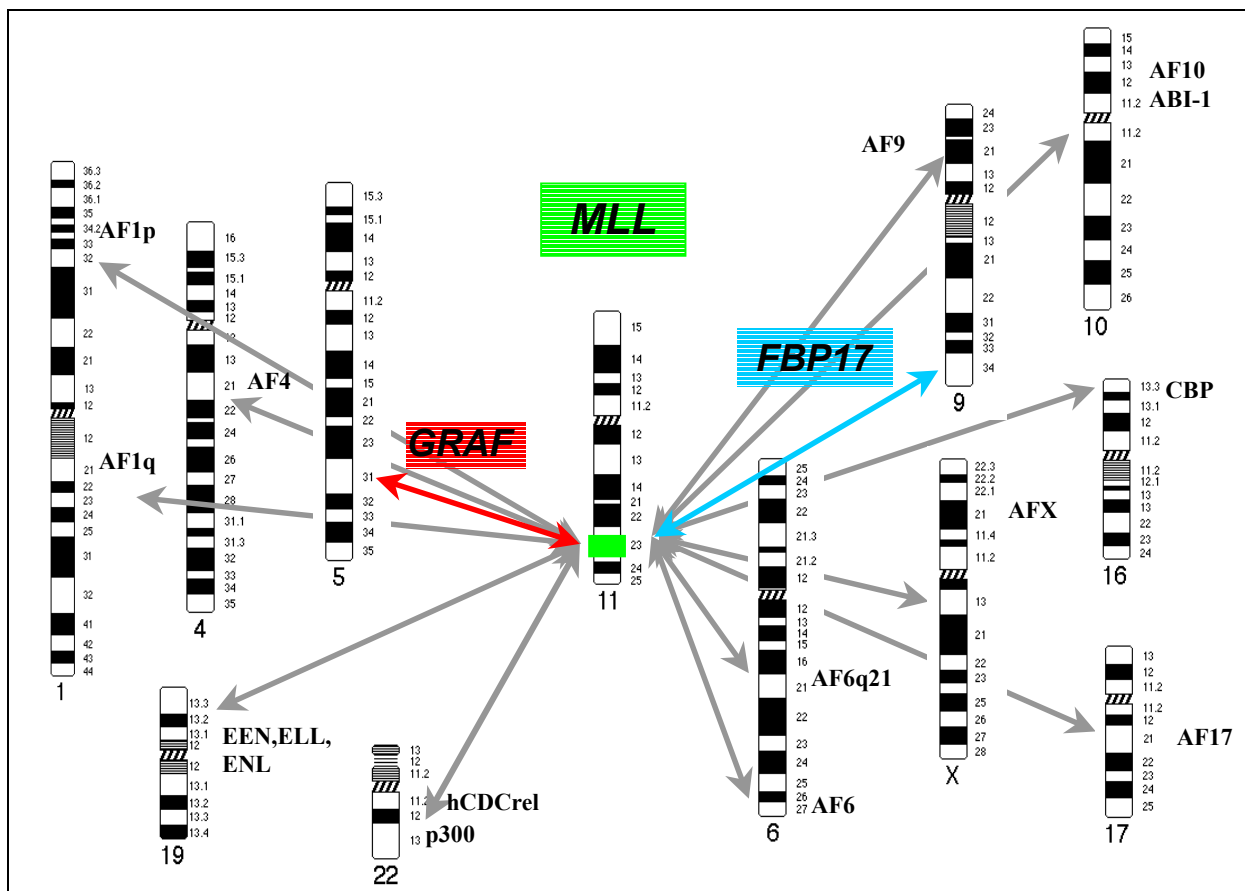
**Abb. I.5:** Domänenstruktur des MLL-Proteins.

Das CxxC-Motiv zeigt Sequenz-Homologien zu zwei Proteinen, die an Transkriptionsregulationsprozessen durch Methylierung beteiligt sind. Dabei handelt es sich um die DNA-Methyltransferase (DMT) und das Methylbindungsdomänenprotein 1 (MBD1; DOMER *et al.* 1993; CROSS *et al.*, 1997; HENDRICH & BIRD, 1998). Bei MLL konnten diesem Motiv transkriptionsreprimierende Eigenschaften zugeordnet werden (ZELEZNIK-LE *et al.*, 1994; PRASAD *et al.*, 1995). Neueste Untersuchungen ergaben, dass die CxxC-Domäne hohe DNA-Bindungsaktivität zeigt und ebenfalls Zink für eine effiziente DNA-Bindung benötigt (LEE *et al.*, 2001).

Darüber hinaus weist MLL noch eine Anzahl weiterer Domänen auf. Am C-Terminus befindet sich eine SET-Domäne, die sich häufig bei Proteinen findet, die als multifunktionale Chromatinregulatoren wirken, wie z.B. den Mitgliedern der PcG und TrG-Proteinfamilien

(JENUWEIN *et al.*, 1998). Bei einigen Proteinen mit SET-Domäne lässt sich eine Methyltransferase-Aktivität für diesen Bereich nachweisen, nicht jedoch bei MLL (REA *et al.*, 2000). Möglicherweise vermittelt die SET-Domäne hier Protein-Protein-Interaktionen, da dieses Motiv auch für Interaktionen mit einer Gruppe von Phosphatasen mit doppelter Spezifität (dsPTPasen) verantwortlich zu sein scheint, die eine Verbindung zu Signaltransduktionswegen für Wachstums- und Differenzierungsprozesse darstellen (CUI *et al.*, 1998). SNL schließlich steht für speckled nuclear localization. Diese Motive (SNL1 und SNL2) vermitteln eine bestimmte subnukleäre Lokalisation des MLL-Proteins und sind im Vergleich zum *Drosophila trithorax*-Protein hoch konserviert (YANO *et al.*, 1997).

Der *MLL*-Locus auf Chromosom 11q23 stellt eine sehr promiskuitive Region bei hämatologischen Neoplasien dar. Bislang sind über 40 Translokationen unter *MLL*-Beteiligung beschrieben, von denen nur ein Teil molekular charakterisiert ist (AYTON & CLEARY, 2001). **Abb. I.6** gibt eine kleine Auswahl dieser gut charakterisierten Translokationen und die involvierten Partnerproteine wieder.



**Abb. I.6:** *MLL* und eine Auswahl seiner Translokationspartner

Eine Besonderheit bei diesen Translokationen stellt die Tatsache dar, dass sie in allen bisher näher untersuchten Fällen zur Expression eines Fusionsproteins führen, da der Leserahmen der beteiligten Gene nicht verändert wird. Dabei bleiben in den Fusionsproteinen die AT-Haken, die SNL1- und 2-Motive sowie das CxxC-Motiv erhalten. Die Zinkfinger, die Transaktivierungsdomäne sowie die SET-Domäne gehen bei den Translokationen verloren, wodurch es zu einem Funktionsverlust im betroffenen *MLL*-Allel kommt (AYTON & CLEARY, 2001).

Die Proteine mit denen *MLL* in den verschiedenen Translokationen fusioniert wird, lassen sich in zwei Klassen einteilen, in nukleäre Proteine und in cytoplasmatische Proteine (AYTON *et al.*, 2001). *In vitro* konnten für die nukleären Partnerproteine transkriptionsaktivierende Fähigkeiten nachgewiesen werden, ihre *in vivo*-Funktionen sind jedoch überwiegend unklar (RUBNITZ *et al.*, 1994; PRASAD *et al.*, 1995; MA & STAUDT, 1996; SLANY *et al.*, 1998). Das cytoplasmatische Partnerprotein AF6 und die Transkriptionsfaktoren AFX und AF6q21 sind an Signalwegen beteiligt, die für Zellteilungsprozesse bzw. das Überleben der Zelle verantwortlich sind (KURIYAMA *et al.* 1996; OGG *et al.*, 1997; BRUNET *et al.*, 1999; KOPS *et al.*, 1999; MEDEMA *et al.*, 2000).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei neue *MLL*-Translokationspartner zu charakterisieren. Es handelte sich dabei um *GRAF* auf Chromosom 5q31 und *FBP17* auf Chromosom 9q34. Im Folgenden sollen diese beiden Proteine kurz vorgestellt werden.

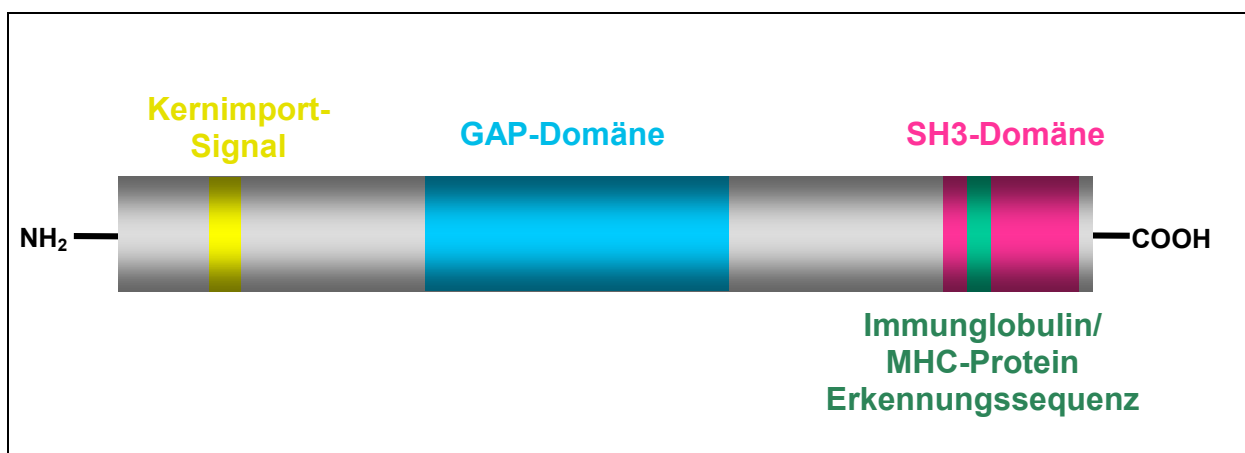
## **I.2 GRAF**

### **I.2.1 Das GRAF-Protein**

GRAF steht für GTPase Regulator assoziiert mit der fokalen Adhäsionskinase (FAK). Es handelt sich um ein überwiegend cytoplasmatisches Protein aus 759 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 82kD, das in geringerem Umfang auch nucleär lokalisiert sein kann (GenBank Accession Y10388 und CAA71414). Das *GRAF*-Gen wurde erstmals aus einer cDNA-Bibliothek des Huhns isoliert, da es in einem Co-Immunopräzipitations-Assay an die fokale Adhäsionskinase FAK binden konnte (HILDEBRAND *et al.*, 1996). FAK ist für die Verankerung des Actin-Cytoskeletts an der Zellmembran verantwortlich ist und verbindet die extrazelluläre Matrix mit dem Cytoskelett (BURRIDGE *et al.*, 1988). Die Interaktion erfolgt

über ein Prolin-reiches Motiv in FAK und eine SH3-Domäne in GRAF. GRAF besitzt eine GTPase aktivierende Domäne, die in der Lage ist, die intrinsische GTPase-Aktivität von RhoA und Cdc42 zu stimulieren, nicht jedoch diejenige von Rac1 oder Ras. Somit gehört GRAF zur Gruppe der GAP-Proteine, die als negative Regulatoren von Rho-Proteinfamilienmitgliedern wirken (McCORMICK, 1998). GRAF-Überexpression mit anschließender Immunfluoreszenz-Detektion zeigte eine deutliche Lokalisation des Proteins an Actin-Stressfasern und an kortikalem Actin. Datenbankrecherchen ergaben einen hohen Konservierungsgrad zwischen der GRAF-Sequenz des Huhns und der eines möglichen Homologons bei *Caenorhabditis elegans*, was auf ein hohes Maß an evolutionärer Konservierung und somit auf grundlegende regulative Funktionen des Proteins zurückschließen lässt. (HILDEBRAND *et al.*, 1996).

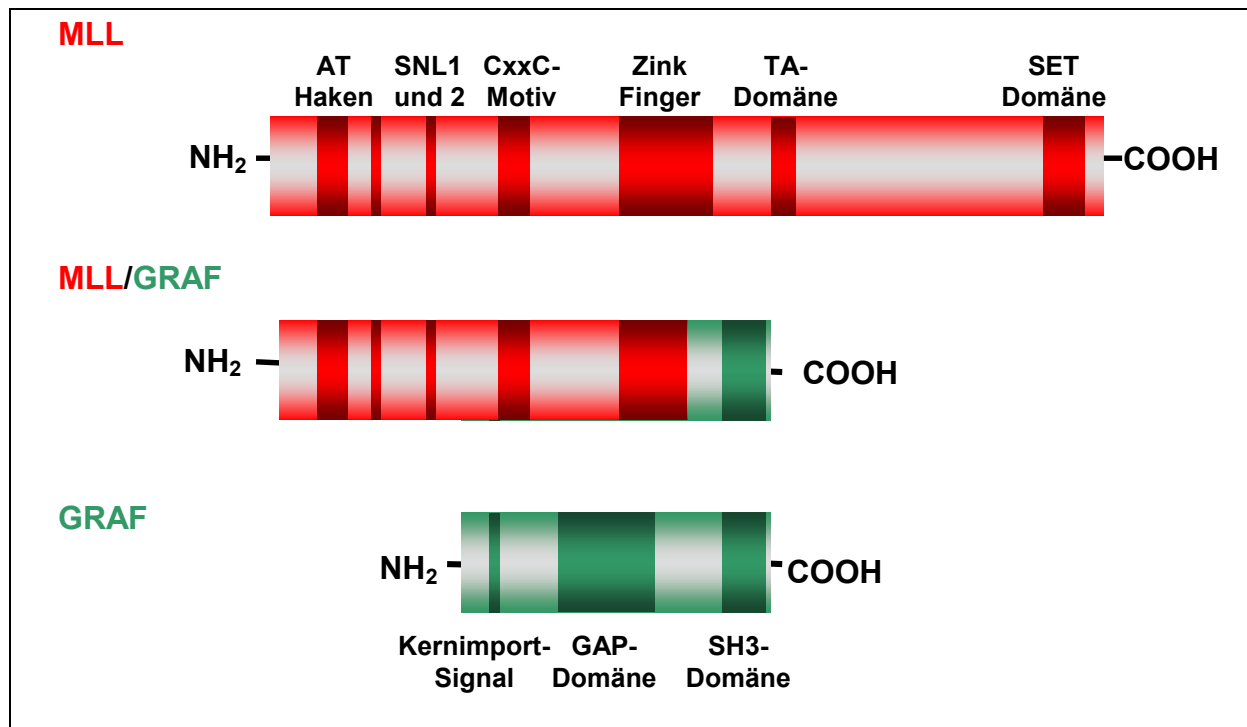
In unserem Labor gelang es, aus einer Knochenmarkspröbe eines Kindes mit einer juvenilen myelomonozytären Leukämie das humane *GRAF*-Gen als neuen Translokationspartner von *MLL* in einer t(5;11)(q31;q23) zu identifizieren (BORKHARDT, BOJESSEN *et al.*, 2000). Untersuchungen der *GRAF*-Expression ergaben, dass das Gen beim Menschen besonders stark in Herz, Hirn, Plazenta und epithelialen Geweben exprimiert wird, in Geweben des hämatopoetischen und Immunsystems hingegen nur schwach. Das Protein weist verschiedene funktionelle Domänen auf, so eine Kernimportsequenz, die bereits beim Huhn identifizierte GAP-Domäne und eine SH3-Domäne, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann (Abb. I.7).



**Abb. I.7:** Domänenstruktur des GRAF-Proteins

Das Protein findet sich vornehmlich im Cytoplasma, trotz der Kernimportsequenz ist nur ein geringer Teil im Nucleus nachweisbar.

Bei der Fusion mit *MLL* kommt es zur Expression eines Fusionsproteins, in dem von GRAF nur die SH3-Domäne als funktioneller Bereich erhalten bleibt. Von *MLL* bleiben die DNA-bindenden Domänen erhalten, die Transaktivierungsdomäne sowie die SET-Domäne gehen hingegen durch die Translokation verloren (**Abb. I.8**).



**Abb. I.8:** MLL/GRAF-Fusionsprotein im Vergleich zu MLL- und GRAF-Wildtyp-Proteinen

Auf eine mögliche Rolle von GRAF als Tumorsuppressor wies die Beobachtung hin, dass es bei einer Reihe von Patienten mit einer Deletion des langen Arms eines Chromosoms 5 zu Mutationen im zweiten GRAF-Allel gekommen war. Dabei zeigten sich Punktmutationen innerhalb der GAP-Domäne sowie Insertionen, die zu einer Leserahmenverschiebung mit vorzeitigem Stop-Codon führten (BORKHARDT, BOJESSEN *et al.*, 2000).

Ein Ziel der Arbeit war es, Aufschluss über das Potential des GRAF-Proteins als möglicher Tumorsuppressor zu erhalten. Hierzu sollte der physiologische Kontext des Proteins in der gesunden Zelle näher untersucht werden.

## I.2.2 Der GRAF-Promotor

Als Promotor eines Gens bezeichnet man die Umgebung des Transkriptionsstartpunktes (+1). In dieser Region befinden sich konservierte DNA-Sequenzmotive (z.B. die TATA-Box), an die spezifische Proteine binden, die die Bindung des Transkriptionskomplexes ermöglichen.

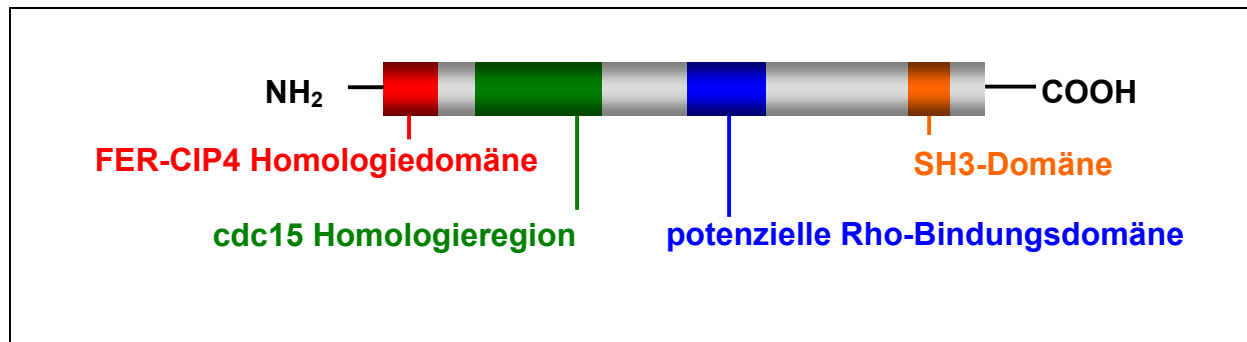
Als basalen Promotor bezeichnet man die Region zwischen -30 und +10, da hier alle generellen Transkriptionsfaktoren binden und so die Bindung der RNA-Polymerase II ermöglichen (SEYFFERT *et al.*, 1998). Daneben kann ein Promotor aber einen weitaus größeren Bereich umfassen und eine Vielzahl von Bindungsstellen für regulative Transkriptionsfaktoren besitzen.

Neben der Klonierung der GRAF-Gensequenz und der Bestimmung der Exon-Intron-Grenzen auf Ebene der genomischen DNA wurde auch der GRAF-Promotor identifiziert und sequenziert (BOJESSEN, 2000). Er umfasste einen Bereich von 1482bp, der sich direkt in 5'-Richtung an den Translationsstart ATG anschloss. Da Promotoren von essentieller Bedeutung für die Regulation der Genexpression sind, wurde der Promotor in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert. Um die funktionell relevanten Bereiche zu identifizieren, wurden Reporter-gen-Assays mit Deletionsmutanten durchgeführt.

### **I.3 FBP17**

In einem Fall einer akuten myeloischen Leukämie wurde ein komplexes chromosomales Rearrangement entdeckt, das nach Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen mit einer Vielzahl verschiedener Sonden als  $\text{ins}(11;9)(\text{q}23;\text{q}34)\text{inv}(11)(\text{q}13\text{q}23)$  identifiziert werden konnte. Diese Aberration betraf das *MLL*-Gen auf Chromosom 11q23 und ein bislang noch nicht als *MLL*-Fusionspartner beschriebenes Gen auf Chromosom 9q34. Das Gen wurde als das menschliche Formin bindende Protein 17 (FBP17)-Gen identifiziert (FUCHS, REHKAMP *et al.*, 2001).

FBP17 wurde erstmals im Rahmen eines umfangreichen Sequenzierungsprojektes von einer japanischen Arbeitsgruppe unter dem Namen KIAA0554 beschrieben (<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA0554>; GenBank Accession AB011126). Der mRNA-Sequenz fehlte das 5'-Ende und es wurde aus der restlichen Sequenz ein Protein von 674 Aminosäuren vorhergesagt. Datenbankanalysen ergaben verschiedene Domänen innerhalb der Proteinsequenz, die in **Abb. I.9** dargestellt sind.



**Abb. I.9:** Domänenstruktur von FBP17

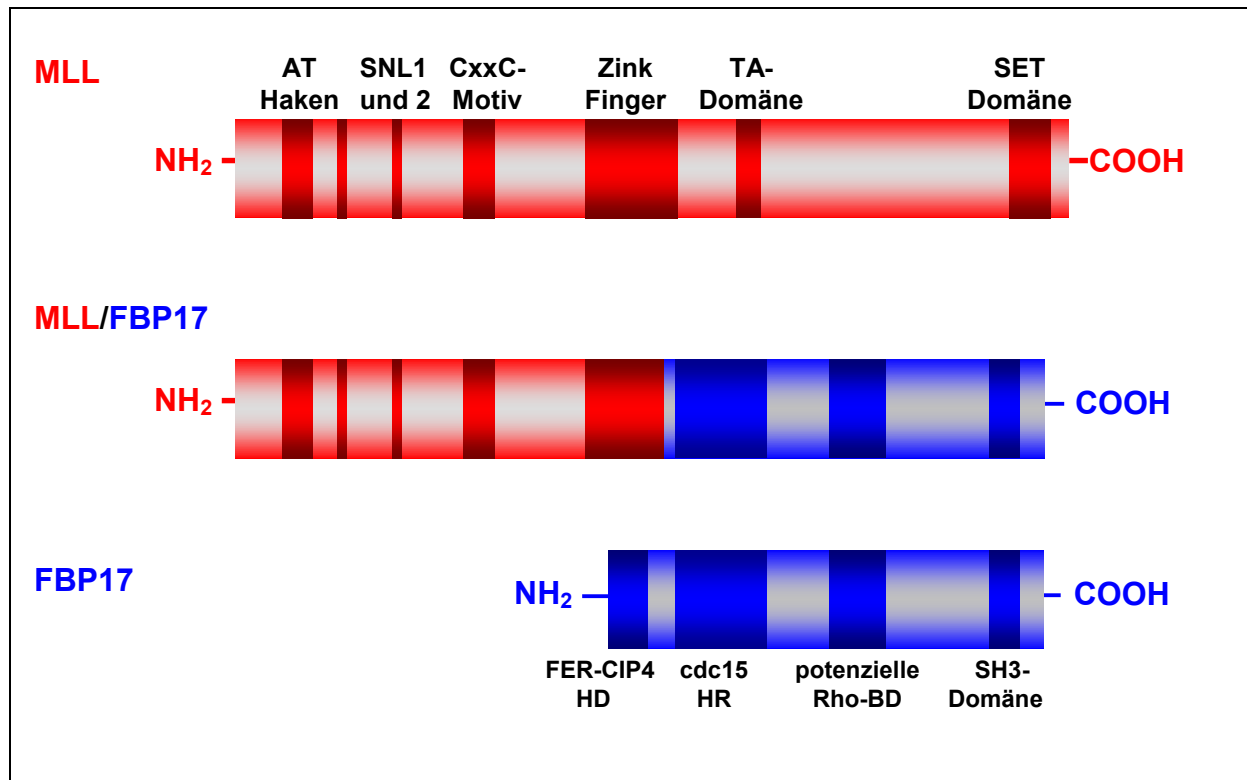
FBP17 besitzt an seinem N-Terminus eine FER/CIP-Homologiedomäne. Dabei handelt es sich um ein Strukturmotiv, das sich bei den Proto-Onkogenen FER und FES, beides Protein-Tyrosinkinasen, CIP4, einem Vermittler zwischen der cdc42 Kinase und Cytoskelett-Proteinen und weiteren Proteinen findet, die eine mögliche Regulationsfunktion auf die GTPase Rho ausüben (ASPENSTRÖM, 1997).

Einen Hinweis auf eine ähnliche Funktion von FBP17 ergab auch das Vorhandensein einer potenziellen Rho-Bindungsdomäne, die eine weitere Verbindung zwischen FBP17 und der Regulation von kleinen GTPasen nahe legt.

Die cdc15-Homologieregion wiederum zeigt eine hohe Übereinstimmung mit cdc15 (cell division control protein 15), einer essentiellen Proteinkinase im Zellzyklus, die in Hefen die Actin-Reorganisation während der Mitose reguliert (FANKHAUSER *et al.*, 1995).

An seinem C-Terminus verfügt das FBP17-Protein über eine SH3-Domäne, die Protein-Protein-Interaktionen durch Bindung an Prolin-reiche Sequenzen vermitteln kann (MORTON & CAMPBELL, 1994).

Auch bei dieser Fusion mit *MLL* kommt es zur Expression eines Fusionsproteins aus einem N-terminalen *MLL*-Anteil und einem C-terminalen FBP17-Anteil. Im Gegensatz zu der Fusion mit GRAF bleibt hierbei jedoch fast das gesamte FBP17-Protein erhalten, lediglich der N-Terminus mit der FER/CIP-Homologiedomäne geht im Fusionsprotein verloren (**Abb. I.10**).



**Abb. I.10:** MLL/FBP17-Fusionsprotein im Vergleich zu MLL- und FBP17-Wildtyp-Proteinen; HD = Homologiedomäne; HR = Homolgieregion; BD = Bindungsdomäne

## **I.4 Fragestellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es,

1. für die MLL-Fusionspartner GRAF und FBP17 Protein-Interaktionspartner zu ermitteln;
2. die für die Interaktion relevanten Proteindomänen zu bestimmen;
3. eine Charakterisierung des GRAF-Promotors durchzuführen;
4. den Einfluss von DNA-Methylierung und Chromatinstruktur auf die GRAF-Expression in Leukämie-Zelllinien zu untersuchen; sowie
5. die Rolle von GRAF in verschiedenen Signaltransduktionswegen zu analysieren.

## **II. Methoden**

Eine Auflistung der verwendeten Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Zelllinien findet sich im Anhang.

### **II.1 Bakterienkultur**

Bakterien wurden über Nacht bei 37°C in einem belüfteten Brutschrank auf LB-Agarplatten mit 60µg/ml des entsprechenden Antibiotikums angezüchtet. Zur Vermehrung von einzelnen Bakterienkolonien wurden 5 ml LB-Medium, dem das erforderliche Antibiotikum zugesetzt wurde (60µg/ml), mit der Kolonie beimpft und 16-18h bei 37°C und 250rpm inkubiert. Zur Erhaltung dieser Kultur wurden 600µl Bakteriensuspension mit 400µl Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert. Die so gelagerten Kulturen sind in der Regel 1 bis 2 Jahre haltbar.

**LB-Medium:**

10g Bactotrypton  
5g Hefeextrakt  
10g NaCl  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
autoklavieren

**Agarplatten:**

10g Bactotrypton  
5g Hefeextrakt  
10g NaCl  
15g Agar  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
autoklavieren

Für die Agarplatten das Medium auf ca. 50°C abkühlen lassen, benötigtes Antibiotikum zusetzen (60µg/ml) und in Kulturschalen füllen.

### **II.2 Kultur eukaryonter Zellen**

Eukaryonte Zelllinien wurden in einem eigenen Brutschrank in feuchter Atmosphäre unter 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. K562-Zellen wurden einmal pro Woche in frischem Medium 1:10 verdünnt. KMST6-Zellen wurden einmal, 293T-Zellen zweimal pro Woche trypsinisiert. Hierzu wurde das alte Medium verworfen, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und anschließend für 5min mit einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die Lösung wurde dann abgenommen, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und ebenfalls in frischem Medium 1:10 verdünnt. Da 293T-Zellen nur semiadhärent sind, lösen sie sich bei der Trypsinierung vom Boden der Kulturflasche. Die Zellsuspension wurde daher in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen bei 200xg für 8min abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Zur Erhaltung der Zelllinien wurden die Zellen einer 10ml-Kultur nach der Zentrifugation in 1ml Einfriermedium resuspendiert und in einem Kryoröhrchen in einem Styroporbehälter langsam bei -70°C eingefroren.

**10xPBS:**

80g NaCl  
2g KCl  
26,8g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
2,4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 7,4  
autoklavieren

**Einfriermedium:**

90% FCS  
10% DMSO

**DMEM:**

500ml Dulbecco's MEM  
mit Glutamax-I und Na-Pyruvat  
und 4500mg/l Glucose (Gibco)  
50ml FCS  
2,5ml Pen/Strep

**RPMI:**

500ml RPMI1640 (Gibco)  
50ml fötales Kälberserum (FCS)  
2,5ml Pen/Strep (Gibco)  
(10'000U Penicillin/ml,  
10'000µg Streptomycin/ml)  
5ml 200 mM L-Glutamin (Gibco)

**Eagles:**

500ml Minimal Essential Medium Eagles (Sigma)  
50ml FCS  
5ml Pen/Strep (Gibco)  
10ml 200mM L-Glutamin (Gibco)  
5ml 100 mM Na-Pyruvat (Gibco)

## **II.3 Arbeiten mit Nucleinsäuren**

### **II.3.1 Isolierung genomischer DNA**

(Camgen™ Mammalian Genomic Mini DNA Purification Kit, Whatman, nach Angaben des Herstellers)

Zur Isolation genomischer DNA aus kultivierten Zellen mittels Aussalzung (LAHIRI *et al.*, 1991) wurden  $5 \times 10^6$  Zellen bei 1500xg für 10min zentrifugiert und der Überstand komplett verworfen. Die Zellen wurden dann durch Pipettieren in 300µl Puffer GenI (10mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM KCl, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 2mM EDTA, 2,5% Nonidet P-40) lysiert. Anschließend wurden 300µl Puffer GenII zugegeben (10mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM KCl, 10mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,4M NaCl, 2mM EDTA, 0,7% SDS), durch Vortexen gemischt und für 30-60min bei 55°C inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden danach 150µl Puffer GenIII (6M NaCl) zugefügt und durch Invertieren gemischt. Die Lösung musste dann 10min bei RT inkubieren, wobei wiederholt gemischt wurde. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (20'000xg, 10min) pelletiert. Aus dem Überstand wurde die genomische DNA durch Zugabe von  $\frac{3}{4}$  Volumen 100% Isopropanol und mehrmaliges Invertieren gefällt. Nach Zentrifugation (20'000xg, 10min) wurde das DNA-Pellet mit 200µl 70% Ethanol gewaschen und 5-10min bei RT getrocknet. Die DNA wurde dann in 100µl 10mM Tris-HCl pH 7,6 mittels Inkubation bei 37°C gelöst.

### **II.3.2 Isolierung von RNA**

(TRIzol™, Gibco, nach Angaben des Herstellers)

In Suspension gewachsene Zellen wurden durch Zentrifugation (1500xg, 10min) geerntet, mit 1ml TRIzol pro  $5-10 \times 10^6$  Zellen versetzt und durch wiederholtes pipettieren lysiert. Die so

homogenisierten Proben wurden 5min bei RT inkubiert, um eine komplette Dissoziation der Nucleoprotein-Komplexe zu erlauben. Anschließend wurden die Proben mit 0,2ml Chloroform pro 1ml eingesetztem TRIzol versetzt, 15s geschüttelt und 2-3min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (maximal 12'000xg, 4°C, 15min) wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der RNA mit 0,5ml 100% Isopropanol pro 1ml eingesetztem TRIzol gemischt. Nach Inkubation bei RT für 10min wurden die Proben erneut zentrifugiert (maximal 12'000xg, 4°C, 10min) und das RNA-Pellet anschließend mit 75% Ethanol (1ml pro 1ml TRIzol) gewaschen. Hierzu wurden die Proben durch vortexen gemischt und abzentrifugiert (7500xg, 4°C, 5min). Das Pellet musste anschließend 5-10min offen trocknen und wurde dann in RNase-freiem Wasser durch mehrmaliges pipettieren und Inkubation bei 60°C für 10min gelöst.

### **II.3.3 cDNA-Synthese**

(Superscript™ First Strand Synthese System für RT-PCR, Gibco, nach Angaben des Herstellers)

Zur Herstellung von cDNA als Template für PCR-Anwendungen wurde das Superscript First Strand Synthese-System der Firma Gibco verwendet, das ursprünglich mit der reversen Transkriptase Superscript, seit 2001 jedoch mit dem Enzym SuperscriptII vertrieben wird. Ein 20µl cDNA-Synthese-Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

|      |                                    |
|------|------------------------------------|
| 10µl | RNA (500ng)                        |
| 1µl  | Random Primer Hexamer (100pmol/µl) |
| 1µl  | dNTPs (10mM)                       |

Dieser Mix wurde gevortext, 5min bei 65°C inkubiert und anschließend 1min auf Eis gekühlt. Dies diente der Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA. Dem Ansatz wurde dann hinzugefügt:

|     |                                                                                       |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 4µl | 5x First Strand Buffer<br>(250mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl <sub>2</sub> ) |
| 2µl | DTT (0,1M)                                                                            |
| 1µl | RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/µl)                                  |
| 1µl | Superscript bzw. SuperscriptII (200U/µl)                                              |

Die Synthese wurde im Thermocycler mit folgendem Inkubationsprogramm durchgeführt:

|      |       |
|------|-------|
| 25°C | 10min |
| 42°C | 50min |
| 70°C | 15min |

Der letzte Inkubationsschritt bei 70°C diente der Inaktivierung des Enzyms. Die so gewonnene cDNA konnte direkt in PCR-Anwendungen eingesetzt werden.

### **II.3.4 PCR**

(MULLIS *et al.*, 1986; SAIKI *et al.*, 1988)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine einfache Methode, in einem zellfreien System DNA exponentiell zu vervielfältigen. Dazu werden zwei kurze DNA-Stücke benötigt, die sog. Primer, die mit einer komplementären Sequenz denaturierter Ausgangs-DNA, dem Template, einen Doppelstrang bilden können (Annealing). Die Primer müssen gegenläufig sein und das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren. Sie stellen das für die Funktion der DNA-Polymerase notwendige freie 3'-Ende zur Verfügung, von dem ausgehend das Enzym DNA polymerisieren und so den Primer verlängern kann (Extension). Nach erneuter Denaturierung des Doppelstranges kann dieser Vorgang zyklisch wiederholt und das Template somit in einem 50µl-Ansatz nach folgendem Protokoll vervielfältigt werden:

|          |                                                          |
|----------|----------------------------------------------------------|
| 5µl      | 10x PCR-Puffer                                           |
| 4µl      | dNTPs (10mM gesamt)                                      |
| (1,5µl   | MgCl <sub>2</sub> [50mM], falls für das Enzym notwendig) |
| 1µl      | Primer 1 (20µM)                                          |
| 1µl      | Primer 2 (20µM)                                          |
| 2,5U     | DNA-Polymerase                                           |
| 50-100ng | DNA-Template                                             |
| ad 50µl  | H <sub>2</sub> O                                         |

PCR-Parameter:

|             |         |      |                 |
|-------------|---------|------|-----------------|
| 1. Schritt: | 2-10min | 94°C |                 |
| 2. Schritt: | 30-60s  | 94°C | (Denaturierung) |
| 3. Schritt: | 30-60s  | X°C  | (Annealing)     |
| 4. Schritt: | Xmin    | 72°C | (Extension)     |
| 5. Schritt  | 10min   | 72°C |                 |

Schritte 2-4 wurden dabei 25-35 mal wiederholt. Die Annealing-Temperatur war abhängig von den verwendeten Primern und lag mindestens 5°C unter dem durch ihren GC-Gehalt festgelegten Schmelzpunkt. Die Extensionszeit musste auf das zu amplifizierende Fragment abgestimmt werden und betrug bei der Verwendung von Taq-Polymerase 1min pro kb Fragmentlänge, bei Verwendung anderer Polymerasen 2min pro kb Fragmentlänge. Der letzte Schritt diente der Komplettierung unvollständiger Fragmente.

### **II.3.5 Agarose-Gelelektrophorese**

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Zur Analyse und Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Hierbei wurde Agarose in 1xTAE in einer Konzentration von 1-2,5% (w/v) durch aufkochen gelöst und in entsprechende Gelschlitten gegossen. Zur Analyse von PCR-

Produkten wurden 5-8µl des PCR-Ansatzes mit 2µl 5xTAE-Auftragspuffer versetzt. Bei jedem Gel wurden in der ersten Spur kommerziell erhältliche Längenstandards mitgeführt, um eine Abschätzung der Fragmentlänge zu ermöglichen. Die Elektrophorese erfolgte in 1xTAE bei 90-140V für 1-1,5h, abhängig von der Größe des Gels und der angestrebten Auflösung. Zur Färbung der DNA wurden die Gele für 10min in eine Ethidiumbromid-Lösung (10mg/l) überführt und anschließend für weitere 10 min in ddH<sub>2</sub>O entfärbt. Analytische Gele wurden dann auf einem UV-Transilluminator bei  $\lambda=254\text{nm}$ , präparative Gele bei  $\lambda=320\text{nm}$  betrachtet und fotografiert.

**50xTAE:**

242g Tris  
100ml 0,5M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0)  
57,1ml Eisessig  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
autoklavieren

**5xTAE-Auftragspuffer:**

10ml 50xTAE  
50ml Glycerin  
0,1% Bromphenolblau  
ddH<sub>2</sub>O ad 100ml

### **II.3.6      Aufreinigung von DNA**

(GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham, nach Angaben des Herstellers)

***Aufreinigung aus einer Lösung:***

PCR-Produkte und DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau wurden mit Hilfe von Glasfaser-Zentrifugensäulchen aufgereinigt. Hierzu wurden bis zu 100µl PCR- oder Restriktionsansatz mit 500µl Capture-Puffer versetzt, auf eine GFX-Säule in einem Sammelgefäß pipettiert und 1min inkubiert. Die Säule wurde dann mit 12'000xg für 30s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 500µl Waschpuffer (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 80% Ethanol) wurde die Säule erneut zentrifugiert und der Durchfluss wiederum verworfen. Die leere Säule wurde dann nochmals zentrifugiert, in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und die DNA nach Zugabe von 30-50µl nucleasefreien Wassers und Inkubation für 1min durch Zentrifugation bei 12'000xg für 2min eluiert.

***Aufreinigung aus einem Agarose-Gel:***

Zur Aufreinigung von DNA aus einem Agarose-Gel wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel auf einem UV-Transilluminator bei  $\lambda=320\text{nm}$  mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, in ein zuvor gewogenes Reaktionsgefäß überführt und erneut gewogen. Pro 10mg Gelstück wurden 10µl Capture-Puffer zugefügt, gevortext und für 5-15min bei 60°C inkubiert, bis sich das Gelstück vollständig gelöst hat. Die Lösung wurde auf eine GFX-Säule übertragen (600µl Lösung pro Säule) und wie oben beschrieben gereinigt.

### **II.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA**

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

DNA- und RNA-Konzentrationen entsprechender Lösungen sowie die Reinheit der Proben wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Die Messungen erfolgten bei  $\lambda=230\text{nm}$ , 260nm, 280nm und 320nm in einer kein UV-Licht absorbierenden Quarzküvette mit einer Schichtdicke von  $d=1\text{cm}$ . Für die Konzentrationsbestimmung wurde folgende Formel herangezogen:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times n \times f$$

mit    c        = Konzentration der Ausgangslösung  
      OD<sub>260</sub> = optische Dichte bei  $\lambda=260\text{nm}$   
      n        = Eichfaktor: 50 für dsDNA, 40 für ssRNA  
      f        = Verdünnungsfaktor

Der bei  $\lambda=230\text{nm}$  gemessene Wert gibt Aufschluss über den Salzgehalt der Lösung, die Extinktion bei  $\lambda=280\text{nm}$  gibt den Proteingehalt wieder, der Wert bei  $\lambda=320\text{nm}$  weist auf sonstige Verunreinigungen hin.

Betrag der Quotient  $OD_{260}/OD_{280} = 1,6-1,8$ , so war die DNA-Lösung ausreichend gereinigt.

### **II.3.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen**

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Restriktionsendonukleasen sind eine Gruppe bakterieller Enzyme, die sequenzspezifisch doppelsträngige DNA hydrolytisch spalten können (ARBER, 1974). Dabei zeigen die einzelnen Enzyme unterschiedliche Effizienzen, benötigen unterschiedliche Reaktionsbedingungen, was bei der Auswahl des entsprechenden Puffers berücksichtigt werden muss und können zusätzlich auch Exonuclease-Aktivität zeigen. Da eine Einheit eines Restriktionsenzym laut Definition 1 $\mu\text{g}$  DNA in einer Stunde bei 37°C schneiden kann, wurde zur Gewährleistung eines vollständigen Verdaus die 10fache Enzymmenge in einen Restriktionsansatz eingesetzt. Daraus ergibt sich beispielsweise für den Verdau von 10 $\mu\text{g}$  eines Plasmid-Vektors folgender Restriktionsansatz:

|                     |                        |
|---------------------|------------------------|
| 10 $\mu\text{g}$    | DNA                    |
| 5 $\mu\text{l}$     | 10x Restriktionspuffer |
| 100U                | Restriktionsenzym      |
| ad 50 $\mu\text{l}$ | H <sub>2</sub> O       |

Bei gleichzeitigem Verdau mit zwei Restriktionsenzymen durfte die Gesamtmenge des eingesetzten Enzyms 10% des Reaktionsansatzes nicht übersteigen. Der Restriktionsansatz wurde dann bei 37°C inkubiert, wobei sich die Inkubationszeit nach den verwendeten

Restriktionsenzymen richtete. Bei Einsatz von EcoRI durfte eine Dauer von 3h nicht überschritten werden, da das Enzym laut Hersteller danach Exonucleaseaktivität zeigt.

Zur Analyse von Klonierungsergebnissen wurde ein vereinfachtes Protokoll angewendet. Hierzu wurden 4µl der DNA-Präparation mit 4µl H<sub>2</sub>O, 1µl Puffer und insgesamt 1µl Restriktionsenzymen versetzt. Der Gesamtansatz konnte dann nach Inkubation bei 37°C für 3h zur Analyse auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden.

### **II.3.9 Klonierung**

#### ***Klonierung mittels Restriktionsenzymen:***

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Zur zellgestützten Klonierung wurden gereinigte PCR-Produkte und Plasmide mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten, so dass die entstehenden überhängenden Enden einander komplementär waren und eine gerichtete Klonierung des PCR-Fragments in den Vektor erlaubten. Der Vektor wurde dann gereinigt und dephosphoryliert, um eine Rezirkularisierung im anschließenden Ligationsschritt zu unterbinden. Hierzu wurde der Vektor mit CIP-Phosphatase behandelt:

|         |                             |
|---------|-----------------------------|
| Xµl     | geschnittener Vektor (10µg) |
| 5µl     | 10x Reaktionspuffer         |
| 1µl     | CIP-Phosphatase (10U/µl)    |
| ad 50µl | H <sub>2</sub> O            |

Dieser Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert und anschließend aufgereinigt. Nach Konzentrationsbestimmung der gereinigten Inserts und des Vektors wurde berechnet, wie viel Insert für die Klonierung benötigt wird:

$$X \text{ ng} = (100 \text{ ng} \times A \times B \text{ bp}) : C \text{ bp}$$

|     |   |                                      |
|-----|---|--------------------------------------|
| mit | X | = benötigte Insertmenge in ng        |
|     | A | = molares Verhältnis Insert : Vektor |
|     | B | = Insertlänge in bp                  |
|     | C | = Vektorlänge in bp                  |

Für die meisten Klonierungen erwies sich ein molares Verhältnis Insert : Vektor von 5:1 als erfolgreich, wenn Wiederholungsversuche notwendig wurden, wurde das Verhältnis auf 8-10:1 erhöht. Zur Ligation wurde T4-DNA-Ligase eingesetzt:

|         |                                                          |
|---------|----------------------------------------------------------|
| 200ng   | Vektor (Geschnitten und dephosphoryliert)                |
| Xµl     | Insert (abhängig von Konzentration und benötigter Menge) |
| 1µl     | 10x Ligasepuffer                                         |
| 1µl     | Ligase                                                   |
| ad 10µl | H <sub>2</sub> O                                         |

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und bei Verwendung der EpicurianColi™-Zellen der Firma Stratagene mit 1µl β-Mercaptoethanol pro 50µl Zellsuspension für 10min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der gesamte gekühlte Ligaseansatz zu 50µl der Zellsuspension pipettiert. Die Zellen wurden nun 30min auf Eis inkubiert, danach für 60s einem Hitzeschock bei 42°C (EpicurianColi: 54°C) unterzogen und erneut 2min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 250µl SOC-Medium (EpicurianColi: 150µl LB-Medium) zugegeben und die Zellen für 1h bei 37°C und 230rpm inkubiert. Nachdem die Zellen nun in der Lage waren, die eingeführten Resistenzgene zu exprimieren, wurden sie abzentrifugiert, der Überstand bis auf 50µl abgenommen, das Pellet im restlichen Medium resuspendiert und auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

Sollte ein Blau/Weiß-Screening der Klone ermöglicht werden, wurden die Platten zuvor mit einer Mischung aus 88µl X-Gal (50mg/ml) und 2µl IPTG (200mg/ml) behandelt und mindestens 30min trocknen gelassen.

**SOC-Medium:**

20g Bactotrypton  
5g Hefeextrakt  
0,5g NaCl  
2,5ml 1M KCl  
20ml 1M Glucose  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 7  
autoklavieren

***TOPO™-Klonierung:***

(SHUMAN, 1994)

Beim TOPO-Klonierungssystem der Firma Invitrogen trägt der linearisierte Vektor pCRII bzw. pcDNA3.1/NT-GFP an 3'-überhängenden T-Resten Topoisomerase I. Da Taq-amplifizierte PCR-Produkte 3'-überhängende A-Reste besitzen bzw. diese nachträglich an PCR-Produkte durch Inkubation für 10min mit Taq und dATP bei 72°C angefügt werden können, lagern sich Vektor und Insert zusammen und nach 5min Inkubation bei RT ist die Ligation abgeschlossen. Dieses System lässt jedoch nur ungerichtete Klonierungen zu, weshalb für gerichtete Klonierungen der Vektor pcDNA3.1D/V5-His eingesetzt wurde. Dieser trägt an einem Ende einen 5'-Überhang mit der Sequenz 3'-GTGG-5'. Fügt man die hierzu komplementäre Sequenz mittels eines entsprechenden PCR-Primers an das Insert an, erfolgt die Ligation gerichtet. Die Transformation der Ligaseansätze in TOP10 oder TOP10F' erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll.

### **II.3.10 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini-, Midi- und Maxipräparationen)**

#### ***Minipräparationen:***

(E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit, PeqLab, nach Angaben des Herstellers)

Das verwendete Präparationssystem kombiniert eine modifizierte alkalische Lyse mit der selektiven und reversiblen DNA-Bindungseigenschaft einer Silikamembran. 5ml-LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum wurde mit einer *E.coli*-Kolonie oder 12,5µl Dauerkultur beimpft und über Nacht bei 37°C und 250rpm inkubiert. Die Zellen wurden dann in 2ml Reaktionsgefäßen durch Zentrifugation (10'000xg, 1min) pelletiert und in 250µl Lösung I, die mit RNase A versetzt wurde, resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden nun 250µl Lösung II zugegeben und 5min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde danach mit 350µl Lösung III neutralisiert und das Präzipitat abzentrifugiert (10'000xg, 10min). Der Überstand wurde auf die Zentrifugensäulen in Sammelröhrchen überführt und für 1min bei 10'000xg zentrifugiert. Nach dem Waschen der Säule mit 500µl HB-Puffer und 750µl DNA-Waschpuffer wurde die Säule nochmals trocken zentrifugiert (jeweils 10'000xg, 1min). Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt, 30-50µl nucleasefreies Wasser zugegeben und für 2min bei 10'000xg zentrifugiert.

#### ***Midipräparationen:***

(Qiagen<sup>®</sup> Plasmid MidiKit, Qiagen, nach Angaben des Herstellers)

5ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer einzelnen Kolonie oder 12,5µl einer Dauerkultur beimpft und 8h bei 37°C und 250rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 50ml frisches Medium überführt und über Nacht unter den gleichen Bedingungen geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000xg und 4°C für 15min geerntet und das Pellet in 4ml Puffer P1 resuspendiert. 4ml Puffer P2 wurden zur Lyse der Bakterien zugegeben, die Lösung durch invertieren gemischt und 5min bei RT inkubiert. Im anschließenden Neutralisierungsschritt wurden 4ml gekühlter Puffer P3 hinzugefügt, wiederum durch invertieren gemischt und die Lösung 15min auf Eis inkubiert. Das ausfallende Präzipitat wurde danach bei 20'000xg und 4°C für 30min abzentrifugiert. Währenddessen wurde eine Quiagen-tip100-Anionenaustauscher-Säule mit 4ml Puffer QBT äquilibriert und anschließend der Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Säulenmatrix wurde danach zweimal mit je 10ml Puffer QC gewaschen und die DNA abschließend mit 5ml Puffer QF eluiert. Das Eluat wurde auf saubere Reaktionsgefäße verteilt und die DNA mit jeweils 0,7 Volumen 100% Isopropanol durch vortexen und anschließende Zentrifugation

(15'000xg, 4°C, 30min) gefällt. Das DNA-Pellet wurde schließlich mit 70% Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in insgesamt 100µl TE pH 7,5 gelöst.

**10xTE:**

100mM Tris-HCl, pH 7,5

10mM EDTA

autoklavieren

***Maxipräparationen:***

(SAMBROOK *et al.*, 1989)

Zur Isolation von Plasmid-Bibliotheken wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Auch bei dieser Präparationsmethode handelte es sich um eine modifizierte alkalische Lyse. 1l einer über Nacht angezüchteten Bakteriensuspension wurde bei 4000rpm abzentrifugiert. Pro 0,5-1ml Zellpellet wurden 5ml GTE zugegeben und die Zellen hierin resuspendiert. Nach Zugabe von 10ml Lösung 2 (pro 5ml GTE) zur Lyse der Zellen wurde die Lösung mehrmals invertiert und 5min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 5ml Lösung 3 wurde wiederum durch invertieren gemischt und die Lösung für 15min auf Eis inkubiert. Dabei bildete sich ein weißes Präzipitat, das für 15min bei 6000rpm abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde durch 5 Lagen Mullbinde filtriert. Zu dieser DNA-Lösung wurde das gleiche Volumen 100% Isopropanol zugegeben, durch vortexen gemischt und 10min auf Eis inkubiert. Das hierdurch gefällte DNA/RNA/Protein-Gemisch wurde dann durch Zentrifugation bei 6000rpm für 15min pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde es in 1ml TE pH 8,0 gelöst und mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol durch Schütteln für 15s extrahiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 15'000xg und 4°C wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase zur Fällung der Nucleinsäuren mit 1/20 Volumen LiCl (8M) und 1 Volumen 100% Isopropanol versetzt, gevortext und 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 30min bei 15'000xg und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Pellet wurde schließlich in 300µl TE pH 7,5 gelöst.

**GTE:**

50mM Glucose

25mM Tris-HCl, pH8,0

10mM EDTA

**Lösung 2:**

1% DSD

0,2M NaOH

**Lösung 3:**

3M KAcetat

2M Essigsäure

### **II.3.11 Identifizierung positiver Klone nach Klonierung**

#### ***Durch PCR:***

Zur Identifizierung von Kolonien, die nach einer Klonierung das korrekte Insert in der angestrebten Orientierung trugen, wurde eine PCR-Amplifikation aus Bakterienkolonien durchgeführt. Hierzu wurde folgender PCR-Mix vorbereitet (50µl):

|       |                          |
|-------|--------------------------|
| 5µl   | 10x PCR-Puffer (Gibco)   |
| 1,5µl | MgCl <sub>2</sub> (50mM) |
| 4µl   | dNTP-Mix (10mM)          |
| 1µl   | Primer 1 (20µM)          |
| 1µl   | Primer 2 (20µM)          |
| 0,5µl | Taq-Polymerase (Gibco)   |
| 37µl  | H <sub>2</sub> O         |

Die Primer wurden so gewählt, dass ein Primer im Plasmid binden konnte (meist ein Sequenzierungsprimer), der zweite Primer im Insert (normalerweise einer der zur Insertproduktion verwendeten Primer). Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine Bakterienkolonie angestochen, die Spitze in den PCR-Mix getaucht und in 5ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Nach Durchführung eines Standard-PCR-Programms wurde die PCR-Produkte auf einem Agarose-Gel analysiert. Ergab sich ein PCR-Produkt mit der erwarteten Länge, konnte darauf geschlossen werden, dass ein korrektes Insert in der angestrebten Orientierung kloniert wurde. Die entsprechenden Kolonien konnten dann zur Präparation angezüchtet werden.

#### ***Durch Restriktionsverdau:***

Zur Klonierungsanalyse durch Restriktionsverdau wurden Minipräparationen einzelner Kolonien durchgeführt. Von der hergestellten DNA-Lösung wurden 4µl mit 4µl H<sub>2</sub>O, 1µl Restriktionspuffer und insgesamt 1µl der zur Klonierung eingesetzten Restriktionsenzyme versetzt. Die Restriktionsansätze wurden dann bei 37°C für 3h inkubiert und anschließend auf einem Agarose-Gel analysiert. Enthielt das Plasmid ein Insert, ergaben sich zwei DNA-Banden auf dem Gel, die hinsichtlich ihrer Länge überprüft werden konnten.

### **II.3.12 In vitro-Mutagenese**

(BRAMAN *et al.*, 1996; QuikChange™ Multi Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, nach Angaben des Herstellers)

Um gezielt Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen in einen Plasmidvektor einzuführen, wurde ein 3-Schritt-System der Firma Stratagene angewendet. Im ersten Schritt wird die zu mutierende DNA als Template in eine PCR-Reaktion mit bis zu 5 die

gewünschten Mutationen tragenden Primern eingesetzt. Dabei müssen alle Primer an den gleichen Strang binden und eine ähnliche Schmelztemperatur besitzen. Der eingesetzte Enzym-Mix verlängert die Primer und ligiert die Nicks im neu synthetisierten DNA-Strang. Die Mutagenese-Reaktion setzt sich dabei wie folgt zusammen:

|          |                                      |
|----------|--------------------------------------|
| 2,5µl    | 10x QuikChange multi Reaktionspuffer |
| 0,75µl   | QuikLösung                           |
| 1µl      | dNTP-Mix                             |
| 1µl      | QuikChange Multi Enzym-Mix           |
| 100ng    | Template                             |
| je 100ng | Primer                               |
| ad 25µl  | H <sub>2</sub> O                     |

Die Reaktion läuft entsprechend der folgenden Parameter ab:

|      |                          |             |
|------|--------------------------|-------------|
| 95°C | 1min                     | } 30 Zyklen |
| 95°C | 1min                     |             |
| 55°C | 1min                     |             |
| 65°C | 2min pro kb Plasmidlänge |             |

Im zweiten Schritt wird das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym Dpn I verdaut, das *dam*-methylierte und -hemimethylierte DNA verdaut. Auf diese Weise kann die Template-DNA aus dem Reaktionsansatz entfernt werden, wenn sie in einem *dam*<sup>+</sup> *E.coli*-Stamm hergestellt wurde. Hierzu werden 10U Dpn I dem PCR-Produkt hinzugefügt und der Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert.

Im dritten Schritt wird die mutierte DNA in einem Standard-Transformationsprotokoll in XL10-Gold ultrakompetente Zellen eingeführt, die vorher mit β-Mercaptoethanol behandelt wurden. Nach Isolation der Plasmid-DNA aus den so erzeugten Klonen muss die Mutagenese durch Sequenzierung bestätigt werden.

### **II.3.13 Sequenzierung**

(SANGER *et al.*, 1977; ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, nach Angaben des Herstellers)

DNA-Sequenzierungen erfolgten mittels Kettenabbruch-Methode auf einem ABI 373A DNA Sequencer System. Hierzu wurde die zu sequenzierende DNA als Template für die Synthese neuer DNA mit Hilfe eines spezifischen Primers durch eine DNA-Polymerase eingesetzt. Die Synthese-Reaktion enthielt dabei außer den normalen vier Desoxyribonucleotiden zusätzlich vier Didesoxyribonucleotide, wobei jedes mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert war. In einer zyklischen Sequenzierungsreaktion wurde mit der zu sequenzierenden DNA als Template und ausgehend von dem gewählten Primer der neu synthetisierte DNA-

Strang so lange verlängert, bis ein markiertes ddNTP eingebaut wurde. Ein Sequenzierungsansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

|         |                               |
|---------|-------------------------------|
| 6µl     | Terminator Ready Reaction Mix |
| 1µl     | Sequenzierungsprimer (5µM)    |
| 0,5-1µg | Plasmid-DNA                   |
| ad 20µl | H <sub>2</sub> O              |

Das verwendete Temperaturprofil:

|           |      |                 |             |
|-----------|------|-----------------|-------------|
| 96°C      | 10s  | (Denaturierung) | } 25 Zyklen |
| 50°C-60°C | 5s   | (Annealing)     |             |
| 60°C      | 4min | (Extension)     |             |

Die verwendete Annealingtemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur des Primers.

Da der Einbau der markierten ddNTPs zufällig erfolgte, entstand in der Sequenzierungsreaktion ein Gemisch unterschiedlich Fluoreszenz-markierter DNA-Moleküle, die sich in ihrer Länge unterschieden. Nach Aufreinigung der Reaktion durch Fällung mittels Zugabe einer Mischung aus 2µl NaAcetat (3M, pH 4,6) und 50µl 95% Ethanol und einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde das DNA-Pellet in einer Vakuum-Zentrifuge für 5min getrocknet und anschließend in Formamid mit 5mM EDTA und 10mg/ml Blue Dextran gelöst. Durch 2min Inkubation bei 90°C wurde die DNA denaturiert und danach auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das Gel bestand aus 6% Acrylamid, 8,3M Harnstoff und 1xTBE, polymerisiert mittels Zugabe einer 10%igen Ammoniumpersulfat-Lösung und TEMED. Der Harnstoff diente dabei der Denaturierung der DNA. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und polymerisierte in 1,5h.

Die vertikale Elektrophorese im ABI 373A benötigte eine Laufzeit von 12h, wobei ein Argon-Laser die Fluoreszenzfarbstoffe anregte und die Lichtemission mit Hilfe eines Photomultipliers aufgenommen wurde. Die erhaltenen Daten wurden direkt in einem angeschlossenen Computer prozessiert und die DNA-Sequenz berechnet. Diese Sequenzen konnten dann noch manuell editiert werden.

**10xTBE:**

108g Tris  
55g Borsäure  
8,3g EDTA  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml

### **II.3.14 Transfektion eukaryonter Zellen**

#### ***Lipofektion:***

(Metafectene™, Biontex, nach Angaben des Herstellers)

Zur Lipid-vermittelten Transfektion eukaryonter Zellen wurde das polykationische Transfektionsreagenz Metafectene eingesetzt. Dabei wird die zu transfizierende DNA in Liposomen verpackt, die mit der Zellmembran verschmelzen und die DNA in das Zellinnere abgeben. Diese Transfektionsmethode wurde bei KMST6 eingesetzt, wobei am Vortag  $2 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz in einer 6-Well-Platte ausgesät wurden. 2 µg Plasmid-DNA wurden in 100 µl Medium ohne Serum und Antibiotika verdünnt. 10 µl Metafectene wurden ebenfalls in 100 µl Medium ohne Zusätze verdünnt und die beiden Lösungen durch vorsichtiges pipettieren gemischt. Nach 20min Inkubation bei RT, in der sich die DNA/Lipid-Komplexe bilden konnten, wurde die Lösung zu den Zellen gegeben, die zuvor mit PBS gewaschen worden waren. Nach 4h wurde Vollmedium mit 10% FCS zugegeben und die Zellen für weitere 48-72h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit konnten die Zellen trypsinisiert und für die Analysen am Konfokalmikroskop vorbereitet werden.

#### ***Kalziumphosphat-Transfektion:***

(CHEN *et al.*, 1987)

293T-Zellen wurden mittels eines modifizierten Protokolls zur Kalziumphosphat-Transfektion transfiziert. Hierzu wurden  $6 \times 10^6$  Zellen in einer 250ml Kulturflasche ausgesät und für 24h in 20ml Vollmedium kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und durch 8ml frisches Medium ersetzt. 20 µg Gesamt-DNA wurden in 895 µl H<sub>2</sub>O verdünnt, und mit 100 µl CaCl<sub>2</sub> (2,5M) und 5 µl Chloroquine (100mM) gemischt. Diese Lösung wurde tropfenweise zu 1ml 2xHBS gegeben, durch das gleichzeitig Luft gesprudelt wurde. Dabei bildete sich ein Kalziumphosphat-DNA-Komplex, der nach kurzem Vortexen tropfenweise unter Bewegung auf die Zellen gegeben wurde. Nach Inkubation für 9 bis 10h wurde das Medium durch frisches Vollmedium ersetzt und die Zellen für weitere 48h kultiviert.

#### **2xHBS:**

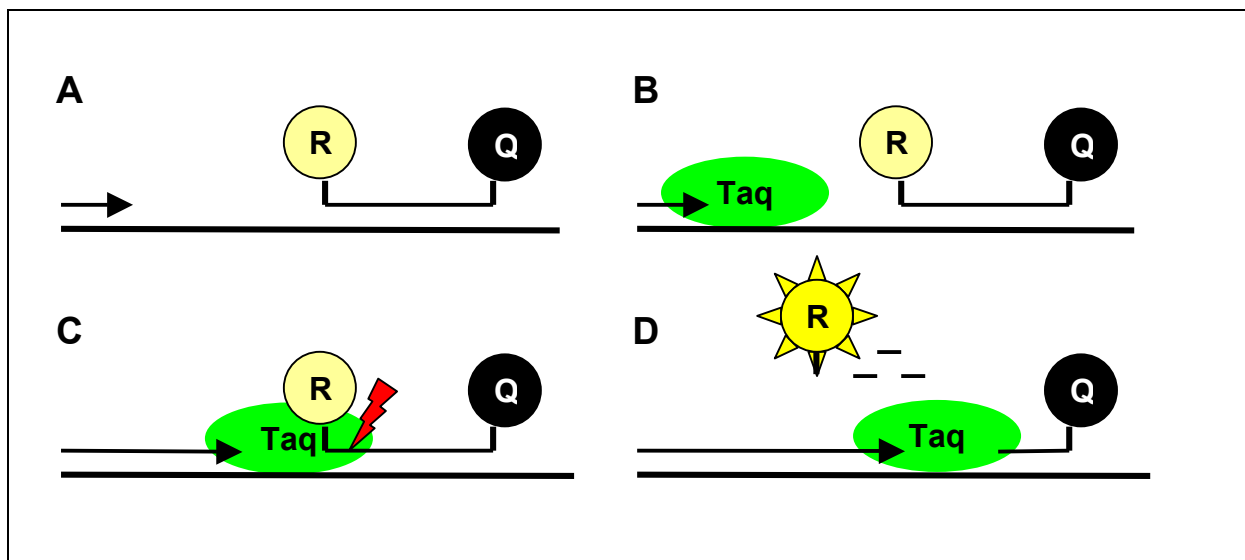
11,9g HEPES  
16,4g NaCl  
0,21g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 7,05 exakt  
steril filtrieren

## II.4 Quantitative PCR

### II.4.1 Funktionsweise

(HOLLAND *et al.*, 1991 ; LEE *et al.*, 1993)

Der TaqMan™-PCR Assay in Kombination mit dem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector der Firma Applied Biosystems macht sich die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase zu Nutze. Einer Standard-PCR-Reaktion wird eine fluorogene Sonde zugefügt, die zwei verschiedene Farbstoffe trägt, einen sog. Reporter (im Versuch: 6-Carboxy-Fluorescein, FAM) und einen sog. Quencher (im Versuch: 6-Carboxy-tetramethylrhodamin, TAMRA). Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt, so wird diese Fluoreszenz durch die räumliche Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt. Die Sonde bindet innerhalb des zu amplifizierenden Bereiches und lagert sich nach Denaturierung des Templates an ihre komplementäre DNA-Sequenz an (**Abb. II.1 A**). Verlängert nun in der Extensionsphase die Polymerase die Primer-DNA (**Abb. II.1 B**), stößt sie auf die gebundene Sonde und beginnt diese vom 5'-Ende her hydrolytisch zu spalten (**Abb. II.1C**). Dadurch wird der Reporter freigesetzt, die räumliche Nähe zum Quencher geht verloren und die Fluoreszenz des Reporters wird detektierbar (**Abb. II.1 D**).



**Abb. II.1:** Funktionsprinzip der quantitativen PCR.

R = Reporter; Q = Quencher ; Taq = DNA-Polymerase

Die Anregung erfolgt mittels eines Argonlasers, die Detektion des Fluoreszenzsignals mit Hilfe einer CCD-Kamera, die während der gesamten PCR alle 7s die Emissionsdaten sammelt. Die Daten werden direkt auf einen angeschlossenen Computer übertragen und

analysiert. Auf diese Weise ist es möglich, die Zunahme des PCR-Produkts anhand der Zunahme des Fluoreszenz-Signals während der PCR zu verfolgen. Dabei ergibt sich ein sog. Schwellenzyklus (threshold cycle,  $C_T$ ), ab dem das Signal detektierbar ist. Je kleiner der  $C_T$ -Wert, desto mehr Template-Kopien lagen im PCR-Ansatz vor. Es ist daher möglich, mit genau festgelegten Starkopienzahlen eines Templates eine Standardkurve zu erstellen, aus der die Ausgangskopienzahl einer unbekannten Probe ermittelt werden kann. Da die PCR eine exponentiell verlaufende Reaktion ist, erfolgt die graphische Darstellung der  $C_T$ -Werte über dem log der Startkopienzahl. Um Expressionsniveaus zu bestimmen, wurde 1 µg Gesamt-RNA in einen cDNA-Syntheseansatz eingesetzt. 2 µl der cDNA dienten dann als Template für die TaqMan-PCR. Ein PCR-Ansatz (25 µl) setzte sich daher wie folgt zusammen:

|         |                                  |
|---------|----------------------------------|
| 12,5 µl | TaqMan® Universal PCR Master Mix |
| 1,5 µl  | Primer 1 (5 µM)                  |
| 1,5 µl  | Primer 2 (5 µM)                  |
| 1 µl    | TaqMan-Sonde (5 µM)              |
| 2 µl    | cDNA                             |
| 6,5 µl  | H <sub>2</sub> O                 |

Zur statistischen Absicherung des Versuchs wurden alle PCR-Ansätze dreifach angesetzt.

Der Master Mix enthielt AmpErase UNG, eine Uracil-N-Glycosylase zur Vermeidung von Kontaminationen durch PCR-Produkte. UNG spaltet Uracil spezifisch aus dUTP-haltiger, doppelsträngiger DNA und verursacht somit Alkali-sensitive, apyrimidine Stellen in der DNA. Das Enzym erreicht sein Reaktionsoptimum bei 50°C und wird bei anschließender Erhitzung des PCR-Ansatzes auf 95°C denaturiert. Die apyrimidinen Stellen blockieren die DNA-Replikation und sind sehr anfällig gegenüber hydolytischer Spaltung (LONGO *et al.*, 1990).

Das PCR-Programm bestand in einer 2-Schritt-PCR mit einem kombinierten Annealing/Extensions-Schritt:

|       |      |                                            |
|-------|------|--------------------------------------------|
| 2min  | 50°C | (Inkubation mit AmpErase UNG)              |
| 10min | 95°C | (Aktivierung der AmpliTaq Gold-Polymerase) |
| 15s   | 95°C | (Denaturierung)                            |
| 1min  | 60°C | (Annealing/Extension)                      |

Der Denaturierungs- und Annealing/Extensions-Schritt wurde 40 Mal wiederholt. Zur Erstellung der Standardkurven wurden als Template 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> bzw. 10<sup>6</sup> Kopien eines linearisierten Plasmids eingesetzt, in das die zu amplifizierende Sequenz kloniert war. Im Falle des Housekeeping-Gens handelte es sich um *ABL*, wobei als Standard das *m-BCR/ABL*-Fusionsgen (Exon e1 bis a4, 1169bp) der Zelllinie SD1 kloniert in pBluescriptII SK(+) (Stratagene), diente. Der Standard wurde von S. Viehmann, Gießen, zur Verfügung gestellt. Als Standard für die GRAF-Expressionsuntersuchungen diente die cDNA-Sequenz

von *GRAF* (2285bp) in pcDNA3 (Invitrogen), die von S. Bojesen, Kopenhagen, bereitgestellt wurde.

Um Qualitätsunterschiede in der RNA-Präparation und cDNA-Synthese zu detektieren, wurde das Housekeeping-Gen in ebenfalls dreifachen Parallelansätzen amplifiziert. Die sich hierbei für die einzelnen Ansätze ergebenden Kopienzahlen für *GRAF* wurden dann auf jeweils 10'000 *ABL*-Kopien im korrespondierenden Ansatz normalisiert.

#### **II.4.2 Behandlung von Zellen mit 5-AzadC und TSA**

Um den Einfluss des Histon-Acetylierungsstatus auf die *GRAF*-Expression zu untersuchen, wurden die Zelllinien K562, Jurkat, Kasumi-1, Daudi und Mutz-1 mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA; YOSHIDA *et al.*, 1990) behandelt und die *GRAF*-Expression anschließend mit Hilfe der quantitativen TaqMan-PCR gemessen. Hierzu wurden in Dreifachansätzen  $5 \times 10^6$  Zellen mit 0, 100, 200 und 300ng TSA (gelöst in Ethanol) pro ml Kulturmedium für 16h inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und eine cDNA-Synthese mit 1µg RNA als Template durchgeführt. Zur Messung der *GRAF*-Expression wurden 2µl der cDNA in einen TaqMan-PCR-Ansatz eingesetzt. Für eine relative Quantifizierung wurde in Parallelansätzen *ABL* als Housekeeping-Gen amplifiziert und die erhaltene *GRAF*-Kopienzahl abschließend auf 10'000 *ABL*-Kopien normalisiert.

Zur Untersuchung des Einflusses des Cytosin-Methylierungsstatus auf die *GRAF*-Expression wurden die oben genannten Zelllinien mit dem DNA-(Cytosin-5)methyltransferase-Inhibitor 5-AzadC (5-Aza-2'-deoxycytidin; JÜTERMANN *et al.*, 1994) behandelt. Hierzu wurden  $5 \times 10^6$  Zellen für 72h mit Vollmedium inkubiert, das 5µM 5-AzadC enthielt. Danach wurde die RNA isoliert, eine cDNA-Synthese und eine quantitative PCR durchgeführt. Auch hierbei wurde die *GRAF*-Kopienzahl auf 10'000 *ABL*-Kopien normalisiert.

Die statistische Überprüfung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe einer t-Test Statistik. Hierbei wird die Ratio Signal/Hintergrund ermittelt, indem die Differenz zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen durch die Variabilität der Gruppen dividiert wird ([http://trochim.human.cornell.edu/kb/stat\\_t.html](http://trochim.human.cornell.edu/kb/stat_t.html)). Die Berechnung des t-Tests erfolgte nach der Formel

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\text{var}_1}{(n_1 - 1)} + \frac{\text{var}_2}{(n_2 - 1)}}$$

mit  $\bar{X}_1$  bzw.  $\bar{X}_2$  = Mittelwert Gruppe 1 bzw. 2  
 $\text{var}_1$  bzw.  $\text{var}_2$  = Varianz Gruppe 1 bzw. 2  
 $n_1$  bzw.  $n_2$  = Anzahl der Einzelwerte in Gruppe 1 bzw. 2

## **II.5 Luciferase-Assay**

(Dual-Luciferase™ Reporter Assay System, Promega, nach Angaben des Herstellers)

Beim Dualen Luciferase Assay der Firma Promega in Verbindung mit den vom selben Hersteller angebotenen pGL3 Luciferase Reporter Vektoren handelt es sich um ein Reporter-System, das die Messung regulativer Eigenschaften einzelner DNA-Fragmente erlaubt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Luciferase Assay zur Bestimmung der Promotor-Kapazität einzelner Abschnitte des *GRAF*-Promotors genutzt. Hierzu wurden Promotor-Fragmente in einer Standard-PCR amplifiziert, für die der *GRAF*-Promotor (1482bp, kloniert in pcDNA3, zur Verfügung gestellt von S. Bojesen, Kopenhagen) als Template diente. Diese wurden über die Bgl II- und Hind III-Restriktionsschnittstellen des Vektors in pGL3-Basic kloniert. Dieser Vektor besitzt neben dem Luciferase-Gen der Spezies *Photinus pyralis* (*Insecta*, *Coleoptera*, *Lampyridae*; Firefly) keine eukaryontischen Promotor- oder Enhancer-Sequenzen und erlaubte daher die direkte Messung des Einflusses eines Promotor-Fragments auf die Expression des Luciferase Gens. Mit diesen Konstrukten wurden K562-Zellen transfiziert und die Expression des Luciferase-Gens über die Umsetzung des Enzym-Substrats bestimmt. Um die erhaltenen Werte vergleichen zu können, wurden sie gegen die Luciferase-Expression unter Regulation des SV40 Promotors im Kontrollplasmid pGL3-Promoter normalisiert.

### **II.5.1 Transfektion für den Dualen Luciferase Assay**

(DMRIE-C™, Gibco, nach Angaben des Herstellers)

Die Transfektion der K562-Zellen für den Dualen Luciferase Assay erfolgte durch kationische Lipofektion mit DMRIE-C. Hierzu wurden in einem Well einer Mikrotiterplatte  $1 \times 10^5$  Zellen in 12µl Medium ohne Zusätze ausplattiert. Die Transfektionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

|       |               |
|-------|---------------|
| 1,8µl | DMRIE-C       |
| 8,2µl | RPMI1640      |
| 2µl   | pGL3 (1µg)    |
| 1µl   | pRL-TK (60ng) |

Das Plasmid pRL-TK diente dabei als interne Transfektionskontrolle. Es trägt das Luciferase-Gen der Spezies *Renilla reniformis* (*Anthozoa*, *Pennatulazea*, *Rennillidae*), das eine andere

Substratspezifität aufweist als die Firefly-Luciferase und daher eine sequentielle Messung der beiden Enzymaktivitäten im gleichen Ansatz erlaubt. So konnten die erhaltenen Messergebnisse auf Schwankungen in der Transfektionseffizienz normalisiert werden.

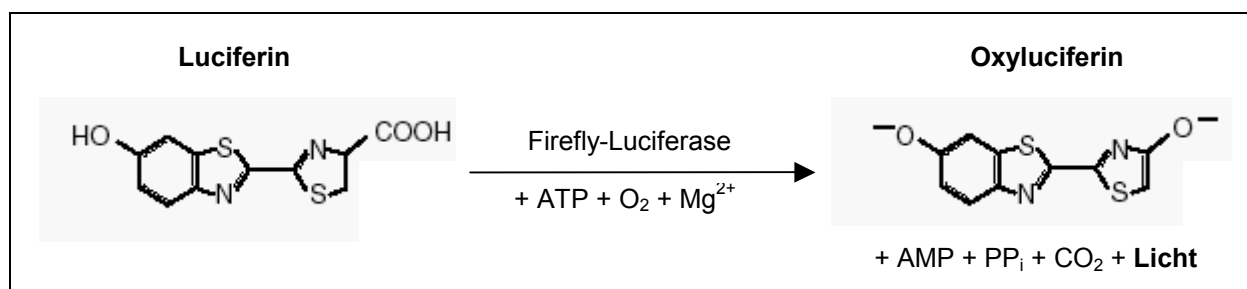
Als Negativkontrolle diente ein Transfektionsansatz mit einem nativen pGL3-Basic-Plasmid. Zur Normalisierung der Messergebnisse und als Positivkontrolle wurde der Vektor pGL3-Promoter eingesetzt. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurde mit Dreifachansätzen gearbeitet.

Für die Liposomverpackung der Plasmide wurden die Transfektionsansätze 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Lösung zu den Zellen gegeben und der Transfektionsansatz dann für 4h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Abschließend wurden 120µl Vollmedium zugegeben und die Zellen weitere 36-40h inkubiert.

### **II.5.2 Dualer Luciferase Assay**

(Dual-Luciferase™ Reporter Assay System, Promega, nach Angaben des Herstellers)

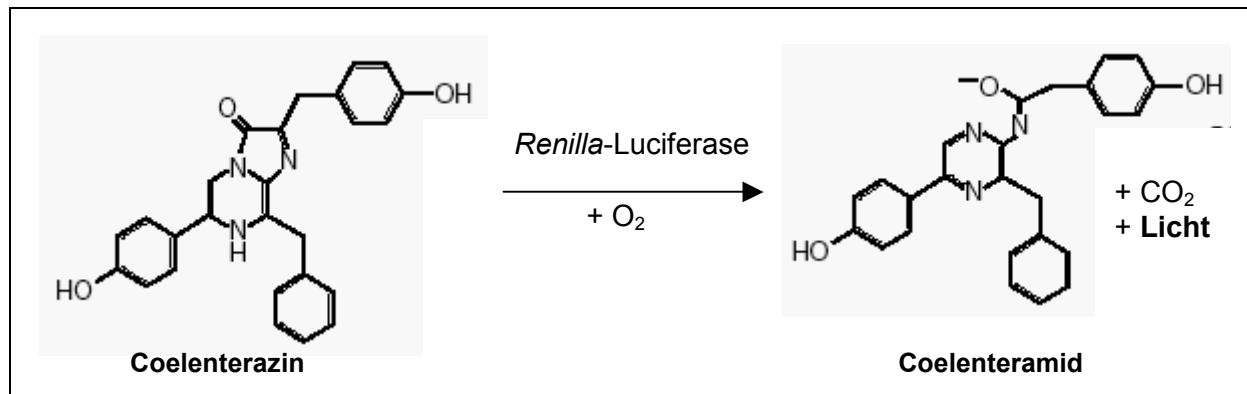
Zur Lyse der transfizierten Zellen wurden sie in Reaktionsgefäße überführt, bei 200xg für 10min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 300µl PBS gewaschen. 5xPassive Lysis Puffer wurde mit H<sub>2</sub>O verdünnt und 40µl dieses Puffers zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden gevortext und danach für 15min bei 250xg zentrifugiert. Der Überstand repräsentierte das Zelllysate und wurde auf Eis gelagert. Als Substrat für die Firefly-Luciferase wurden 100µl LARII in Polypropylen-Luminometerröhrchen vorgelegt, zu dem 20µl Zelllysate gegeben wurde. LARII enthält Luciferin, das von der Firefly-Luciferase unter Freisetzung von Licht zu Oxyluciferin umgesetzt wird (**Abb. II.2**).



**Abb. II.2:** Reaktionschemie der Firefly-Luciferase  
(nach Promega Technical Manual #TM040)

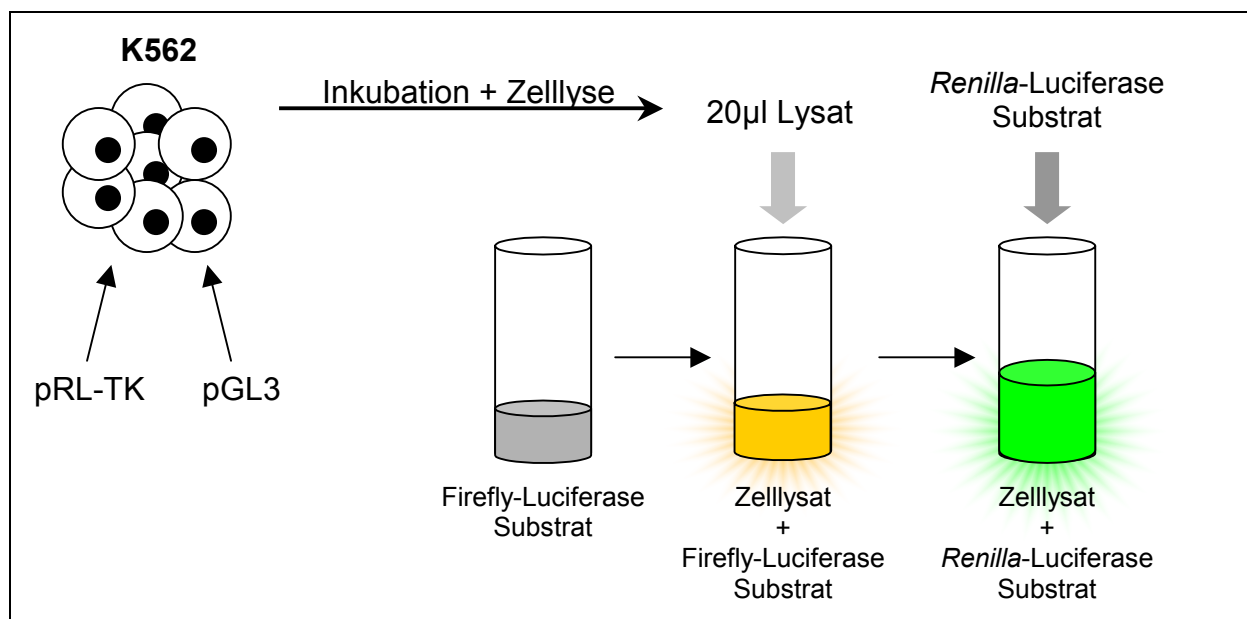
Nach kurzem Mischen wurde die Probe in einem Luminometer mit 2s Messverzögerung und 10s Messintervall gemessen. Als Substrat für die *Renilla*-Luciferase wurden anschließend

100µl Stop&Glo Reagenz zugegeben und die Probe erneut gemessen. Stop&Glo enthält Coelenterazin, dass von dem Enzym zu Coelenteramid umgesetzt wird (**Abb. II.3**).



**Abb. II.3:** Reaktionschemie der *Renilla*-Luciferase (nach Promega Technical Manual #TM040)

Der gesamte Versuchsablauf ist in **Abb. II.4** dargestellt.



**Abb. II.4:** Funktionsweise des Dualen Luciferase Assays

Zur Normalisierung der Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Transfektionseffizienzen in den einzelnen Ansätzen wurde der Quotient aus den relativen Lichteinheiten (relative light units, RLU) für die Firefly-Luciferase und dem Ergebnis für die *Renilla*-Luciferase gebildet:

$$Ratio_{\text{Firefly/Renilla}} = \frac{RLU_{\text{Firefly}}}{RLU_{\text{Renilla}}}$$

Dieses Verhältnis wurde ebenfalls für die den SV40-Promotor enthaltende Positivkontrolle bestimmt und hiermit die experimentellen Daten (EP) normalisiert:

$$\frac{EP}{SV40} = \frac{RLU_{\text{Firefly-EP}} / RLU_{\text{Renilla-EP}}}{RLU_{\text{Firefly-SV40}} / RLU_{\text{Renilla-SV40}}}$$

## II.6 Pathway Profiling

(Mercury™ Pathway Profiling Luciferase System, Clontech, nach Angaben des Herstellers)

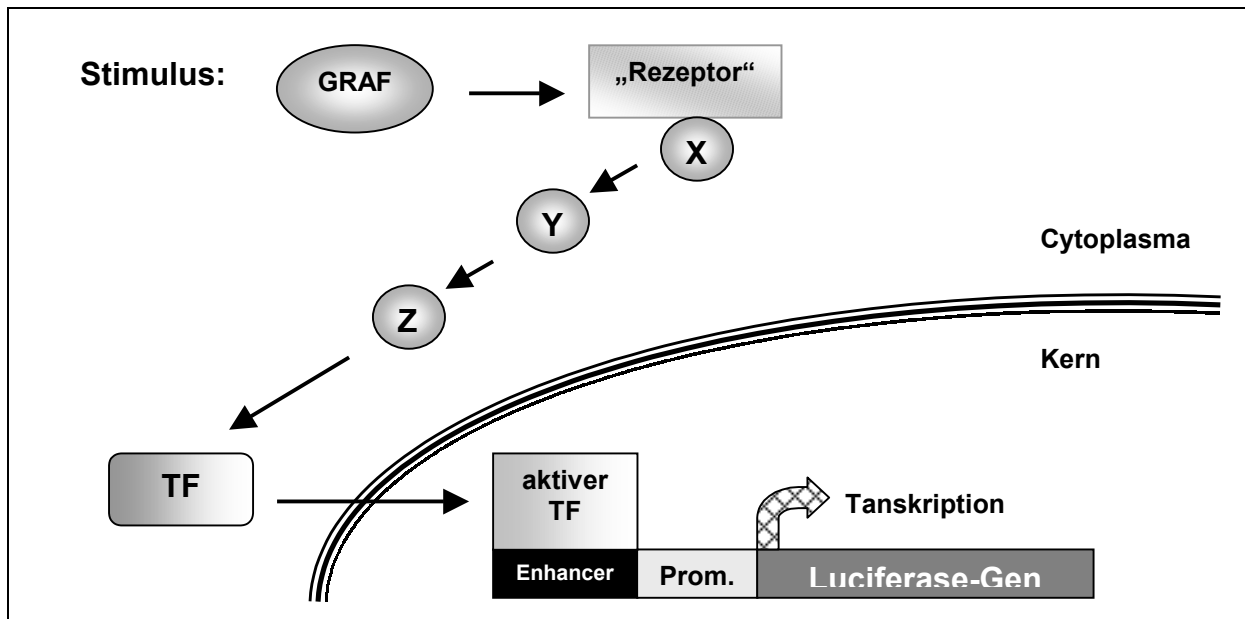
Mit dem Mercury™ Pathway Profiling Luciferase System der Firma Clontech ist es möglich, den Einfluss eines Stimulus auf verschiedene Signaltransduktionswege zu untersuchen. Im Versuch diente das GRAF-Protein in seiner Wildtyp-Form und trunkiert als Stimulus. Zur Herstellung des trunkierten GRAF-Proteins wurde in die Wildtyp-*GRAF*-Sequenz im Expressionsvektor pcDNA3 mittels gerichteter Mutagenese ein Stop-Codon innerhalb der GAP-Domäne des Proteins (nach Base 1611) eingeführt.

Als Reporter wurden sechs verschiedene Plasmide eingesetzt, die *cis*-agierende DNA-Sequenzen (Enhancer) vor dem Firefly-Luciferasegen trugen. Diese werden bei Stimulierung von Transkriptionsfaktoren gebunden, die bestimmten Signaltransduktionswegen zuzuordnen sind (**Tab. II.1** und **Abb. II.5**).

**Tab. II.1:** Signaltransduktionswege im Mercury System (Clontech User Manual PT3286-1)

| Plasmid | Enhancer                        | Transkriptionsfaktoren | Signaltransduktionsweg |
|---------|---------------------------------|------------------------|------------------------|
| pAP1    | Activator Protein 1             | c-jun/c-fos            | JNK                    |
| pCRE    | cAMP response Element           | ATF2/CREB              | JNK/p38 und PKA        |
| pGRE    | Glucocorticoid response Element | GR                     | Glucocorticoid/HSP90   |
| pHSE    | Heat shock response Element     | HSF                    | Hitzeschock-Antwort    |
| pNFκB   | Kernfaktor von κB-Zellen        | NFκB                   | NFκB                   |
| pSRE    | Serum response Element          | Elk-1/SRF              | MAPk/JNK               |

Als Maß für die Aktivierung des Signalweges diente die Menge der exprimierten Luciferase, die in einem doppelten Luciferase-Assay detektiert wurde. Negativkontrolle war dabei der Reportervektor pTAL, der das Luciferase-Gen ohne vorgeschaltetes Enhancer-Element trug.



**Abb. II.5:** Funktionsprinzip des Pathway Profiling. TF = Transkriptionsfaktor

Mittels Lipofektion wurden, wie oben für K562 beschrieben, 293T-Zellen mit jeweils 500ng GRAF-Expressionsvektor, 500ng Reportervektor und 60ng pRL-TK transfiziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte ohne Serum, um eine Induktion von Transduktionswegen durch externe Stimuli zu vermeiden.

Um den Einfluss von externem  $\text{TNF}\alpha$  im Vergleich zu den *GRAF*-transfizierten Zellen zu untersuchen, wurden mit pNF $\kappa$ B und pRL-TK allein transfizierte Zellen 24h nach Transfektionsbeginn mit  $\text{TNF}\alpha$  in einer Endkonzentration von 100ng/ml für weitere 4 bzw. 6h inkubiert. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels einer t-Test Statistik.

## II.7 Arbeiten mit Proteinen

### II.7.1 Herstellung von Zellextrakten

Um Zellextrakte für Proteinanalysen aus transfizierten 293T-Zellen herzustellen, wurden die semiadhärenten Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst, abzentrifugiert (200xg, 10min) und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in hypotonischem Zelllyse Puffer resuspendiert und durch mehrmaliges Pipettieren lysiert. Nach Inkubation auf Eis für 10min wurden die Nuclei und der Zelldebris durch Zentrifugation bei 20'000xg und 4°C für 5s pelletiert. Der Überstand repräsentierte die cytosolische Zellfraktion.

**Hypotonischer Lyse-Puffer:**

20mM HEPES, pH 7,5  
 10mM KCl  
 0,5mM EDTA  
 0,1% Triton X-100  
 10% Glycerin

pro 1ml vor Gebrauch zugeben:  
 4µl 1M DTT  
 2µl 0,25M NaVanadat  
 2 µl 1M NaF  
 4µl Protease Inhibitor Cocktail  
 20µl 100mM PMSF (in Methanol)

**II.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

(LAEMMLI, 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Möglichkeit zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die unterschiedlichen Ladungen der Proteine werden dabei durch das zugesetzte SDS aufgehoben, indem sich SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs/Masse-Verhältnis bilden. Dadurch ist die Auftrennung in einer dreidimensionalen Polyacrylamid-Matrix nach der Größe der Moleküle möglich. Die Matrix ist dabei diskontinuierlich, d.h. über dem eigentlichen Trennbereich des Gels befindet sich ein niedriger konzentriertes Sammelgel mit niedrigerem pH-Wert. Es wurden 10%, 12% und 15%ige SDS-PAGE-Gele eingesetzt:

| Gelkonzentration      | 10%   | 12%   | 15%   |
|-----------------------|-------|-------|-------|
| H <sub>2</sub> O      | 4,0ml | 3,3ml | 2,3ml |
| 30% Acrylamid/Bis     | 3,3ml | 4,0ml | 5,0ml |
| 1,5M Tris-HCl pH 8,8  | 2,5ml | 2,5ml | 2,5ml |
| 10% SDS               | 100µl | 100µl | 100µl |
| 10% Ammoniumpersulfat | 100µl | 100µl | 100µl |
| TEMED                 | 4µl   | 4µl   | 4µl   |

Die Gesamtmenge von 10ml reichte für zwei Gele des Mini Protean II Elektrophorese-Systems der Firma BioRad aus. Zur Verbesserung der Polymerisation und Vermeidung von Luftblasen wurde das Trenngel mit 100µl H<sub>2</sub>O überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation (ca. 20min) wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel aufgetragen, in welches dann der Probenkamm eingesetzt wurde. Ebenfalls für zwei Gele ausreichend war ein 4ml Sammelgel-Ansatz (5%ig):

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O      | 2,7ml  |
| 30% Acrylamid/Bis     | 0,67ml |
| 1,5M Tris-HCl pH 8,8  | 0,5ml  |
| 10% SDS               | 40µl   |
| 10% Ammoniumpersulfat | 40µl   |
| TEMED                 | 4µl    |

Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit 2x nicht reduzierendem Auftragspuffer versetzt und 5min bei 90°C denaturiert. Pro Spur wurden 20µl Probe aufgetragen, die Elektrophorese wurde bei 20mA bis zur Trennlinie Sammelgel/Trenngel durchgeführt, danach wurde auf 25mA pro Gel erhöht. Die Gesamtdauer der Elektrophorese betrug 1h. Bei jedem Lauf wurde ein vorgefärbter Protein-Größenstandard mitgeführt.

**10xSDS-PAGE Laufpuffer:**

10g SDS  
30,3g Tris  
144,1g Glycin  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml

**2x Nicht reduzierender Auftragspuffer:**

60µl 1M TrisHCl, pH 6,8  
312µl 80% Glycerin  
200µl 10% SDS  
428µl H<sub>2</sub>O  
einige Körner Bromphenolblau

**Gelfärbung mit Coomassie-Blau:**

Sofern kein Western Blot durchgeführt werden sollte, wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung übertragen, kurz in einem Mikrowellengerät aufgeköcht und anschließend so lange in Entfärbelösung unter Bewegung inkubiert, bis sich die Proteinbanden gegen den entfärbten Hintergrund abzeichneten. Dabei wurde die Entfärbelösung wiederholt gewechselt.

**Coomassie Blue Färbelösung**

2,5g Coomassie Brilliantblau R-250  
450ml Methanol  
100ml Essigsäure  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml

**Coomassie Entfärbelösung**

450ml Methanol  
100ml Essigsäure  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml

**II.7.3 Co-Immunopräzipitation**

(PELTZ *et al.*, 1987; SCHNEIDER *et al.*, 1982)

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurden Epitop-markierte Proteine in transfizierten 293T-Zellen für 48h exprimiert. Danach wurden Zellextrakte hergestellt, aus denen mittels immobilisierter Antikörper gegen eines der verwendeten Markierungs-Epitope ein Protein aus dem Extrakt isoliert wurde. Dabei wurde auch ein eventueller Interaktionspartner an die feste Phase gebunden und konnte nach Ablösung der Proteine und Western Blot mit einem gegen das zweite Markierungs-Epitop gerichteten Antikörper nachgewiesen werden.

Im Versuch wurden GRAF bzw. FBP17 N-terminal mit einem *myc*-Epitop der Aminosäure-Sequenz NH<sub>2</sub>-EQKLISEEDL-COOH markiert. Nach Kalziumphosphat-Transfektion von 293T-Zellen wurden nach 48h Inkubationszeit Zellextrakte hergestellt. Um den Extrakt vorzuklären, wurde der gesamte Zellextrakt eines Transfektionsansatzes mit 20µl Protein A/G Agarose versetzt, die zuvor zweimal mit Waschpuffer (PBS, 0,25% BSA, 2mM DTT)

gewaschen wurde, und für 1h bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Die Agarose wurde anschließend abzentrifugiert (15'000xg, 5s, 4°C) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Als immobilisierter Antikörper diente ein monoklonaler anti-*myc*-Antikörper, der kovalent an Agarose-Kügelchen gebunden war (*myc*-Beads, Clontech). Zur Bindung der markierten Proteine an die *myc*-Beads wurden jeweils 40µl der gewaschenen Beads dem vorgeklärten Extrakt zugesetzt. Dieser Ansatz wurde für weitere 2,5h bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Die Beads wurden dann abzentrifugiert und 7x mit gekühltem Waschpuffer gewaschen. Ein letzter Waschschrift erfolgte mit PBS ohne Zusätze. Um die Proteine von den Beads zu lösen, wurde das PBS bis auf 20µl entfernt, 20µl 2x nicht reduzierender Auftragspuffer hinzugegeben und die Proben dann für 5min bei 90°C denaturiert. Die Beads wurden abschließend durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

#### **II.7.4 Western-Blot**

(TOWBIN *et al.*, 1979; OGATA *et al.*, 1983 ; Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad, nach Angaben des Herstellers; ECL™ Western Blotting Detection System, Amersham, nach Angaben des Herstellers)

SDS-PAGE-Gele wurden nach dem Lauf zur Äquilibration in CAPS Protein-Transferpuffer überführt und für 15min unter Bewegung bei RT inkubiert. Die Nitrocellulose-Membranen wurden ebenfalls für mindestens 15min in Transferpuffer eingeweicht. Der Blot baute sich wie folgt auf: Anodenseite – puffergetränktes Faserpad – puffergetränktes Filterpapier – Membran – Gel – puffergetränktes Filterpapier – puffergetränktes Faserpad – Kathodenseite. Diese Anordnung wurde zwischen zwei Kunststoffgitter gespannt und zwischen Anode und Kathode einer Blotkammer eingesetzt, die mit eisgekühltem CAPS-Protein-Transferpuffer gefüllt war. Das Blotten erfolgte bei 100V und maximal 350mA für 1h.

Nach Abschluss des Blot-Vorgangs wurde das Gel von der Membran entfernt und die Banden des vorgefärbten Protein-Größenstandards mit Bleistift nachgezogen. Um eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, wurde die Membran für 30min bei RT unter Bewegung in 1x Roti®-Block (10x Stammlösung verdünnt mit H<sub>2</sub>O) inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit TBST gespült. Der Primärantikörper wurde in 10ml 1,5% Magermilchpulver in TBST (w/v) verdünnt und die Membran für 1h bei RT mit dieser Lösung unter Bewegung inkubiert. Danach wurde der Blot wiederum mit TBST gespült und anschließend 5min mit TBST gewaschen. Der Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 10ml der Magermilchlösung verdünnt und die Membran für weitere 30min in dieser Lösung bewegt. Anschließend wurde der Blot viermal für 5min mit TBST gewaschen

und ein weiteres Mal gespült. Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des ECL™ Detektionsreagenz der Firma Amersham. Für eine 7x8cm große Membran wurden 2ml Lösung 1 mit 2ml Lösung 2 gemischt und auf die Membran aufgetragen, die für 1min hierin unter Bewegung inkubiert wurde. Die Lösung enthält Wasserstoffperoxid, mit dessen Hilfe die Peroxidase unter alkalischen Bedingungen Luminol oxidiert, wobei Licht bei einer Wellenlänge von 428nm freigesetzt wird. Diese Lichtemission wurde mittels eines in diesem Wellenlängenbereich besonders sensitiven Autoradiographiefilms (Hyperfilm ECL, Amersham) aufgenommen, welcher dann in einem Röntgenfilmentwickler der Firma Agfa entwickelt wurde.

**CAPS Protein-Transferpuffer:**

100ml 100mM CAPS, pH 11  
200ml Methanol  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml

**TBST:**

20ml 1M Tris-HCl pH 7,6  
137ml 1M NaCl  
2ml Tween20  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml

### **II.7.5 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E.coli***

(SMITH *et al.*, 1988)

Das Glutathion S-transferase (GST) Genfusionssystem der Firma Amersham dient der Expression rekombinanter Fusionsproteine in *E.coli*, bei denen ein Gen der Wahl mit dem Gen für die Glutathion S-Transferase von *Schistosoma japonicum* (*Trematoda*, *Strigeata*) fusioniert wird. Die Fusionsproteine können aus Zelllysaten mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-Kügelchen (Beads) aufgereinigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System für die Expression von GST-GRAF-Fusionsproteinen genutzt. Hierzu wurde die *GRAF*-cDNA-Sequenz über die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI in den Vektor pGEX-2T (Amersham) kloniert. Mit diesem Vektor wurden Bakterien des Stammes BL21 transformiert. 9ml LB-Medium mit 100µg Ampicillin/ml wurden mit einem solchen Klon beimpft und über Nacht bei 37°C und 250rpm angezüchtet. Diese Vorkultur wurde in 400ml LB-Medium mit 100µg Ampicillin/ml überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 37°C und 250rpm inkubiert. Zur Induktion der Proteinexpression wurden 250µl IPTG (0,2M) zugegeben. Die Bakterien wurden weitere 3h bei RT und 250rpm kultiviert, anschließend durch Zentrifugation bei 2500xg und 4°C für 15min pelletiert und in 5ml MTPBS resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte durch zweimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C. Anschließend wurde das Zelllysate zweimal für 30s sonifiziert und Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei

10'000xg und 4°C für 10min pelletiert, der Überstand mit 10% Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Zum Nachweis der Expression des Fusionsproteins wurde eine SDS-PAGE durchgeführt.

**MTPBS:**

150mM NaCl

16mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 4mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 

pH 7,3

vor Gebrauch frisch hinzugeben:

2µg/ml Aprotinin

2µg/ml Leupeptin

1mM PMSF

### **II.7.6 Reinigung von GST-Fusionsproteinen**

Um GST-Fusionsproteine aus dem Zelllysat aufzureinigen, wurden 20µl Glutathion-Sepharose-Beads fünfmal mit dem gleichen Volumen N-Ten gewaschen und bei 1000xg für 3min abzentrifugiert. Der Zellextrakt wurde 1min bei 20'000xg und 4°C zentrifugiert, 500µl des Überstandes wurden dann mit 20µl gewaschenen Beads versetzt und für 30min unter Bewegung bei RT inkubiert. Danach wurden die Beads durch erneute Zentrifugation pelletiert, 7x mit Puffer C und einmal mit N-Ten gewaschen.

**Puffer C:**

20mM HEPES, pH 7,4

100mM KCl

0,2mM EDTA

20% Glycerin

vor Gebrauch frisch hinzugeben:

1mM DTT

2µg/ml Aprotinin

1,5mM  $\text{MgCl}_2$ **N-Ten:**

100mM NaCl

20mM Tris-HCl, pH8,0

1mM EDTA

05% NP-40

### **II.7.7 In vitro-Transkription und Translation**

(TNT<sup>®</sup> Quick Coupled Transcription/Translation System, Promega, nach Angaben des Herstellers)

Zur Expression von Proteinen in einem zellfreien System, wurde das TNT Quick Coupled Transcription/Translation System der Firma Promega eingesetzt. Dieses System ermöglicht die Transkription und Translation eines offenen Leserahmens ausgehend von einem T7- oder einem SP6-Promotor. In die Reaktion wurde als Template der Vektor pCRII-TOPO (Invitrogen) eingesetzt, in dem das Insert von einem T7- und einem SP6-Promotor flankiert wird. Je nach Orientierung des Inserts konnte das entsprechende TNT-System gewählt werden. Zum Nachweis des Translationsprodukts wurde <sup>35</sup>S-Methionin eingesetzt, das bei der

Translation in die Polypeptidkette eingebaut wurde und mittels Autoradiographie detektiert werden konnte. Ein Reaktionsansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

|         |                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------|
| 40µl    | TNT Quick Master Mix                                  |
| 2µl     | <sup>35</sup> S-Methionin (1'000Ci/mmol bei 10mCi/ml) |
| 1µg     | Template-Plasmid                                      |
| ad 50µl | H <sub>2</sub> O                                      |

Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C für 90min inkubiert. Für die SDS-PAGE-Analyse des Translationsproduktes wurde 1µl des Reaktionsansatzes mit 1µl 3fach SDS-Auftragspuffer versetzt, 5min bei 90°C denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

**3fach SDS-Auftragspuffer:**

62,5mM Tris-HCl pH 6,8

2% SDS

5% β-Mercaptoethanol

30% Glycerin

0,05% Bromphenolblau

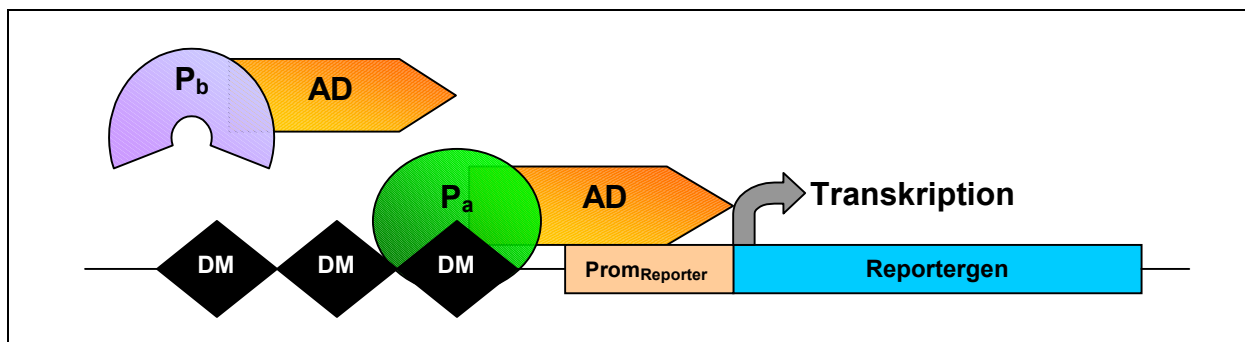
## **II.7.8 GST-Pull down-Experimente**

Zur Verifikation von Protein-Protein-Interaktionen wurden an Glutathion-Sepharose gebundene GST-GRAF-Fusionsproteine mit *in vitro* Translaten inkubiert, in denen der zu testende potenzielle Interaktionspartner als Template (kloniert in pCRII-TOPO) gedient hatte. Hierzu wurden 20µl GST-GRAF-beladene Beads mit 200µl N-Ten gemischt und 0,5µl Ethidiumbromid (10mg/ml) sowie 5µl BSA (20mg/ml) zugegeben. Zu dieser Lösung wurden 10µl *in vitro*-Translat pipettiert und der Ansatz für 60min bei RT rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 1000xg für 3min pelletiert und fünfmal mit N-Ten gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads pelletiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden dann in 25µl 3fach SDS-Auftragspuffer aufgenommen, 5min bei 90°C denaturiert und 1min bei 15'000xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15min in Coomassie Blau Färbelösung gefärbt und danach so lange in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden der GST-Fusionsproteine gut sichtbar waren. Anschließend wurde das Gel kurz mit Wasser gewaschen und bei 65°C getrocknet. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte in einer Filmkassette mit Intensifier-Screen für 12-48h bei -80°C.

## II.8 Das One Hybrid System

(Matchmaker One Hybrid System, Clontech, nach Angaben des Herstellers)

Das One Hybrid System ist ein Werkzeug zur Identifikation DNA-bindender Proteine *in vivo* in Hefezellen. Hierbei wird das zu untersuchende DNA-Motiv in mindestens 3 Tandem-Kopien vor den Promotor eines Reportergens kloniert. Das Konstrukt wird in das Hefe-Genom eingebaut und dieser Reporterstamm anschließend mit einer cDNA-Bibliothek transformiert, bei der die unterschiedlichen Inserts in Fusion mit einer Aktivierungsdomäne exprimiert werden. Bindet ein solches Fusionsprotein an das DNA-Motiv, initiiert die Aktivierungsdomäne die Reportergen-Expression (Abb. II.6).



**Abb. II.6:** Funktionsprinzip des One Hybrid-Systems. Protein A (P<sub>a</sub>) kann an das DNA-Motiv (DM) binden und durch die Aktivierungsdomäne (AD) die Transkription des Reportergens aktivieren. Protein B (P<sub>b</sub>) bindet nicht, die Reportergenaktivierung unterbleibt. (Nach Clontech User Manual PT1031-1)

### II.8.1 Hefekultur

#### *Für Transformation:*

Hefezellen des Stammes YM4271 wurden auf YPD-Agarplatten bei 30°C in einem belüfteten Brutschrank für 2-4 Tage angezüchtet. Einige der Kolonien wurden dann in 1ml YPD-Medium überführt und durch vortexen resuspendiert. Für Transformationen wurde mit dieser Zellsuspension nun 50 ml YPD-Medium beimpft. Die Kultur wurde nun bei 30°C und 250rpm für 16-18h inkubiert, bis sie eine OD<sub>600</sub>>1,5 erreicht hatte. Die Übernachtskultur wurde dann in 300ml YPD-Medium überführt und weitere 3h bei 30°C und 230rpm inkubiert. Sobald die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,5±0,1 erreicht hatte, konnten die Zellen durch Zentrifugation bei 1000xg für 5min geerntet werden.

***Für Plasmidisolation:***

Für Plasmidisolationen wurden einzelne Kolonien mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze in 3ml SD/-His-Medium überführt und über Nacht bei 30°C und 250rpm inkubiert.

***Für Dauerkultur:***

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 850µl einer über Nacht gewachsenen Kultur mit 150µl Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren. Alternativ konnte auch eine entsprechende Medium/Glycerin-Lösung hergestellt werden, in der dann mehrere Kolonien von einer Agarplatte resuspendiert wurden. Die so hergestellten Dauerkulturen sind mehrere Jahre haltbar.

**YPD Medium:**

50g YPD Medium (Clontech)  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 6,5  
autoklavieren

**YPD Agarplatten:**

70g YPD Agar Medium (Clontech)  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 6,5  
autoklavieren

**Minimal SD Medium:**

26,7g Minimal SD Base (Clontech)  
Xg Dropout-Zusatz  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 5,8  
autoklavieren

**Minimal SD Agarplatten:**

46,7g Minimal SD Agar Base (Clontech)  
Xg Dropout-Zusatz  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 5,8  
autoklavieren  
in Kuturschalen füllen

**Dropout-Zusätze (Clontech):**

-Leu (0,69g/l Medium)  
-Ura (0,77g/l Medium)  
-His (0,77g/l Medium)  
-Trp (0,74g/l Medium)  
-Leu/-His (0,67g/l Medium)

-His/-Ura (0,75g/l Medium)  
-Trp/-Ura (0,72g/l Medium)  
-His/-Trp/-Ura (0,7g/l Medium)  
-His/-Leu/-Trp/-Ura (0,6g/l Medium)

**II.8.2 Transformation von Hefezellen**

Die für die Transformation kultivierten Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000xg und RT für 5 min geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend mit 50ml sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen und erneut abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand komplett entfernt und das Zellpellet in 1,5ml frisch hergestellter TE/LiAc-Lösung (1xTE, 0,1M LiAcetat, pH 7,5) resuspendiert. In einem frischen Reaktionsgefäß wurden 1µg linearisiertes Plasmid und 0,1mg Herring Testes Carrier DNA mit 0,1ml der kompetenten Hefezellen durch vortexen gemischt. Zu dieser Suspension wurden 0,6ml frisch hergestellte PEG/LiAc-Lösung (40% PEG4000, 1xTE, 0,1M LiAc, pH 7,5) gegeben und 10s gevortext. Die Mischung wurde anschließend für 30min bei 30°C und 200rpm inkubiert. Nach Zugabe von 70µl DMSO wurden die Zellen für

15min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und anschließend 2min auf Eis gekühlt. Die Hefezellen wurden dann durch Zentrifugation für 5min bei 1000xg pelletiert und in 150µl sterilem 1xTE resuspendiert. Die gesamte Suspension wurde bei Einsatz von pHISi oder pHISi-1 auf SD/-His-Agar ausplattiert, bei Transformation mit pLacZi auf SD/-Ura-Agarplatten. Die Platten wurden dann für 2-4 Tage bei 30°C inkubiert.

### **II.8.3 Herstellung eines einfachen bzw. doppelten Reporterstammes**

Die ausgewählten DNA-Motive wurden als 4fach Tandemkopien mit einer 5'-vorgeschalteten EcoR I-Schnittstelle und einer 3'-nachgeschalteten Xba I-Schnittstelle für die Vektoren pHISi und pHISi-1, sowie für den Vektor pLacZi mit EcoR I- und Sal I-Schnittstellen kommerziell als sense- und antisense-Stränge synthetisiert (Roth):

Fragment 545-534: 5'-GGCCACGCCCC-3'

Fragment 492-479 : 5'-ACCGCGGAAGGGCC-3'

Das Annaeling erfolgte in 10µl 50mM NaCl mit 0,1µg sense- und 0,1µg antisense-Strang. Dazu wurde die Lösung für 5min auf 70°C erhitzt und dann über einen Zeitraum von 30min auf RT abgekühlt.

Die so gewonnenen Inserts wurden in die entsprechenden Vektoren kloniert und sequenziert. Die Plasmide pHISi und pHISi-1 wurden danach mit der Restriktionsendonuclease XhoI linearisiert, pLacZi mit dem Enzym NcoI und in Zellen des Hefestammes YM4271 transformiert, wo sie in das Hefegenom integriert wurden. Jeder einzelne Reporterstamm wurde dann auf basale Reporterexpression überprüft. Hierzu wurde eine einzelne Kolonie eines pHISi- oder pHISi-1 Reporterstammes in 1ml 1xTE resuspendiert. 5µl dieser Zellsuspension wurden auf SD/-His-Medium ausgestrichen, das 0, 15, 45 bzw. 60mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) enthielt, einen kompetitiven Inhibitor des *HIS3*-Genprodukts. Wuchsen die Hefezellen nur auf SD/-His mit weniger als 45mM 3-AT, war die Hintergrund-*HIS3*-Expression des Reporterstammes gering und er konnte für den Versuch genutzt werden. Um den Reporterstamm zu testen, in den das pLacZi-Konstrukt integriert worden war, wurde ein Colony Lift Filter-Assay durchgeführt. Färbten sich die Kolonien erst nach mehr als 15min blau, war die Hintergrund-Expression des LacZ-Gens gering und der Stamm konnte als Reporterstamm genutzt werden.

Für den Screen der cDNA-Bibliothek wurde ein doppelter Reporterstamm konstruiert, mit dem ein direkter Test auf falsch-positive Klone mittels Colony Lift Filter-Assay möglich war. Hierzu wurde das pHISi- oder pHISi-1-Konstrukt, das den geringeren HIS3-Hintergrund

produzierte, zur Transformation des LacZi-Reporterstamms eingesetzt. Die entstehenden Klone wurden auf SD/-His/-Ura-Medium kultiviert.

#### **II.8.4 Screening einer cDNA-Bibliothek**

Um eine cDNA-Bibliothek nach DNA-Bindungsproteinen zu screenen, wurde der Hefe-Reporterstamm mit einer humanen cDNA-Bibliothek der Firma Clontech transformiert, die aus gesundem Gehirngewebe eines 60 Jahre alten Mannes gewonnen und in den Vektor pACT2 kloniert worden war. Die Bibliothek umfasste  $3,5 \times 10^6$  unabhängige Klone mit einer Insertlänge zwischen 0,5 und 4,2kb. Der doppelte Reporterstamm wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll mit der cDNA-Bibliothek transformiert, jedoch wurden in den Transformationsansatz 20µg Bibliothek-Plasmide und 2mg Herring Testes Carrier DNA sowie 1ml der kompetenten Hefezellen eingesetzt. Diese Mischung wurde mit 6ml PEG/LiAc-Lösung versetzt und nach der Inkubationsphase wurden 700µl DMSO zugegeben. Das nach der abschließenden Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in 7ml 1xTE resuspendiert. Je 500µl der Zellsuspension wurden auf 150mm-SD/-His/-Leu-Agarplatten mit optimalem 3-AT-Gehalt ausgestrichen und für 4-6 Tage bei 30°C inkubiert.

Die entstandenen Kolonien wurden in einem Raster auf frische SD/-His/-Leu-Platten übertragen und zur Bestätigung der Interaktion einem Colony Lift Filter-Assay unterzogen.

#### **II.8.5 Colony Lift Filter-Assay**

Nur Kolonien, in denen eine Interaktion zwischen dem Fusionsprotein des Bibliothek-Plasmids und dem integrierten *HIS3*-Reportergenkonstrukt stattgefunden hatte, konnten auf Medium ohne Histidin wachsen. Dennoch kann es bei diesem System zu falsch-positiven Ergebnissen kommen, die mit Hilfe eines Colony Lift Filter-Assays eliminiert werden können, in welchem die Expression des LacZ-Reportergenkonstruktes getestet wird. Hierzu wurden 100ml Z-Puffer mit 0,27ml β-Mercaptoethanol und 1,67ml X-Gal (20mg/ml) versetzt. Für jede zu testende Platte wurde in einer Petrischale steriles Filterpapier (Whatman) mit dieser Lösung benetzt. Eine Nitrocellulose-Membran (Amersham) wurde auf die Oberfläche der Kolonien-tragenden Platte gedrückt, so dass die Kolonien an der Membran haften blieben. Danach wurde die Membran mit den Kolonien nach oben für 10s in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Membran wurde dann bei RT aufgetaut, auf das getränkte Filterpapier gelegt und bei 30°C inkubiert. Diejenigen Kolonien, die nach 2h Inkubationszeit eine Blaufärbung

zeigten, wurden als positiv für die Reportergenaktivierung eingestuft und zur Plasmid-Extraktion angezüchtet.

**10xBU-Salze:**70g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 30g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ddH<sub>2</sub>O ad 100ml

pH 7

autoklavieren

**Z-Puffer:**16,1g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,5g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 

0,75g KCl

0,246g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ddH<sub>2</sub>O ad 100ml

pH 7, autoklavieren

**II.8.6 Plasmid-DNA-Extraktion aus Hefe**

(Yeastmaker™ Yeast Plasmid Isolation Kit, Clontech, nach Angaben des Herstellers)

Eine große frische Hefekolonie wurde in 3ml des passenden SD-Dropout-Mediums resuspendiert. Diese Kultur wurde über Nacht bei 30°C und 250rpm inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 20'000xg für 5min pelletiert, der Überstand bis auf 50µl abgenommen und die Zellen hierin resuspendiert. Nach Zugabe von 10µl Lyticase (5U/µl) wurden die Zellen für 60min bei 37°C inkubiert. Nun wurden 10µl 20% SDS hinzugefügt und die Suspension für 1min gevortext. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten, wurde die Lösung nun bei -20°C eingefroren und anschließend bei RT wieder aufgetaut. Während dessen wurde eine Chroma Spin-1000 DEPC-H<sub>2</sub>O-Säule durch invertieren und vortexen gemischt und in einem Sammelgefäß für 5min bei 700xg zentrifugiert, damit sich die Gelmatrix zur Aufreinigung der Plasmid-DNA bilden konnte. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Hefeextrakt wurde nun auf die Säule aufgetragen und diese erneut bei 700xg für 5min zentrifugiert. Das Eluat stellte die gereinigte Plasmid-DNA-Lösung dar. Um die Plasmide zurückzugewinnen, wurden mit 10µl dieser Lösung Epicurian coli-Zellen (Stratagene) transformiert.

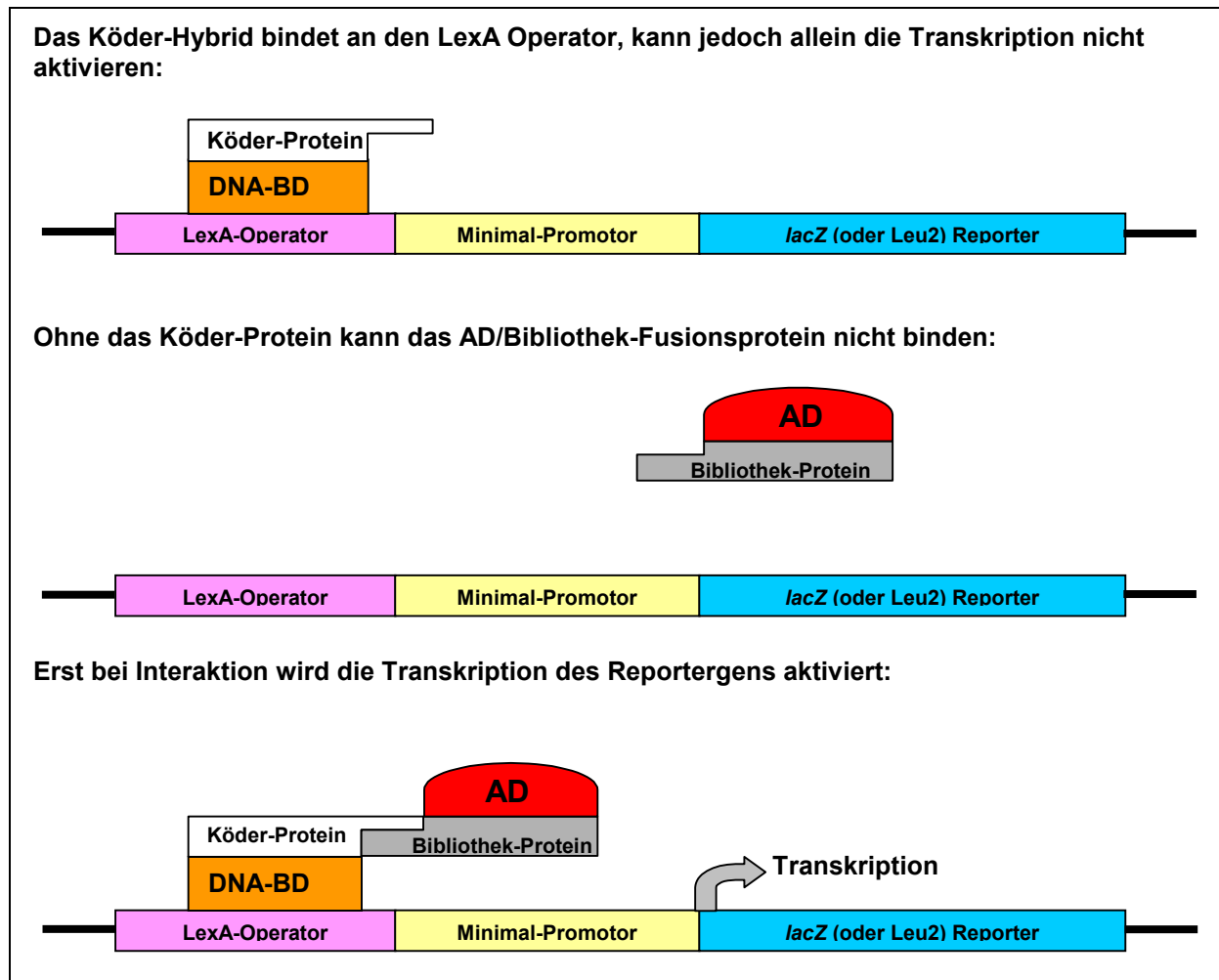
## **II.9 Das Two Hybrid System**

(FIELDS & SONG, 1989; GYURIS *et al.*, 1993; MENDELSON & BRENT 1994; Matchmaker LexA Two Hybrid System, Clontech, nach Angaben des Herstellers)

Das Two Hybrid System dient dem Nachweis bzw. der Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* in Hefezellen. Grundlage des Systems ist die Beobachtung, dass Transkriptionsfaktoren modular aufgebaut sind und über eine DNA-Bindungsdomäne und eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne verfügen. Diese beiden Domänen lassen sich voneinander trennen und mit verschiedenen zu testenden Proteinen fusionieren. Dabei dient das mit der DNA-Bindungsdomäne (BD) fusionierte Protein als sog. Köder, der mit der Aktivierungsdomäne (AD) fusionierte Interaktionspartner wird als Beute bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde das LexA Two Hybrid System der Firma Clontech eingesetzt. Bei diesem System wird das LexA-Protein aus *E.coli*, das normalerweise als Repressor der *SOS*-Gene fungiert (EBINA *et al.*, 1983), als DNA-Bindungsdomäne mit dem zu untersuchenden Gen (*GRAF* bzw. *FBP17*) fusioniert. Dies erfolgt mit Hilfe des Hefe-Expressionsvektors pLexA. Das Fusionsprodukt ist in der Lage, an den LexA-Operator eines in das Hefegenom integrierten Reportergens (*Leu2*) bzw. an den LexA-Operator des Reporterplasmids (im Versuch: p8op-lacZ) zu binden, kann jedoch allein die Transkription der nachgeschalteten Reportergene nicht aktivieren.

Die potentiellen Interaktionspartner werden mit dem 88 Aminosäuren langen Polypeptid B42 aus *E.coli* fusioniert, das die Transkription in Hefen aktivieren kann (MA *et al.*, 1987). Dies wird mittels des Hefe-Expressionsplasmids pB42AD erreicht, bei dem die Expression des Fusionsgens unter der Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors steht. Werden mit diesem Plasmid transformierte Hefen auf Glucose-haltigem Medium gezüchtet, erfolgt keine Expression des Fusionsgens. Erst bei Kultivierung auf Galactose/Raffinose-haltigem Medium wird die Expression der AD-Fusion induziert. Dies ermöglicht es, auch solche Proteine als Interaktionspartner zu testen bzw. bei einem Screen einer cDNA-Bibliothek zu identifizieren, die bei längerer Expression toxisch für die Zellen wären. Eine Übersicht über die Funktionsweise des Two Hybrid Systems gibt **Abb. II.7**.



**Abb. II.7:** Funktionsprinzip des Two Hybrid Systems.  
BD = DNA-Bindungsdomäne, AD = Aktivierungsdomäne  
(Nach Clontech User Manual PT3040-1)

### II.9.1 Hefekultur

Im Two Hybrid System wurde mit dem Leu-auxotrophen Reporterstamm EGY48[p8op-LacZ] gearbeitet, der bereits mit dem Reporterplasmid transformiert war. Die Zellen wurden auf YPD-Agar angezüchtet und für Transformationen einige Kolonien in 1ml YPD-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 50ml SD/-Ura-Medium überführt und bei 30°C und 250rpm über Nacht inkubiert. Die Kultur hatte dann eine  $OD_{600} > 1,5$ , wurde in 300ml YPD übertragen und für weitere 3h bei 30°C und 230rpm kultiviert. Danach erreichte sie eine  $OD_{600}$  von  $0,5 \pm 0,1$ . Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000xg für 5min geerntet und das Zellpellet mit 50ml sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1,5ml TE/LiAc-Lösung (1xTE, 0,1M LiAcetat, pH 7,5) resuspendiert. Für jeden Transformationsansatz wurden in einem sterilen Reaktionsgefäß 0,1µg Köderkonstrukt (in pLexA), optional 0,1µg Beutekonstrukt (in pB42AD) und 0,1mg Herring Testes Carrier DNA

gemischt und mit 0,1ml der kompetenten Hefezellen versetzt. Hierzu wurden 0,6ml PEG/LiAc-Lösung (40% PEG4000, 1xTE, 0,1M LiAc, pH 7,5) pipettiert und durch Vortexen mit der Hefesuspension gemischt. Der Ansatz wurde dann für 30min bei 30°C und 200rpm inkubiert. Anschließend wurde den Zellen 70µl DMSO hinzugefügt, durch invertieren gemischt und die Hefen einem Hitzeschock bei 42°C für 15min unterzogen. Danach wurden die Zellen für 2min auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation bei 1000xg für 5min pelletiert. Das Pellet wurde in 500µl 1xTE resuspendiert und 200µl der Suspension auf SD/-His/-Ura ausgestrichen, wenn nur für Transformanden mit dem Köderkonstrukt selektiert werden sollte. Wurde eine Co-Transformation von Köder- und Beutekonstrukt vorgenommen, wurde die Zellsuspension auf SD/-His/-Trp/-Ura ausgestrichen.

Für eine sequenzielle Transformation von Zellen, die bereits mit dem Köderkonstrukt transformiert worden waren, mussten diese über Nacht in SD/-His/-Ura kultiviert werden, um den Selektionsdruck auf das Reporterplasmid und das Köderkonstrukt aufrecht zu erhalten. Nach abgeschlossener Transformation wurde für Doppeltransformanden wiederum auf SD/-His/-Trp/-Ura selektiert.

**YPD Medium:**

50g YPD Medium (Clontech)  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 6,5  
autoklavieren

**YPD Agarplatten:**

70g YPD Agar Medium (Clontech)  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 6,5  
autoklavieren

**Minimal SD Medium:**

26,7g Minimal SD Base (Clontech)  
Xg Dropout-Zusatz  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 5,8  
autoklavieren

**Minimal SD Agarplatten:**

46,7g Minimal SD Agar Base (Clontech)  
Xg Dropout-Zusatz  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 5,8  
autoklavieren  
in Kuturschalen füllen

**Dropout-Zusätze (Clontech):**

-Leu (0,69g/l Medium)  
-Ura (0,77g/l Medium)  
-His (0,77g/l Medium)  
-Trp (0,74g/l Medium)  
-Leu/-His (0,67g/l Medium)

-His/-Ura (0,75g/l Medium)  
-Trp/-Ura (0,72g/l Medium)  
-His/-Trp/-Ura (0,7g/l Medium)  
-His/-Leu/-Trp/-Ura (0,6g/l Medium)

## **II.9.2 Klonierung in Hefezellen mittels Rekombination**

(PETERMANN *et al.*, 1998)

Die Klonierung von *FBP17* in den Vektor pLexA erfolgte mittels homologer Rekombination in Hefezellen des Stammes EGY48[p8op-LacZ]. Dabei wird der linearisierte, dephosphorylierte Vektor gemeinsam mit einem mittels PCR hergestellten Insert in die Hefezellen transformiert. Das Insert trägt dabei Sequenzen, die den Enden des linearisierten Vektors homolog sind. In der Zelle lagern sich diese Bereiche aneinander und in einem Teil

der Zellen kommt es durch homologe Rekombination zu einem Einbau des Inserts in den Vektor.

Im Versuch trugen die bei der Herstellung des *FBP17*-Inserts verwendeten PCR-Primer pLexA-Sequenzen, die der EcoRI-Schnittstelle des Vektors benachbart waren. Der Sense-Primer beinhaltete dabei an seinem 5'-Ende 29bp aus pLexA (2119-2149), die die EcoRI-Schnittstelle einschlossen. Der Antisense-Primer trug am 5'-Ende 31bp (2150-2180) der pLexA-Sequenz, die sich direkt an die EcoRI-Schnittstelle anschlossen. Als Template für die PCR-Reaktion diente der Klon KIAA0554, der vom Kazusa DNA Research Institute (Kisarazu, Japan) zur Verfügung gestellt wurde und ein 5383bp-Fragment der *FBP17*-cDNA (kloniert in pBluescript II SK(+), Stratagene) enthielt. Die hieraus amplifizierte Sequenz repräsentierte Base 48 bis 2041 der *FBP17*-mRNA-Sequenz (GenBank Accession AF26550). Die PCR wurde in einem Standard-PCR-Ansatz mit AmpliTaq Gold nach folgendem Programm durchgeführt:

|      |       |                          |             |
|------|-------|--------------------------|-------------|
| 94°C | 10min | (Aktivierung des Enzyms) | } 35 Zyklen |
| 94°C | 15s   | (Denaturierung)          |             |
| 55°C | 20s   | (Annealing)              |             |
| 72°C | 3min  | (Extension)              |             |
| 72°C | 10min |                          |             |

Der Vektor wurde mit EcoRI linearisiert und nach Gelreinigung dephosphoryliert. Nach erneuter Reinigung des Vektors und des Inserts wurden die Hefezellen mit 200ng PCR-Produkt und 50ng linearisiertem und dephosphoryliertem pLexA transformiert und auf SD/-His/-Ura-Medium ausgestrichen.

Einige der entstandenen Klone wurden gepickt, die Plasmid-DNA aus ihnen isoliert und *Escherichia coli*-Zellen (Stratagene) hiermit transformiert. Da die *E.coli*-Transformanten entweder das Reporterplasmid oder pLexA enthalten konnten, wurden die aus ihnen isolierten Plasmide einem Restriktionsverdau mit EcoRI und NotI (3h, 37°C) unterzogen. Dieser Verdau führte zur Entstehung von vier Banden bei p8op-LacZ, einer Bande bei religiertem pLexA und zwei Banden bei erfolgreicher Rekombination. Die rekombinierten Plasmide wurden mittels Sequenzierung auf den korrekten Einbau des Inserts hin überprüft.

### **II.9.3 Screening einer cDNA-Bibliothek**

#### ***Screen mit GRAF als Köder:***

Die vollständige *GRAF*-Sequenz (GenBank Accession Y10388) wurde als Köder in pLexA kloniert. Hierfür diente die cDNA-Sequenz (2285bp) kloniert in pcDNA3 (Invitrogen), die von S. Bojesen, Kopenhagen, zur Verfügung gestellt wurde, als PCR-Template. Anschließend

wurden EGY48[p8op-LacZ]-Hefezellen mit diesem Konstrukt transformiert. Die entstehenden Klone wurden auf SD/-His/-Ura komplettiert mit 1xBU-Salzen und 80mg/l X-Gal ausgestrichen, um auf eine autonome Aktivierung des Reporters durch das Köderkonstrukt zu testen. Die Expression des Köderkonstrukts wurde mittels Western-Blot bestätigt.

Nach Abschluss dieser Tests wurden die Hefen mit einer humanen Plazenta-cDNA-Bibliothek (Clontech) transformiert, die  $1 \times 10^7$  unabhängige Klone umfasste. Dazu wurden einige Kolonien der pLexA-GRAF-transformierten Hefezellen in 1ml SD/-His/-Ura resuspendiert und 150ml desselben Mediums hiermit beimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 30°C und 250rpm inkubiert, bis sie eine  $OD_{600} > 1,5$  erreicht hatte. Die Zellsuspension wurde dann in 1l YPD-Medium überführt und für weitere 3h bei 30°C und 230rpm kultiviert, bis eine  $OD_{600}$  von  $0,5 \pm 0,1$  vorlag. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000xg für 5min geerntet und mit 500ml sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 8ml 1xTE/LiAc-Lösung (1xTE, 0,1M LiAcetat, pH 7,5) resuspendiert. In einem 50ml Zentrifugenröhrchen wurden 0,5mg Bibliothek-Plasmid-DNA und 20mg Herring Testes Carrier DNA mit 8ml der kompetenten Hefezellen vermischt und mit 8ml frischer PEG/LiAc-Lösung (40% PEG4000, 1xTE, 0,1M LiAc, pH 7,5) gevortext. Nach Inkubation für 30min bei 30°C und 200rpm wurden 7ml DMSO hinzugefügt und die Zellen für 15min unter gelegentlichem Schütteln bei 42°C inkubiert. Nach diesem Hitzeschock wurde der Transformationsansatz für 2min auf Eis gekühlt und anschließend bei 1000xg für 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml 1xTE resuspendiert und jeweils 100µl der Suspension auf 100 150mm-Platten SD/-His/-Trp/-Ura-Medium ausgestrichen. Nach Inkubation für 4 Tage bei 30°C wurden die entstandenen Kolonien in 5ml 1xTE pro Platte geschabt, abzentrifugiert und mit 1xTE gewaschen. Das Zellpellet wurde in 20ml 1xTE resuspendiert.

Zur Durchführung eines  $\beta$ -Galactosidase-Assays wurden nun jeweils 200µl der Zellsuspension auf 100 150mm-Platten mit SD/Gal/Raf/-His/-Leu/-Trp/-Ura-Induktionsmedium, das mit 1xBU-Salzen und 80mg/l X-Gal komplettiert worden war, ausgestrichen. Dieses Medium selektierte doppelt auf Klone, die eine Interaktion zwischen Köder und Beute zeigten und daher sowohl Leu-autotroph waren als auch Blaufärbung aufgrund der Expression des LacZ-Gens des Reporterplasmids zeigten. Die nach 5 Tagen Inkubation bei 30°C gewachsenen blauen Klone wurden als positiv klassifiziert, weiße Kolonien als falsch-positiv eingestuft. Zur Erhaltung der positiven Klone wurden diese gepickt, in 10µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf SD/-His/-Trp/-Ura aufgetropft. Um einen

repräsentativen Screen der umfangreichen cDNA-Bibliothek zu gewährleisten, wurde diese Vorgehensweise fünfmal wiederholt.

### **Screen mit *FBP17* als Köder:**

Hierfür wurden die mittels Rekombinationsklonierung mit dem *FBP17*-Köderkonstrukt transformierten Hefezellen genutzt. Diese wurden mit einer humanen Nieren-cDNA-Bibliothek (Clontech) transformiert und auf Protein-Protein-Interaktionen getestet wie für den GRAF-Bibliotheksscreen beschrieben. Die cDNA-Bibliothek bestand aus  $3,5 \times 10^6$  unabhängigen Klonen und wurde durch dreimalige Wiederholung des oben beschriebenen Screen-Protokolls repräsentativ untersucht.

#### **Agarplatten aus Induktionsmedium:**

54g Minimal SD Agar Base/Gal/Raf (Clontech)  
Xg Dropout-Zusatz  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000ml  
pH 5,8  
autoklavieren  
in Kulturschalen füllen

#### **Dropout-Zusätze (Clontech):**

-Leu (0,69g/l Medium)  
-Ura (0,77g/l Medium)  
-His (0,77g/l Medium)  
-Trp (0,74g/l Medium)  
-Leu/-His (0,67g/l Medium)  
-His/-Ura (0,75g/l Medium)  
-Trp/-Ura (0,72g/l Medium)  
-His/-Trp/-Ura (0,7g/l Medium)  
-His/-Leu/-Trp/-Ura (0,6g/l Medium)

## **II.9.4 Herstellung von Hefeextrakten für Western-Blots**

(PRINTEN *et al.*, 1994)

Um die korrekte Expression der Köderkonstrukte in den Hefezellen nachzuweisen, wurden nach der Harnstoff/SDS-Methode Zellextrakte aus den entsprechend transformierten Kulturen hergestellt und diese in einen Western Blot eingesetzt. Für die Zellextrakte wurden 5ml SD/-His/-Ura-Medium mit *GRAF*- bzw. *FBP17*-transformierten Hefen beimpft. Als Negativkontrolle dienten untransformierte Hefen, die in 10ml YPD-Medium kultiviert wurden. Die Kulturen wurden über Nacht bei 30°C und 250rpm inkubiert, gevortext und in 50ml YPD-Medium überführt. Diese Hauptkultur wurde für weitere 4h kultiviert, bis sie eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 erreicht hatte. Die für 1ml Kultur gemessene OD<sub>600</sub> wurde dann mit dem Gesamtkulturvolumen (55ml) multipliziert, um die Gesamtzahl der OD<sub>600</sub>-Einheiten festzustellen. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt, die zur Hälfte mit Eis gefüllt waren und für 5min bei 1000xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50ml kaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Lyse der Hefezellen wurde Hefe-Lysepuffer auf 60°C vorgewärmt, 100µl Puffer pro 7,5 OD<sub>600</sub>-Einheiten Hefezellen zu dem gefrorenen Zellpellet gegeben und die Zellen hierin

aufgetaut. In einem sterilen Reaktionsgefäß wurden 80µl Glasbeads pro 7,5 OD<sub>600</sub>-Einheiten Hefezellen vorgelegt und diese mit der Zellsuspension versetzt. Die Proben wurden dann für 10min bei 70°C inkubiert und anschließend für 1min gevortext. Durch Zentrifugation bei 20'000xg und 4°C für 5min wurden der Zelldebris und nicht lysierte Zellen pelletiert, der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde für 5min in einem Wasserbad gekocht, erneut gevortext und zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem zuvor erhaltenen Überstand vereinigt. Nach Zugabe von 2x nicht reduzierendem Auftragspuffer wurden die Proben 5min bei 90°C inkubiert und in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte für das LexA-GRAF-Fusionsprotein mit einem polyklonalen Antiserum gegen Aminosäuren 677-692 des humanen GRAF-Proteins (Eurogentec) in der Verdünnung 1:1000. Für das LexA-FBP17-Fusionsprotein erfolgte die Detektion mit einem polyklonalen FBP17-Antiserum gegen das Epitop NH<sub>2</sub>-KQLESSKRRFERDC-COOH (Eurogentec; Verdünnung 1:1000), das den Aminosäuren 194-207 des humanen FBP17-Proteins entspricht.

**Hefe Lyse-Puffer:**

48g Harnstoff  
5g SDS  
4ml 1M Tris-HCl, pH 6,8  
20µl 0,5M EDTA  
40mg Bromphenolblau  
ddH<sub>2</sub>O ad 100ml  
pro 1ml vor Gebrauch hinzufügen:  
10µl β-Mercaptoethanol  
4µl Protease Inhibitor Mix  
50µl 100mM PMSF

**II.9.5 Identifikation falsch-positiver Klone**

Zur Identifikation falsch-positiver Two Hybrid Klone, die keine tatsächliche Protein-Protein-Interaktion dokumentieren, wurden mehrere Testverfahren durchgeführt.

Zuerst wurden die positiven Klone wiederholt auf SD/-His/-Trp/-Ura-Medium ausgestrichen, um eine Plasmid-Segregation in denjenigen Klonen zu erreichen, die mehrere Library-Plasmide aufgenommen hatten. Danach wurden die Klone einem Plasmid Loss-Test unterzogen, der Reportergenaktivierung durch das Beuteplasmid allein nachweisen sollte.

***Plasmid Loss-Test:***

Bei diesem Test wurden Co-Transformanten für 24h in 3ml SD/-Trp/-Ura-Medium bei 30°C und 250rpm kultiviert. In diesem Medium unterblieb der selektive Druck auf das Köderplasmid, weshalb ca. 10% der Zellen dieses Plasmid verloren. 150µl einer 1:1000-

Verdünnung dieser Kultur wurden auf 100mm-Platten des gleichen Mediums ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Kolonien wurden dann auf SD/-His/-Trp/-Ura-Platten mit Hilfe steriler Samtstempel replica-plattiert, für 2 Tage bei 30°C inkubiert und das Ergebnis mit den Ausgangsplatten verglichen. Kolonien, die nicht mehr auf Medium ohne Histidin wachsen konnten, mussten das Köderplasmid verloren haben und wurden auf Induktionsmedium mit Histidin und X-Gal (SD/Gal/Raf/-Trp/-Ura, 1x BU-Salze, 80mg/l X-Gal) übertragen. Zeigten die Kolonien nach 48h Blaufärbung, verursachte das Beuteplasmid allein eine Reporterogenaktivierung und der Klon konnte als falsch-positiv identifiziert werden.

### ***Rescreen:***

Aus den im Plasmid Loss-Versuch negativen Kolonien wurden die Plasmide isoliert, in *E.coli* transformiert und präpariert. Da die Bakterien nach dieser Transformation entweder das Reporterplasmid p8op-LacZ oder das pB42AD-Libraryplasmid enthalten konnten, wurden die isolierten Plasmide mittels Restriktionsverdau mit HindIII (3h, 37°C) oder PCR mit pB42 Identifikationsprimern auf ihre Identität hin überprüft. Der Restriktionsverdau ergab für p8opLacZ drei Banden, für pB42AD vier oder mehr Banden, je nachdem, ob das Bibliothek-Insert zusätzliche HindIII-Schnittstellen enthielt. Die Identifikations-PCR erfolgte in einem Standard-PCR-Protokoll mit den Primern ID pB42 up und ID pB42 do. Lag pB42AD im Ansatz vor, wurde ein Fragment von 326bp amplifiziert, bei p8op-LacZ ergab sich kein PCR-Produkt.

Bereits mit dem Köder transformierte Hefezellen wurden dann erneut mit dem Bibliothek-Plasmid transformiert, für 3 Tage bei 30°C auf SD/-His/-Trp/-Ura-Medium kultiviert und die entstandenen Kolonien dann auf Induktionsmedium (SD/Gal/Raf/-His/-Leu/-Trp/-Ura, 1xBU-Salze, 80mg/l X-Gal) übertragen. Diejenigen Klone, die nach 48h eine Blaufärbung zeigten, wurden als positiv interpretiert und die entsprechenden Bibliothek-Plasmide sequenziert. Die Sequenzen wurden mittels einer Datenbanksuche auf ihre Identität hin überprüft.

## **II.10      Datenbanken und Software**

Für Informationen über DNA-Sequenzen wurde die Datenbank „GenBank“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) genutzt. Sequenzierungsergebnisse konnten mit Hilfe des Programms „BLAST Search“ mit der Datenbank verglichen werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem Programm „OMIGA 2“ der Firma Oxford Molecular analysiert. Die Untersuchung von

Proteinsequenzen hinsichtlich ihrer Domänenstruktur erfolgte mittels der „PROSITE“ Datenbank (<http://www.expasy.ch/prosite>). Als weiteres Hilfsmittel zur Analyse von Domänenstrukturen diente der „ISREC ProfileScan Server“ (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>). Die Überprüfung von DNA-Sequenzen auf Bindungsstellen für DNA-bindende Proteine erfolgte mit der Datenbank „Transfac“ (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC>). Eine allgemeine Informationsmöglichkeit zu Genen und Proteinen bot „GeneCards“ (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>).

## **III. Ergebnisse**

### **III.1 Der GRAF-Promotor**

#### **III.1.1 Ergebnisse der Luciferase Assays**

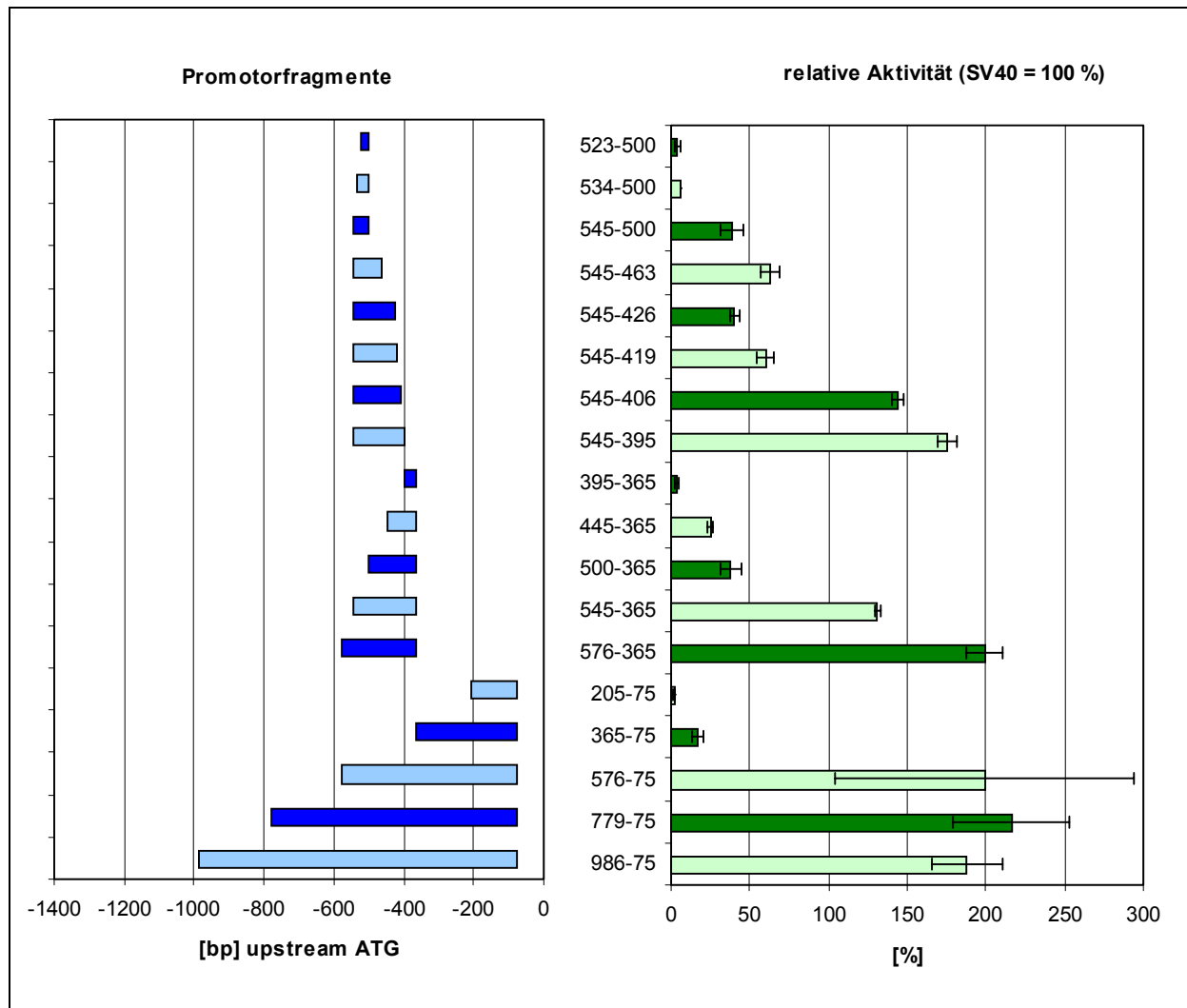
Der *GRAF*-Promotor umfasst eine 1481bp lange Region, die unmittelbar 5' des Start-Codons des *GRAF*-Gens liegt. Deletionsexperimente in Kombination mit einem Reporterassay, dem dualen Luciferase Assay System, zeigten, dass die 5' des ATG (mit A = +1) gelegenen Basen -75 bis -1481 für die Promotor-Aktivität verantwortlich waren. Besonders die Region bis Base -981 erwies sich als regulativ aktiv (BOJESSEN, 1999). Unter Anwendung desselben Reporter-Assays sollte nun in weiteren Deletionsexperimenten untersucht werden, welche Bereiche dieser Region für die Promotor-Aktivität essenziell sind und ob sich potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren eingrenzen lassen. Hierzu wurden mittels PCR verschiedene Fragmente der Promotorregion amplifiziert, wobei entweder der Sense-Primer beibehalten und mit verschiedenen Antisense-Primern kombiniert wurde, oder aber der Antisense-Primer konstant blieb und unterschiedliche Sense-Primer gewählt wurden. Diese Fragmente wurden in einem Vektor ohne eigene Promotorsequenzen einem Luciferase-Gen als Reporter vorgeschaltet, in K562-Zellen transfiziert und nach einer Inkubationszeit von 36 bis 40h in einem dualen Luciferase-Assay auf ihre Promotor-Aktivität hin getestet. Als Positivkontrolle diente ein Kontrollvektor, der den SV40-Promotor vor dem Luciferase-Gen enthielt. Die für diese Kontrolle ermittelten Daten dienten als Bezugspunkt und wurden gleich 100% gesetzt. Die Mittelwerte der auf die SV40-Aktivierung bezogenen experimentellen Daten gibt **Tab. III.1** wieder.

**Tab. III.1:** Relative Reporterogenaktivierung verschiedener Promotor-Fragmente in Bezug auf die Aktivierung durch den SV40-Promotor (=100%)

| Fragment    | relative Aktivität<br>(SV40 = 100%) | Stabw. | Fragment    | relative Aktivität<br>(SV40 = 100%) | Stabw. |
|-------------|-------------------------------------|--------|-------------|-------------------------------------|--------|
| -986 / -75  | 188                                 | 22     | -395 / -365 | 4                                   | 1      |
| -779 / -75  | 216                                 | 37     | -545 / -395 | 175                                 | 6      |
| -576 / -75  | 199                                 | 95     | -545 / -426 | 40                                  | 3      |
| -365 / -75  | 17                                  | 4      | -545 / -463 | 63                                  | 6      |
| -205 / -75  | 2                                   | 0,4    | -545 / -419 | 60                                  | 5      |
| -576 / -365 | 199                                 | 12     | -545 / -406 | 144                                 | 4      |
| -545 / -365 | 131                                 | 2      | -545 / -500 | 39                                  | 7      |
| -500 / -365 | 38                                  | 7      | -534 / -500 | 6                                   | 0,4    |
| -445 / -365 | 25                                  | 2      | -523 / -500 | 4                                   | 1,5    |

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse (**Abb. III.1**) verdeutlicht, dass eine Deletion des Promotor-Bereiches zwischen Base -986 und -576 keinen Einfluss auf die aktivierenden Eigenschaften des Promotor-Fragmentes hatte. Erst weitere Deletionen ausgehend vom 5'-Ende dieser Region führten zu einer deutlichen Verringerung der Promotor-Aktivität. Dabei konnte generell eine graduelle Abnahme der Reporteraktivierung mit Verkürzung des Promotorfragments beobachtet werden. Ebenfalls verzichtbar erschien die Region zwischen Base -75 und -365, die allein nur eine geringe Aktivierungskapazität zeigte. Damit konnte nachgewiesen werden, dass besonders der Bereich zwischen Base -365 und -576 für die Promotor-Funktion notwendig ist.

Detailliertere Deletionsanalysen sollten nun dazu dienen, potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zu detektieren. Da eine Deletion der Basen -500 bis -545 zu einer mehr als dreifachen Reduktion der Reporteraktivierung führte, wurde dieser Bereich allein kloniert und weitere Deletionen sowohl an seinem 3'-Ende als auch am 5'-Ende durchgeführt. Dabei ergab eine Verkürzung um weitere 11 Basen am 5'-Ende (Basen -534 bis -545) einen Rückgang der Aktivierung von 38 auf 6%. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Region um eine potenzielle Bindungsstelle für Transkriptionsregulatoren handeln könnte, weshalb dieses Motiv in einem One Hybrid Assay weiter untersucht wurde.



**Abb.III.1:** Relative Reporter-Genaktivierung der einzelnen Promotorfragmente  
Die Lage der Fragmente im Gesamtpromotor ist links dargestellt, rechts die relative Reporter-Genaktivierung bezogen auf den SV40-Promotor (SV40 = 100%)

### III.1.2 Ergebnisse der One Hybrid Screens

Um eine gegebene DNA-Sequenz auf ihr Potenzial als Protein-Bindungsmotiv hin zu testen, wurde diese als vierfach tandem-repetitive Sequenz in einen One Hybrid Assay eingesetzt. Dabei wird das DNA-Motiv vor die regulative Region zweier Reportergene kloniert und diese Konstrukte in das Genom eines geeigneten Hefestammes integriert. Der so hergestellte Reporterstamm wird dann mit einer cDNA-Bibliothek transformiert, in der die Proteine in Fusion mit einer aktivierenden Domäne exprimiert werden. Kommt es zur Bindung eines solchen Fusionsproteins an das zu testende DNA-Motiv, wird die Expression der Reportergene aktiviert. Im Versuch diente zum einen das Gen *HIS3* als Reporter, das bei Expression eine normalerweise Histidin-auxotrophe Hefe autotroph werden lässt. Als zweites

Reportergen diente das LacZ-Gen, dessen Expression in einem  $\beta$ -Galactosidase-Assay zur Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff führt.

Da *GRAF* ein besonders hohes Expressionsniveau in Hirngewebe zeigt (BORKHARDT, BOJESSEN *et al.*, 2000), wurde eine entsprechende cDNA-Bibliothek gewählt. Diese war in den Vektor pACT2 kloniert, von dem aus N-terminal mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusionierte Proteine exprimiert wurden. Als potenzielles Bindungsmotiv diente zum einen das mit Hilfe der Luciferase-Assays eingegrenzte DNA-Motiv -545 bis -534 mit der Sequenz 5'-GGCCACGCCCC-3'. Zum anderen wurde eine Sequenz herangezogen, die sich in DNaseI-Schutzexperimenten (sog. *Footprint*-Experimente) als methylierungssensitiv erwiesen hatte (AMMERPOHL, 2000). Diese umfasste die Basen -492 bis -479 und hatte die Sequenz 5'-ACCGCGGAAGGGCC-3'.

#### ***Ergebnisse für die Region –545 bis –534:***

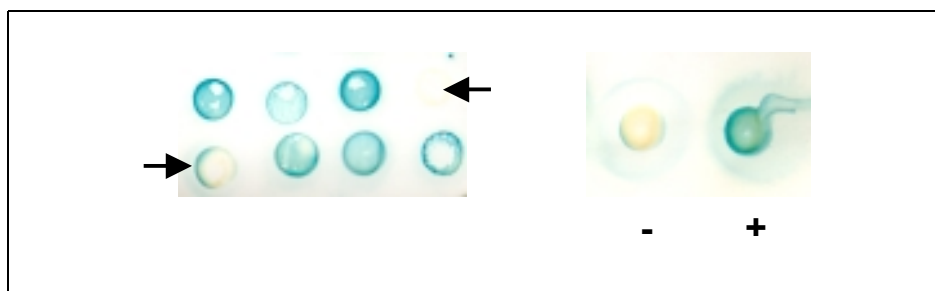
Zur Herstellung eines Hefe-Reporterstammes wurde die Sequenz 5'-GGCCACGCCCC-3' in vierfacher Wiederholung in zwei verschiedenen Plasmiden (pHISi und pHISi-1) vor den Minimalpromotor des *HIS3*-Reportergens kloniert. Diese Konstrukte wurden in das Hefegenom des Hefestammes YM4271 integriert und auf selbstständige Aktivierung des Reporters getestet. Dies erfolgte unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von 3-AT, einem kompetitiven Inhibitor des *HIS3*-Genprodukts. Nur ein Konstrukt, das bei Zugabe von mehr als 45mM 3-AT keine Hintergrundaktivierung des Reporters mehr zeigte, konnte für den Bibliotheksscreen genutzt werden. Wie **Tab. III.2** zeigt, erfüllte der Vektor pHISi-1/545-534 dieses Kriterium.

**Tab. III.2:** Ergebnis des Tests auf Hintergrundaktivierung des *HIS3*-Reportergens

| Plasmid                    | Klon | 0 mM 3-AT   | 15 mM 3-AT      | 45 mM 3-AT  | 60 mM 3-AT      |
|----------------------------|------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
| <b>pHISi<br/>545-534</b>   | 1    | Rasen       | Rasen           | 15 Kolonien | 5 Kolonien      |
|                            | 2    | Rasen       | Rasen           | Rasen       | ca. 50 Kolonien |
|                            | 3    | Rasen       | ca. 50 Kolonien | 10 Kolonien | -               |
|                            | 4    | Rasen       | 20 Kolonien     | -           | -               |
| <b>pHISi-1<br/>545-534</b> | 1    | Rasen       | ca. 50 Kolonien | 7 Kolonien  | -               |
|                            | 2    | 15 Kolonien | -               | -           | -               |
|                            | 3    | Rasen       | 11 Kolonien     | -           | -               |
|                            | 4    | 3 Kolonien  | -               | -           | -               |

Auch nach Insertion des pLacZi/545-534-Konstrukts in das Hefegenom konnte keine Hintergrundexpression des *LacZ*-Reportergens in einem Colony Lift Filter-Assay nach einer Inkubationszeit von 15min bei 30°C festgestellt werden. Es war daher möglich, einen doppelten Hefe-Reporterstamm herzustellen, der anschließend mit der Hirn-cDNA-Bibliothek transformiert wurde.

Nach einem repräsentativen Screen von  $3,5 \times 10^6$  unabhängigen Bibliotheks-Klonen konnten 64 Histidin-autotrophe Hefekolonien identifiziert werden. Von diesen färbten sich in einem Colony Lift Filter-Assay nach einer Inkubationszeit von 1h bei 30°C 25 Klone blau. **Abb. III.2** zeigt beispielhaft einen Ausschnitt aus einem solchen Filter.



**Abb. III.2:** Ergebnis eines Colony Lift Filter-Assays. Die mit Pfeilen markierten Kolonien wurden als negativ gewertet.

- = Negativkontrolle (p53-Bindungssequenz + GAL4-Aktivierungsdomäne)
- + = Positivkontrolle (p53-Bindungssequenz + p53-AD-Konstrukt)

Nach Isolierung der Plasmide konnte die ungefähre Größe der Inserts durch Restriktionsverdau mit EcoRI und XhoI und Agarose-Gelelektrophorese bestimmt werden. Anschließend wurden die Inserts sequenziert und mittels einer Datenbankrecherche identifiziert. Die Ergebnisse zeigt **Tab. III.3**.

Die Inserts der Klone A10, C6, C10 und D10 konnten als ALU-Repeats identifiziert werden, das Insert von Klon D11 stellte einen retroviralen LTR13 (long terminal repeat 13) dar. Da diese repetitiven Sequenzen des menschlichen Genoms nicht exprimiert werden, wurden die Klone als falsch-positiv klassifiziert. Die Inserts, die Bestandteile der Gene für BRCA1 assoziiertes Protein-1, LAMP2, Na,K-ATPase und den Transkriptionsfaktor MAX enthielten, repräsentierten 3'-untranslatierte Regionen der entsprechenden Gene und wurden ebenfalls als falsch-positiv betrachtet. Als weitere falsch-positive Ergebnisse wurden die Klone B6 und D15 gewertet. Beim Insert des Klons B6 handelte es sich um die letzten 22 Aminosäuren des hypothetischen Proteins DC42 sowie 3' des Gens gelegene untranslatierte Sequenzen. Klon D15 enthielt untranslatierte genomische sowie Intronsequenzen des *HAP-1* Gens, die jedoch nur einen offene Leserahmen für 12 Aminosäuren in Fusion mit der Aktivierungsdomäne ergaben.

**Tab. III.3:** Ergebnisse des One Hybrid Bibliothek-Screens für das Promotorfragment -545 bis -534. +/+ : Insert und identifizierte Sequenz sind gleich orientiert; +/- : Insert und identifizierte Sequenz sind gegenläufig orientiert

| Klon | Insert<br>[bp] | Identität                                     | GenBank<br>Accession | Lokalisation<br>des Inserts | Übereinstimmung<br>[%] |
|------|----------------|-----------------------------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------|
| A6   | 700            | BRCA1 associated protein-1                    | NM_004656.1          | ab Base 2907 +/+            | 93                     |
| A10  | 1850           | Chromosom 22,<br>Klon RP3-434P1               | Z97056.1             | ab Base 53573<br>+/+        | 95                     |
| A15  | 1600           | Chromosom 17,<br>Klon hRPC.1164_O_3           | AC004703             | ab Base 47510<br>+/-        | 95                     |
| B2   | 650            | Ubiquitin Carboxyl<br>Extension Protein       | S79522.1             | ab Base 17 +/+              | 95                     |
| B6   | 2900           | DC42                                          | AF267864             | ab Base 706 +/+             | 99                     |
| B9   | 1100           | LAMP2                                         | S79873.1             | ab Base 3228 +/+            | 95                     |
| B10  | 950            | cDNA-Klon<br>DKFZp566I1546                    | AL110254.1           | ab Base 1159 +/+            | 96                     |
| B12  | 3700           | Chromosom 7,<br>Klon RP11-36B6                | AC016831             | ab Base 144201<br>+/-       | 98                     |
| C2   | 2000           | KIAA0515                                      | AB011087             | ab Base 4820 +/+            | 97                     |
| C6   | 1400           | Chromosom 22,<br>Klon RP3-434P1               | Z97056.1             | repetitiv +/-               | 90-97                  |
| C7   | 2300           | Bladder Cancer<br>Related Protein<br>(BC10)   | NM_006698.1          | ab Base 37 +/+              | 96                     |
| C9   | 1300           | Mitochondrium                                 | X62996               | ab Base 7806 +/+            | 97                     |
| C10  | 1700           | Chromosom 21,<br>PAC LLNCO21F0122             | AL109967.2           | ab Base 98452<br>+/-        | 92                     |
| C11  | 900            | Na,K-ATPase $\beta$ -<br>Untereinheit (ATP1B) | NM_001677.1          | ab Base 1534 +/+            | 97                     |
| C12  | 250            | MAX                                           | X66867               | ab Base 2630 +/+            | 99                     |
| D6   | 2100           | Chromosom 2,<br>Klon 101B6                    | AC002038             | ab Base 9103 +/-            | 85                     |
| D9   | 800            | Mitochondrium                                 | NC_001807.2          | ab Base 9220 +/+            | 95                     |
| D10  | 1000           | X-Chromosom,<br>PAC Klon DJ327A19             | AC002477             | repetitiv +/-               | 90-93                  |
| D11  | 2500           | Chromosom 22q13.3,<br>Klon RP3-402G11         | AL022328.21          | ab Base 173711<br>+/-       | 97                     |
| D14  | 2300           | cDNA-Klon<br>DKFZp762M127                     | AL157484.1           | ab Base 177 +/+             | 100                    |
| D15  | 1850           | HAP-1                                         | AJ012824             | repetitiv +/-               | 81-87                  |

Klon C7 beinhaltetete die gesamte kodierende Sequenz des *BC10*-Gens, jedoch fand sich in der 5'-untranslatierten Region ein Stop-Codon, das die Expression eines Fusionsgens mit der GAL4-Aktivierungsdomäne des Vektors ausschloss. Ähnliches gilt für das Insert des Klons B2, das die gesamte codierende Sequenz des Ubiquitin Carboxyl Extensionsproteins

(HUBCEP80) umfasste, allerdings in einem verschobenen Leserahmen, der zu einem vorzeitigen Translationsstop führte.

#### **Ergebnisse für die Region -492 bis -479:**

Die Sequenz 5'-ACCGCGGAAGGGCC-3', die der Region -492 bis -479 des *GRAF*-Promotors entsprach, wurde ebenfalls in vierfacher Wiederholung vor das *HIS3*-Reportergen in pHISi und pHISi-1 bzw. vor das *LacZ*-Reportergen im pLacZi kloniert. Anschließend wurde wiederum der Hefestamm YM4271 mit den linearisierten Plasmiden transformiert, so dass es zu einem Einbau der Konstrukte in das Hefegenom kam. Vier Klone wurden jeweils auf ihre Hintergrundexpression des Reportergens überprüft. Für die *HIS3*-Reporter zeigt **Tabelle III.4** das Ergebnis dieses Versuchs. Das Konstrukt pHISi-1/492-479 zeigte bei einer 3-AT-Konzentration von 45mM kaum Hintergrundexpression. Da auch die pLacZi/492-479 transformierten Hefezellen keine Hintergrundexpression des *LacZ*-Gens in einem Colony Lift Filter-Assay zeigten, konnte ein doppelter Reporterstamm hergestellt werden.

**Tab. III.4:** Ergebnis des Tests auf Hintergrundaktivierung des *HIS3*-Reportergens

| Plasmid                    | Klon | 0 mM 3-AT        | 15 mM 3-AT       | 45 mM 3-AT      | 60 mM 3-AT |
|----------------------------|------|------------------|------------------|-----------------|------------|
| <b>pHISi<br/>492-479</b>   | 1    | ca. 120 Kolonien | ca. 100 Kolonien | 10 Kolonien     | -          |
|                            | 2    | Rasen            | Rasen            | -               | -          |
|                            | 3    | Rasen            | Rasen            | ca. 50 Kolonien | -          |
|                            | 4    | Rasen            | Rasen            | -               | -          |
| <b>pHISi-1<br/>492-479</b> | 1    | Rasen            | ca. 100 Kolonien | -               | -          |
|                            | 2    | Rasen            | ca. 80 Kolonien  | -               | -          |
|                            | 3    | ca. 80 Kolonien  | ca. 80 Kolonien  | -               | -          |
|                            | 4    | Rasen            | ca. 120 Kolonien | 20 Kolonien     | -          |

Nach Transformation des doppelten Reporterstammes mit der Hirn-cDNA-Bibliothek zeigten sich 200 Klone Histidin-autotroph. Bei Replattierung auf entsprechendem Erhaltungsmedium erwiesen sich jedoch nur 48 dieser 200 positiven Klone als tatsächlich autotroph, die übrigen Kolonien wuchsen nicht wieder an und wurden als falsch-positiv eingestuft. Im Colony Lift Filter-Assay färbten sich 28 der 48 Klone nach einer Inkubationszeit von 1h bei 30°C blau. Aus diesen Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert, sequenziert und die erhaltenen Sequenzen durch Datenbankrecherchen identifiziert (**Tab. III.5**).

**Tab. III.5:** Ergebnisse des One Hybrid Bibliothek-Screens für das Promotorfragment -492 bis -479. +/+ : Insert und Sequenz gleich orientiert; +/- : Insert und Sequenz gegenläufig orientiert

| Klon | Insertlänge [bp] | Identität                                               | GenBank Accession    | Lokalisation des Inserts | Übereinstimmung [%] |
|------|------------------|---------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|
| 1    | 900              | GAPDH                                                   | XM_033258            | ab Base 831 +/-          | 94                  |
| 2    | 1600             | Humanin (HN1)                                           | AY029066             | ab Base 7 +/+            | 85                  |
| 3    | 1300             | MK-STYX                                                 | XM_034786            | ab Base 77 +/+           | 88                  |
| 4    | 1500             | Chromosom 10, Klon RP11-437J2                           | AL157396             | ab Base 8704 +/-         | 95                  |
| 8    | 3000             | GTP-bindendes Protein, $\alpha$ -Untereinheit (GNAS1)   | X07036               | ab Base 562 +/+          | 94                  |
| 9    | 2700             | STM-7                                                   | X92493               | ab Base 115 +/+          | 93                  |
| 10   | 1500             | Chromosom 9, Klon hRPK.401_G_18                         | AC006312             | ab Base 158912 +/-       | 100                 |
| 12   | 900              | Chromosom 11q13, bac41i21                               | AC008102             | ab Base 25934 +/-        | 88                  |
| 13   | 1600             | SRP9                                                    | XM_017873            | ab Base 1 +/+            | 96                  |
| 15   | 1300             | Guanylat Kinase 1                                       | XM_002110            | ab Base 2 +/+            | 99                  |
| 16   | 450              | EHD3; EHD2                                              | XM_052437 ; AF214736 | ab Base 3212 +/+         | 94                  |
| 17   | 1400             | Heparan Glucosaminyl N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 2 | AF042084             | ab Base 4051 +/-         | 90                  |
| 19   | 950              | X-Chromosom, Klon RP11-274M8                            | AL139809             | ab Base 146722 +/+       | 96                  |
| 22   | 950              | MBP                                                     | XM_008797            | ab Base 1166 +/+         | 97                  |
| 23   | 1200             | Ferritin                                                | BC004245             | ab Base 5 +/+            | 91                  |
| 24   | 150              | Chromosom 11q, Klon RP11-823O21                         | AP000936             | repetitiv +/- und +/+    | 90                  |
| 25   | 1250             | hypothetisches Protein FLJ20950                         | XM_029355            | ab Base 1392 +/+         | 94                  |
| 26   | 1250             | hypothetisches Protein FLJ20950                         | XM_029355            | ab Base 1392 +/+         | 100                 |
| 28   | 1550             | RPL21                                                   | XM_040643            | ab Base 9 +/+            | 92                  |
| 31   | 1250             | KIAA0789                                                | XM_033113            | ab Base 3179 +/+         | 89                  |
| 32   | 1900             | Chromosom 22, Klon RP4-742C19                           | AL031846.2           | ab Base 42661 +/-        | 98                  |
| 34   | 2500             | Mitochondrium                                           | BC000525             | ab Base 10 +/+           | 93                  |
| 35   | 400              | btf2p44, NAIP und SMN                                   | U80017               | ab Base 18641 +/+        | 85                  |
| 37   | 1800             | Chromosom 7, Klon RP11-182G3                            | AC018641             | repetitiv +/+ und +/-    | 95-98               |
| 38   | 1900             | Chromosom 10, Klon RP11-522H2                           | AC069548             | repetitiv +/-            | 94-96               |
| 40   | 450              | EHD3; EHD2                                              | XM_052437 ; AF214736 | ab Base 3207 +/+         | 94                  |
| 41   | 2300             | kein Ergebnis                                           | -                    | -                        | -                   |
| 45   | 1600             | cDNA-Klon DKFZp564D016                                  | AL050021             | ab Base 1600 +/+         | 94                  |

Einige der identifizierten Klone konnten direkt als falsch-positiv klassifiziert werden. So enthielt Klon 1 zwar Abschnitte der kodierenden Sequenz des *GAPDH*-Gens, jedoch in reverser Orientierung. Klone 2, 3, 9, 13 und 15 enthielten ebenfalls kodierende Sequenzen, jedoch zusätzlich auch 5'-untranslatierte Bereiche der entsprechenden Gene, die zu Stop-Codons vor Translationsbeginn des jeweiligen Proteins führten. Klone 25 und 26, die beide kodierende Sequenzen des hypothetischen Proteins FLJ20950 beinhalteten, wiesen eine Leserahmenverschiebung mit vorzeitigem Stop nach 18 Aminosäuren auf. Gleiches gilt für Klon 28, der kodierendes Material des *RPL21*-Gens enthielt. Die Klone 16, 22, 31 und 40 beinhalteten Sequenzen aus der 3'-untranslatierten Region der jeweils aufgeführten Gene, Klon 23 hingegen 5'-untranslatierte Bereiche, die zu einem Stop vor Beginn der kodierenden Region führten.

Die genomische DNA aus Klon 32 stellte einen Teil der 5'-untranslatierten Region des noch nicht näher charakterisierten Gens *dJ742C19.5* dar. Ebenfalls genomischen Ursprungs war das Insert aus Klon 17, das Intron-Sequenzen der Heparan-Glucosaminyl N-Deacetylase enthielt. Klon 35 enthielt genomische Sequenzen, die zwischen den Genen für die Proteine BTF2p44 und NAIP lagen. Ebenfalls genomische Inserts, bei denen es sich meist um repetitive Sequenzen wie ALU-Repeats handelte, wiesen die Klone 4, 12, 19, 24, 37 und 38 auf. Die Klone 10, 41 und 45 enthielten kleine offene Leserahmen, die zur Synthese von Peptiden aus 13 (Klon 45) bis 40 (Klon 10) Aminosäuren führten.

Einzig Klon 8 beinhaltete einen offenen Leserahmen, dessen Sequenz einem bekannten Protein entsprach. Es handelte sich dabei um die  $\alpha$ -Untereinheit des stimulierenden GTP-bindenden Proteins (GNAS1), dessen insgesamt 394 Aminosäuren umfassende Proteinsequenz ab Aminosäure 184 von diesem Bibliotheks-Plasmid kodiert wurde.

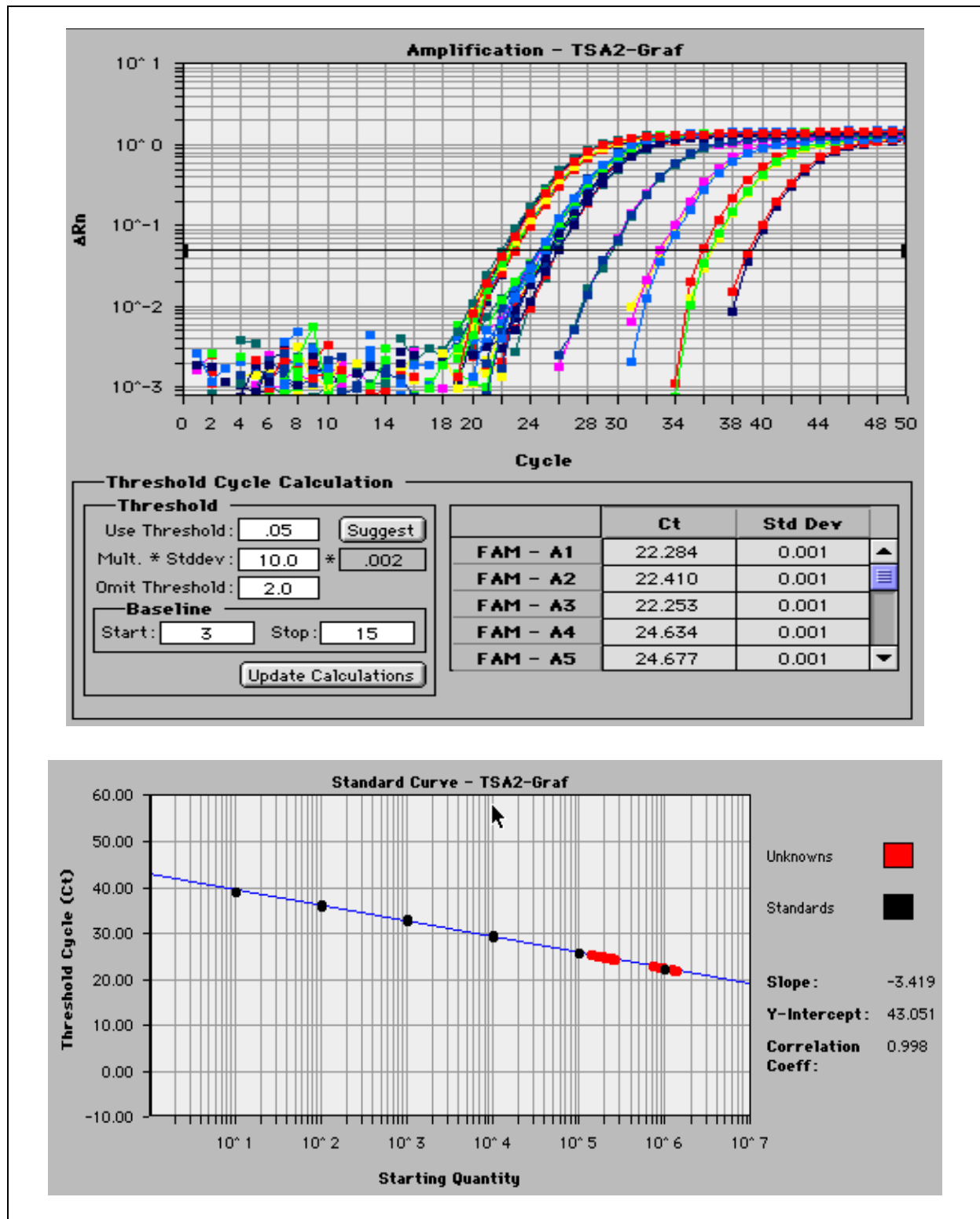
## **III.2 Die GRAF-Expression**

### **III.2.1 Einfluss von TSA**

Die Acetylierung und Deacetylierung von Histonen in den Nucleosomen des Chromatins spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. Hyperacetylierte Histone sind mit Genaktivität assoziiert, da die Acetylierung die positiven Ladungen der N-terminalen Lysin-Reste neutralisiert. Dadurch wird die Affinität der Histone für DNA herabgesetzt, die Nucleosomen entfalten sich und Transkriptionsfaktoren erhalten einen leichteren Zugang zur

DNA (LEE *et al.*, 1993; GRUNSTEIN, 1997). Dieser Effekt wird von Histon-Deacetylasen rückgängig gemacht, die die Acetyl-Reste von den Lysinen entfernen (DAVIE, 1998). Mit Hilfe von Histon-Deacetylase-Inhibitoren sollte es also möglich sein, die Expression eines Gens zu steigern, da die Nucleosomen nicht mehr durch die Deacetylasen in ihre hochgradig kondensierte, hypoacetylierte Konformation überführt werden können. Ein solcher Inhibitor ist Trichostatin A (TSA), das nicht-kompetitiv das katalytische Zentrum der Histon-Deacetylasen, eine tubuläre Struktur mit einem zentralen Zink-Atom, blockiert (YOSHIDA *et al.*, 1990, MARKS *et al.*, 2000). Allgemein führen Histon-Deacetylase-Inhibitoren zu einem Wachstumsstopp und zu Differenzierung oder Apoptose bei einer Vielzahl kultivierter transformierter Zellen (MARKS *et al.*, 2001).

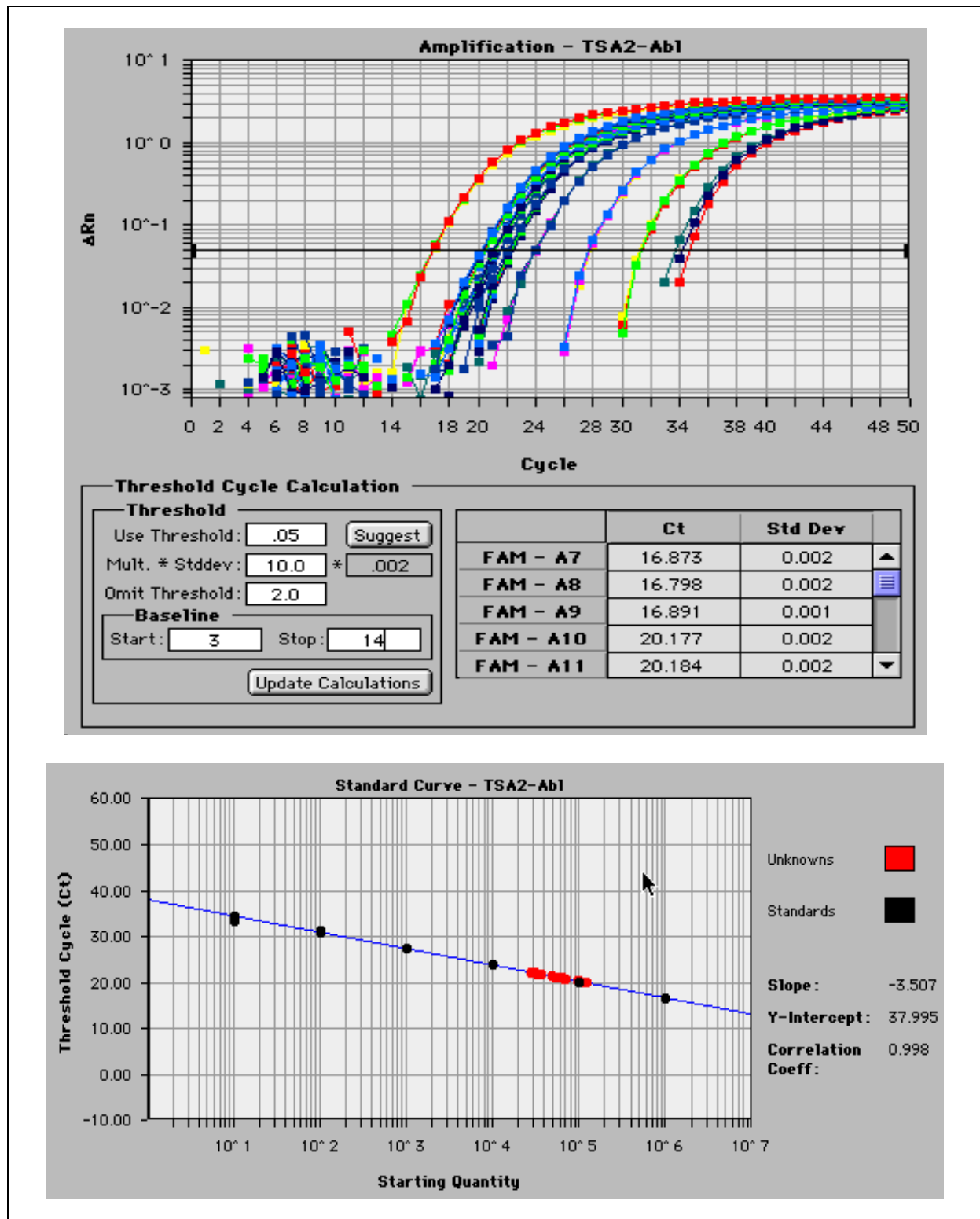
Im Versuch sollte der Einfluss eines Histon-Deacetylase-Inhibitors auf die *GRAF*-Expression untersucht werden. Hierzu wurden die Zelllinien Jurkat, Daudi, Mutz-1, K562 und Kasumi-1 mit 0, 100, 200 bzw. 300ng TSA pro ml Kulturmedium für 16h inkubiert. Dabei zeigte sich in den Ansätzen mit 200 bzw. 300ng TSA pro ml bereits nach dieser kurzen Inkubationszeit eine Schädigung der Zellen. Anschließend wurde die Gesamt-RNA nach einem Standardprotokoll isoliert und mit diesem Template cDNA synthetisiert. Dabei wurde jeweils 1µg RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Qualität der cDNA wurde in einer Standard-PCR mit den für die *GRAF*-Quantifizierung genutzten Primern (GR.Gen-1662F und GR.Gen-1743R) überprüft. Aus allen Proben konnte ein PCR-Produkt von 82bp Länge generiert werden. Die *GRAF*-Expressionsniveaus in den einzelnen Ansätzen wurden anschließend mit Hilfe von Real Time quantitativer PCR am TaqMan ermittelt. Dies erfolgte im Vergleich zu dem Housekeeping-Gen ABL, wobei die Anzahl der ermittelten *GRAF*-Kopien auf jeweils 10'000 ABL-Kopien normalisiert wurden, um unterschiedliche Effizienzen der PCR auszugleichen. Als Standard dienten linearisierte Plasmide, die die entsprechenden Gensequenzen enthielten und in bekannten Kopienzahlen in die PCR eingesetzt wurden. Aus den für diese Verdünnungsreihen ermittelten Werten konnte eine Standardkurve erstellt werden, aus der dann die experimentellen Werte abgeleitet wurden. **Abb. III.3** zeigt die Standardkurve sowie die experimentellen Daten, die für *GRAF* generiert wurden.



**Abb. III.3:** GRAF-Detektion (Bestimmung der  $C_T$ -Werte) und Quantifizierung anhand einer Standardkurve in den einzelnen Zelllinien nach Behandlung mit TSA

Die  $C_T$ -Werte gaben dabei denjenigen Zyklus der PCR an, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals einen festgelegten Schwellenwert überschritt. Je früher das Signal detektierbar war, desto mehr Template-Kopien waren in der in den PCR-Ansatz eingesetzten cDNA vorhanden.

**Abb. III.4** gibt die korrespondierenden Ergebnisse für das Housekeeping-Gen *ABL* wieder.



**Abb. III.4:** ABL-Detektion (Bestimmung der  $C_T$ -Werte) und Quantifizierung mit Hilfe einer Standardkurve in den einzelnen Zelllinien nach Behandlung mit TSA

Aus den Rohdaten ergaben sich die in **Tab. III.6** aufgeführten *GRAF*-Kopienzahlen. Dabei zeigte sich unter TSA-Behandlung eine Erhöhung der *GRAF*-Expression bei allen untersuchten Zelllinien, jedoch abhängig von der TSA-Konzentration und der jeweiligen Zelllinie. K562 wies generell eine sehr geringe *GRAF*-Expression auf, die sich erst bei

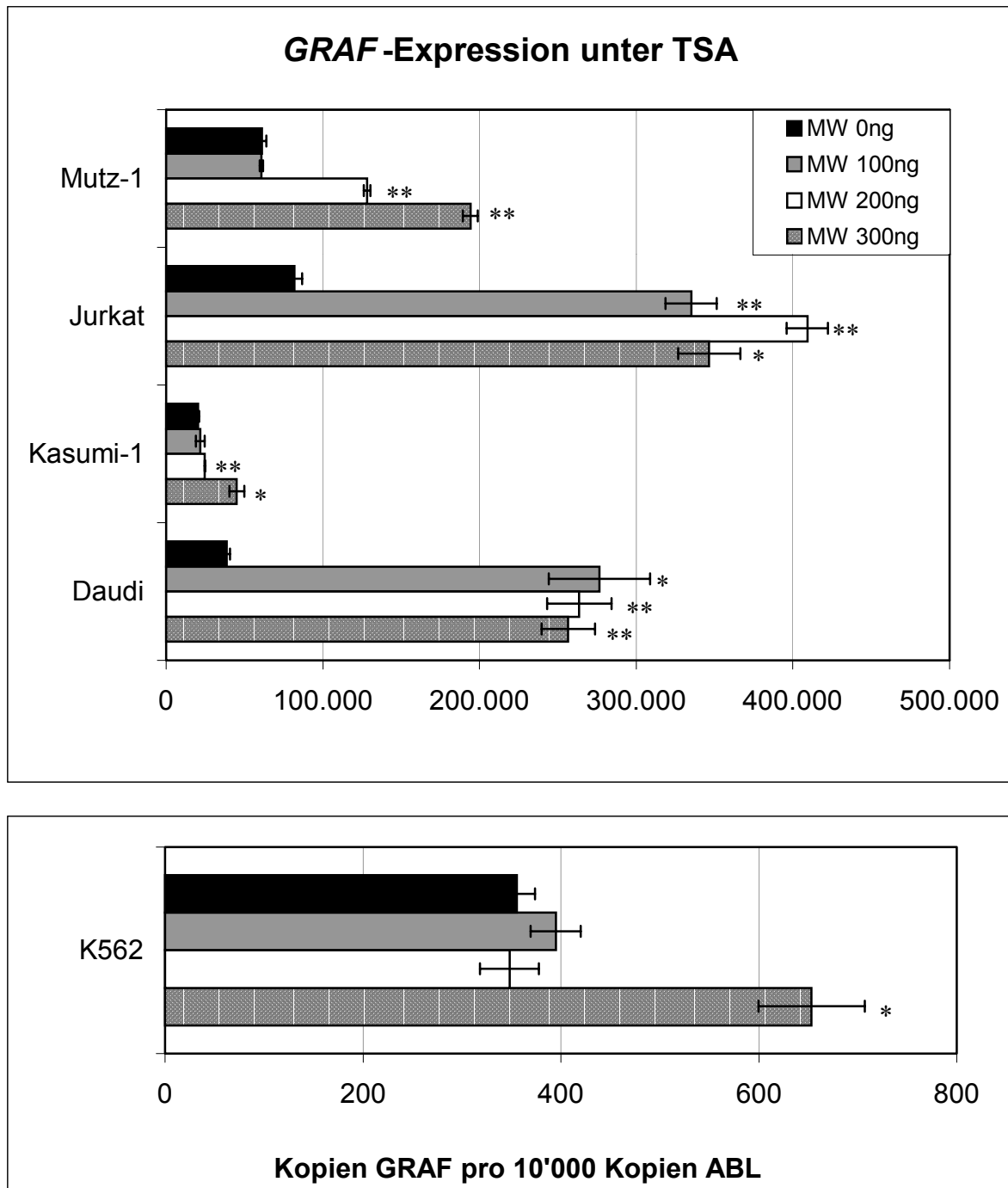
Kultivierung unter Zusatz von 300ng TSA/ml deutlich erhöhte und den doppelten Wert der unbehandelten Kontrolle ergab. Mutz-1 zeigte bei 200ng TSA/ml eine Verdoppelung der *GRAF*-Expression, die bei 300ng TSA/ml auf den dreifachen Wert der unbehandelten Zellen anstieg. Die übrigen Zelllinien reagierten bereits bei einer Konzentration von 100ng/ml TSA mit einem Anstieg der *GRAF*-Expression. Am deutlichsten erfolgte dies bei Daudi, bei der ein Anstieg auf das Siebenfache der Ausgangskopienzahl zu verzeichnen war. Bei weiterer Erhöhung der TSA-Konzentration nahm das Expressionsniveau wieder ab, was die Schädigung der Zellen durch TSA, die im Mikroskop zu beobachten war, molekular dokumentierte (Differenzierungsinduktion und Apoptose; MARKS *et al.*, 2001). Ähnliche Beobachtungen konnten bei der Zelllinie Jurkat gemacht werden.

Darüber hinaus fiel auf, dass die aus myeloischen Leukämien (K562 und Kasumi-1) bzw. myelodysplastischem Syndrom (Mutz-1) abgeleiteten Zelllinien höhere TSA-Konzentrationen benötigten, bis es zu einer signifikanten Erhöhung der *GRAF*-Expression kam.

**Tab III.6:** Anzahl der *GRAF*-Kopien nach Inkubation mit TSA, jeweils normalisiert auf 10'000 Kopien *Abl*.

| Zelllinie         | + 0ng TSA/ml   | + 100ng TSA/ml   | + 200ng TSA/ml       | + 300ng TSA/ml   |
|-------------------|----------------|------------------|----------------------|------------------|
| Mutz-1            | 61'062 ± 3'036 | 60'889 ± 1'060   | 128'378 ± 2'077      | 194'178 ± 4'853  |
| <i>p (t-Test)</i> |                | 0,9473           | 0,0001               | 0,0005           |
| K562              | 355 ± 18       | 395 ± 25         | 348 ± 30             | 653 ± 54         |
| <i>p (t-Test)</i> |                | 0,07144          | 0,7824               | 0,0144           |
| Jurkat            | 81'842 ± 4'785 | 335'076 ± 16'458 | 409'242 ± 13'136     | 346'517 ± 19'786 |
| <i>p (t-Test)</i> |                | 0,0003           | $5,4 \times 10^{-7}$ | 0,0111           |
| Kasumi-1          | 20'511 ± 662   | 21'757 ± 2'954   | 24'684 ± 213         | 45'128 ± 4'670   |
| <i>p (t-Test)</i> |                | 0,4916           | 0,0043               | 0,0312           |
| Daudi             | 38'482 ± 2'157 | 276'489 ± 32'197 | 263'640 ± 20'608     | 256'582 ± 17'074 |
| <i>p (t-Test)</i> |                | 0,0115           | 0,001                | 0,0026           |

**Abb. III.5** gibt eine graphische Darstellung der *GRAF*-Expressionsniveaus in den einzelnen Ansätzen wieder.



**Abb. III.5:** GRAF-Expressionsniveaus verschiedener Zelllinien in Abhängigkeit von der TSA-Konzentration

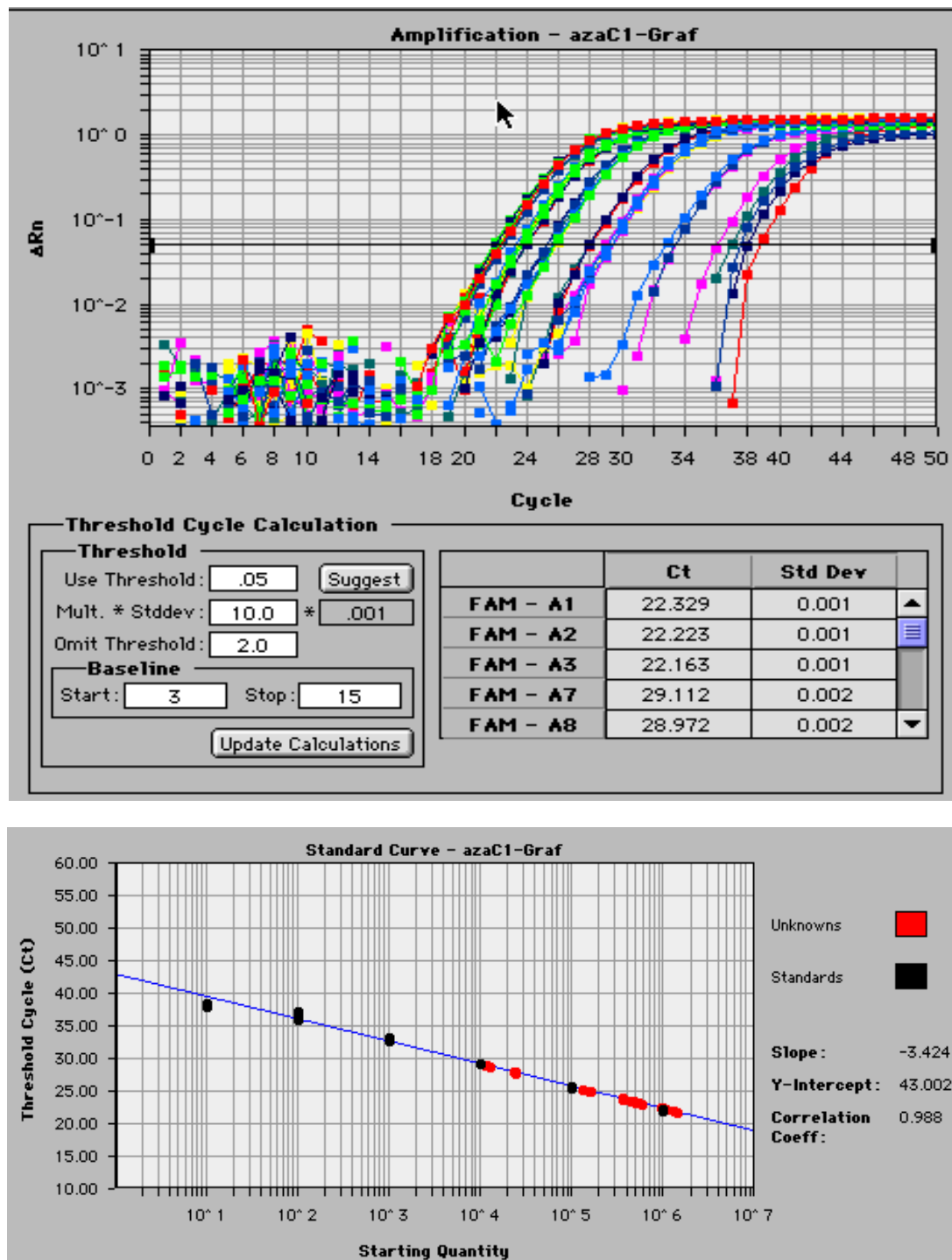
\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$  nach t-Test Statistik

### III.2.2 Einfluss von 5-azadC

Methylierung von Cytosin-Resten in CpG-Dinucleotiden regulativer DNA-Abschnitte ist ein verbreiteter Mechanismus zur Suppression der Genexpression (COLOT *et al.*, 1999). Die meisten Transkriptionsfaktoren bei Säugetieren besitzen GC-reiche Bindungsstellen, die oftmals CpG-Dinucleotide enthalten. Zur optimalen Bindung müssen diese Faktoren Kontakt

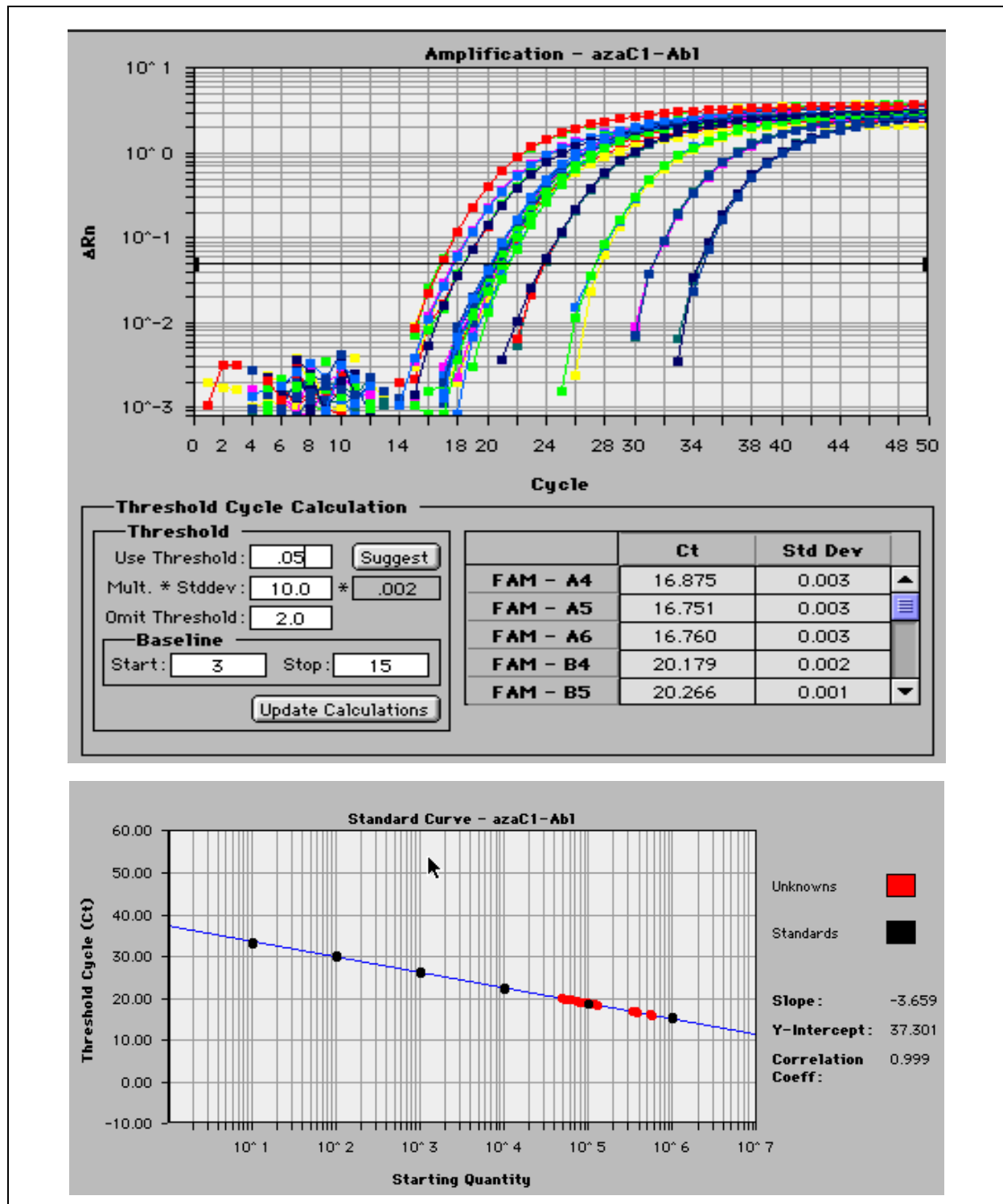
zu Cytosin-Resten in der großen Furche der DNA aufnehmen. Sind diese Reste methyliert, kann der Transkriptionsfaktor nicht mehr binden und die Expression des entsprechenden Gens unterbleibt. Die Methylierung der Cytosin-Reste erfolgt durch eine Gruppe von DNA-Cytosin-Methyltransferasen (DNMTs), von denen bei Säugern bislang vier bekannt sind (BIRD *et al.*, 1999). Das bei der Behandlung von AML und MDS eingesetzte Nucleotid-Analogon 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-azadC) wirkt als Inhibitor der Methyltransferase1 (DNMT1). Hierzu muss es während der Synthese in die DNA eingebaut werden. Dabei ist eine Einbaurate von 0,3% ausreichend, um 95% der Methyltransferasen zu inhibieren (CREUSOT *et al.*, 1982). Dies erfolgt durch kovalente Bindung des Enzyms an 5-azadC, wodurch die Transferase weiteren Reaktionen entzogen ist. Als Konsequenz kommt es zu einer Demethylierung der genomischen DNA, was zur Aktivierung der Transkription der durch Methylierung reprimierten Gene führen kann. (JÜTTERMANN *et al.*, 1994).

Es sollte der Einfluss von 5-azadC auf die *GRAF*-Expression in verschiedenen Zelllinien getestet werden. Untersucht wurden die Zelllinien K562, Jurkat, Kasumi-1 Daudi und Mutz-1. Pro Ansatz wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in Vollmedium mit einer Endkonzentration von  $5 \mu\text{M}$  5-azadC kultiviert. Da das Reagenz in die DNA integriert werden muss, um seine Wirksamkeit zu zeigen, mussten die Zellen für mindestens einen Teilungszyklus mit 5-azadC inkubiert werden. Für alle verwendeten Zelllinien war eine Inkubationszeit von 72h hierfür ausreichend. Als Negativkontrolle diente die gleiche Anzahl Zellen, die in Vollmedium ohne Zusatz von 5-azadC kultiviert worden waren. Nach dieser Zeitspanne zeigten die behandelten Zellen keine morphologischen Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollen. Sie wurden geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und  $1 \mu\text{g}$  RNA in eine cDNA-Synthese eingesetzt.  $2 \mu\text{l}$  cDNA dienten als Template in einem quantitativen PCR-Ansatz. Die Anzahl der *GRAF*-Kopien wurde wiederum mittels Real Time quantitativer PCR am TaqMan ermittelt und jeweils auf 10'000 Kopien des Housekeeping-Gens *ABL* normalisiert. **Abb. III.6** zeigt die für *GRAF* ermittelte Standardkurve sowie die experimentellen Daten.



**Abb. III.6:** GRAF-Detektion (Bestimmung der  $C_T$ -Werte) und Quantifizierung mit einer Standardkurve in den einzelnen Zelllinien nach Behandlung mit 5-azadC

Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde das *ABL*-Housekeeping-Gen auf die gleiche Weise detektiert. Die entsprechenden Ergebnisse zeigt **Abb. III.7**.



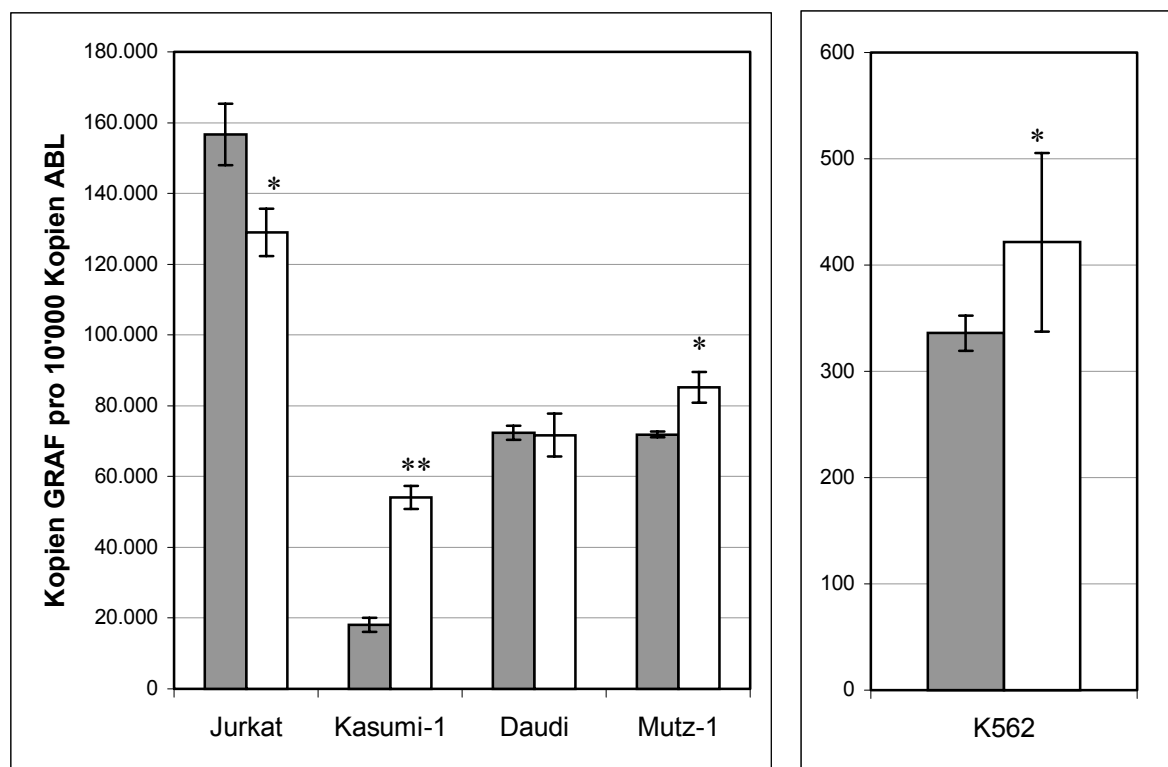
**Abb. III.7:** GRAF-Detektion (Bestimmung der  $C_T$ -Werte) und Quantifizierung in den einzelnen Zelllinien nach Behandlung mit 5-azadC

Wie aus **Tab. III.7** ersichtlich, kam es nur bei den Zelllinien Kasumi-1, Mutz-1 und K562 zu einer Erhöhung der GRAF-Expression, wobei besonders Kasumi-1 auf die Behandlung mit 5-azadC ansprach. Hier war eine hoch signifikante Erhöhung der GRAF-Expression um den Faktor 3 messbar. Daudi zeigte keinen signifikanten Unterschied im Expressionsniveau, Jurkat eine nur schwach signifikante leichte Verringerung der Kopienzahlen.

**Tab. III.7:** Anzahl der GRAF-Kopien in verschiedenen Zelllinien normalisiert auf 10'000 ABL-Kopien bei Inkubation mit und ohne 5-azadC

| Zelllinie | ohne 5-azadC     | mit 5-azadC      | <i>p</i> (t-Test) |
|-----------|------------------|------------------|-------------------|
| K562      | 336<br>± 16      | 421<br>± 84      | 0,008             |
| Jurkat    | 156619<br>± 8666 | 129067<br>± 6693 | 0,034             |
| Kasumi    | 18097<br>± 1910  | 54118<br>± 3223  | 0,0009            |
| Daudi     | 72410<br>± 1968  | 71665<br>± 6080  | 0,603             |
| Mutz      | 71873<br>± 798   | 85200<br>± 4351  | 0,014             |

**Abb. III.8** verdeutlicht diese Ergebnisse graphisch.



**Abb. III.8:** GRAF-Expressionsniveaus in verschiedenen Zelllinien nach Behandlung mit 5-azadC (weiße Säulen) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (graue Säulen)  
 \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$  nach t-Test Statistik

### **III.3 Einfluss von GRAF auf Signaltransduktionswege**

Extrazelluläre Botenstoffe wie Hormone oder Wachstumsfaktoren, aber auch zellulärer Stress wie Hitze- oder Strahlungseinfluss stellen Signale dar, die von der Zelle wahrgenommen und angemessen beantwortet werden müssen. Die Wahrnehmung erfolgt häufig mit Hilfe von membranständigen Rezeptoren, die über eine Transmembrandomäne in der Membran verankert sind und sowohl über eine extrazelluläre als auch eine cytoplasmatische Domäne verfügen. An den extrazellulären Abschnitt kann ein Botenstoff binden, was zu Veränderungen an der cytoplasmatischen Domäne des Rezeptors führt. Dadurch werden Signalkaskaden innerhalb der Zelle ausgelöst, die schließlich zur Aktivierung der Genexpression bestimmter Zielgene im Kern führen und eine dem Reiz angemessene Zellantwort erlauben.

Um den Einfluss des GRAF-Proteins auf verschiedene dieser Signaltransduktionswege zu testen, wurde das Protein in einen Pathway Profiling Assay eingesetzt. Hierzu wurden 293T-Zellen sowohl mit dem Wildtyp-Protein als auch mit einem trunkierten GRAF-Protein in einem eukaryonten Expressionsvektor (pcDNA3) transfiziert. Zusätzlich wurde ein Reportervektor in die Zellen eingeführt, der ein für einen bestimmten Signaltransduktionsweg spezifisches Enhancer-Element vor einem Luciferase-Gen als Reporter trug. Nach einer Inkubationszeit von 40h wurde in einem dualen Luciferase Assay die Aktivierung des Reportergens gemessen, was einen direkten Rückschluss auf die Aktivierung des jeweiligen Signaltransduktionsweges zuließ. Als interne Kontrolle diente wiederum die Expression der *Renilla*-Luciferase des Kontrollvektors pRL-TK, der bei jedem Ansatz in gleicher Konzentration mitgeführt wurde. **Tab. III.8** gibt die Ergebnisse im Vergleich zu den für einen Kontrollvektor ohne Enhancer-Element (pTAL) in Kombination mit dem leeren Expressionsvektor (pcDNA3) erhaltenen Werte wieder.

**Tab. III.8:** Ergebnisse des Pathway-Profilings normalisiert auf die Messergebnisse für die *Renilla*-Luciferase (interne Kontrolle).  
WT = GRAF Wildtyp-Protein, Stop = GRAF mit vorzeitigem Stop-Codon

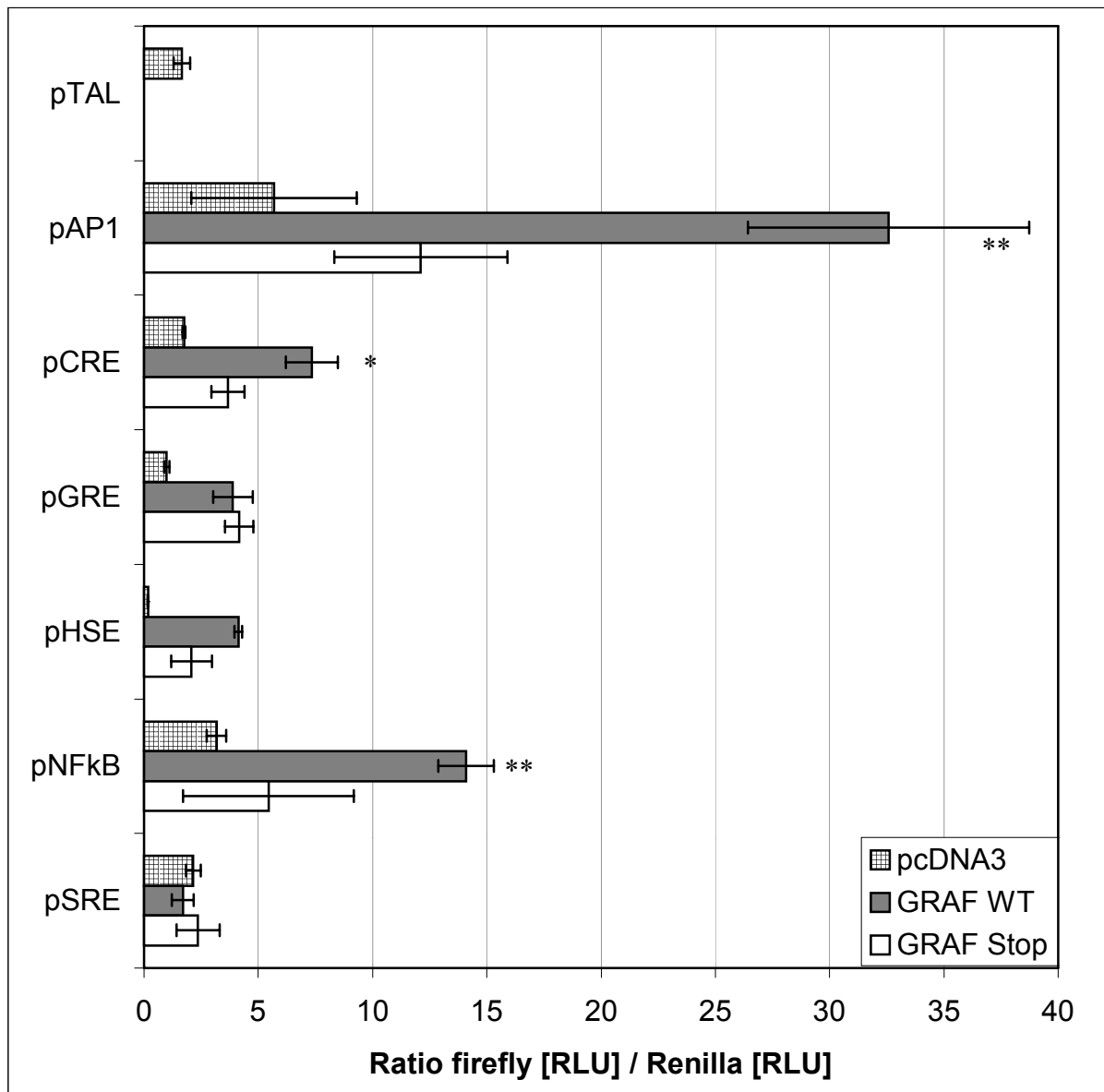
| Plasmid | pcDNA3 | GRAF WT | <i>p</i> ( <i>t</i> -Test) | GRAF Stop | <i>p</i> ( <i>t</i> -Test) |
|---------|--------|---------|----------------------------|-----------|----------------------------|
| pTAL    | 1,66   | -       | -                          | -         | -                          |
|         | ± 0,35 |         |                            |           |                            |
| pAP1    | 5,69   | 32,58   | 0,006                      | 12,11     | 0,1468                     |
|         | ± 3,62 | ± 6,15  |                            | ± 3,79    |                            |
| pCRE    | 1,75   | 7,35    | 0,018                      | 3,67      | 0,1236                     |
|         | ± 0,07 | ± 1,14  |                            | ± 0,72    |                            |
| pGRE    | 0,99   | 3,89    | 0,0427                     | 4,16      | 0,0118                     |
|         | ± 0,11 | ± 0,87  |                            | ± 0,61    |                            |
| pHSE    | 0,17   | 4,13    | 0,00002                    | 2,08      | 0,1738                     |
|         | ± 0,01 | ± 0,17  |                            | ± 0,89    |                            |
| pNFκB   | 3,17   | 14,10   | 0,0013                     | 5,45      | 0,5809                     |
|         | ± 0,43 | ± 1,22  |                            | ± 3,74    |                            |
| pSRE    | 2,16   | 1,70    | 0,0298                     | 2,36      | 0,3676                     |
|         | ± 0,33 | ± 0,47  |                            | ± 0,95    |                            |

Um zu testen, ob die ermittelten Signifikanzen auch beim Vergleich zwischen GRAF-Wildtyp- und trunkiertem GRAF-Protein Bestand haben, wurden diese Gruppen nochmals gegeneinander getestet (**Tab. III.9**).

**Tab. III.9:** Vergleich der Pathway-Profilings-Ergebnisse zwischen GRAF-Wildtyp und trunkiertem GRAF

| Plasmid | GRAF WT | GRAF Stop | <i>p</i> ( <i>t</i> -Test) |
|---------|---------|-----------|----------------------------|
| pAP1    | 32,58   | 12,11     | 0,0127                     |
| pCRE    | 7,35    | 3,67      | 0,0137                     |
| pGRE    | 3,89    | 4,16      | 0,6791                     |
| pHSE    | 4,13    | 2,08      | 0,0525                     |
| pNFκB   | 14,10   | 5,45      | 0,0459                     |
| pSRE    | 1,70    | 2,36      | 0,3579                     |

Dabei wurde deutlich, dass die für pGRE, pHSE und pSRE ermittelten Werte zwar zum Teil signifikant von der jeweiligen Negativkontrolle abwichen, sich jedoch kein Unterschied zwischen dem Einfluss des Wildtyp GRAF-Proteins und dem des trunkierten Proteins zeigte. Zur besseren Vergleichbarkeit dieser Daten zeigt **Abb. III.9** eine graphische Darstellung der Ergebnisse des Pathway Profilings, wobei nur diejenigen Versuchsansätze markiert sind, die in beiden Tests einen signifikanten Unterschied zeigten.



**Abb. III.9:** Graphische Darstellung der Ergebnisse des Pathway Profilings

\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,005$  nach t-Test Statistik

Einen deutlichen Anstieg der Luciferase-Expression im Vergleich zum Reporterplasmid ohne Enhancer-Element zeigten die mit pAP1 und pNFkB transfizierten Zellen. Hier schien das GRAF-Protein einen induzierenden Einfluss auf die jeweiligen Signaltransduktionskaskaden

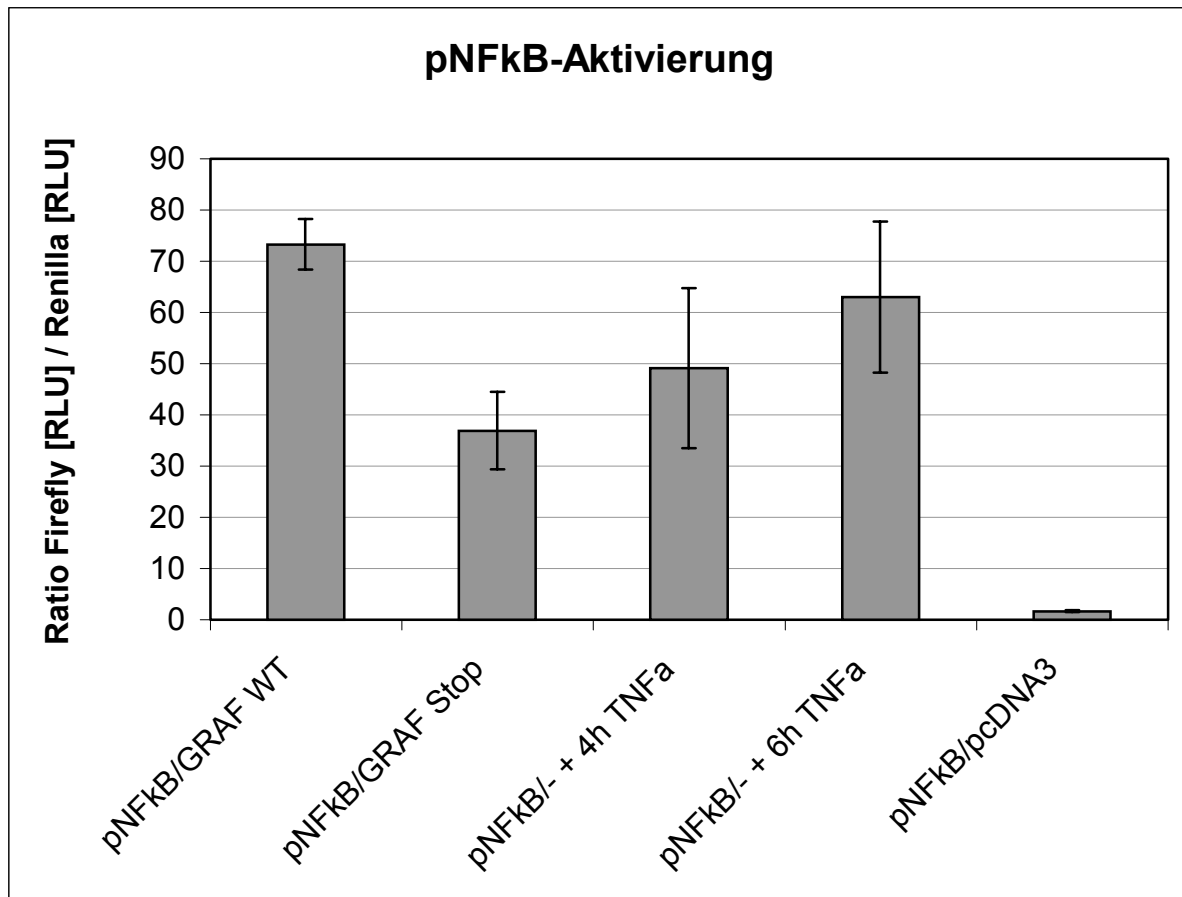
zu haben, wobei es sich im Falle von pAP1 um den JNK- und im Falle von pNF $\kappa$ B um den NF $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg handelte. Bei pAP1 war eine Steigerung auf das 5,7fache der Negativkontrolle zu beobachten, bei pNF $\kappa$ B auf das 4,5fache. Diese Ergebnisse wurden durch die Beobachtung unterstrichen, dass die Co-Transfektion des trunkierten GRAF-Proteins zu einem deutlich geringeren Reporter-genaktivierung führte.

Um die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signaltransduktionsweges genauer zu untersuchen, wurden 293T-Zellen mit dem GRAF-Wildtyp-Protein bzw. mit dem trunkierten Protein transfiziert. Um weitere Vergleichswerte zu erhalten, wurden Zellen, die nur mit pNF $\kappa$ B transfiziert worden waren, 20h nach Beginn der Transfektion für 4 bzw. 6h mit TNF $\alpha$  in einer Endkonzentration von 100ng/ml Medium inkubiert. TNF $\alpha$  ist ein Cytokin, das von vielen verschiedenen Zelltypen, darunter auch Zellen des hämatopoetischen Systems, produziert wird. Bindung von TNF $\alpha$  an seine membranständigen Rezeptoren resultiert in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 und NF $\kappa$ B, wodurch die Expression von Genen aktiviert wird, die in die zelluläre Antwort auf Entzündungsprozesse eingebunden sind (BAUD *et al.*, 2001; BARNES *et al.*, 1997; KARIN *et al.*, 1997). Die Ergebnisse dieser Versuche gibt **Tab. III.10** wieder.

**Tab. III.10:** Vergleich der Reporter-gen-Aktivierung durch NF $\kappa$ B unter Einfluss von GRAF und TNF $\alpha$ , normalisiert auf die Messergebnisse für die *Renilla*-Luciferase  
WT = Wildtyp-Protein, Stop = trunkiertes Protein, 3.1GS = Expressionsvektor mit TNF $\alpha$ -Sequenz

| Probenname                         | MW    | Stabw. |
|------------------------------------|-------|--------|
| pNF $\kappa$ B/GRAF WT             | 73,29 | 4,95   |
| pNF $\kappa$ B/GRAF Stop           | 36,93 | 7,60   |
| pNF $\kappa$ B/- + 4h TNF $\alpha$ | 49,11 | 15,61  |
| pNF $\kappa$ B/- + 6h TNF $\alpha$ | 63,02 | 14,79  |
| pNF $\kappa$ B/pcDNA3              | 1,67  | 0,16   |

**Abb. III.10** zeigt eine graphische Gegenüberstellung dieser Ergebnisse.



**Abb. III.10:** Reporter-Gen-Aktivierung in pNFκB in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli. WT = GRAF-Wildtyp-Protein; Stop = trunkiertes Protein

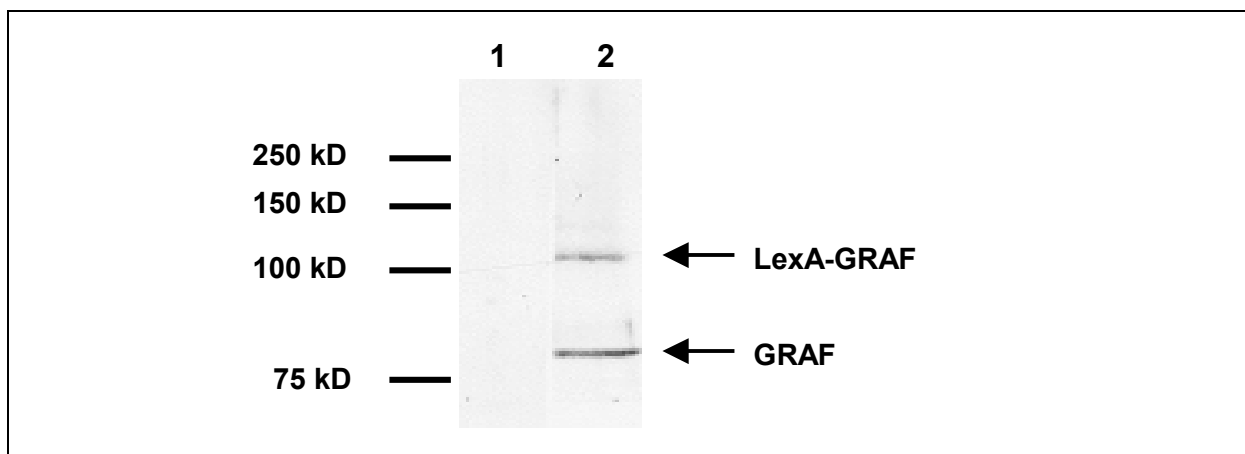
Wiederum ergab pNFκB in Kombination mit dem GRAF-Wildtyp-Protein eine deutliche Reporter-Gen-Aktivierung im Vergleich zur Negativkontrolle pNFκB/pcDNA3. Auch rief das trunkierte GRAF-Protein eine um die Hälfte niedrigere Luciferase-Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp-Protein hervor. Erst nach einer Inkubationszeit von 6h mit TNFα wurde die durch das GRAF-Wildtyp-Protein hervorgerufene Aktivierung der Firefly-Luciferase innerhalb der Standardabweichung erreicht. Ein Vergleich zwischen dem GRAF Wildtyp-Ansatz und dem Ansatz mit trunkiertem GRAF-Protein ergab in einem t-Test einen hochsignifikanten Unterschied mit  $p = 0,0039$ . Die sechsstündige Inkubationszeit der Zellen mit TNFα im Vergleich zu den Werten nach vierstündiger Inkubation hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,3256$ ).

Darüber hinaus ergab dieser Versuch eine allgemein deutlich höhere Reporter-Gen-Aktivierung bei einer Gesamt-Inkubationszeit von 26h im Vergleich zu den nach 40h Inkubation erreichten Werten (vergleiche Tab. III.8).

### **III.4 GRAF-Interaktionspartner**

#### **III.4.1 Ergebnisse des Bibliothek-Screens**

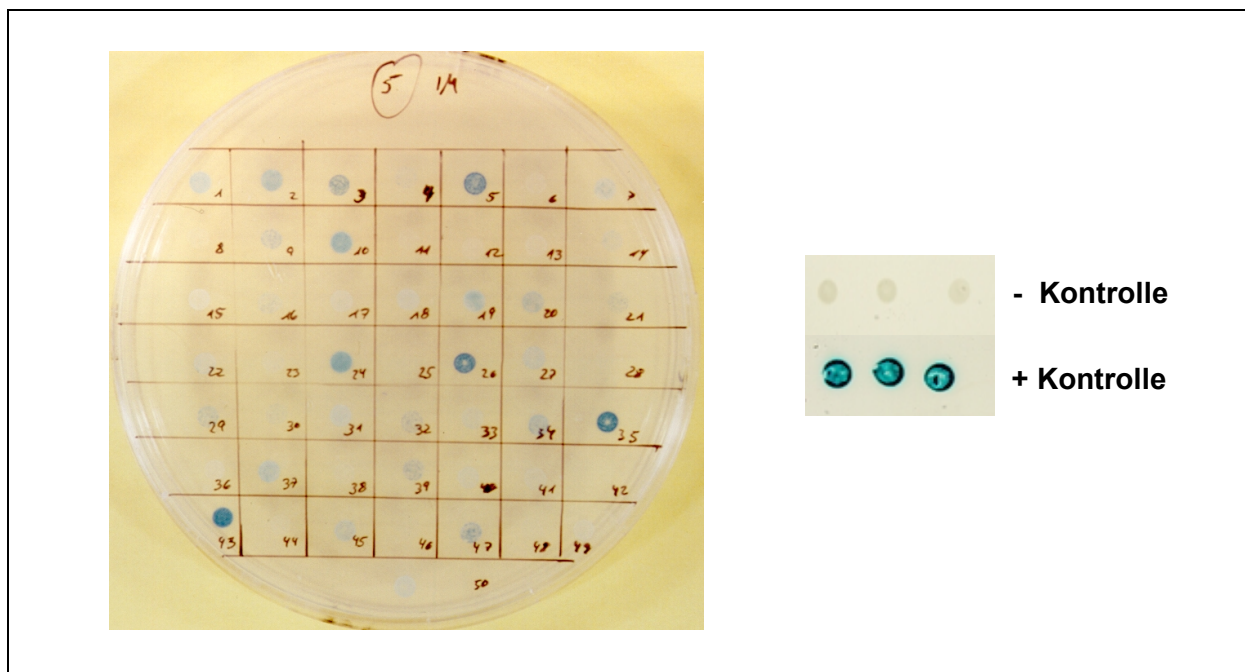
Zur Identifikation potentieller Interaktionspartner wurde das GRAF-Wildtyp-Protein in einen Yeast Two Hybrid Screen eingesetzt. Dabei wurden Hefezellen mit einem Reportervektor, der das *lacZ*-Gen trug, sowie mit einem Hefe-Expressionsvektor, in den die *GRAF*-cDNA-Sequenz kloniert war, transformiert. Dieser Vektor (pLexA) ermöglichte es, GRAF als Köder in einer N-terminalen Fusion mit einer DNA-Bindungsdomäne zu exprimieren. Die Expression dieses Fusionsproteins wurde mit Hilfe eines Western-Blots verifiziert. Hierzu wurden Hefeextrakte in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Blotten auf eine Nitrocellulose-Membran mit einem GRAF-spezifischen Antiserum nachgewiesen. Das Ergebnis zeigt **Abb. III.11**.



**Abb. III.11:** Nachweis der Expression des BD-GRAF-Fusionsgens mittels Western-Blot  
Spur 1: Kontrolle mit Extrakt aus untransformierten Zellen  
Spur 2: Extrakt aus GRAF-transformierten Zellen. Es zeigt sich neben einer GRAF-Wildtyp-Bande bei 82kD die Bande des LexA-GRAF-Fusionsproteins bei 106kD

Da das LexA-GRAF-Fusionsprotein allein keine Reporterogenaktivierung in einem  $\beta$ -Galactosidase-Assay hervorrief, konnte der so transformierte Hefestamm für die Untersuchung einer humanen cDNA-Bibliothek herangezogen werden. Da *GRAF* besonders stark in der Plazenta exprimiert wird (BOJESSEN, 1999), wurde eine cDNA-Bibliothek im Vektor pB42AD eingesetzt, die aus Plazenta-Gewebe gewonnen worden war. Diese erzeugte Fusionsproteine, die N-terminal mit einer aktivierenden Domäne fusioniert waren. Nach Amplifikation und Isolierung der Bibliotheksplasmide gemäß dem Herstellerprotokoll (Clontech User Manual PT3040-1) wurden die Hefezellen hiermit transformiert und die Transformanten dann auf Induktionsmedium übertragen. Ausgehend von  $1 \times 10^7$  primären

Bibliotheks-Klonen wurden auf insgesamt 500 Platten mit Induktionsmedium (mit X-Gal und BU-Salzen) jeweils 200'000cfu pro Platte ausgestrichen ein  $\beta$ -Galactosidase-Assay zur Identifikation von Klonen durchgeführt, in denen GRAF mit einem Bibliotheks-Protein interagierte. Nur diejenigen Klone wurden gepickt und weiter analysiert, die nach vier Tagen Inkubation bei 30°C eine deutliche Blaufärbung zeigten. Es handelte sich hierbei um insgesamt 1410 Klone, die auf Erhaltungsmedium übertragen und mehrfach neu ausgestrichen wurden, um eine Plasmidsegregation bei denjenigen Kolonien zu erreichen, die mehrere Bibliotheksplasmide aufgenommen hatten. Bei erneuter Durchführung eines  $\beta$ -Galactosidase-Assays färbten 339 Klone hellblau, 267 mittelblau und 99 dunkelblau. Ein Beispiel für einen solchen Assay zeigt **Abb. III.12**.

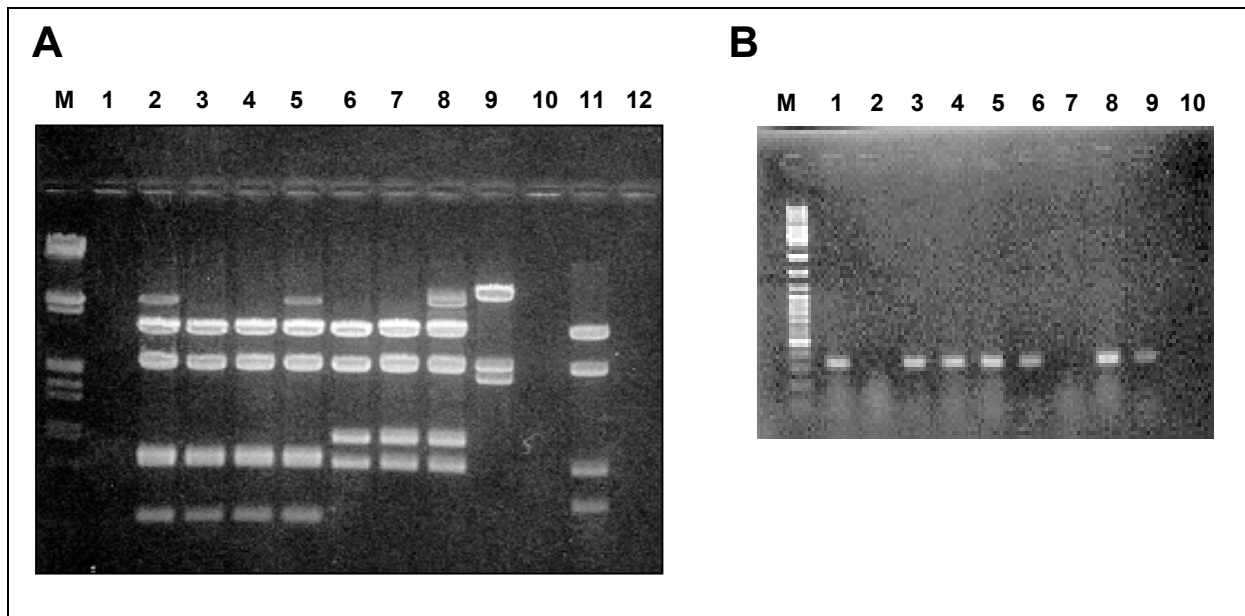


**Abb III.12:**  $\beta$ -Galactosidase-Assay im Yeast Two Hybrid System mit GRAF als Köder.  
 Negativkontrolle: murines p53 in pLexA und humanes LaminC in pB42AD;  
 Positivkontrolle: murines p53 und SV40 large T-Antigen in pB42AD

Da die Intensität der Blaufärbung positiv mit der Intensität der Interaktion korreliert, wurden die 99 dunkelblau färbenden Klone weiteren Analysen unterzogen. Nach Verlust des Köder-Plasmids in einem Plasmid Loss Versuch zeigte ein Klon autonome Reporterogenaktivierung und wurde als falsch positiv verworfen.

Die Beuteplasmide wurden dann aus den positiven Kolonien isoliert. Da bei diesem sog. Plasmid Rescue auch die Reporterplasmide isoliert und in *E.coli* transformiert wurden, mussten in einem anschließenden Schritt die Beuteplasmide identifiziert werden. Hierzu

wurden die Plasmide aus mehreren *E.coli*-Kolonien isoliert und durch Restriktionsverdau oder mittels PCR mit pB42AD-Identifikationsprimern auf ihre Identität hin geprüft (**Abb.III.13**).



**Abb. III.13:** Identifikation der Plasmide nach Plasmid Rescue. M = Längenmarker

**A:** Identifikation mittels Restriktionsverdau mit HindIII. Spur 2-8: Beuteplasmide mit verschiedenen Inserts; Spur 9: Reporterplasmid; Spur 11: natives pB42AD; Spur 1, 10 und 12 frei

**B:** Identifikation mittels PCR. Fragmentlänge bei pB42AD als Template: 320bp. Spur 1, 3-6, 8 und 9 positiv, Spur 2 und 7 negativ, Spur 10: Negativkontrolle

Mit den Beuteplasmiden wurden dann erneut Hefezellen transformiert, die das Reporterplasmid sowie das GRAF-Köderplasmid bereits enthielten. In einem sog. Rescreen wurden die Transformanten in einem  $\beta$ -Galactosidase-Assay auf Reporter-gen-Aktivierung getestet. Hierbei zeigten 14 Klone keine Blaufärbung mehr und wurden daher als falsch-positiv eingestuft. Die Bibliotheksplasmide der übrigen Klone wurden sequenziert und die Sequenzen mittels Datenbankrecherche analysiert. Dabei konnten 46 bekannte Proteine und 5 chromosomale Klone identifiziert werden. Eine Auflistung dieser potenziellen Interaktionspartner gibt **Tab. III.11** wieder.

**Tab. III.11:** Potentielle GRAF-Interaktionspartner, identifiziert in einem Yeast Two Hybrid Bibliotheks-Screen. db = dunkelblau, mb = mittelblau, hb = hellblau im Rescreen

| identifiziertes Gen                                     | Anzahl der Klone | GenBank Accession | Übereinstimmung [%] |
|---------------------------------------------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| ARC20                                                   | 1                | NM_005718         | 95                  |
| Arfaptin 2                                              | 1                | U52522            | 96                  |
| ATPase inhibitor precursor                              | 1                | AB029042          | 97                  |
| BN51                                                    | 1                | NM_001722         | 87                  |
| C1qB-chain of complement system                         | 1                | X03084            | 97                  |
| C1qc                                                    | 1                | NM_007574         | 81                  |
| CD14                                                    | 1                | M86511            | 94                  |
| chorionic somatomammotropin hormone 1                   | 4                | NM_001317         | 97                  |
| chorionic sommatomammotropin                            | 1                | J03071            | 94                  |
| Chromosom 19                                            | 1                | AC006133          | 96                  |
| Chromosom 22                                            | 1                | Z83844            | 92                  |
| Chromosom 5                                             | 1                | AC008394          | 96                  |
| cytokine receptor EBI3                                  | 1                | L08187            | 95                  |
| Cytokine receptor induced by Eppstein-Barr Virus        | 1                | NM_005755         | 96                  |
| epsilon-COP protein                                     | 1                | AJ249366          | 96                  |
| eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4   | 1                | NM_003755         | 95                  |
| FAK2                                                    | 3                | L49207            | 98                  |
| Fibronectin (FN1)                                       | 1                | X02761            | 97                  |
| Fibulin 1 (FBLN1)                                       | 8                | NM_001996         | 96                  |
| Galectin-3                                              | 1                | AB006780          | 98                  |
| GCN5                                                    | 1                | NM_001487         | 96                  |
| HBA1                                                    | 1                | AF105974          | 97                  |
| hemoglobin, alpha 1 (HBA1)                              | 1                | NM_000517         | 96                  |
| HEP27                                                   | 2                | U31875            | 93                  |
| Histone Acetyltransferase 1 (HAT1)                      | 1                | XM_002242         | 97                  |
| HSJ2                                                    | 1                | AB015799          | 98                  |
| HSPC301                                                 | 1                | AF161419          | 94                  |
| Human cDNA-clone DKFZp434B1517                          | 1                | AL122098          | 96                  |
| IGF2                                                    | 3                | NM_000612         | 94                  |
| immunoglobulin-like transcript 3 protein variant 1 gene | 1                | AF072099          | 93                  |
| KIAA0002                                                | 1                | D13627            | 94                  |
| KIAA0084                                                | 6                | D42043            | 95                  |
| KIAA0583                                                | 4                | AB011155          | 96                  |
| KISS1 (metastasis-suppressor)                           | 1                | NM_002256         | 87                  |
| Klon 349E10 auf Chromosom 16                            | 1                | AL022341          | 94                  |
| Laminin beta 1 (LAMB1)                                  | 1                | NM_002291         | 97                  |
| MAGOH                                                   | 1                | NM_002370         | 83                  |
| Metallothionein                                         | 2                | V00594            | 97                  |
| mitochondrial short-chain enoyl-CoA hydratase           | 2                | D13900            | 96                  |
| Mitochondrion                                           | 1                | X93334            | 98                  |
| p167                                                    | 1                | U58046            | 94                  |
| p85 – alpha subunit                                     | 1                | XM_043865         | 97                  |

| identifiziertes Gen                                             | Anzahl der Klone | GenBank Accession | Übereinstimmung [%] |
|-----------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| PLAP (human placental alkaline phosphatase)                     | 1                | M12551            | 96                  |
| pregnancy-specific beta-1 glycoprotein                          | 1                | M34421            | 98                  |
| pregnancy-specific glycoprotein-1a                              | 1                | M33664            | 99                  |
| Protein Kinase H11                                              | 2                | AF191017          | 94                  |
| RalBP1-associated EH domain protein ( <i>M. musculus</i> REPS1) | 1                | AF031939          | 90                  |
| RalBP1-interacting protein (POB1)                               | 1                | NM_004726         | 98                  |
| Ribosomal Protein L9                                            | 1                | U09953            | 97                  |
| Ribosomal protein S15a                                          | 1                | NM_001019         | 98                  |
| Ribosomal protein S20                                           | 1                | L06498            | 98                  |
| Serine protease 11 (IGF-binding) (PRSS11)                       | 1                | AF070555          | 95                  |
| Splicing coactivator subunit SRm300 (SRM300)                    | 1                | AF201422          | 90                  |
| TRPM-2                                                          | 1                | M64722            | 97                  |
| WNT7a                                                           | 1                | D83175            | 89                  |

#### **III.4.2 Klassifizierung der Interaktionspartner**

Die so identifizierten 46 potenziellen Interaktionspartner von GRAF ließen sich grob in verschiedene Protein-Kategorien einteilen. Die Einteilung erfolgte aufgrund von Ergebnissen von Datenbankrecherchen zu den einzelnen identifizierten Partnern. Die gefundenen Gruppen und ihre Vertreter zeigt **Tab. III.12**.

**Tab. III.12:** Zugehörigkeit der GRAF-Interaktionspartner zu Protein-Kategorien

| Proteinkategorie                  | Häufigkeit | Vertreter                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Cytokine und Wachstumsfaktoren    | 3          | IGF2                                                                                                                                                          |
| DNA oder RNA assoziierte Proteine | 9          | eukaryotic translation initiation factor 3<br>Galectin-3<br>GCN5<br>HAT1<br>Ribosomal Protein L9<br>Ribosomal protein S15a<br>Ribosomal protein S20<br>SRM300 |
| Transportproteine                 | 5          | COPE<br>HBA1<br>Metallothionein                                                                                                                               |
| Hormone und aktive Peptide        | 5          | chorionic somatomammotropin hormone 1                                                                                                                         |
| Hydrolasen                        | 1          | Serin Protease 11                                                                                                                                             |

| Proteinkategorie                        | Häufigkeit | Vertreter                                                                                            |
|-----------------------------------------|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Immunglobuline und assoziierte Proteine | 5          | Immunoglobulin-Transkript 3<br>Pregnancy specific Glycoprotein<br>C1qB<br>C1qC                       |
| Inhibitoren                             | 3          | ATPase Inhibitor Precursor<br>KISS1<br>TRPM-2                                                        |
| mitochondriale Proteine                 | 2          | mitochondrial short-chain enoyl-CoA hydratase                                                        |
| Oxidoreductasen                         | 2          | HEP27                                                                                                |
| Transferasen                            | 5          | FAK2<br>Protein Kinase H11                                                                           |
| Proteinsekretion and Chaperone          | 3          | KIAA0002<br>HSJ2<br>HSPC301                                                                          |
| Rezeptoren                              | 3          | Cytokin-Rezeptor EBI3<br>CD14                                                                        |
| Signalproteine                          | 2          | WNT7a<br>p85 $\alpha$                                                                                |
| Strukturproteine                        | 11         | Arc20<br>Fibronectin<br>Fibulin<br>Laminin                                                           |
| Tumor-Suppressoren                      | 4          | KIAA0583                                                                                             |
| Andere                                  | 11         | Arfaptin<br>BN51<br>KIAA0084<br>MAGOH<br>RalBP-assoziiertes Protein<br>RalBP-interagierendes Protein |

Ein häufig beim Yeast Two Hybrid System auftretendes Phänomen sind falsch-positive Interaktionspartner, die zwar zu einer Blaufärbung der Kolonien im  $\beta$ -Galactosidase Assay führen, eine Verifikation der Interaktion durch andere Bestätigungsmethoden jedoch nicht erlauben. Unter [http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/main\\_false.html](http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/main_false.html) findet sich eine von ERICA GOLEMIS im Fox Chase Cancer Center (Philadelphia, USA) zusammengestellte Auflistung von besonders häufig als falsch-positiv identifizierten Interaktionspartner. Dabei wiederholen sich besonders häufig Heat Shock-Proteine, ribosomale und mitochondriale Proteine sowie Proteine des Cytoskeletts. Daher wurde für weitere Analysen der GRAF-Interaktionspartner eine Auswahl aus den oben aufgeführten Proteinen getroffen (**Tab. III.13**). Dieser Auswahl fiel auch das häufig gefundene Partnerprotein KIAA0084 zum Opfer, da es sich bei den gefundenen Sequenzen um untranslatierte Bereiche handelte, die in Fusion

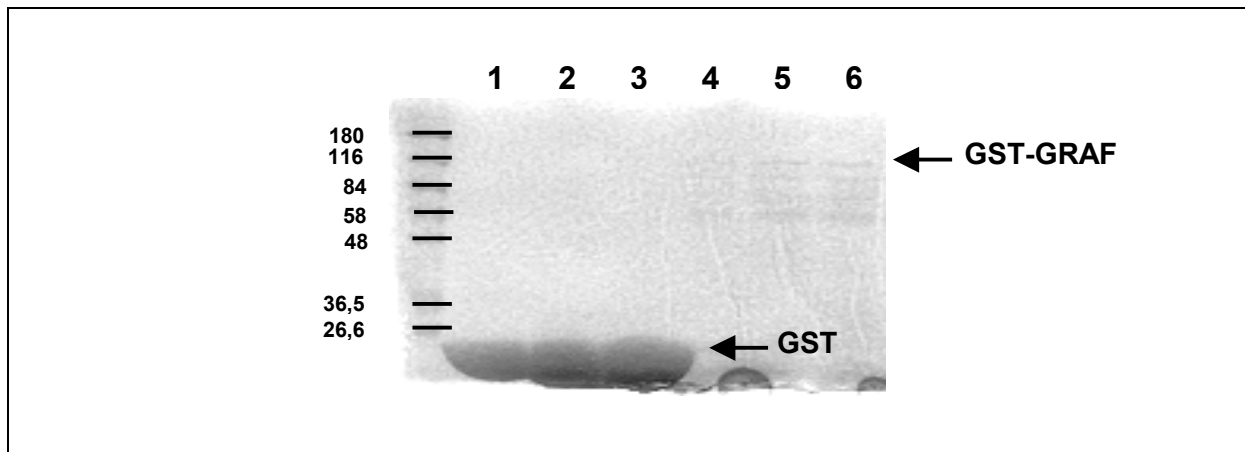
mit der aktivierenden Domäne zur Expression eines sehr kleinen artifiziellen Peptides führten, das als falsch-positiv klassifiziert wurde.

**Tab. III.13:** GRAF-Interaktionspartner, die für weitere Analysen ausgewählt wurden

| Name | Klon | Insert                                                | Insertlänge [bp] |
|------|------|-------------------------------------------------------|------------------|
| D30  | a    | CD14                                                  | 1500             |
| E3   | c    | KISS1                                                 | 550              |
| L5   | a    | RalBP1-interacting protein (POB1)                     | 900              |
| M50  | a    | Fibulin                                               | 550              |
| N38  | a    | WNT7a                                                 | 700              |
| O4   | a    | RalBP1-associated EH domain protein (REPS1)           | 650              |
| O6   | a    | Serin Protease 11                                     | 1000             |
| Q8   | b    | KIAA0583                                              | 2200             |
| R8   | d    | MAGOH                                                 | 800              |
| R9   | a    | eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4 | 850              |
| S25  | a    | FAK2                                                  | 1700             |
| V44  | a    | Arfaptin                                              | 1100             |
| V49  | c    | Protein Kinase H11                                    | 1500             |
| Y34  | d    | Histon Acetyltransferase 1                            | 800              |
| Z30  | a    | TRPM-2                                                | 700              |
| II/7 | a    | p85 – alpha subunit                                   | 750              |
| V/35 | a    | Splicing coactivator subunit SRm300 (SRM300)          | 550              |

### **III.4.3 GST-Pull down-Experimente**

Um die Interaktion zwischen GRAF und den im Yeast Two Hybrid System gefundenen potenziellen Partnerproteinen zu verifizieren, wurde eine Auswahl der Proteine in einen GST-Pull down-Assay eingesetzt. Hierzu wurde GRAF durch Klonierung in den Vektor pGEX-2T N-terminal mit dem Enzym Glutathion-S-Transferase fusioniert und das Fusionsprodukt in *E.coli* exprimiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und das Fusionsprotein mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-Beads aus dem Zellextrakt aufgereinigt. Die Expression des Fusionsproteins wurde nach dieser Aufreinigung mit Hilfe einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung bestätigt (**Abb. III.14**). Das erwartete Molekulargewicht des Fusionsproteins betrug 108kD.



**Abb. III.14:** Expressionskontrollgel für das GST-GRAF-Fusionsprotein

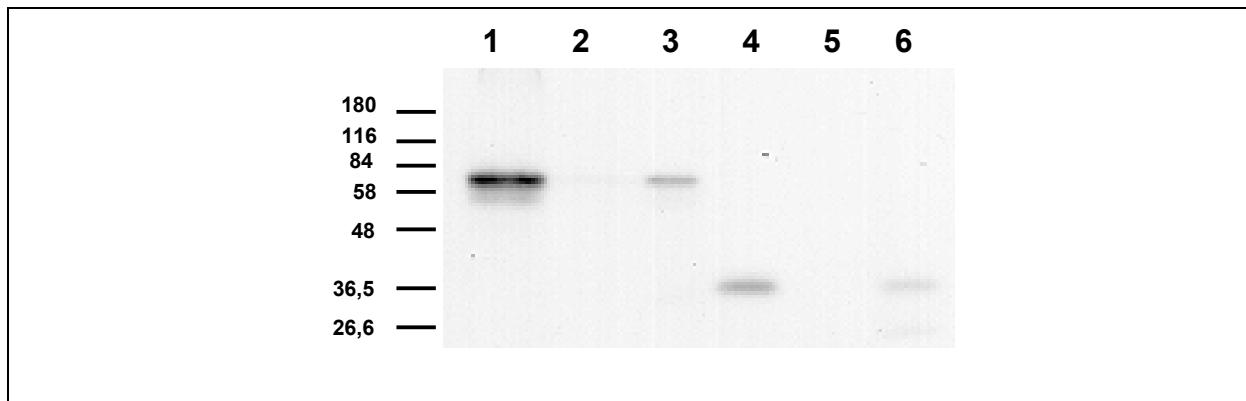
Spur 1-3: Glutathion-S-Transferase (Molekulargewicht 26kD), aufgereinigt aus 100, 200 bzw. 500µl Proteinextrakt

Spur 4-6: GST-GRAF (Molekulargewicht 108kD) aufgereinigt aus 100, 200 bzw. 500µl Proteinextrakt

Die zu testenden Interaktionspartner wurden in den Vektor pCRII-TOPO kloniert, der es ermöglichte, die Proteine ausgehend von einem T7- oder SP6-Promotor *in vitro* zu transkribieren und translatieren. Bei dieser Reaktion wurde dem Ansatz  $^{35}\text{S}$ -markiertes Methionin beigefügt, wodurch eine radioaktive Markierung der Proteine während der Translation erfolgte. Die GST-GRAF-beladenen Glutathion-Beads wurden dann mit dem *in vitro*-Translat inkubiert. Bei Interaktion von GRAF mit dem *in vitro* translatierten Protein band dieses ebenfalls an die Beads und konnte nach mehreren Waschschritten durch kochen von den Beads gelöst und in einem Western-Blot mit anschließender Autoradiographie nachgewiesen werden.

Alle untersuchten Proteine ließen sich *in vitro* transkribieren und translatieren. Als positiv in diesem Assay wurden diejenigen Proteine klassifiziert, die nach einer Autoradiographiezeit von 48h ein deutliches Signal auf dem Röntgenfilm zeigten. Die Negativkontrolle stellte ein Pull down-Versuch dar, bei dem Glutathion-S-Transferase nativ anstelle des GRAF-GST Fusionsproteins an die Beads gekoppelt wurde. Keines der getesteten Proteine konnte im Eluat dieser Ansätze detektiert werden, weshalb falsch-positive Ergebnisse bei dieser Testmethode ausgeschlossen werden konnten.

Die GST-Pull down-Assays ergaben für CD14, Fibulin, WNT7a, KIAA0583, FAK2 und HAT1 die in den **Abbildungen III.15, 16 und 17** gezeigten positiven Ergebnisse.



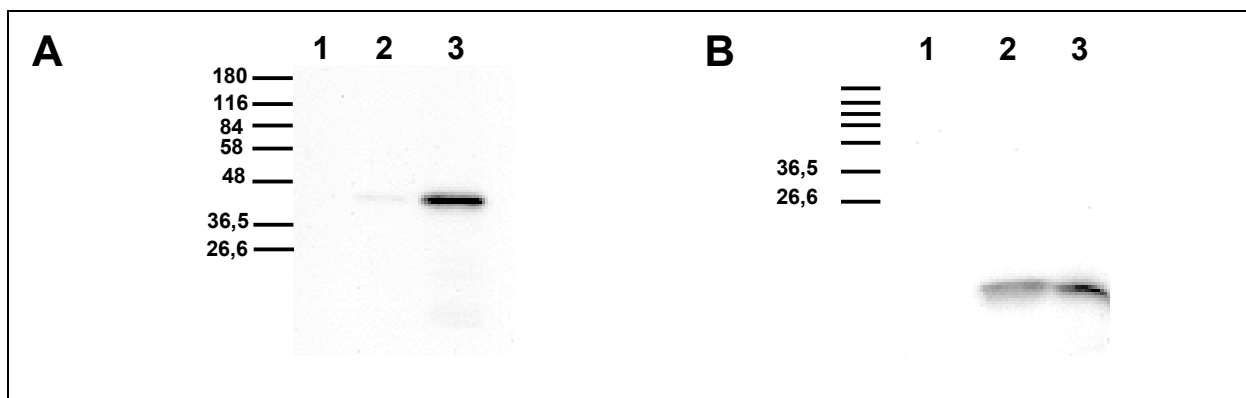
**Abb. III.15:** Ergebnisse des GST-Pull down-Assays für KIAA0583 (Q8,) und FAK2 (S25).

Spur 1: GST-GRAF + Q8; Spur 2: GST + Q8;

Spur 3: Q8 *in vitro*-Translat (68,3kD);

Spur 4: GST-GRAF + S25; Spur 5: GST + S25;

Spur 6: S25 *in vitro*-Translat (29,6kD)



**Abb. III.16: A:** Ergebnisse des GST-Pull down-Assays für CD14 (D30).

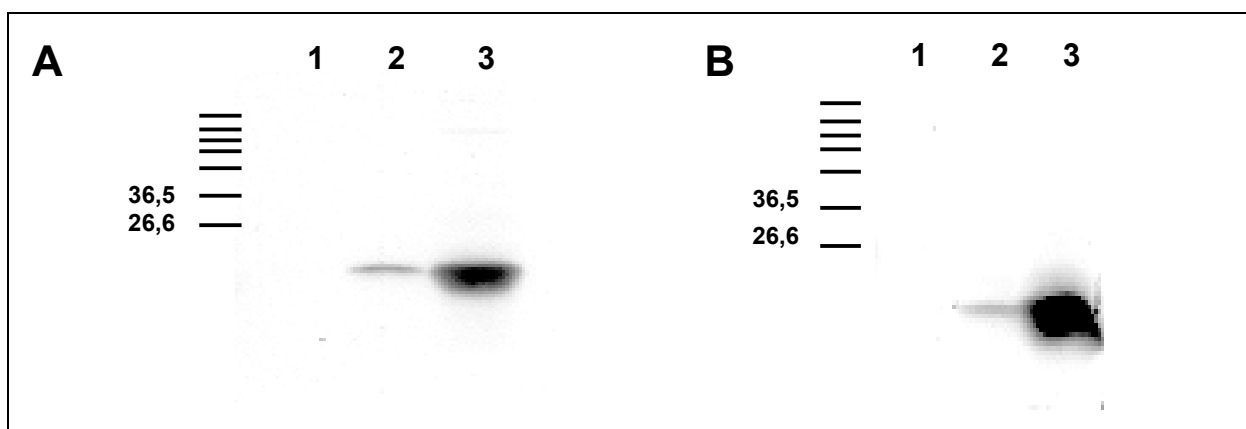
Spur 1: GST + D30; Spur 2: GST-GRAF + D30;

Spur 3: D30 *in vitro*-Translat (41,3kD)

**B:** Ergebnisse des GST-Pull down-Assays für WNT7a (N38)

Spur 1: GST + N38; Spur 2: GST-GRAF + N38;

Spur 3: N38 *in vitro*-Translat (10kD);



**Abb. III.17: A:** Ergebnisse des GST-Pull down-Assays für Fibulin (M50)

Spur 1: GST + M50; Spur 2: GST-GRAF + M50;

Spur 3: M50 *in vitro*-Translat (14kD)

**B:** Ergebnisse des GST-Pull down Assays für HAT1 (Y34)

Spur 1: GST + Y34; Spur 2: GST-GRAF + Y34;

Spur 3: Y34 *in vitro*-Translat (12,5kD)

Darüber hinaus bestätigte sich auch für MAGOH, TRPM-2 und p85 $\alpha$  die Interaktion mit GRAF. Bei den übrigen getesteten GRAF-Interaktionspartnern konnte keine Interaktion mittels dieser Verifikationsmethode nachgewiesen werden. Sie wurden daher als falsch-positive Ergebnisse des Yeast Two Hybrid Screens gewertet und keinen weiteren Analysen unterzogen. **Tab. III.14** fasst die Ergebnisse zusammen.

**Tab. III.14:** Zusammenfassung der Ergebnisse der GST-Pull down-Assays.

TNT = *in vitro*-Transkription und Translation

+ = Interaktion zwischen GRAF und dem getesteten Protein;

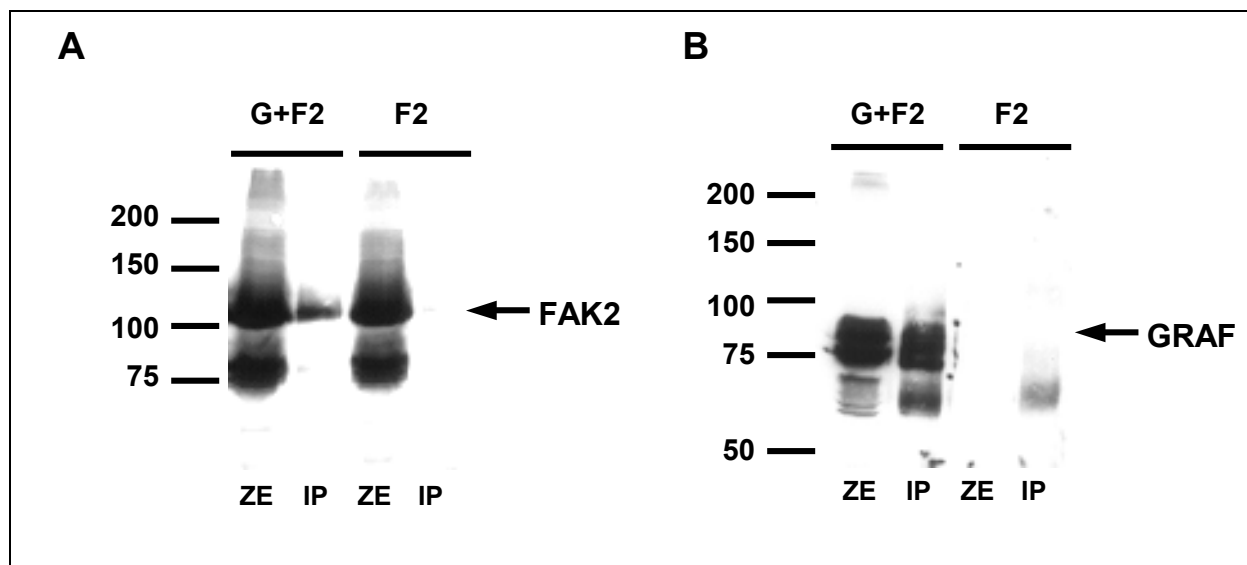
(+) = sehr schwache Interaktion; - = keine Interaktion

| Name | Insert                                                      | Insertlänge<br>[bp] | Promotor | TNT | Gewicht des<br>Proteinfragments<br>[kD] | Interaktion |
|------|-------------------------------------------------------------|---------------------|----------|-----|-----------------------------------------|-------------|
| D30  | CD14                                                        | 1500                | SP6      | +   | 41,3                                    | +           |
| E3   | KISS1                                                       | 550                 | T7       | +   | 10                                      | -           |
| L5   | POB1                                                        | 900                 | SP6      | +   | 19                                      | -           |
| M50  | Fibulin                                                     | 550                 | SP6      | +   | 14                                      | +           |
| N38  | WNT7a                                                       | 700                 | SP6      | +   | 10                                      | +           |
| O4   | REPS1                                                       | 650                 | SP6      | +   | 12                                      | -           |
| O6   | Serin Protease 11                                           | 1000                | SP6      | +   | 8                                       | -           |
| Q8   | KIAA0583                                                    | 2200                | SP6      | +   | 68,3                                    | +           |
| R8   | MAGOH                                                       | 800                 | SP6      | +   | 17,6                                    | +           |
| R9   | eukaryotic<br>translation initiation<br>factor 3, subunit 4 | 850                 | T7       | +   | 27                                      | (+)         |
| S25  | FAK2                                                        | 1700                | SP6      | +   | 29,6                                    | +           |
| V44  | Arfaptin                                                    | 1100                | SP6      | +   | 15                                      | (+)         |
| V49  | Protein Kinase H11                                          | 1500                | SP6      | +   | 20                                      | -           |
| Y34  | HAT1                                                        | 800                 | SP6      | +   | 12,5                                    | +           |
| Z30  | TRPM-2                                                      | 700                 | SP6      | +   | 16,4                                    | +           |
| II/7 | p85 – alpha subunit                                         | 750                 | SP6      | +   | 26                                      | +           |
| V/35 | Splicing coactivator<br>subunit SRm300<br>(SRM300)          | 550                 | T7       | +   | 15                                      | (+)         |

#### **III.4.4 Co-Immunopräzipitationen**

Da es sich bei den GST-Pull down-Assays um eine *in vitro*-Methode zur Verifikation von Protein-Protein-Interaktionen handelt, wurde als *in vivo*-Methode zur Bestätigung der Interaktion ein Co-Immunopräzipitationsassay gewählt, in den GRAF mit den im Pull down positiv getesteten Interaktionspartnern eingesetzt wurde. Hierzu wurde GRAF mit einem N-terminalen *myc*-Epitop, die jeweiligen Partner mit einem HA-Epitop in einen eukaryonten

Expressionsvektor (pcDNA3.1D) kloniert. Mit diesen Konstrukten wurden 293T-Zellen transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48h wurden die Zellen lysiert und die cytoplasmatische Fraktion nach Vorklärung mit einem Agarose-gekoppelten *myc*-Antikörper versetzt. Hieran band nun das *myc*-markierte GRAF-Protein und bei Interaktion auch der zu testende Partner. Die Proteine wurden nach Elution von den Agarose-Beads in einem Western-Blot mit den gegen das jeweilige Epitop gerichteten Antikörpern detektiert. Die bereits dokumentierte Interaktion zwischen GRAF und FAK2 konnte auf diese Weise bestätigt werden, nachdem die vollständige codierende Sequenz von FAK2 kloniert worden war (**Abb. III.18**).

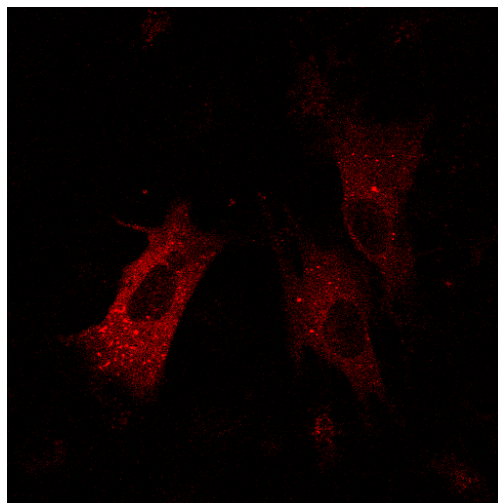


**Abb. III.18:** Co-Immunopräzipitation von HA-FAK2 durch *myc*-GRAF.  
 ZE: Zellextrakt, IP: Immunopräzipitat, G: mit *myc*-GRAF transfizierte Zellen,  
 F2: mit HA-FAK2 transfizierte Zellen  
**A:** Nachweis von FAK2 mit anti-HA bei 117kD.  
**B:** Nachweis der korrekten GRAF-Expression und Immunopräzipitation mit anti-*myc* bei 83kD.

Für die übrigen Partnerproteine konnte die Interaktion mit GRAF mittels dieser Methode nicht bestätigt werden. Dies lag in einigen Fällen an einer verminderten Stabilität der markierten Proteine, was sich in einer geringen Expression niederschlug (z.B. bei HAT1, p85 $\alpha$ , WNT7a). In anderen Fällen wurden die Partnerproteine zwar exprimiert, co-immunopräzipitierten jedoch nicht mit GRAF. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer veränderten Faltung der Proteine nach Fusion mit ihrer Markierung liegen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht in einem möglicherweise transienten Charakter der Interaktion, der sich mit der Methode der Co-Immunopräzipitation nicht nachweisen lässt.

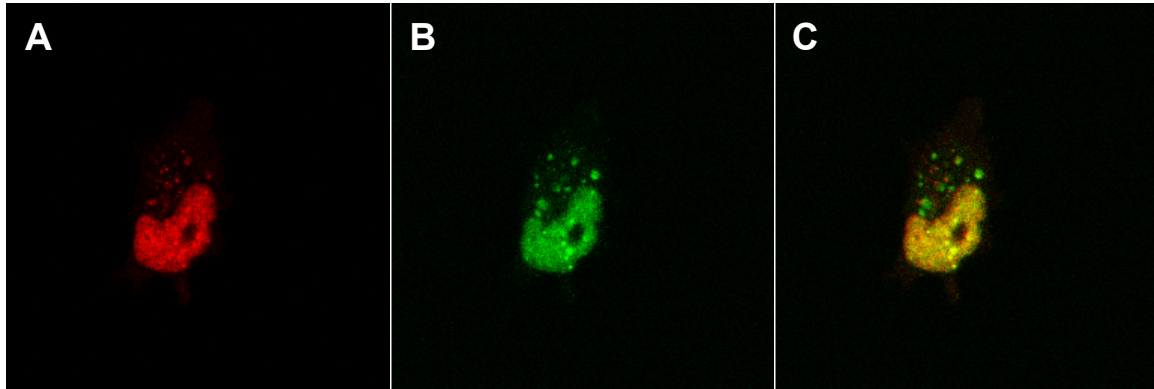
### **III.4.5 Co-Lokalisation der Interaktionspartner**

Um das Verhalten der Interaktionspartner von GRAF in Säugerzellen zu testen, wurden Fibroblasten der Zelllinie KMST6 mit Plasmiden cotransfiziert, die zum einen ein C-terminal DsRed-fusioniertes GRAF-Protein und zum anderen ein N-terminal GFP-fusioniertes Partnerprotein exprimierten. Nach Inkubation für 48h wurden die Zellen geerntet, auf Deckgläsern ausgesät und in einem konfokalen Laser Scan Mikroskop die zelluläre Lokalisation der fluoreszierenden Fusionsproteine beobachtet. Bei Interaktion der beiden Fusionsproteine sollten diese in den Zellen co-lokalisieren und dadurch eine gelbe Mischfluoreszenz entstehen. **Abb. III.19** zeigt nur mit GRAF-DsRed transfizierte Fibroblasten, die die cytoplasmatische Lokalisation von GRAF auch in der Fusion mit DsRed bestätigten.



**Abb. III.19:** Cytoplasmatische Lokalisation des GRAF-DsRed-Fusionsproteins (rot)

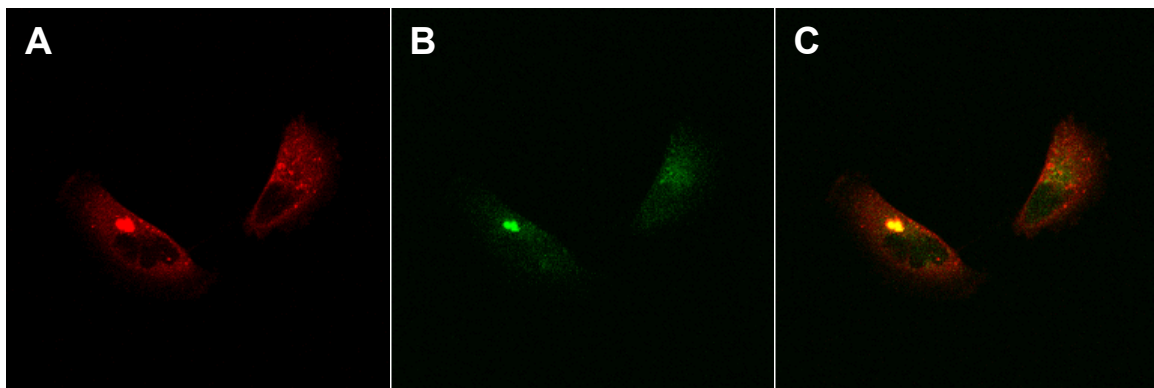
Als Positivkontrolle dienten die Fusionsproteine p53-DsRed und GFP-large T, deren deutliche Co-Lokalisation aufgrund bekannt starker Interaktion in **Abb. III.20** dargestellt ist.



**Abb. III.20:** Co-Lokalisation von p53 und large T in transfizierten Fibroblasten.

**A:** p53-DsRed (rot); **B:** GFP-large-T (grün); **C:** Überlagerung von A und B mit der Bildung einer gelben Mischfarbe aus roter und grüner Fluoreszenz

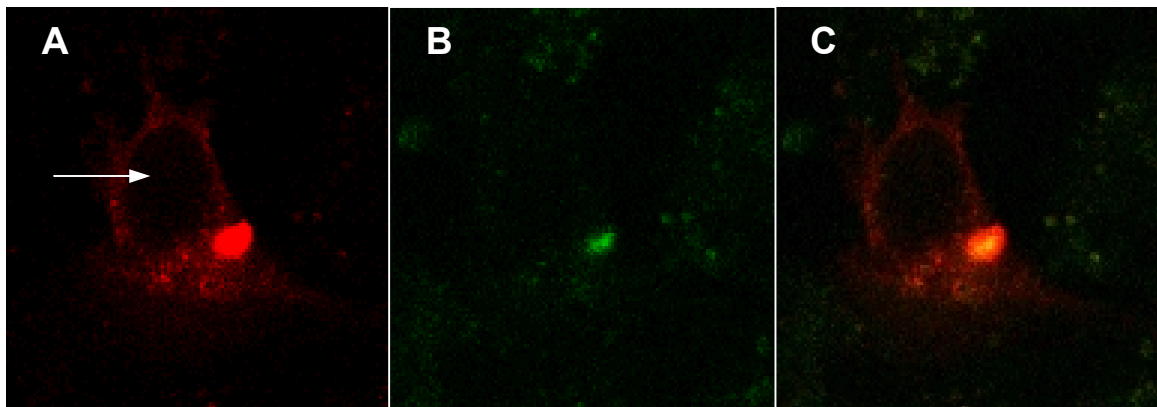
Eine deutliche Co-Lokalisation ergab sich ebenfalls für GRAF und das Monozyten-Differenzierungsantigen CD14 aus dem positiven Yeast Two Hybrid-Klon D30. Dies macht **Abb. III.21** deutlich.



**Abb. III.21:** Co-Lokalisation von GRAF-DsRed und GFP-CD14 (D30).

**A:** GRAF-DsRed (rot); **B:** GFP-CD14 (grün); **C:** Überlagerung von A und B mit der Bildung einer gelben Mischfarbe aus roter und grüner Fluoreszenz

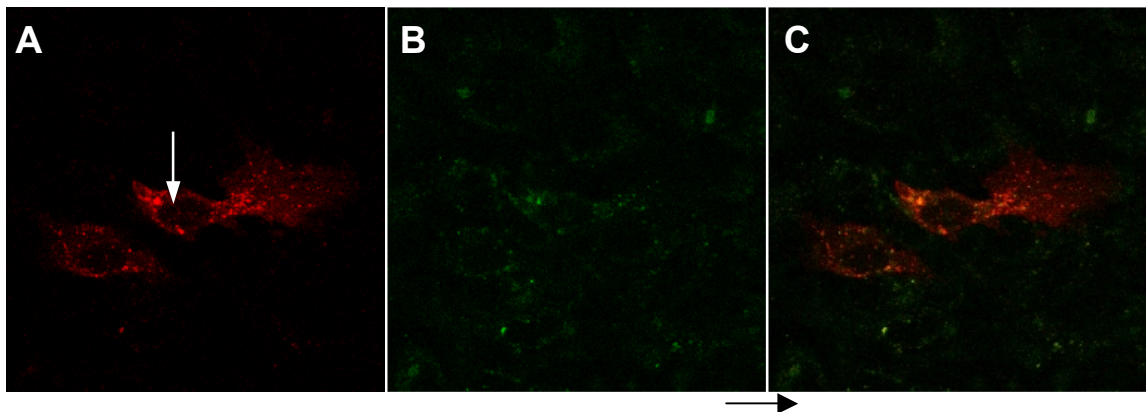
Abb. **III.22** zeigt die Verteilung der GRAF-dsRed- und GFP-KIAA0583-Fusionsproteine. Es fällt auf, dass die Lokalisation dieser beiden Interaktionspartner der von GRAF und CD14 ähnelt und sich besonders auf eine globuläre Struktur in der Nähe des Zellkerns konzentriert.



**Abb. III.22:** Co-Lokalisation von GRAF-DsRed und GFP-KIAA0583 (Q8).

**A:** GRAF-DsRed (rot); **B:** GFP-KIAA0583 (grün); **C:** Überlagerung von A und B mit der Bildung einer gelben Mischfarbe aus roter und grüner Fluoreszenz. Der Pfeil markiert den Nucleus.

Darüber hinaus ließ sich eine Co-Lokalisation von GRAF und der Histon-Acetyltransferase 1 (HAT1, Two Hybrid-Klon Y34) im Laser Scan Konfokalmikroskop zeigen. Hierbei zeigte das GFP-HAT1-Fusionsprotein allerdings nur eine schwache Expression. Trotzdem lässt sich auch in diesem Ansatz eine Konzentration der Proteine in einer Struktur in der Nähe des Zellkerns beobachten (**Abb. III.23**).



**Abb. III.23:** Co-Lokalisation von GRAF-DsRed und GFP-HAT1 (Y34).

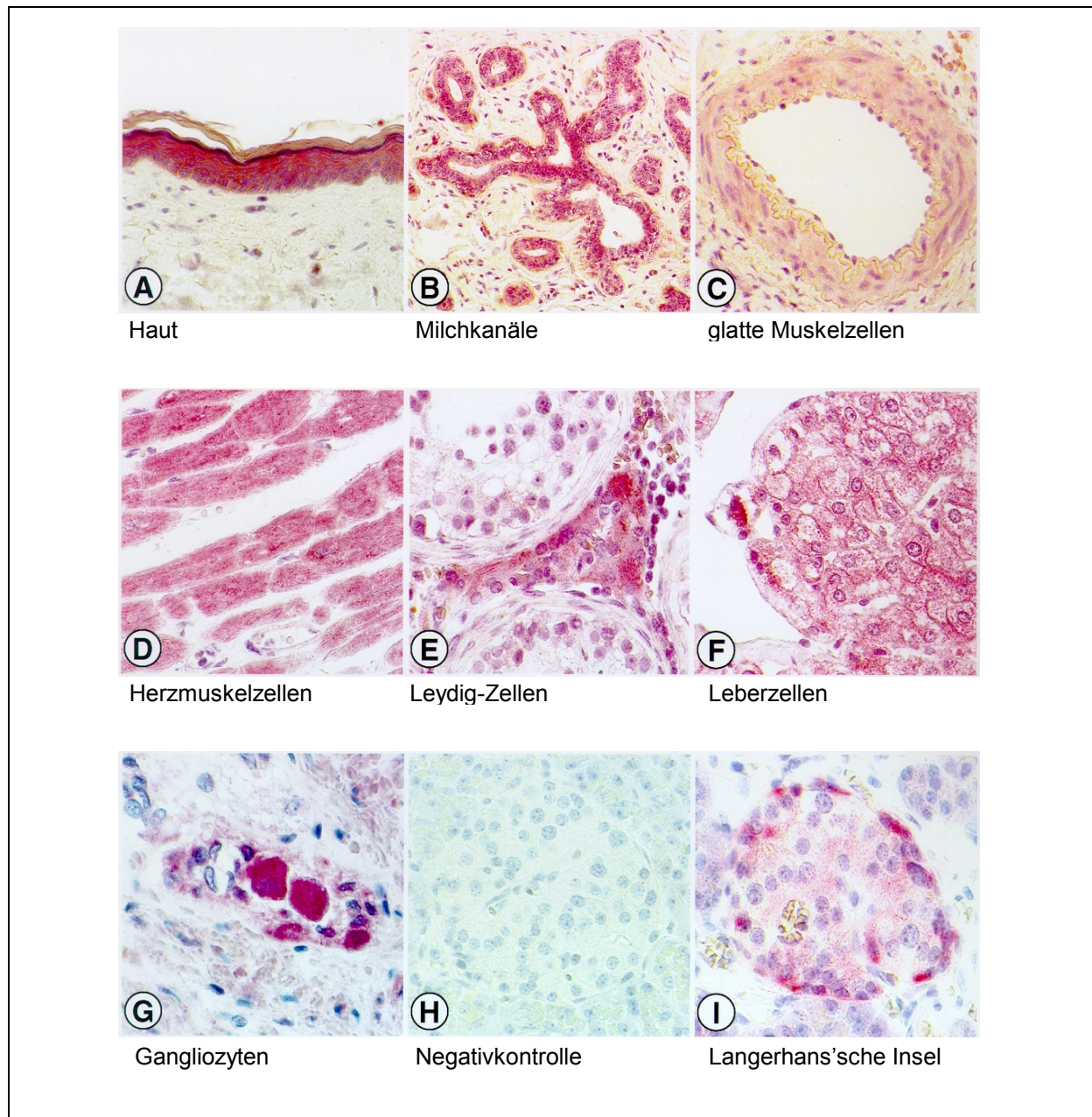
**A:** GRAF-DsRed (rot); **B:** GFP-HAT1 (grün); **C:** Überlagerung von A und B mit der Bildung einer gelben Mischfarbe aus roter und grüner Fluoreszenz. Der Pfeil markiert den Nucleus.

### **III.5 FBP17-Interaktionspartner**

#### **III.5.1 FBP17 und Mitglieder der Rho-Proteinfamilie**

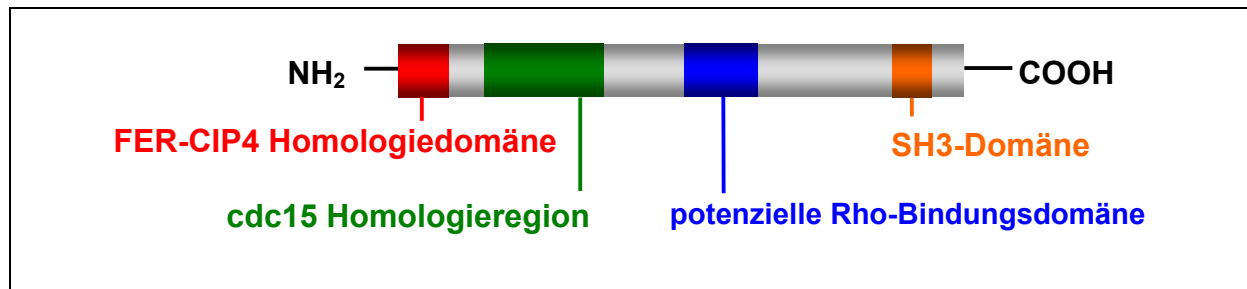
Im Rahmen der Doktorarbeit von G. Rehkamp in unserem Labor wurde bei einem Patienten mit AML und einer komplexen chromosomalen Aberration [ins(11;9)(q23;q34)inv(11)(q13q23)] das Formin bindende Protein 17 (FBP17) als neuer Fusionspartner von *MLL* identifiziert. Immunohistochemische Untersuchungen mit polyklonalem FBP17-Antiserum, die im pathologischen Labor der Universitätsklinik Gießen von Prof. Bohle durchgeführt wurden, zeigten eine rein cytoplasmatische Lokalisation des FBP17-Wildtypproteins. Dies steht im Kontrast zu der Beobachtung, dass mit *MLL/FBP17*-cDNA transfizierte Zellen ein Fusionsprotein exprimieren, dass sich fast ausschließlich im Kern nachweisen lässt, wie R. Slany im Institut für Genetik der Universität Erlangen zeigen konnte (FUCHS, REHKAMP *et al.*, 2001).

Eine besonders starke Expression des FBP17-Proteins konnte in epithelialen Zellen nachgewiesen werden, besonders im Bereich der Atmungsorgane, sowie des Verdauungs- und Urogenitaltraktes (**Abb. III.24**). Im hämatopoetischen System wurde FBP17 ausschließlich während der Erythropoese gebildet, in Zellen der myeloischen Entwicklungslinie ließ es sich nicht nachweisen. Hinsichtlich des Translationsstartpunktes konnte die bereits unter der Bezeichnung KIAA0554 (GenBank Accession AB011126) bekannte mRNA-Sequenz um 15bp erweitert werden, allerdings war es nicht möglich, das erste ATG zu klonieren (GenBank Accession AF265550 und AAK49824).



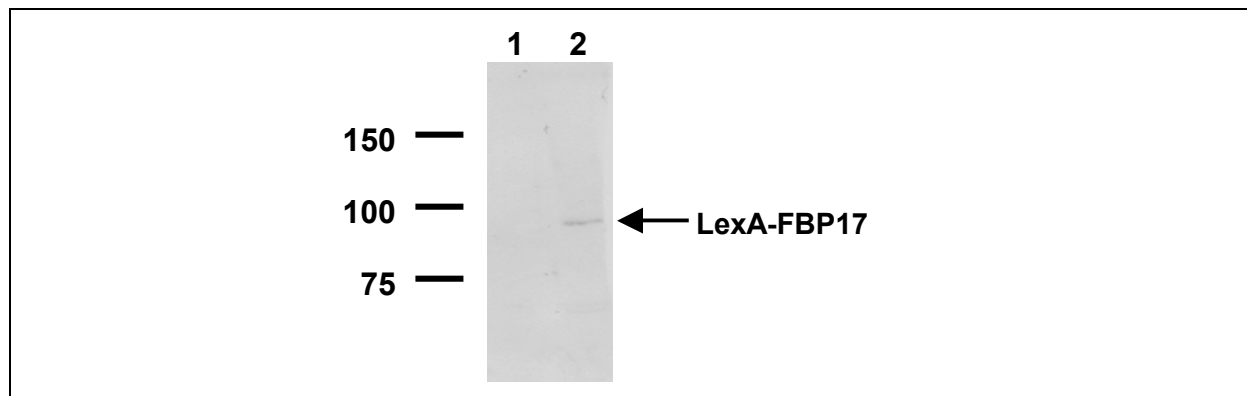
**Abb III.24:** Immunohistochemischer Nachweis von FBP17 in verschiedenen Geweben

Datenbankrecherchen ergaben, dass das 73kD schwere Formin bindende Protein 17 (FBP17) verschiedene Domänen aufweist, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können (FUCHS, REHKAMP *et al.*, 2001; **Abb. III.25**).



**Abb. III.25:** Domänenstruktur von FBP17

Besonders interessant für Interaktionsstudien erschien dabei die potenzielle Rho-Bindungsdomäne, die die Aminosäuren 475-537 umfasst. Bei den Molekülen der Rho-Familie handelt es sich um kleine GTPasen, die als molekulare Schalter in verschiedenste zelluläre Prozesse involviert sind, darunter auch Signaltransduktionswege (FUJISAWA *et al.*, 1998). Um zu testen, ob diese Domäne tatsächlich eine Interaktion zwischen FBP17 und Mitgliedern der Rho-Proteinfamilie ermöglicht, wurden diese Partner gezielt in einen Yeast Two Hybrid Interaktionstest eingesetzt. Hierzu wurde FBP17 durch Rekombinationsklonierung in pLexA mit der LexA-DNA-Bindungsdomäne fusioniert und die Expression des Fusionsproteins in einem Western Blot mit polyklonalem FBP17-Antiserum überprüft (**Abb. III.26**).

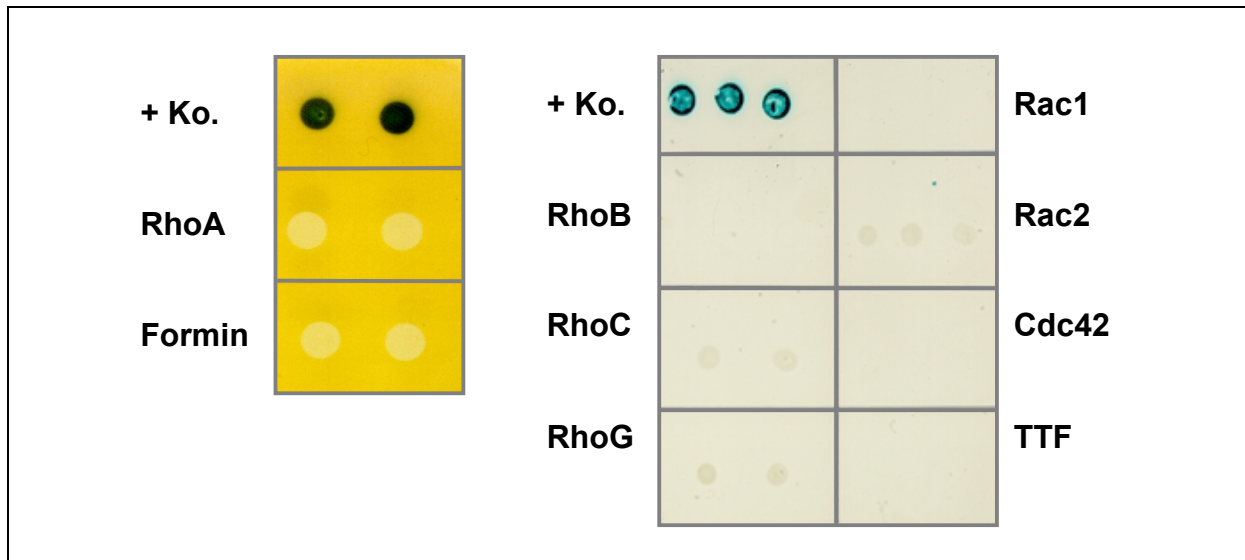


**Abb. III.26:** Nachweis des LexA-FBP17 Fusionsproteins in Hefe-Zellextrakten.  
 Spur 1: Negativkontrolle, Zellextrakt aus untransformierten Hefezellen  
 Spur 2: LexA-FBP17-Fusionsprotein (96,9kD). Marker in kD.

Die Durchführung eines  $\beta$ -Galactosidase-Assays mit dem so hergestellten Reporterstamm ergab keine autonome Reportergenaktivierung durch das LexA-FBP17-Fusionprotein.

Die verschiedenen Rho-Familienmitglieder wurden mittels PCR aus cDNA von Zelllinien gewonnen und über Klonierung in pB42AD mit dem sauren Aktivatormolekül B42 fusioniert. Es handelte sich dabei um die kompletten cDNA-Sequenzen von *RhoA*, *RhoB*, *RhoC*, *RhoG*, *Rac1*, *Rac2*, *cdc42* und *TTF*. Ebenso wurde ein B42-Formin-Fusionsprotein gewonnen. Mit diesen Konstrukten wurde der FBP17-transformierte Reporterhefestamm transformiert und

nach Anzucht auf glucosehaltigem Medium auf Induktionsmedium mit X-Gal übertragen. Keiner der so erzeugten Hefeklone zeigte eine Blaufärbung in diesem  $\beta$ -Galactosidase-Assay (**Abb. III.27**). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die potenzielle Rho-Bindungsdomäne in FBP17 keine funktionelle Bedeutung besitzt.



**Abb. III.27:** Ergebnisse des Yeast Two Hybrid-Interaktionstests von FBP17, Formin und verschiedenen Mitgliedern der Rho-Proteinfamilie.  
+ Ko. = Positivkontrolle p53/large T

FBP17 interagiert demnach unter physiologischen Bedingungen mit anderen Proteinen, als durch computergestützte Domänenanalysen vorhergesagt werden kann. Um diese Vermutung zu testen, wurde FBP17 zunächst mit einer Auswahl der potenziellen GRAF-Interaktionspartner in einen Yeast Two Hybrid-Versuch eingesetzt. Dieser Interaktionstest erbrachte mit den in **Tab. III.15** aufgeführten GRAF-Interaktionspartnern ebenfalls ausschließlich negative Ergebnisse in einem  $\beta$ -Galactosidase-Assay.

Beide cytoplasmatischen MLL-Partnerproteine, GRAF und FBP17, haben demnach offensichtlich unterschiedliche physiologische Interaktionspartner in der gesunden Zelle. Hieraus ergab sich die Notwendigkeit eines Bibliothek-Screens, um mögliche FBP17-Interaktionspartner zu identifizieren.

**Tab. III.15:** Interaktionstest zwischen FBP17 und potentiellen GRAF-Interaktionspartnern

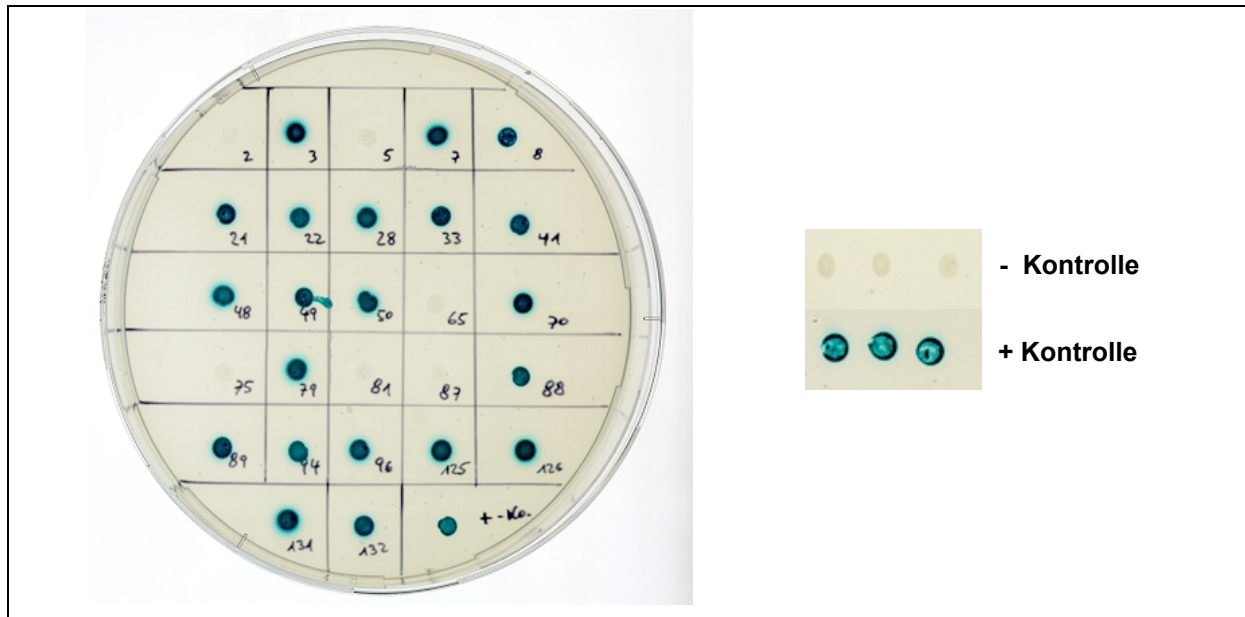
| Klon  | Färbung mit GRAF | identifiziertes Gen                                             | Färbung mit FBP17 |
|-------|------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|
| A28   | dunkelblau       | Metallothionein                                                 | weiß              |
| B25   | dunkelblau       | p167, KIAA0139                                                  | weiß              |
| C1    | dunkelblau       | ATPase inhibitor precursor                                      | weiß              |
| C3    | dunkelblau       | Human cDNA-clone DKFZp434B1517                                  | weiß              |
| C17   | dunkelblau       | Klon 349E10 auf Chromosom 16                                    | weiß              |
| D30   | mittelblau       | CD14                                                            | weiß              |
| E3    | hellblau         | KISS1 (metastasis-suppressor)                                   | weiß              |
| G3    | mittelblau       | KIAA0002                                                        | weiß              |
| L5    | dunkelblau       | RalBP1-interacting protein (POB1)                               | weiß              |
| L22   | hellblau         | HBA1                                                            | weiß              |
| M50   | dunkelblau       | Fibulin 1 (FBLN1)                                               | weiß              |
| N38   | dunkelblau       | WNT7a                                                           | weiß              |
| O4    | mittelblau       | RalBP1-associated EH domain protein ( <i>M. musculus</i> Repl1) | weiß              |
| O6    | mittelblau       | Serine protease 11 (IGF-binding) (PRSS11)                       | weiß              |
| O8    | dunkelblau       | IGF2                                                            | weiß              |
| P14   | dunkelblau       | KIAA0583                                                        | weiß              |
| R8    | dunkelblau       | mago nashi                                                      | weiß              |
| R9    | mittelblau       | eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 4           | weiß              |
| R12   | hellblau         | epsilon-COP protein                                             | weiß              |
| T11   | dunkelblau       | GCN5                                                            | weiß              |
| U35   | hellblau         | HRIHFB2122                                                      | weiß              |
| V44   | dunkelblau       | Arfaptin2, Por1                                                 | weiß              |
| V49   | dunkelblau       | Protein Kinase H11                                              | weiß              |
| W13   | dunkelblau       | Chromosom 19                                                    | weiß              |
| W21   | mittelblau       | ARC20                                                           | weiß              |
| W30   | dunkelblau       | C1qB-chain of complement system                                 | weiß              |
| X11   | dunkelblau       | HSPC301                                                         | weiß              |
| Y20   | dunkelblau       | HSJ2                                                            | weiß              |
| Y34   | mittelblau       | Histone Acetyltransferase 1 (HAT1)                              | weiß              |
| Z30   | dunkelblau       | TRPM-2                                                          | weiß              |
| Z32   | mittelblau       | cytokine receptor EBI3                                          | weiß              |
| II/7  | mittelblau       | p85 – alpha subunit                                             | weiß              |
| II/11 | dunkelblau       | Hep27                                                           | weiß              |
| II/12 | dunkelblau       | FAK2                                                            | weiß              |
| II/13 | dunkelblau       | Chromosom 5                                                     | weiß              |
| IV/25 | hellblau         | Galectin-3                                                      | weiß              |
| IV/32 | dunkelblau       | BN51                                                            | weiß              |
| IV/41 | dunkelblau       | Fibronectin (FN1)                                               | weiß              |
| V/26  | mittelblau       | KIAA0084                                                        | weiß              |
| V/35  | dunkelblau       | Splicing coactivator subunit SRm300 (SRM300)                    | weiß              |
| V/43  | mittelblau       | C1qc                                                            | weiß              |

### **III.5.2 Ergebnisse des Bibliothek-Screens**

FBP17 wird besonders stark in der Niere exprimiert, was sowohl immunohistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten (FUCHS, REHKAMP *et al.*, 2001) als auch RT-PCR-Analysen an 13 verschiedenen humanen Geweben (NAGASE *et al.* unter <http://www.kazusa.or.jp/huge/grpage/KIAA0554>) zeigten. Daher wurde für einen Yeast Two Hybrid Bibliothek-Screen eine humane cDNA-Bibliothek ausgewählt, die aus Nierengewebe gewonnen worden war (Clontech). Ausgehend von  $3,5 \times 10^6$  unabhängigen Klonen dieser Bibliothek wurden auf 200 Platten mit Induktionsmedium, komplettiert mit X-Gal und BU-Salzen, jeweils 200'000 cfu pro Platte ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden dann die 288 gewachsenen blauen Klone gepickt und auf Erhaltungsmedium übertragen. Erneute Übertragung auf Induktionsmedium ergab für 58 Klone eine dunkelblaue Färbung. Da die Intensität der Blaufärbung positiv mit der Intensität der Interaktion korreliert, wurden nur diese Klone weiteren Tests zum Ausschluss von falsch-positiven Interaktionspartnern unterzogen.

Nach Durchführung eines Plasmid Loss-Versuchs zum Test auf autonome Reportergenaktivierung durch die Beuteplasmide zeigten 7 der 58 Klone eine Blaufärbung in einem  $\beta$ -Galactosidase-Assay auf -Trp/-Ura-Induktionsmedium. Diese wurden als falsch-positiv gewertet und nicht weiter analysiert.

Die übrigen Beuteplasmide wurden aus den Hefezellen isoliert, in *E.coli* transformiert (Plasmid Rescue) und nach Identifikation als pB42AD mittels PCR wieder in den FBP17-transformierten Hefereporterstamm gebracht. Dabei ließ sich ein Beuteplasmid nicht zurückgewinnen, weshalb auch dieser Klon als falsch-positiv klassifiziert wurde. In diesem Rescreen zeigten 44 Klone eine Blaufärbung nach 48 Stunden, die übrigen sechs erwiesen sich als ebenfalls falsch-positiv. Beispielhaft zeigt **Abb. III.28** das Ergebnis eines solchen Rescreens.



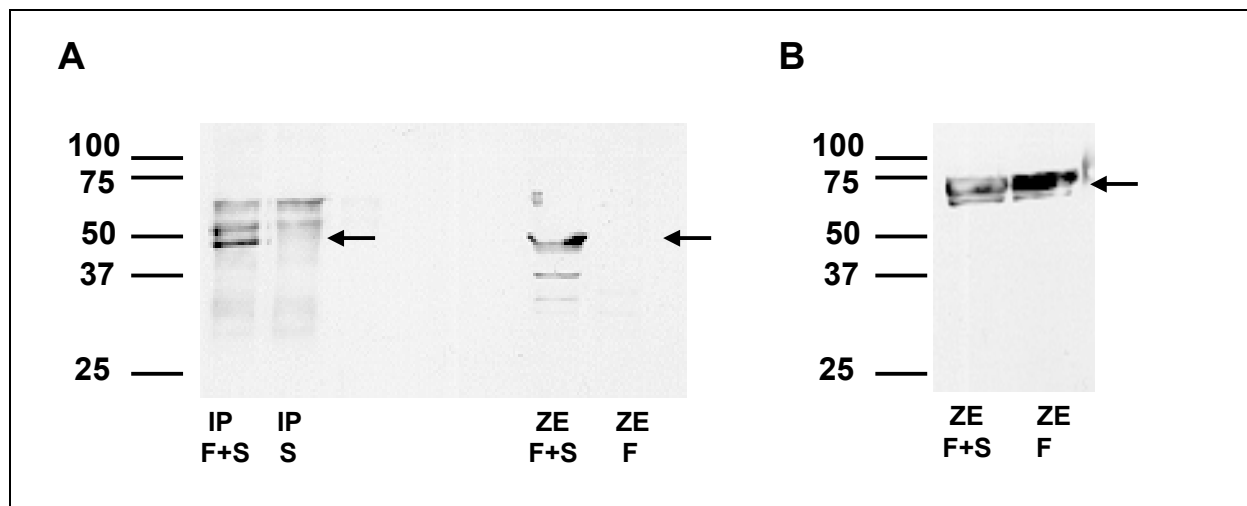
**Abb. III.28:** Ergebnis eines Rescreens der FBP17-Beutepasmide  
 Negativkontrolle: p53/Lamin  
 Positivkontrolle: p53/large T

Sequenzierung dieser Beutepasmide ergab in 14 Fällen das Sorting Nexin 2 (*SNX2*; GenBank Accession XM\_003830) als Interaktionspartner von FBP17, die übrigen 30 Plasmide enthielten Sequenzen der mRNA für Tankyrase (*TNKS*; GenBank Accession NM\_003747). Im Fall von *SNX2* codierten die Inserts der Beutepasmide für die mRNA-Sequenz ab Base 1316 (Gesamtlänge: 2048bp) und damit für die letzten 81 Aminosäuren des 520 Aminosäuren umfassenden Proteins. Datenbankrecherchen ergaben für diesen Bereich von *SNX2* eine potenzielle Protein Kinase C-Phosphorylierungsstelle (Aminosäuren 470 bis 472 des Wildtyp-Proteins), jedoch keine bekannten Proteindomänen.

Im Falle von Tankyrase handelte es sich um eine alternativ gespleißte Form der mRNA, die weder der bereits beschriebenen Spleißvariante TT7 (GenBank Accession AF082558) noch der Variante TT9 (GenBank Accession AF082559) entsprach. Sie umfasste die Basen 695 bis 3158 der *TNKS*-mRNA-Sequenz. Hieran schlossen sich 21 Basen an, die sich nicht weiter zuordnen ließen, gefolgt von einem Stop-Codon. Diese Variante von *TNKS* enthielt fast die gesamte Ankyrin-Repeat-Domäne des Wildtyp-Proteins (Aminosäuren 205 bis 943) sowie einen Teile der SAM-Domäne (SAM = sterile alpha module, Aminosäuren 1030 bis 1089), einer Domäne, die Homo- und Heterodimerisierung vermitteln kann (THANOS *et al.*, 1999). Darüber hinaus fehlte am C-Terminus des Proteins die PARP-Domäne (Aminosäuren 1176 bis 1327), die dem Wildtyp-Protein die Fähigkeit verleiht, Zielproteine mit Poly(ADP-Ribose)-Polymeren zu versehen (SMITH *et al.*, 1998).

### III.5.3 Bestätigung der Interaktion

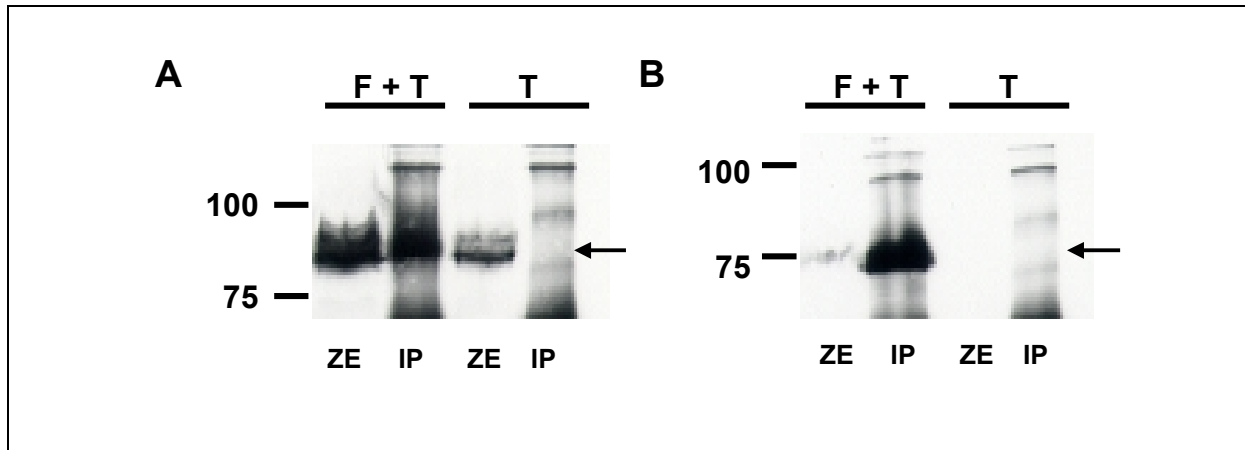
Zur Überprüfung der Interaktion zwischen FBP17 und SNX2 bzw. Tankyrase wurden diese Proteine in einen Co-Immunopräzipitationsassay eingesetzt. Hierzu wurde durch PCR mit einem entsprechenden Primer FBP17 N-terminal mit einem *myc*-Epitop versehen und dieses Fusionsprodukt in einen eukaryonten Expressionsvektor (pcDNA3.1D) kloniert. SNX2 wurde durch Klonierung in den Vektor pcDNA3.1-NT-GFP-TOPO N-terminal mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert. Nach Transfektion von 293T-Zellen und Inkubation der Zellen für 48h wurden Zellextrakte hergestellt und diese mit anti-*myc*-Agarose-Beads versetzt. Hieran banden die *myc*-markierten FBP17-Proteine. Nach mehreren Waschschritten und Elution von den Beads konnte in einem Western-Blot mit anti-GFP-Antikörpern die Gegenwart des GFP-markierten SNX2 im Eluat nachgewiesen werden. Das Ergebnis einer solchen Co-Immunopräzipitation zeigt **Abb. III.29**.



**Abb. III.29:** **A:** Co-Immunopräzipitation von GFP-SNX2 (42kD, Pfeile) durch *myc*-FBP17. Marker in kD. Nachweis erfolgte mit anti-GFP  
F = Zellen transfiziert mit FBP17; S = Zellen transfiziert mit SNX2  
IP = Immunopräzipitat; ZE = Zellextrakt  
**B:** Nachweis der korrekten *myc*-FBP17-Expression (bei 73kD, Pfeil) in den Zellextrakten mit anti-*myc*.

In analoger Weise wurde nun die Interaktion zwischen FBP17 und Tankyrase verifiziert. Da die Fusion von GFP mit TNKS keine befriedigende Proteinexpression erbrachte, wurde TNKS N-terminal mit einem FLAG-Epitop versehen. Dies erfolgte durch Klonierung in den eukaryonten Expressionsvektor pCMV-Tag 2B. Wiederum wurden 293T-Zellen mit dem *myc*-FBP17- und dem *FLAG-TNKS*-Konstrukt transfiziert und die nach 48h gewonnenen Zellextrakte mit anti-*myc*-konjugierten Agarose-Beads versetzt. Nach Elution der gebundenen Proteine und Aufnahme in nicht reduzierendem Probenpuffer wurde das Eluat in einem

Western Blot auf die Gegenwart von FLAG-markierter Tankyrase hin getestet. Dabei zeigte sich ein starkes Tankyrase-Signal im Eluat der cotransfizierten Zellen, womit die Interaktion dieser Proteine bestätigt werden konnte. **Abb. III.30** zeigt das Ergebnis dieses Versuches.



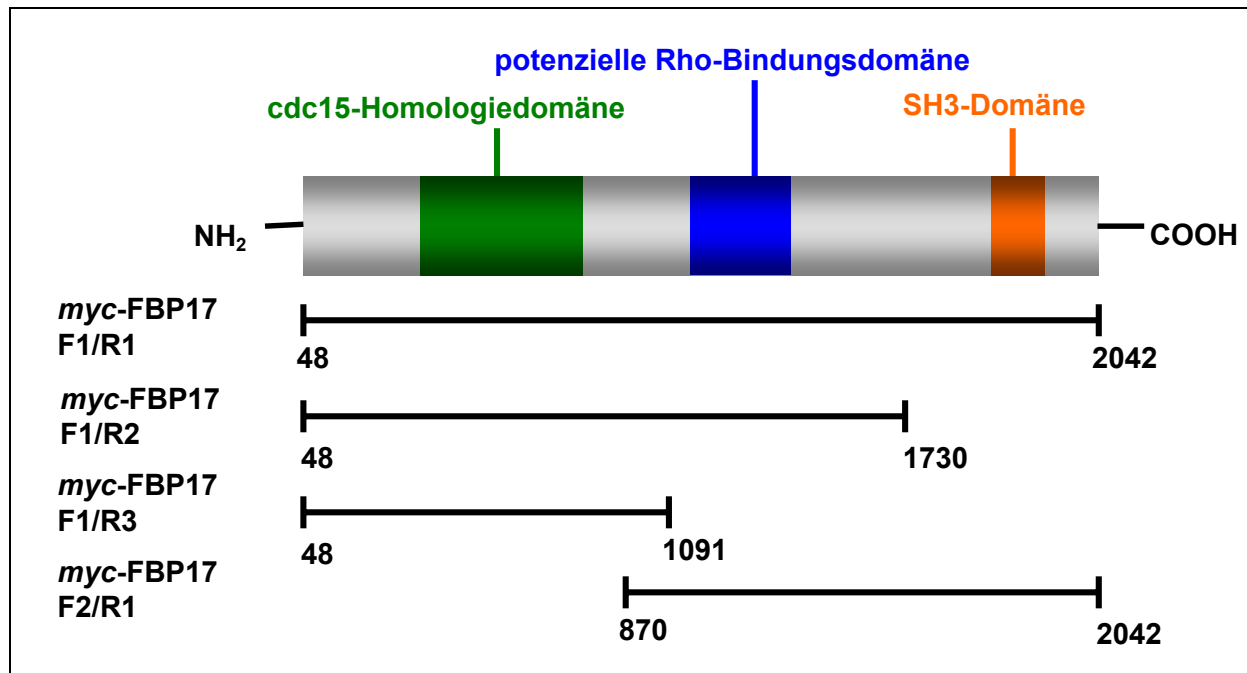
**Abb.III.30:** **A:** Co-Immunopräzipitation von FLAG-TNKS (bei 90kD, Pfeil) durch *myc*-FBP17. Nachweis erfolgte mit anti-FLAG. Marker in kD.  
ZE = Zellextrakt; IP = Immunopräzipitat;  
F = Zellen transfiziert mit FBP17; T = Zellen transfiziert mit TNKS  
**B:** Nachweis der korrekten *myc*-FBP17-Expression (bei 75kD, Pfeil) mit anti-*myc*.

Diese deutliche Interaktion zwischen FBP17 und Tankyrase warf die Frage auf, welche Domänen von FBP17 hierfür verantwortlich sind.

#### **III.5.4 Funktionelle Charakterisierung der FBP17/TNKS-Interaktion**

Wie bereits erwähnt, verfügt FBP17 über mehrere Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können. Von besonderer Bedeutung sind dabei die *cdc15*-Homologiedomäne, die Rho-Bindungsdomäne und die SH3-Domäne. Bei der *cdc15*-Homologiedomäne handelt es sich um eine Region, die sich häufig bei Tyrosin-Proteinkinasen findet, die den Zellzyklus regulieren (FANKHAUSER *et al.*, 1995; SMITHGALL *et al.*, 1998). Die 60 Aminosäuren umfassende SH3-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen durch Bindung an Prolin-reiche Peptide (MORTON *et al.*, 1994).

Um zu testen, welche Rolle diese Domänen bei der Interaktion zwischen FBP17 und Tankyrase spielen, wurden mittels PCR Deletionsmutanten von FBP17 hergestellt, die N-terminal mit einem *myc*-Epitop versehen waren. Diese wurden in den eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3.1D kloniert, in Co-Immunopräzipitations-Assays eingesetzt und so auf ihre Fähigkeit getestet, FLAG-markierte Tankyrase zu binden. **Abb. III.31** zeigt die getesteten Deletionsmutanten.

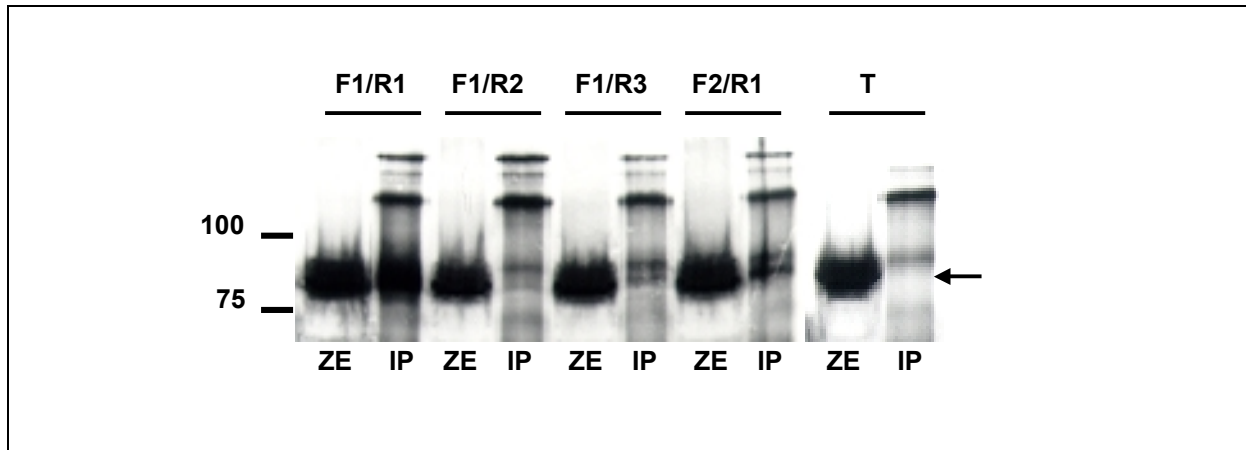


**Abb. III.31:** FBP17-Deletionsmutanten. Angaben in Basenpaaren der cDNA-Sequenz.

Konstrukt F1/R1 repräsentierte dabei die gesamte *FBP17*-cDNA-Sequenz, Mutante F1/R2 ein trunkiertes Protein, dem die SH3-Domäne fehlte. Konstrukt F1/R3 stellte ein noch kürzeres Fragment ohne SH3- und Rho-Bindungsdomäne dar. Der Mutante F2/R1 schließlich fehlte der N-terminus mit der cdc15-Homologiedomäne.

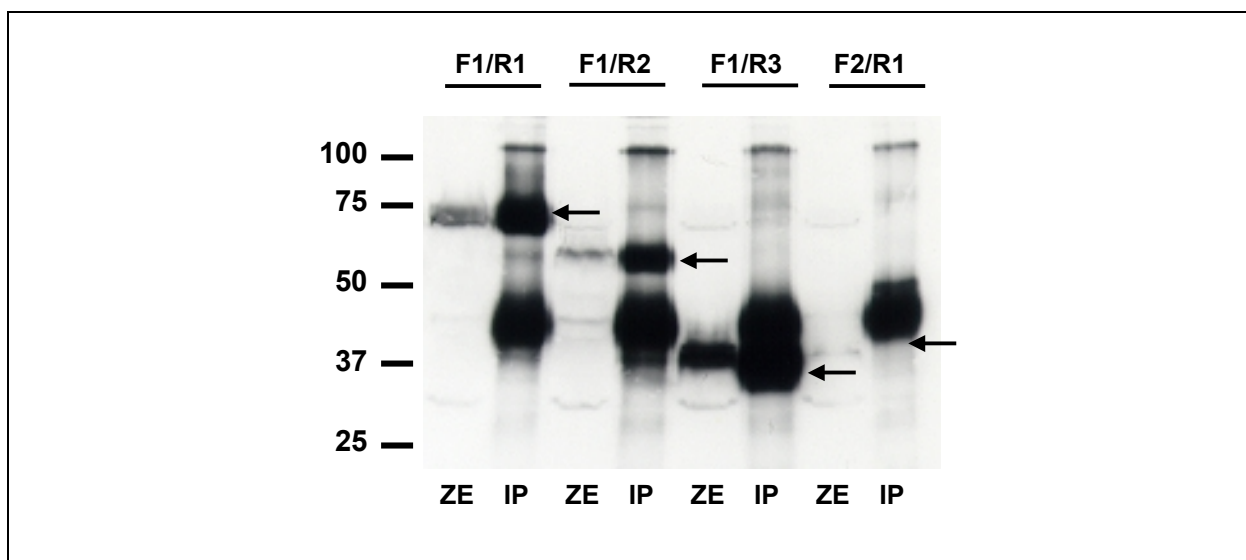
Mit diesen Konstrukten und FLAG-markiertem TNKS wurden 293T-Zellen transfiziert. Aus den nach 48h gewonnen Zellextrakten wurde *myc*-FBP17 immunopräzipitiert. In einem anschließenden Western-Blot wurde FLAG-Tankyrase im Präzipitat nachgewiesen.

Dabei zeigte sich, dass Tankyrase nur in den Ansätzen effizient co-präzipitiert wurde, die eine FBP17-Mutante mit SH3-Domäne enthielten. Im Präzipitat des FBP17-Konstrukts F1/R2, dem die SH3-Domäne fehlte, fand sich deutlich weniger Tankyrase als bei Konstrukt F1/R1 oder F2/R1. Im mit dem Konstrukt F1/R3 gewonnenen Co-Präzipitat schließlich war Tankyrase kaum noch nachweisbar. **Abb. III.32** zeigt diese Ergebnisse.



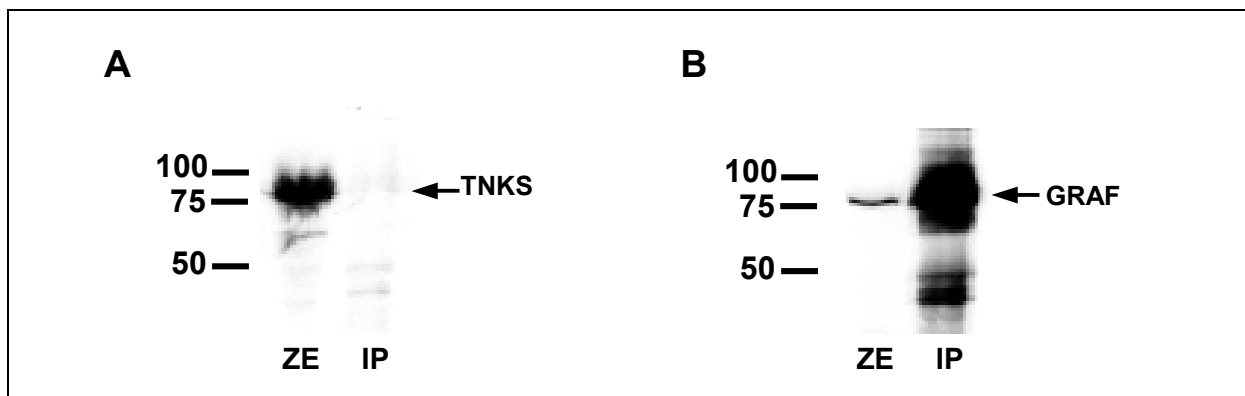
**Abb. III.32:** Co-Immunopräzipitationen mit FBP17-Deletionskonstrukten. Nachweis von TNKS (bei 90kD) erfolgte mit anti-FLAG.  
F/R = FBP17-Deletionsmutanten; T = Tankyrase; ZE = Zelleextrakt;  
IP = Immunopräzipitat

Um zu prüfen, ob die verschiedenen FBP17-Konstrukte in allen Ansätzen wie erwartet exprimiert wurden, erfolgte die Detektion im gleichen Western Blot mit anti-myc-Antikörpern. Dabei zeigte sich, dass das Konstrukt F2/R1 sehr viel schwächer exprimiert worden war als die übrigen Deletionsmutanten. Dies lässt sich möglicherweise auf eine Instabilität des N-terminal-trunkierten Proteins zurückführen. Trotzdem zeigte sich in diesem Immunopräzipitat ein deutliches Tankyrase-Signal, was auf eine relativ starke Interaktion zurückschließen lässt. **Abb. III.33** zeigt den Nachweis der FBP17-Konstrukte.



**Abb. III.33:** Bestätigung der korrekten Expression der myc-FBP17-Konstrukte. Nachweis mit anti-myc. Das starke Hintergrundsignal bei 45kD lässt sich auf die schwere Kette des IgG des primären Antikörpers zurückführen.  
F/R = FBP17-Deletionsmutanten; ZE = Zelleextrakt; IP = Immunopräzipitat  
Molekulargewichte: F1/R1: 73kD; F1/R2: 62kD; F1/R3: 38kD; F2/R1: 42kD

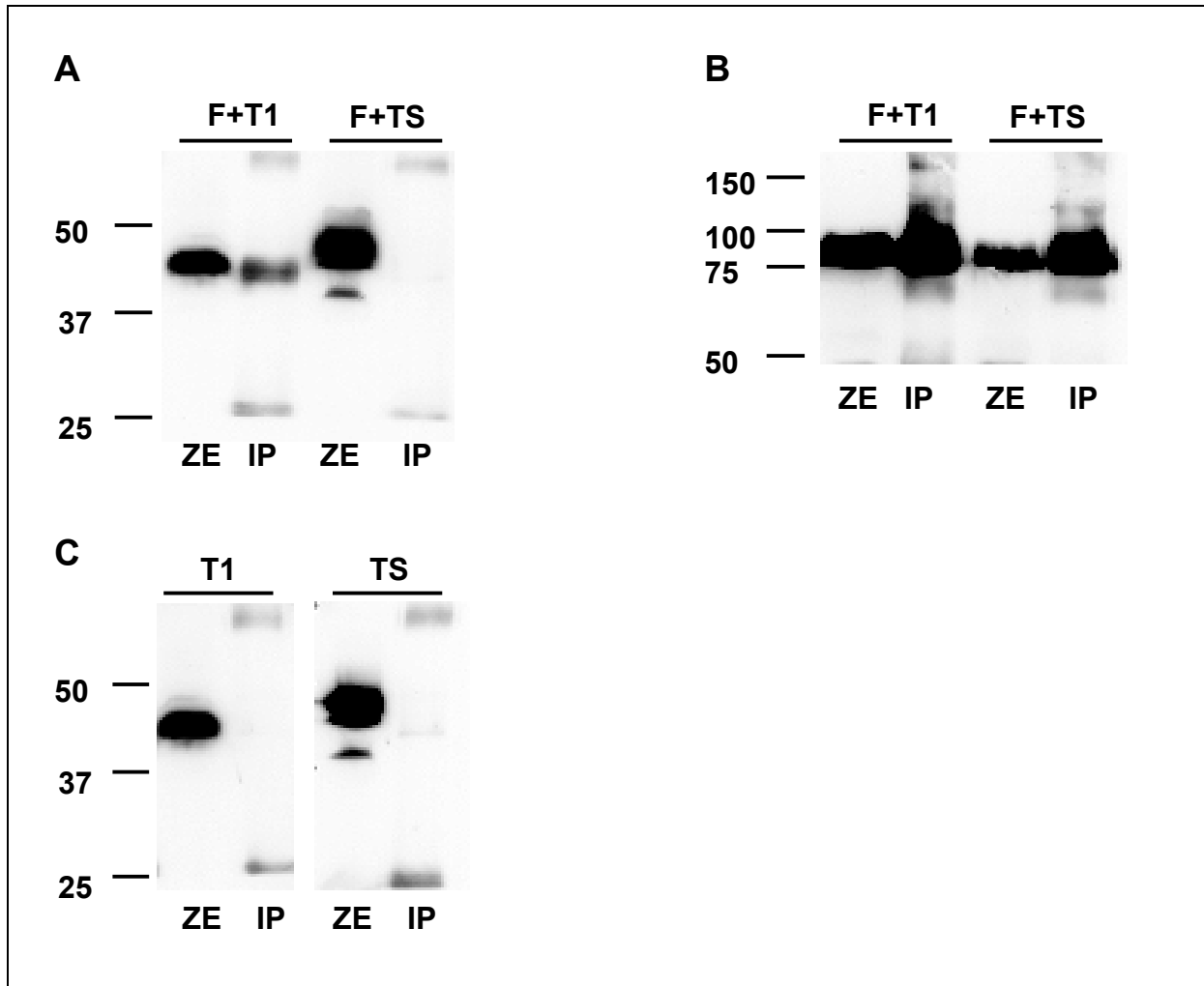
Um zu testen, ob die Interaktion zwischen FBP17 und Tankyrase spezifisch von der SH3-Domäne des FBP17-Proteins vermittelt wird, oder ob Tankyrase generell mit SH3-Domänen interagiert, wurde ein weiterer Co-Immunopräzipitationsversuch mit Tankyrase und GRAF durchgeführt. GRAF besitzt an seinem C-Terminus ebenfalls eine SH3-Domäne, und obwohl das Protein stark exprimiert wurde und im Immunopräzipitat deutlich nachweisbar war, war es im Versuch jedoch nicht in der Lage, Tankyrase zu binden (**Abb. III.34**). Die Interaktion zwischen FBP17 und Tankyrase erfolgt demnach spezifisch über die SH3-Domäne von FBP17.



**Abb. III.34:** Co-Immunopräzipitation von TNKS mit GRAF  
 ZE = Zellextrakt; IP = Immunopräzipitat  
**A:** Nachweis von TNKS mit anti-FLAG (bei 90kD)  
**B:** Nachweis von GRAF mit anti-myc (bei 82kD)

Die hier als FBP17-Interaktionspartner identifizierte Tankyrase-Variante enthielt mit Ausnahme des ersten sämtliche Ankyrin-Repeats des Wildtyp-Proteins. Diese jeweils 33 Aminosäuren umfassenden Repeats fungieren als modulare Adaptoren für Proteinerkennungsprozesse. Man geht davon aus, dass diese Module in ihrer gefalteten Konformation in der Lage sind, variabel Reste zu exponieren, die mit einer Vielzahl von Proteinliganden interagieren können (BENNETT, 1992). Dabei ist zwischen 15 intakten und 9 aberranten Repeats bei Tankyrase zu unterscheiden; die intakten Repeats sind in 5 funktionellen Clustern (Ankyrin repeat cluster, ARC; SEIMIYA & SMITH, 2002) organisiert. Um zu testen, welche Region der Ankyrin-Repeat-Domäne für die Interaktion mit FBP17 verantwortlich ist, wurden zwei Deletionsmutanten von TNKS hergestellt, von denen die Mutante T1 die intakten Ankyrin-Repeats 2-9 (entsprechend ARCI und II) des Wildtyp-Proteins und die Mutante TS die Repeats 10-15 (ARCIII bis V) umfasste. Hierzu wurden mittels PCR die ersten 1300bp der 2505bp langen kodierenden Region des identifizierten TNKS-Variante mit einem FLAG-Tag versehen und in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert (T1). Ebenso wurde mit den verbleibenden 1205bp verfahren

(TS). Mit diesen Plasmiden sowie *myc*-markiertem FBP17 wurden 293T-Zellen transfiziert und die Proteine nach Immunopräzipitation von FBP17 im Zellextrakt und Präzipitat mittels Western Blot nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigt **Abb. III.35**.

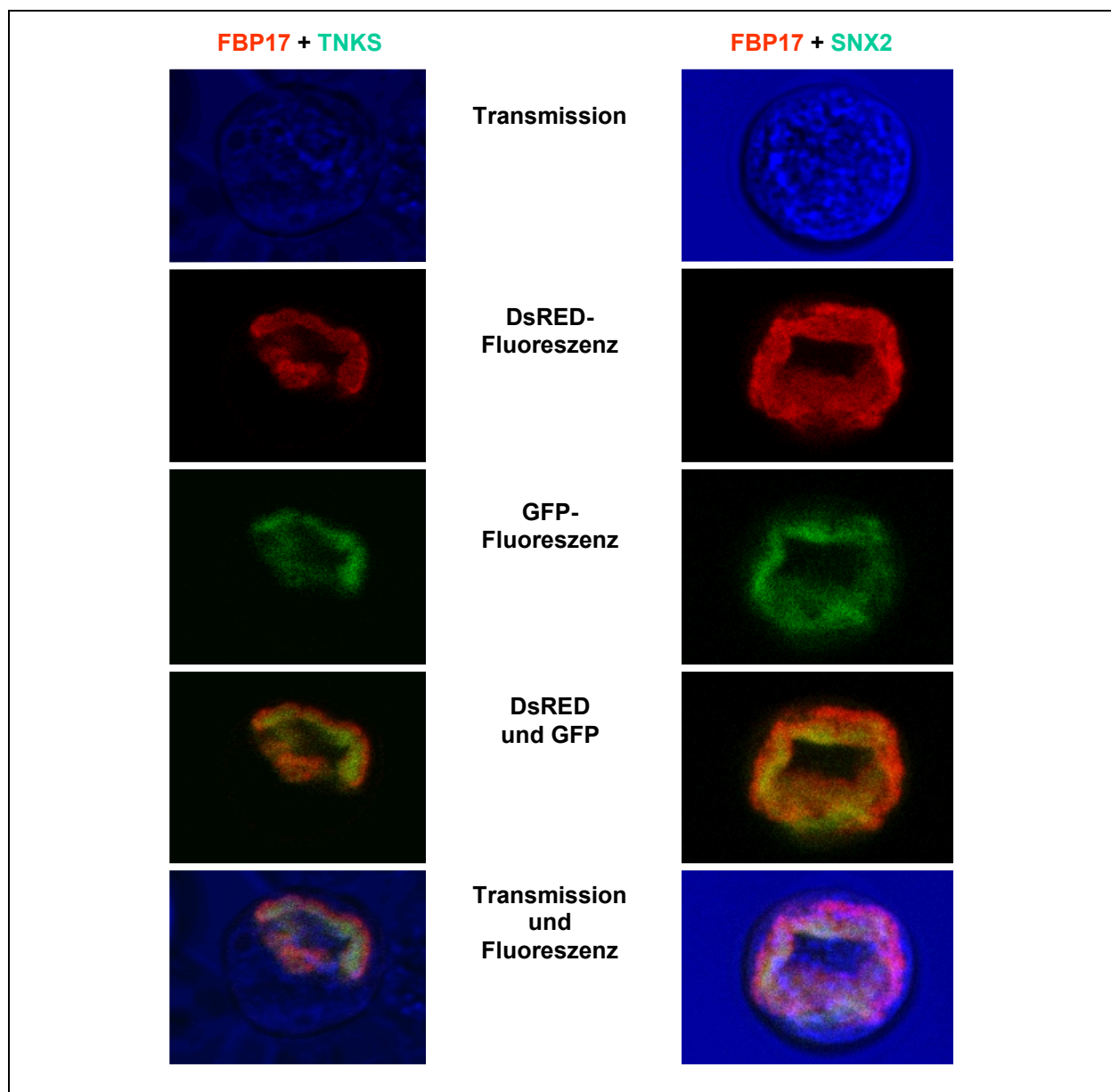


**Abb. III.35:** Co-Immunopräzipitation der TNKS-Deletionsmutanten mit FBP17  
 ZE = Zellextrakt; IP = Immunopräzipitat; F = FBP17; T1= TNKS Basen 1-1300;  
 TS = TNKS Basen 1300-Stop  
**A:** Nachweis der TNKS-Konstrukte mit anti-FLAG (bei ca. 45kD).  
 Nur T1 co-immunopräzipitiert mit FBP17  
**B:** Nachweis der korrekten FBP17-Expression und –Präzipitation mit anti-myc  
 (bei 73kD).  
**C:** Weder T1 noch TS sind im Immunopräzipitat ohne FBP17 nachweisbar.

Die Ergebnisse machten deutlich, dass die ersten 8 Ankyrin-Repeats (ARCI und II) der untersuchten Tankyrase-Variante, repräsentiert durch das Konstrukt T1, für die Interaktion von Tankyrase und FBP17 verantwortlich sind. Das Restprotein, repräsentiert durch TS, das über weitere 6 Ankyrin-Repeats verfügt, bindet allein nicht mehr an FBP17.

### III.5.5 Co-Lokalisation von FBP17 mit SNX2 bzw. TNKS

Um zu testen, wie sich die FBP17-Interaktionspartner SNX2 und Tankyrase in Säugerzellen verhalten, wurden 293T-Zellen mit FBP17, das C-terminal mit dem rot fluoreszierenden Protein (DsRed) fusioniert war, sowie mit C-terminal GFP-fusionierten Interaktionspartnern transfiziert. **Abb. III.36** zeigt die im Laser Scan-Konfokalmikroskop beobachteten Ergebnisse. Alle Proteine wurden ausschließlich cytoplasmatisch exprimiert und zeigten in den jeweiligen Paaren eine deutliche Co-Lokalisation, die von einer gelben Mischfluoreszenz dokumentiert wurde.



**Abb. III.36:** Co-Lokalisation von FBP17 und SNX2 bzw. TNKS in transfizierten 293T-Zellen  
eingesetzte Fusionsproteine: FBP17-DsRed (rot), GFP-TNKS GFP-SNX2 (grün)

## **IV. Diskussion**

### **IV. 1 Das *MLL*-Gen**

Bei der Diagnose hämatologischer Neoplasien und für die Prognose des Krankheitsverlaufs dienen wiederkehrende chromosomale Rearrangements als aufschlussreiche Marker, die routinemäßig in solchen Fällen analysiert werden. Neben dieser Funktion bieten die Aberrationen jedoch auch Einsichten in die der Leukämogenese zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Im Fall von *MLL*, dem humanen Homolog des *Drosophila trithorax*-Gens, handelt es sich bei den häufigsten Aberrationen um reziproke Translokationen. Diese führen zur Entstehung von Fusionsgenen aus *MLL* und einem Partnergen auf dem zweiten betroffenen Chromosom. Die Fusion zieht die Expression von chimären Proteinen aus einem N-terminalen *MLL*-Anteil und einem C-terminalen Partneranteil nach sich. Eine Besonderheit hierbei besteht darin, dass die Fusionen immer „in frame“ erfolgen, die Leserahmen beider beteiligten Proteine also erhalten bleiben. Dadurch werden Domänen des *MLL*-Gens, die für die Bindung des Proteins an DNA verantwortlich sind (AT-Haken, CxxC-Motiv), mit unterschiedlichsten Domänen der Partnerproteine vereint. Handelt es sich um Strukturen mit aktivierender Funktion, kann dies zur unspezifischen Aktivierung von Genen führen, die für den *MLL*-Anteil erkennbare Bindungssequenzen besitzen. Darüber hinaus geht den Fusionsproteinen die SET-Domäne von *MLL* verloren, eine Domäne, die bei chromosomalen Proteinen zu finden ist, die an der Modulation der Genaktivität beteiligt sind. Die SET-Domäne bietet dabei möglicherweise eine Interaktionsstelle für die Zusammenstellung aktivierender oder reprimierender Chromatinkomplexe (DIMARTINO & CLEARY, 1999). Die nach Translokationen entstehenden Fusionsproteine zeigen somit völlig neue Eigenschaften, die ursächlich zur Entstehung der Leukämie beitragen können. Dies konnte beispielsweise für die *MLL/ENL*-Fusion nach t(11;19)(q23;p13.3), sowie für *MLL/ELL* nach t(11;19)(q23;p13.1) nachgewiesen werden (SLANY *et al.*, 1998; LAVAU *et al.*, 1997). Generell lassen sich die bislang identifizierten Fusionspartner in zwei funktionale Gruppen einteilen: nucleäre Faktoren, die bei der Transkriptionsregulation eine Rolle spielen und cytoplasmatische Proteine, die an Signalgebungsprozessen beteiligt sind (AYTON & CLEARY, 2001).

Experimente in murinen Modellsystemen zeigten, dass der Verlust des *MLL*-Proteins allein für die Leukämogenese nicht verantwortlich ist. *MLL* reguliert als humanes trithorax-Homolog die Expression von *HOX*-Genen, die sowohl bei der frühen Stammzellentwicklung

als auch bei der hämatopoetischen Differenzierung eine Rolle spielen (LAWRENCE *et al.*, 1996). Allerdings führte Haploinsuffizienz für *MLL* im Mausmodell nur zu einer abnormen Hämatopoese, nicht jedoch zu einer Neoplasie (DiMARTINO & CLEARY, 1999). Darüber hinaus zog retrovirale Transduktion muriner myeloischer Vorläuferzellen mit trunkiertem *MLL*, wie es in den verschiedenen Fusionsproteinen erhalten bleibt, keine Transformation der Zellen in einem Replattierungsassay (CFC-Test) nach sich (LAVAU *et al.*, 1997; DiMARTINO *et al.*, 2000; FUCHS, REHKAMP *et al.*, 2001).

Aus diesem Grund wurde spekuliert, dass die Fusionspartner in den verschiedenen Translokationen unter *MLL*-Beteiligung ausschlaggebend für die maligne Transformation sein müssten (AYTON & CLEARY, 2001). Tatsächlich konnten für die Fusionsproteine *MLL/ENL*, *MLL/ELL*, *MLL/AF10* und *MLL/CBP* transkriptionelle Effektorfunktionen nachgewiesen werden, die für die Leukämogenese entscheidend sind (SLANY *et al.*, 1998; DiMARTINO *et al.*, 2000; DiMARTINO *et al.*, 2002; LAVAU *et al.*, 2000). Im Detail sind die Mechanismen der malignen Transformation in diesen Fällen jedoch noch ungeklärt, allerdings handelt es sich bei den erwähnten Fusionspartnern um Proteine, die transkriptionelle Regulationsfunktionen ausüben.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine GRAF und FBP17 gehören zur Gruppe der cytoplasmatischen *MLL*-Fusionspartner. Bei beiden ergab ein CFC-Test kaum transformierende Wirkung in myeloischen Vorläuferzellen der Maus (FUCHS, REHKAMP *et al.*, 2001). Damit sind zur Zeit mit *ABII* und *LASPI* insgesamt lediglich vier *MLL*-Fusionen ohne transformierende Wirkung bekannt (STREHL *et al.*, zur Publikation eingereicht; R. SLANY, unveröffentlichte Daten). Die Tatsache, dass alle vier Proteine im Cytoplasma lokalisiert sind, kann jedoch nicht der Grund sein, dass die cytoplasmatischen Fusionspartner von *MLL* ein generell niedrigeres transformierendes Potenzial aufweisen, wie der Vergleich mit AF6 zeigt. Hierbei handelt es sich um ein der RAS- und NOTCH-Signalgebung nachgeschaltetes Protein, das ebenfalls im Cytoplasma zu finden ist. AF6 wird in seiner *MLL*-Fusion als dominante Zugewinnmutante angesehen, die einen aktiven Beitrag zur Transformation leistet (JOH *et al.*, 1997; AYTON & CLEARY, 2001). Offensichtlich sind also bei den Fusionen ohne transformierendes Potenzial zusätzliche Mutationen notwendig, die zur Entwicklung einer Leukämie führen. Da die bislang im murinen Modell getesteten *MLL*-Fusionsproteine auch bei nachweislich starken transformierenden Fähigkeiten eine gewisse Latenzzeit bis zur Entstehung einer akuten Leukämie in der Maus zeigen, kann man schließen, dass es auch in diesen Fällen weiterer Aberrationen bedarf, damit es zur Ausbildung des vollen malignen

Phänotyps kommt (AYTON & CLEARY, 2001). In den hier aufgeführten Fällen ohne großes Transformationspotenzial in einem CFC-Test könnte spekuliert werden, dass eine größere Anzahl genetischer Veränderungen notwendig ist, um den gleichen Phänotyp zu erzeugen. Daher müssten diese Aberrationen seltener bei Patienten nachweisbar sein, was insofern bestätigt werden kann, als sie bisher nur in einzelnen Fällen dokumentiert sind und MLL-Fusionen mit nucleären Proteinen wie ENL, AF9 und AF4 den prozentual größten Anteil an Translokationen unter *MLL*-Beteiligung darstellen (DIMARTINO & CLEARY 1999).

## **IV.2 Der *GRAF*-Promotor**

Eukaryontische RNA-Polymerasen benötigen mehrere kurze konservierte Sequenzelemente in der direkten Nachbarschaft eines Gens, um die Transkription initiieren zu können. Dabei werden diese Erkennungssequenzen von Transkriptionsfaktoren gebunden, die der Polymerase den Weg weisen und sie aktivieren. Eine Gruppe solcher Erkennungssequenzen befindet sich in der Regel stromaufwärts der kodierenden Region eines Gens und bildet dort den sog. Promotor (STRACHAN & READ, 1996). An diesen kann die basale Transkriptionsmaschinerie (Präinitiationskomplex) binden, die sich aus 8 generellen Transkriptionsfaktoren zusammensetzt. Eine Schlüsselrolle nimmt in diesem System der generelle Transkriptionsfaktor TFIID ein, der den gesamten Komplex an den Promotor heranführt. Die meisten der von der RNA-Polymerase II transkribierten Gene enthalten eine sog. TATA-Box, die etwa 25bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle liegt. Eine Untereinheit von TFIID, TBP (TATA-box binding protein) bindet an dieses DNA-Motiv und positioniert so den Präinitiationskomplex (GREENBLATT, 1991; BURATOWSKI, 1994).

Neben diesem Promotortyp gibt es jedoch auch solche, denen eine TATA-Box fehlt. Diese besitzen stattdessen eine sog. Initiator-Sequenz, die den Transkriptionsstartpunkt umschließt und ebenfalls eine korrekte Positionierung des Präinitiationskomplexes ermöglicht. Die Initiator-Sequenz wird von dem generellen Transkriptionsfaktor TFIIA gebunden, der die übrigen Faktoren des Komplexes rekrutiert und so die Transkription ermöglicht (BURLEY & ROEDER, 1996). Darüber hinaus gibt es in solchen Promotoren häufig Sequenzmotive, die von ubiquitär vorkommenden regulativen Transkriptionsfaktoren gebunden werden. Als Beispiel hierfür sei die CAAT-Box genannt, eine Sequenz, die beispielsweise von den regulativen Transkriptionsfaktoren NF1 und CTF gebunden wird (BENOIST & CHAMBON, 1981). Oder aber die GC-Box, die als Bindungsstelle für den Promotor-spezifischen Transkriptionsfaktor

SP1 dient, der wiederum mit TBP interagiert und so die Positionierung des Präinitiationskomplexes vermittelt (BRIGGS et al., 1986).

Im Rahmen der Identifikation von *GRAF* als neuem *MLL*-Fusionspartner konnte der Translationsinitiationspunkt der mRNA an Hand der konservierten Kozak-Erkennungssequenz (KOZAK, 1991) festgestellt werden. Ausgehend von diesem Startpunkt wurde auf genomischer Ebene eine 1482bp lange Sequenz mit Promotoreigenschaften identifiziert. Mit Reportergen-Assays konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität dieser Sequenz orientierungsabhängig war und es sich hierbei somit nicht um einen Enhancer, sondern tatsächlich um den GRAF-Promotor handelte, obwohl eine offensichtliche TATA-Box fehlte. Allerdings verfügt die Promotorsequenz über zahlreiche SP1-Bindungsstellen. Deletionsexperimente zeigten, dass die Basen -75 bis -981 stromaufwärts des GRAF-Translationsstartpunktes höchste Aktivierungskapazität aufweisen. Dies ließ darauf schließen, dass sich in den übrigen Abschnitten des Promotors negativ regulative Sequenzen befinden (BOJESSEN, 1999). In der vorliegenden Arbeit sollte nun mit Hilfe von Reportergenassays untersucht werden, ob sich innerhalb dieser 924 Basen umfassenden Region regulativ wirkende Sequenzen detektieren lassen. Dabei war es möglich, eine 11 Basen umfassende Sequenzmotiv zu isolieren (-534 bis -545). Der Bereich wurde parallel hierzu in DNase I-Schutzexperimenten (sog. „Footprintanalysen“) als methylierungssensitiv identifiziert (AMMERPOHL, 2000). Datenbankrecherchen ergaben für diese Region potenzielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF1, AP-2 und AP-4. Bei NF1 (Nuclear Factor 1) handelt es sich um einen weit verbreiteten Transkriptionsfaktor, für den Bindungsstellen in Promotoren bei zahlreichen Genen in praktisch allen Geweben beschrieben sind. NF1 hat eine mögliche Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation, wie beim Menschen und auch in Tiermodellen gezeigt werden konnte (GEURTS *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 1998; GRONOSTAJSKI, 2000). AP-2 ist in der Lage, seine Zielgene entweder zu aktivieren oder zu reprimieren. Unter den aktivierten Zielen finden sich die Gene für verschiedene Rezeptoren wie TGF $\alpha$ , c-KIT und den Östrogenrezeptor, negativ wird u.a. *c-Myc* reguliert (HILGER-EVERSHEIM *et al.*, 2000). Bei Überexpression von AP-2 kommt es *in vitro* zu maligner Transformation der Zellen und tatsächlich konnte in Brustkrebs-Proben eine Überexpression des AP-2-Gens nachgewiesen werden (KANNAN *et al.*, 1994; TURNER *et al.*, 1998). Um die Bindung von AP-2 an den *GRAF*-Promotor zu überprüfen, müssten jedoch weitere Experimente wie EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) zur Bestätigung einer Protein-Bindung an die DNA und Gel-Supershift-Assays zur Identifikation des bindenden Proteins durchgeführt werden. Darüber hinaus müsste geklärt werden, ob es bei Bindung des

Transkriptionsfaktors hier zu einer Repression oder Aktivierung der GRAF-Expression kommt. Daher ist es verfrüht, über einen Beitrag von GRAF zur malignen Entartung in diesen Fällen zu spekulieren. AP-4 wiederum wurde ursprünglich als Enhancer-Bindungsfaktor beschrieben und besitzt die Fähigkeit, Homodimere zu bilden. Bindung von AP-4 an seine Erkennungssequenz führt zu einer Transkriptionsaktivierung, wobei die Bildung von Dimeren eine Möglichkeit zur Kontrolle der Transkription während der zellulären Differenzierung darstellen kann (MERMOD *et al.*, 1988; HU *et al.*, 1990). Die Tatsache, dass mit Hilfe des One Hybrid-Systems und des DNA-Motivs -534 bis -545 keiner dieser Faktoren als Bindungsprotein bestätigt werden konnte, kann zwei mögliche Ursachen haben. Zum Einen können die Ergebnisse von computergestützten Sequenzanalysen nur als Hypothesen betrachtet werden, da eine realistische Aussage über die physiologische Signifikanz der Interaktion rein auf der Grundlage von Sequenzdaten nur sehr bedingt möglich ist. Zum Anderen besteht die Möglichkeit, dass der ermittelte DNA-Abschnitt im Rahmen der One Hybrid-Systemvorgaben zu kurz gewählt wurde, wodurch für die Bindung der Proteine möglicherweise essentielle flankierende Sequenzen verloren gingen. Dafür spricht die Beobachtung, dass der im Footprint-Assay als methylierungssensitiv auffällig gewordene Bereich eine Sequenz von 28bp Länge umfasst (AMMERPOHL, 2000).

Die zweite Region, die sich als methylierungssensitiv erwiesen hatte, umfasste 24bp, aus der eine 14bp lange Kernregion für den One Hybrid Screen ausgewählt wurde. In diesem Bereich befindet sich eine Nrf2-Erkennungssequenz, wobei es sich um einen Leucin-Zipper-Transkriptionsaktivator handelt (MOI *et al.*, 1994). Nrf2 interagiert mit CBP (CREB binding protein), wodurch es zu einer synergistischen Aktivierung der Transkription kommt. CREB ist ein Transkriptionsaktivator, der eine stimulierende Wirkung auf Gene ausübt, die *cis*-regulatorische cAMP sensitive DNA-Elemente besitzen, sog. CREs. CBP wiederum bindet an CREB und vermittelt die Wechselwirkung zwischen diesem und TFIIB des basalen Transkriptionsapparates, wodurch die Transkription aktiviert werden kann (KATOH *et al.*, 2001; NORDHEIM, 1994). Allerdings konnte auch in diesem Fall eine Interaktion zwischen Nrf2 und dem GRAF-Promotor mittels des One Hybrid Systems nicht bestätigt werden. Das einzige mit diesem System gefundene vollständige Protein war GNAS1, ein G-Protein, das in die hormonelle Regulation der Adenylat-Cyclase involviert ist und bei hereditären Erkrankungen des endokrinologischen Systems häufig mutiert vorliegt (LANIA *et al.*, 2001). Da GNAS1 normalerweise membranassoziiert vorliegt, könnte die Interaktion mit dem GRAF-Promotor auf die Verlagerung des Proteins in den Zellkern zurückgeführt werden. Da jedoch beispielsweise für den ebenfalls membranständigen EGF-Rezeptor auch eine Rolle als

Transkriptionsfaktor diskutiert wird (LIN *et al.*, 2001), ist eine Lokalisation von GNAS1 im Nucleus oder Cytoplasma und damit die Möglichkeit einer Interaktion mit GRAF nicht auszuschließen.

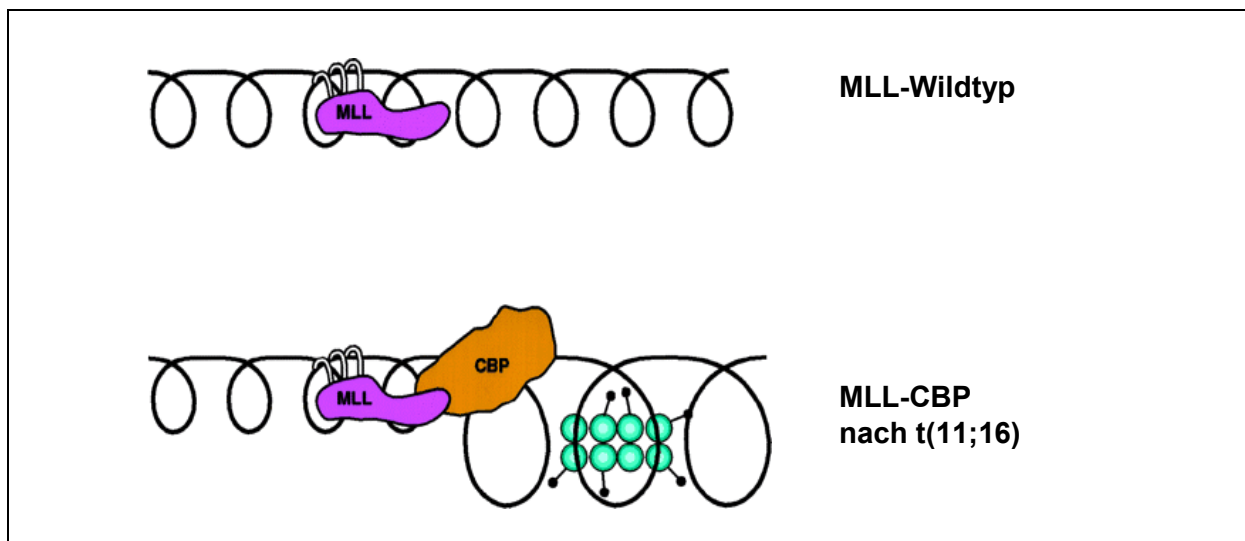
### **IV.3      Abhängigkeit der *GRAF*-Expression von Chromatinstruktur und Methylierung**

Die Regulation der Genexpression ist ein komplexer Mechanismus, der auf verschiedenen Ebenen reguliert werden kann. Wie bereits erwähnt, stellt die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder -repressoren an spezifische regulative DNA-Elemente eine dieser Ebenen dar. Aber auch auf der Ebene des Chromatins selbst erfolgt eine elementare Regulation der Expression. Diese wird zum Einen durch Acetylierung und Deacetylierung der nucleosomalen Histone erreicht, zum Anderen durch Methylierung von Cytosin-Resten in CpG-Inseln regulativer DNA-Abschnitte.

#### ***Histon-Acetylierung:***

Aktiv transkribierte Gene zeichnen sich durch eine Hyperacetylierung der Histone H2A, H2B, H3 und H4 aus. Dies führt zu Ladungsveränderungen, die die normalerweise enge Assoziation zwischen DNA und Histonen lockert (LEE *et al.* 1993). Man nimmt an, dass dies den Zugang von Transkriptionsfaktoren und ihre Bindung an die DNA erleichtert und so die Transkription aktiviert wird. Gestützt wurde diese Annahme beispielsweise durch die Beobachtung, dass in Hefen ein mutiertes H4, das eine komplette Hypoacetylierung simuliert, die Genexpression verschiedener getesteter Gene reprimiert (DURRIN *et al.*, 1991). Der Acetylierungsstatus der DNA wird durch ein fein reguliertes Wechselspiel zwischen Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) geregelt. Auf die grundlegende Bedeutung dieses Regulationsmechanismus weist die Tatsache hin, dass eine Reihe von Transkriptions-Coaktivatoren über eine intrinsische HAT-Aktivität verfügen und so einmal für den Transkriptionsfaktor zugänglich gemachte DNA für die Zusammenstellung des Transkriptionsapparates weiter lockern können. Als Beispiele hierfür können die TFIID-Untereinheit TAFII250 (MIZZEN *et al.* 1996) und CBP/p300 genannt werden (BANNISTER & KOUZARIDES, 1996). Bei CBP handelt es sich um einen Integrator vieler Signaltransduktionswege, u.a. auch des MAP-Kinase-Weges. Dabei ist besonders interessant, dass auch *CBP* ein *MLL*-Fusionspartner ist. Bei der Translokation t(11;16)(q23;p13.3), die

häufig bei Therapie-induzierten sekundären Leukämien auftritt, entsteht ein Fusionsprotein, das die DNA-Bindungseigenschaften von MLL mit der HAT-Aktivität von CBP verbindet. Es konnte gezeigt werden, dass die Verknüpfung dieser beiden Eigenschaften für die Entstehung der Leukämie essenziell ist, da weder ein trunkiertes MLL-Protein, noch der in der Fusion erhaltene CBP-Rest allein *in vivo* oder *in vitro* ein transformierendes Potenzial aufwies (LAVAU *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass MLL mittels seiner AT-Hooks an die kleine Furche der DNA bindet. Die Aktivität der HAT-Domäne von CBP führt dann zu einer Änderung der Chromatinstruktur und damit zu einer besseren Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren. Es käme also entweder durch die HAT-Aktivität direkt oder durch weitere Komponenten des Coaktivator-Komplexes, mit denen der CBP-Rest interagiert, zu einer abnormen Veränderung der Chromatinstruktur (Abb. IV.I; REDNER *et al.*, 1999).



**Abb. IV.I:** Mögliche Wirkung des MLL-CBP-Fusionsproteins bei Translokation t(11;16). Die Acetylierung der Histone durch das Fusionsprotein führt zu einer Lockerung der Chromatinstruktur, die das MLL-Wildtypprotein nicht bewirkt (nach REDNER *et al.*, 1999).

HDACs wirken den HATS entgegen und sind durch gezielte Deacetylierung von Lysin-Resten an den N-Termini der Histone in der Lage, den ursprüngliche, eng gepackten nucleosomalen Verbund wieder herzustellen. Auf diese Weise kommt es zu einer Repression der Genaktivität, allerdings konnte bislang noch kein Transkriptionsrepressor mit intrinsischer HDAC-Aktivität identifiziert werden. Bei Säugern sind HDACs in großen Multiproteinkomplexen aktiv, die Transkriptionsfaktoren rekrutieren können, was zu einer gerichteten Repression der Zielsequenz führt. Dies konnte zum Beispiel für Mitglieder der Mad-Familie von Transkriptionsfaktoren gezeigt werden (LAHERTY *et al.*, 1997).

Inhibitoren der HDACs sollten also in der Lage sein, einer derartigen Repression der Genaktivität entgegen zu wirken. Bei einem dieser Inhibitoren handelt es sich um das *Streptomyces*-Produkt Trichostatin A, für das bereits 1990 eine spezifische Inhibierung von Histon-Deacetylasen nachgewiesen werden konnte. Diese Inhibierung führte zu einer transienten Hyperacetylierung des gesamten Genoms. Als Konsequenz kam es zu einem Zellzyklusarrest und zu fortschreitender Differenzierung der Zellen (YOSHIDA *et al.*, 1990). Untersuchungen an Hefen zeigten, dass die Inhibierung der Repression eine Konzentrationsabhängigkeit aufweist, dass also mit steigender TSA-Konzentration eine zunehmende Repression erreicht werden kann (OLSSON *et al.*, 1999). Auf diesen Grundlagen wurden HDAC-Inhibitoren als potenzielle neue Chemotherapeutika in der Krebsbehandlung interessant, zumal in Experimenten mit Zelllinien aus verschiedenen Tumortypen Wachstumsstop, Differenzierung und/oder Apoptose nach Inkubation der Zellen mit Deacetylase-Inhibitoren nachgewiesen werden konnte (MARKS *et al.*, 2000). Eine Reihe von entsprechenden Substanzen befinden sich derzeit in klinischen Studien (MARKS *et al.*, 2001).

Im Experiment sollte nun überprüft werden, inwiefern TSA einen Einfluss auf die *GRAF*-Expression in Leukämie-Zelllinien unterschiedlicher Herkunft ausüben kann. Hintergrund für diesen Versuchsansatz war die Beobachtung, dass TSA eine signifikante Veränderung der Genexpression in kultivierten Zellen nur bei ca. 2% aller Gene verursacht (MARKS *et al.*, 2001). Tatsächlich konnte in allen untersuchten Zelllinien eine Erhöhung der *GRAF*-Expression nach TSA-Behandlung beobachtet werden. Auch eine Dosis-Abhängigkeit konnte gezeigt werden, allerdings unterschieden sich die Zelltypen in ihrer TSA-Antwort. Die aus einer myeloischen Leukämie oder myelodysplastischem Syndrom kultivierten Zellen benötigten eine doppelt bzw. dreifach höhere TSA-Konzentration, bis ein signifikanter Anstieg der *GRAF*-Expression nachweisbar war, als die aus einer lymphatischen Leukämie oder einem Lymphom etablierten Linien. Dies weist darauf hin, dass sich die unterschiedlichen Entwicklungslinien auch in unterschiedlichen Acetylierungsmustern manifestieren. Allerdings kann aus den ermittelten Expressiondaten der unbehandelten Kontrollen nicht auf eine generell stärkere Repression des *GRAF*-Gens in der myeloischen Entwicklungslinie rückgeschlossen werden. Deutlich wurde jedoch, dass Hypoacetylierung bei *GRAF* ein Repressionsmechanismus im hämatopoetischen System darstellt, der sich in der hier beobachteten schwachen Expression des Gens im Vergleich zu anderen humanen Geweben niederschlägt (BORKHARDT, BOJESSEN *et al.*, 2000).

***Methylierung:***

Der zweite wesentliche Mechanismus zur Regulation der Genexpression auf Chromatinebene bei höheren Eukaryonten stellt die Methylierung von Cytosinen dar, die durch DNA-(Cytosin-5)-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert wird. Die Methylierung erfolgt an Cytosinen in CpG-Dinucleotiden. CpG-reiche Regionen der DNA finden sich hauptsächlich im Bereich des Promotors und des ersten Exons eines Gens und werden als CpG-Inseln bezeichnet (BIRD, 1986). Methylierung führt zu einer Suppression der Genaktivität, was durch zwei Mechanismen verwirklicht werden kann: zum Einen durch eine Behinderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren, deren Bindungsstellen CpGs enthalten (z.B. c-Myc; TATE & BIRD, 1993), zum Anderen durch die Bindung Methyl-CpG-bindender Proteine, die zwar nicht sequenzspezifisch agieren, aber spezifisch für methylierte DNA sind (BOYES & BIRD, 1992). In der Carcinogenese spielt die Methylierung von CpG-Inseln eine nicht unerhebliche Rolle. So kann es leicht zu einer Deaminierung von Methyl-Cytosin zu Thymin und somit zur Entstehung von Punktmutationen kommen (SHEN *et al.*, 1992). Der wesentlichere Aspekt ist jedoch eine fehlgesteuerte Methylierung regulativer Sequenzen von Tumorsuppressorgenen, die die Expression des Gens bis hin zum Allelverlust reprimieren kann (MYOHANEN *et al.*, 1998; VACHTENHEIM *et al.* 1994).

Wie für den GRAF-Promotor bereits gezeigt werden konnte, führt eine *in vitro*-Methylierung der regulativen Sequenzen zu einem fast vollständigen Verlust der Promotoraktivität (BOJESSEN, 1999). Um zu testen, ob dieser Mechanismus auch *in vivo* für die Regulation der GRAF-Expression in Leukämie-Zelllinien eine Rolle spielt, wurden Zelllinien verschiedener Entwicklungsreihen mit dem Nucleotid-Analogen 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-azadC) behandelt. Wird 5-azadC während der Synthese in die DNA eingebaut, inhibiert es die Methyltransferase DNMT1, was zu einer Demethylierung der genomischen DNA führt. Dies zieht wiederum die Aktivierung durch Methylierung reprimierter Gene nach sich (JÜTTERMANN *et al.*, 1994). In der Krebsbehandlung wurde 5-azadC speziell bei akuter myeloischer Leukämie und myelodysplastischem Syndrom als Chemotherapeutikum getestet (PINTO & ZAGONEL, 1993). Im Versuch zeigte sich eine Erhöhung der GRAF-Expression nach 5-azadC-Behandlung bei drei von fünf Zelllinien, allerdings war der Anstieg der GRAF-Kopienzahlen in der mRNA nur für eine AML-Zelllinie hoch signifikant im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Daraus lässt sich schließen, dass die Hypermethylierung der Promotorregion nicht den primären Mechanismus der GRAF-Repression darstellt. Allerdings sind synergistische Effekte durchaus denkbar. So konnte bereits für verschiedene Gene, die durch Hypermethylierung in Karzinomzelllinien reprimiert sind, nach leichter

Demethylierung durch 5-azadC und zusätzlicher Inhibierung der Histon-Deacetylasen durch TSA eine Reexpression der Gene erreicht werden (CAMERON *et al.*, 1999). Auf ein Zusammenwirken des Methylierungs- und des Histon-Deacetylierungsstatus einer gegebenen Sequenz in der Regulation der Expression weist auch die Tatsache hin, dass Methyl-CpG-bindende Proteine Komplexe mit Histon-Deacetylasen und Transkriptionsrepressoren bilden können (NAN *et al.*, 1998).

#### **IV.4 Einfluss von GRAF auf Signaltransduktionswege**

Im Versuch wurde getestet, inwiefern das GRAF-Protein in seiner Wildtyp-Form im Vergleich zu einem trunkierten Protein einen Einfluss auf verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege nimmt. Dabei ergab sich eine signifikante Aktivierung für die JNK-, NFκB- und cAMP-vermittelten Signalwege mit den jeweils assoziierten Transkriptionsfaktoren AP-1, NFκB und CREB. Diese Aktivierung ließ sich eindeutig auf den Einfluss des GRAF-Proteins zurückführen, da das trunkierte Protein keinen signifikant von der Negativkontrolle abweichenden Effekt hatte. Die aktivierende Wirkung des GRAF-Proteins auf drei scheinbar unabhängige Enhancer lässt sich dadurch erklären, dass alle drei Signaltransduktionswege, in die diese Enhancer involviert sind, miteinander vernetzt sind. Veränderungen in der AP-1-Aktivität lassen sich auf eine Veränderung der Expression verschiedener Mitglieder der AP-1-Transkriptionsfaktorenfamilie oder auf posttranslationelle Modifikationen zurückführen (z.B. Phosphorylierungen). Beides erfolgt als Antwort auf eine Vielzahl verschiedener Stimuli, wozu mitogene Wachstumsfaktoren, Cytokine in Entzündungsprozessen, zellulärer Stress verschiedenster Art und neoplastische Transformation gehören. AP-1-Signalgebung wird sowohl durch die ERK-Familie als auch durch die JNK-Familie von MAP-Kinasen kontrolliert. AP-1-Bindungsstellen können durch verschiedene Mitglieder der AP-1-Transkriptionsfaktorfamilie; dabei handelt es sich um eine Gruppe verwandter dimerer Komplexe aus Proteinen der Fos- und Jun-Familie. Die Spezifität und Aktivierungskapazität dieser Homo- und Heterodimere hängt von den beteiligten Proteinen ab. Dabei zeigt AP1 auch die Fähigkeit, mit NFκB zu interagieren (WISDOM, 1999).

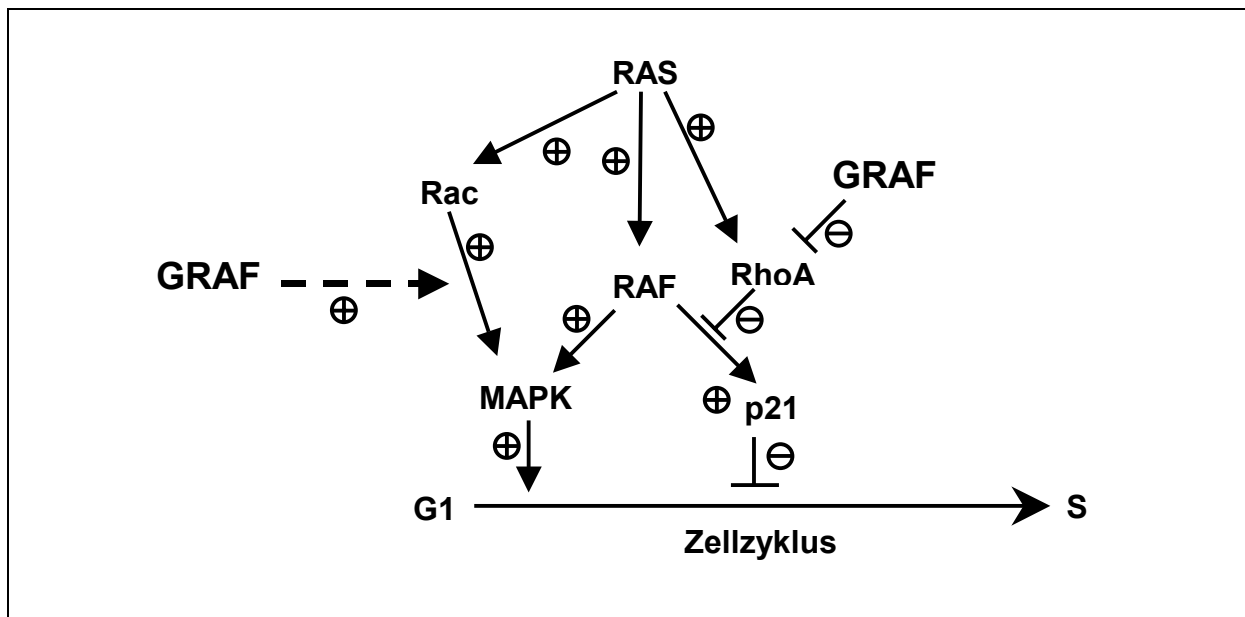
Die Proteine der NFκB/Rel-Familie sind dimere sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren, die die Expression einer großen Zahl von Genen als Antwort auf Entzündungsprozesse, virale und bakterielle Infektionen und zellulären Stress aktivieren. NFκB wird also immer dann

aktiv, wenn eine schnelle Antwort der Zelle durch Reprogrammierung der Genexpression notwendig wird. In den meisten Zellen vermittelt NF $\kappa$ B Überlebenssignale, wodurch die Zellen vor Apoptose geschützt werden (ROTHWARF & KARIN, 1999). Daraus erklärt sich, dass eine aberrante Regulation von NF $\kappa$ B zu einer Vielzahl von Erkrankungen beiträgt, wozu auch Krebs gehört. Bei Säugern sind bislang fünf verschiedene Mitglieder der NF $\kappa$ B/Rel-Familie identifiziert worden (NF $\kappa$ B1, NF $\kappa$ B2, c-Rel, RelA und RelB). Vier dieser fünf Faktoren sind im Zusammenhang mit neoplastischer Transformation *in vitro* und/oder *in vivo* aufgefallen, die sich entweder auf Überexpression durch Amplifikation oder Genrearrangements oder auf Translokationen zurückführen ließen. Dabei ist bemerkenswert, dass diese Veränderungen besonders häufig bei hämatologischen Tumoren zu beobachten sind (LUQUE & GÉLINAS, 1997). NF $\kappa$ B2 beispielsweise auf Chromosom 10q24 ist häufig bei Non-Hodgkin-Lymphomen durch Translokationen beeinträchtigt. Die Bruchpunkte liegen dabei innerhalb der 3'-kodierenden Region, wodurch ein C-terminal trunkiertes Protein entsteht. Dadurch kommt es zu einer vornehmlich nucleären Lokalisation des Proteins, wo es ohne vorhergehende Prozessierung eine konsitutive Genexpression seiner Zielgene hervorrufen kann (CHANG *et al.*, 1995). Ein Beispiel für ein Mitglied der NF $\kappa$ B/Rel-Familie, das durch Amplifikation zur neoplastischen Transformation beiträgt, ist *c-rel*, das in 25% aller extranodalen diffusen großzelligen Lymphomen und primären B-Zell-Lymphomen amplifiziert vorliegt, wobei allerdings die Wirkung der Amplifikation noch ungeklärt ist (HOULDSWORTH *et al.*, 1996; JOOS *et al.*, 1996).

Die schnelle Antwort der Zelle auf externe Stimuli durch NF $\kappa$ B-Signalgebung ist möglich, da NF $\kappa$ B durch Bindung an I $\kappa$ B im Cytoplasma in einer inaktiven Form gelagert wird. Bei einem entsprechenden Reiz (z.B. durch Bindung von TNF $\alpha$  an einen Rezeptor) wird I $\kappa$ B phosphoryliert und löst sich von NF $\kappa$ B, wodurch dessen Kernimportsignal freigelegt wird. NF $\kappa$ B wird daraufhin in den Zellkern gebracht und kann dort die Transkription seiner Zielgene aktivieren. Die Phosphorylierung erfolgt von I $\kappa$ B erfolgt durch die Kinase IKK. Diese wiederum wird durch verschiedene MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK; z.B. NIK, MEKK1-3) phosphoryliert, die damit IKK und als Konsequenz NF $\kappa$ B aktivieren (ROTHWARF & KARIN, 1999). Den deutlichen Einfluss des GRAF-Proteins auf diesen Signalweg unterstrich nochmals die Beobachtung, dass erst eine relativ lang dauernde Inkubation mit dem bekannten NF $\kappa$ B-Aktivator TNF $\alpha$  eine den GRAF-transfizierten Zellen vergleichbare Reporter-gen-Expression erbrachte.

CREB (cyclic AMP response element binding protein) wurde ursprünglich durch seine Fähigkeit identifiziert, das zelluläre Ansprechen auf cAMP auf eine Vielzahl von Promotoren zu übertragen (SHAYWITZ & GREENBERG, 1999). Auch CREB wird durch den MAP-Kinase Signalweg reguliert. Man geht gegenwärtig davon aus, dass ein Reiz zu einer Aktivierung des Signalweges über Ras → Raf → MEK → MAP-Kinasen und schließlich über Kinasen der Rsk- oder Msk-Familie in den Nucleus geleitet wird. Dort wird CREB phosphoryliert und dadurch aktiviert, woraufhin es an CRE-Erkennungssequenzen bindet und die Transkription der nachgeschalteten Gene aktiviert (IMPEY & GOODMAN, 2001).

Alle drei von GRAF aktivierten Signaltransduktionswege involvieren demnach die Signalgebung durch MAP-Kinasen. Es wurde bereits spekuliert, dass GRAF in seiner Rolle als negativer Regulator von RhoA (HILDEBRAND *et al.*, 1996), welches p21 negativ reguliert (OLSON *et al.*, 1998), einen positiven Einfluss auf die Weiterführung des Zellzyklus hat, indem es zu einer Aufhebung der durch RhoA verursachten Blockade in der G1-Phase beiträgt (BORKHARDT, BOJESSEN *et al.*, 2000; **Abb. IV.2**).



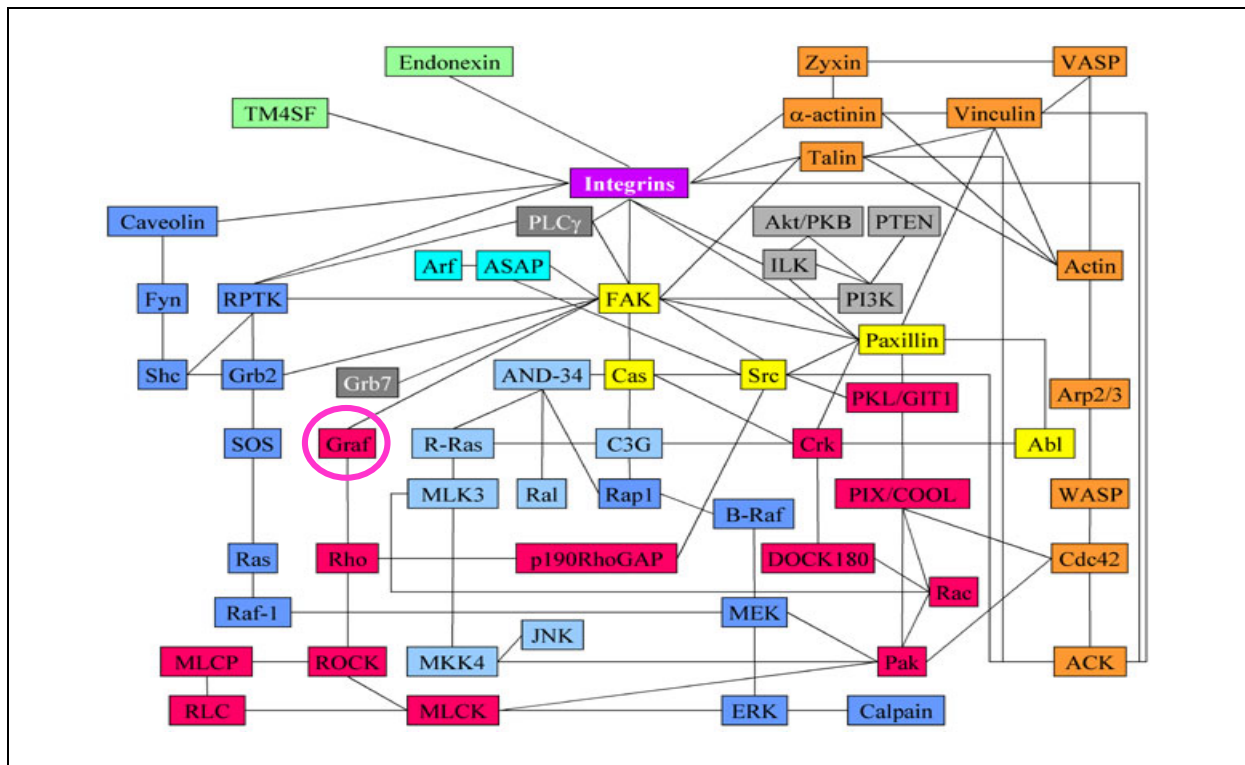
**Abb. IV.2:** Modell des Beitrags von GRAF zur Regelung des Zellzyklus (verändert nach BORKHARDT, BOJESSEN *et al.*, 2000)

Die hier vorgelegten Ergebnisse weisen darüber hinaus auf einen direkteren Beitrag des GRAF-Proteins hin, indem es unmittelbaren Einfluss auf die Signalgebung zur Weiterführung des Zellzyklus durch Mitogen-aktivierte Protein Kinasen nimmt. Dies stünde allerdings im Widerspruch zu der Beobachtung, dass das negativ von GRAF regulierte RhoA zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Weges und somit zur malignen Entartung Ras-transformierter Zellen beiträgt (QIU *et al.*, 1995). Längere Zeit war man der Ansicht, dass Ras über die

Aktivierung von Rac zu einer Aktivierung von RhoA führt. Weiterführende Untersuchungen ergaben jedoch, dass Rac und RhoA unabhängig voneinander agieren und beide Zielproteine von Ras sind (QIU *et al.*, 1997). Da GRAF nicht notwendigerweise darauf beschränkt sein muss, als negativer Regulator von RhoA in die Kontrolle der Zellproliferation einzugreifen, könnten weitere Interaktionspartner von GRAF eine neue Verbindung zu Mitogen-aktivierten Signalgebungsprozessen herstellen.

#### **IV.5 GRAF-Interaktionspartner**

GRAF fungiert als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für die GTP-bindenden Proteine RhoA und Cdc42. Rho-GTPasen dienen als molekulare Schalter, die zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen Form und einer aktiven, GTP-gebundenen Form wechseln. Sie spielen eine wichtige Rolle in den Bereichen Organisation des Cytoskeletts, Membrantransport, Transkriptionskontrolle und Zellwachstumskontrolle (VAN AELST & D'SOUZA-SCHOREY; 1997). Besonders die Einbindung der Rho-GTPasen in Proliferationskontrollprozesse macht sie für die onkologische Forschung interessant. Darüber hinaus interagiert GRAF mit der fokalen Adhäsionskinase FAK, einem Vermittler der Integrin-Signalgebung (HILDEBRAND *et al.*, 1996). Integrine verknüpfen extrazelluläre Gerüststrukturen mit dem intrazellulären Zellgerüst. Außerdem setzen sie Zell-Zellkontakte in intrazelluläre Signalübertragungsprozesse um und sind somit auch für die Regulation der Gewebekomöostase und für die Tumorbildung von Bedeutung. Weitere Komponenten der Integrin-Signalübertragung neben FAK sind noch weitere Protein-Tyrosinkinasen (z.B. Src- und Syk-Kinasen), Proteinkinase C, Adaptorproteine wie Grb2 und Crk, Signalezyme wie die PI(3)-Kinase und die Phospholipase C $\gamma$ , Phospholipide sowie Proteine der Ras-Superfamilie, wodurch wiederum eine Verbindung zu RhoA hergestellt ist (CLARK & BRUGGE, 1995). Eine Übersicht über die komplexen Zusammenhänge der Integrin-vermittelten Signaltransduktion gibt **Abb. IV.3**.



**Abb. IV.3:** Schematische Übersicht über die Integrin-Signalgebung (nach MARTIN *et al.*, 2002)

Einige der im Yeast Two Hybrid Screen ermittelten potenziellen Interaktionspartner von GRAF fügen sich gut in diesen Kontext ein. So konnte die bereits beschriebene Interaktion mit FAK2 (Synonym: CAK $\beta$ ) bestätigt werden, einer FAK hoch homologen Adhäsionskinase, die ebenfalls an den fokalen Adhäsionsstellen der Zelle lokalisiert ist (OHBA *et al.*, 1998).

Ebenfalls in diesem Bereich findet sich ein weiterer Interaktionspartner, KIAA0583 (Synonym: P-dlg). Hierbei handelt es sich um das humane Homolog des *Drosophila*-Gens *discs large 1*, einem Membran-assoziierten Guanylat-Kinase-Homolog (MAGUK). Mitglieder dieser MAGUK-Proteingruppe besitzen drei wesentliche Domänen: eine PDZ- und eine SH3-Domäne, die beide Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, sowie eine Guanylat-Kinase-Domäne, die jedoch nicht mehr in der Lage ist, die Phosphorylierung von GMP zu GDP zu katalysieren, sondern wahrscheinlich ebenfalls als Interaktionsinterface dient. P-dlg bildet mit p55, einem weiteren MAGUK, heteromere Komplexe an der Plasmamembran (NAKAMURA *et al.*, 1998). *Dics large 1* spielt in *Drosophila* eine zentrale Rolle an Tight Junctions und hat vermutlich einen Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation, da Mutanten eine Erhöhung der Teilungsaktivität der Zellen der Imaginalscheiben zeigen und so eine Funktion des Proteins als Tumorsuppressor nahe legen (WOODS *et al.*, 1996). Inwiefern P-dlg jedoch in den Integrin-Signaltransduktionsweg eingebunden sein könnte, ist gegenwärtig noch unklar.

Eine deutlichere Verbindung zu Integrinen zeigt sich bei einem weiteren GRAF-Interaktionspartner, der Phosphatidylinositol 3'-Kinase PI3K. PI3Ks sind eine Familie von Lipidkinasen, die als Heterodimere aus einer katalytischen und einer regulativen Untereinheit bestehen. GRAF interagiert mit einem Mitglied der Gruppe der regulativen Untereinheiten, p85 $\alpha$ . PI3Ks sind in die Integrin-vermittelte Kontrolle von Proliferationsprozessen eingebunden, indem sie FAK nachgeschaltet sind und über Rac, PAK und Raf einen Einfluss auf den MAP-Kinase Signalweg nehmen (SCHWARTZ & ASSOIAN, 2001). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass p85 $\alpha$  in den Insulin-vermittelten Signalweg eingebunden ist. Mäuse mit genetischer Insulin-Resistenz sind bei herabgesetzter p85 $\alpha$ -Expression (durch Mutation eines Allels) vor Diabetes geschützt, zeigen eine verbesserte Insulin-Signalgebung und auch eine stabilere Glucose-Homöostase (MAUVAIS-JARVIS *et al.*, 2002). Dies ist besonders vor dem Hintergrund interessant, dass GRAF besonders stark in den Insulin-produzierenden Zellen der Langerhans'schen Inseln exprimiert wird (BORKHARDT, BOJESSEN *et al.*, 2000).

Auch das Monozyten-Differenzierungsantigen CD14 besitzt eine mögliche Verbindung zum Integrin-Signaltransduktionsweg. In polymorphonucleären Leukozyten nimmt membranständiges CD14 an der Integrin-abhängigen Anheftung an Fibrinogen teil. Als Antwort auf Lipopolysaccharide im extrazellulären Raum wird die MAP-Kinase p38 in einer CD14-abhängigen Weise phosphoryliert, allerdings sind die genaueren Zusammenhänge noch unklar (DETMERS *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CD14 mit TLR2 (toll like Rezeptor 2) coexprimiert wird und einen Komplex mit diesem Transmembranrezeptor bildet (YANG *et al.*, 1999). TLR-vermittelte Signale führen wiederum zur Expression durch NF $\kappa$ B kontrollierter Gene (LANDMANN *et al.*, 2000), wirken bei Macrophagen beispielsweise aber auch aktivierend auf MAP-Kinasen. Die den Rezeptoren nachgeschalteten Signalüberträger liegen allerdings noch im Dunkeln (RAO, 2001). Es wäre vorstellbar, dass GRAF hier eine integrierende Funktion ausüben könnte, was seine aktivierende Wirkung auf die NF $\kappa$ B- und MAPK-Signalgebung erklären würde.

Die GRAF-Interaktionspartner MAGOH und HAT1 fügen sich jedoch nicht in diesen Kontext ein. MAGOH ist das humane Homolog des mago nashi-Proteins bei *Drosophila*, wo es als Produkt eines maternalen Effektgens für die normale Keimplasma-Entwicklung im Embryo verantwortlich ist (NEWMARK & BOSWELL, 1994). Das evolutionär hoch konservierte MAGOH wurde ursprünglich mittels eines Yeast Two Hybrid Screens einer fötalen Hirn-cDNA-Bibliothek isoliert, bei der als Köder das Protein SCL diente (ZHAO *et al.*, 1998). SCL steht für stem cell leukaemia Gen, das am Bruchpunkt einer chromosomalen Translokation

(1;14) eines Patienten mit T-Zell-Leukämie identifiziert wurde (BEGLEY *et al.*, 1989). SCL ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wesentliche Rolle bei der Proliferationsregulation in Hämatopoese und Gefäßentwicklung spielt (BARTON *et al.*, 1999), und in 3% aller Fälle pädiatrischer T-ALL durch Translokationen beeinträchtigt ist. Hierbei kommt es zu einem Verlust der regulativen Sequenzen des Gens, was zu einer aberranten Expression führt (BERNARD *et al.*, 1990). Allerdings konnte die Interaktion zwischen MAGOH und diesem interessanten Regulator nicht durch unabhängige Testmethoden bestätigt werden. MAGOH wird besonders stark in proliferierenden Geweben, darunter auch Knochenmark, exprimiert (ZHAO *et al.*, 1998). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass es mit einem neuen RNA-bindenden Protein, RBM8, interagiert, dessen Expressionsmuster sich mit dem von MAGOH deckt (ZHAO *et al.*, 2000). Man nimmt an, dass RBM8 ein Bestandteil von RNA-Protein-Komplexen ist und konnte zeigen, dass es mit dem potenziellen Tumorsuppressorgen OVCA1 interagiert (SALICIONI *et al.*, 2000). In *Drosophila* ist mago nashi Bestandteil des Exon-Exon-Verknüpfungskomplexes. Es bindet über seine Interaktion mit Y41, dem *Drosophila*-Homolog von RBM8, an die RNA, bevor diese gespleißt wird und verbleibt auch danach während der Transportprozesse in das Cytoplasma und sogar in Nachbarzellen an der mRNA (PALACIOS, 2002). MAGOH könnte demnach also auch im Säugersystem ein Richtungsgeber für die subzelluläre Lokalisation der mRNA sein, einem ersten Schritt zur korrekten Proteinlokalisierung in der Zelle. Hierbei hätte es die Möglichkeit, sowohl mit der nucleären als auch mit der cytoplasmatischen Fraktion des GRAF-Proteins zu interagieren und so die Proteinsynthese am Zielort des durch die gebundene mRNA kodierten Proteins zu ermöglichen.

Die Histon-Acetyltransferase 1 (HAT1) besitzt ebenfalls die Fähigkeit, das Zellkompartiment zu wechseln. HAT1 findet sich primär im Nucleus, kommt jedoch auch cytoplasmatisch vor (VERREAULT *et al.*, 1998). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Acetylierung löslichen Histons H4 unmittelbar nach dessen Synthese, jedoch kann sie auch Histon H2A acetylieren. Die Acetylierung von H4 ist für den Einbau des Proteins in das Nucleosom erforderlich, wird danach jedoch wieder rückgängig gemacht (VERREAULT *et al.*, 1998). Die elementare Bedeutung der Histon-Acetylierung und -Deacetylierung für die Transkriptionskontrolle wurde bereits dargelegt. Besonders Histon H4 scheint dabei eine Schlüsselrolle einzunehmen (VETTESE-DADEY *et al.*, 1996). Es wäre denkbar, dass GRAF durch seine Interaktion mit HAT1 zu einer Kontrolle des Acetylierungsstatus von Histon H4 beiträgt, jedoch ist unklar, ob diese Kontrolle eher im Nucleus oder im Cytoplasma stattfindet, da beide Proteine in beiden Kompartimenten vorkommen können.

Die verbleibenden potenziellen Interaktionspartner, nämlich Fibulin, TRPM-2 (Synonym: Clusterin) und WNT7a können in keinen physiologischen Kontext mit GRAF eingeordnet werden. Bei allen drei Partnern handelt es sich um sezernierte Proteine, von denen einzig Fibulin als Calcium-bindendes Glycoprotein der extrazellulären Matrix noch mit fokalen Adhäsionspunkten in Verbindung stehen könnte. Die Funktion von TRPM-2, das ursprünglich aus dem männlichen reproduktiven System isoliert wurde, ist bislang noch unklar. Seine Expression wird als Antwort auf starken zellulären Stress induziert, weshalb man annimmt, dass es überlebende Zellen nach Gewebeschädigungen schützen könnte (BAILEY & GRISWOLD, 1999). Wnt7a schließlich ist ein Wachstumsfaktor, der nach Bindung an einen membranständigen Rezeptor der *Frizzled*-Genfamilie die Expression AP-1-kontrollierter Gene induziert (MILLER, 2001; TUFAN *et al.*, 2002). Die Interaktion zwischen GRAF und diesen Proteinen muss auf die erzwungene Expression in fremden Zellkompartimenten teilweise in Fusion zu unnatürlichen Proteindomänen zurückgeführt werden, was immer auch eine veränderte Faltung der Proteine nach sich zieht und so zu einem untypischen Verhalten beitragen kann.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse sind weitere Untersuchungen notwendig, um die physiologische Relevanz der verschiedenen möglichen Interaktionen vor dem Hintergrund der malignen Transformation zu prüfen.

#### **IV.6 FBP17-Interaktionspartner**

Formine wurden zuerst bei der Maus beschrieben, wo sie vom *limb deformity* Locus kodiert werden. Diese Gene kodieren für alternativ prozessierte mRNAs, die in eine Familie verwandter nucleärer Phosphoproteine translatiert werden. In der Maus regulieren diese Proteine die Musterbildungsprozesse in der Embryonalentwicklung und sind speziell für die korrekte Entwicklung der Extremitäten und der Niere verantwortlich (TRUMPP *et al.*, 1992; VOGT *et al.*, 1993). Mutationen im *ld*-Locus führen zu einer Veränderung der anterior-posterior-Entwicklung der Vorder- und Hinterbeine sowie zu Störungen der Nierenentwicklung bis hin zur völligen Agenese der Nieren (WOYCHIK *et al.*, 1990; MASS *et al.*, 1990). Formine sind Substrate für Serin/Threonin Proteinkinasen und verfügen alle über Prolin-reiche Regionen, die bei einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren als Transkriptionsaktivierungsdomänen fungieren oder aber Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können (VOGT *et al.*, 1993).

Die Formin bindenden Proteine (FBPs) wurden ursprünglich als eine Gruppe von Proteinen identifiziert, die mit Forminen interagieren, indem eine Expressions-Bibliothek aus der Extremitätenknospe der Maus mit der Prolin-reichen Region von Formin auf Interaktionspartner hin getestet wurde. Dabei konnten zwei Klassen von FBPs identifiziert werden, die über unterschiedliche Proteindomänen mit Prolin-reichen Regionen wechselwirken (CHAN *et al.*, 1996), die WW-Domäne (SUDOL *et al.*, 1995) und die SH3-Domäne (MORTON & CAMPBELL, 1994). Besonders Letztere ist häufig bei Proteinen zu finden, die in Signaltransduktionsprozessen eine Rolle spielen (BAR-SAGI *et al.*, 1993; GOUT *et al.*, 1993) oder als Cytoskelett-Elemente fungieren (FREEMAN *et al.*, 1996). Ob die Bindung der FBPs an Formin tatsächlich eine physiologische Rolle spielt, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Im Hefesystem ließ sich eine Interaktion zwischen der Prolin-reichen Formin-Region und FBP17 nicht bestätigen.

Bei einer Suche nach möglichen FBP-Bindungspartnern neben Formin konnte eine Gruppe von Proteinen identifiziert werden, die spezifisch an WW-Domänen binden. Hierunter fand sich ein Protein (WBP7), das Ähnlichkeiten zum *thrtorax*-Gen von *Drosophila* aufwies, dem beim Menschen *MLL* entspricht. Die meisten bekannten Mitglieder dieser Gruppe sind nukleär lokalisiert und in der Lage, neben der WW-Domäne bestimmter FBPs auch die SH3-Domäne der ABL-Tyrosinkinase zu binden (BEDFORD *et al.*, 1997). Es scheint also eine gewisse Austauschbarkeit dieser Domänen vorzuliegen, zumal ABL im Cytoplasma lokalisiert ist (WOLFE, 1993).

Auch FBP17 ist ausschließlich im Cytoplasma nachweisbar, wie immunhistochemische Untersuchungen zeigten. In der Fusion mit *MLL* kommt es jedoch zu einer Verlagerung des Fusionsproteins in den Zellkern, wodurch FBP17 seiner Funktion im Cytoplasma entzogen wird. Dies wurde auch schon für andere *MLL*-Fusionsprodukte nachgewiesen (JOH *et al.*, 1997). Koloniebildungsassays (CFC-Tests; LAVAU *et al.*, 1997) in einem murinen Modellsystem ergaben für das *MLL*/FBP17-Fusionsprotein ein geringes transformierendes Potential (FUCHS, REHKAMP *et al.*, 2001). Im Vergleich zu anderen *MLL*-Fusionsproteinen wie z.B. *MLL*/ENL (LAVAU *et al.*, 1997; LAVAU *et al.*, 2000) oder *MLL*/ELL (DiMARTINO *et al.*, 2000) bleibt jedoch die Signifikanz dieser Resultate unklar, zumal bei einer Erhöhung der Zahl der Zellpassagen auch für *MLL*/ELL schon ab der dritten Passage ein Rückgang des transformierenden Potentials zu beobachten ist (LAVAU, LUO *et al.*, 2000).

Unter diesen Voraussetzungen stellte sich die Frage nach dem physiologischen Kontext von FBP17 in der gesunden Zelle und ob ein Fehlen des Genproduktes zur Entstehung einer Neoplasie beitragen könnte. Wäre dies der Fall, würde FBP17 die Kriterien eines

Tumorsuppressors erfüllen. Da das Protein PROSITE-Computeranalysen nach zu urteilen eine potenzielle Rho-Bindungsdomäne besitzt, wurde zunächst überprüft, ob das FBP17 tatsächlich mit Mitgliedern der Rho-Proteinfamilie interagiert. Im Interaktionstest zwischen FBP17 und verschiedenen Mitgliedern der Rho-Proteinfamilie konnte jedoch keine direkte Interaktion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse machten deutlich, dass die Aussagekraft von computergestützten Sequenzanalysen fragwürdig bleibt, sofern funktionelle Untersuchungen fehlen. Daraus ergab sich die Notwendigkeit einer umfassenderen Untersuchung zu möglichen zellulären Interaktionspartnern von FBP17, die mittels eines Bibliothek-Screens im Yeast Two Hybrid System durchgeführt wurde. Auf diese Weise konnten zwei Interaktionspartner für FBP17 identifiziert werden, das Sorting Nexin SNX2 und die Poly(ADP-Ribose)Polymerase Tankyrase. Beide Interaktionen wurden mit unabhängigen Methoden bestätigt (FUCHS *et al.*, Manuskript eingereicht), was bei GRAF bisher so nicht gelang.

#### **SNX2:**

Die Sorting Nexine sind eine Familie in vielen Geweben exprimierter Proteine mit konservierter Phox-Homologiedomäne (PX; HAFT *et al.*, 1998). Sie zeigen einen hohen evolutionären Konservierungsgrad, so dass eindeutige Homologien zu den Hefeproteinen Vps5p und Mvp1p nachweisbar waren. Diese sind für die Sortierung und den Transport von Proteinen zur Vakuole der Hefezelle zuständig (HORAZDOVSKY *et al.*, 1997). Dieser Umstand gab bereits einen Hinweis auf die mögliche Funktion der humanen Sorting Nexine. Tatsächlich konnte zuerst für SNX1 nachgewiesen werden, dass es mit dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) interagiert und seinen Transport zu Lysosmen vermittelt, wo er abgebaut wird (KURTEN *et al.*, 1996).

Gegenwärtig sind 13 verschiedene Sorting Nexine bekannt, die durch das Vorhandensein einer PX-Domäne und das Fehlen von Signalsequenzen oder Transmembrandomänen charakterisiert sind. Die Proteine lassen sich phylogenetisch in drei Untergruppen einteilen, allerdings sind Mitglieder aller Untergruppen entweder bei Säugern oder Hefen am endosomalen Proteintransport beteiligt (TEASDALE *et al.*, 2001). Neben SNX1 interagieren auch SNX2, SNX4 und SNX6 mit einer Vielzahl von Rezeptoren (HAFT *et al.*, 1998; PARKS *et al.*, 2001). Für SNX2 konnte eine Interaktion mit den Rezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF), Insulin und Leptin nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich auch, dass der größte Teil des Proteins in der Zelle membranassoziiert vorliegt, SNX2 allerdings auch in der cytosolischen Fraktion

nachgewiesen werden kann (HAFT *et al.*, 1998). SNX1 und SNX2 sind Orthologe des Hefeproteins Vps5p, das in den Rücktransport von Endosomen zum *trans*-Golgi-Netzwerk eingebunden ist. Bei Hefen wird dieser Transport durch sog. „Retromerkomplexe“ durchgeführt (SEAMAN *et al.*, 1998). Es wurde spekuliert, dass bestimmte Sorting Nexine dazu dienen könnten, Rezeptoren zu diesen Komplexen zu rekrutieren und so am korrekten Protein-Recycling von den Endosomen zum trans-Golgi-Apparat Teil haben (HAFT *et al.*, 2000).

Als weitere Verbindung der Sorting Nexine mit Signaltransduktionswegen lässt sich die Beobachtung werten, dass die PX-Domäne mit PtdIns(3)P interagiert (XU *et al.*, 2001). Verschiedene Phosphoinositide sind dafür bekannt, Signalwege zu regulieren (VANHAESEBROECK *ET AL.*, 1997) und einen Einfluss auf den Membrantransport zu haben (CORVERA *et al.*, 1999).

FBP17 ist nicht der einzige *MLL*-Fusionpartner, der eine Verbindung zum EGFR-Signalweg aufweist, auch wenn dieser Zusammenhang für Formin bindende Proteine neuartig ist. Auch das in der Translokation (1;11)(p32;q23) mit *MLL* fusionierte Protein AF1p ist mit diesem Signalweg verbunden, da es das humane Homolog des murinen EGFR Substrat 15 (eps15) darstellt (BERNARD *et al.* 1994). Dabei handelt es sich um ein cytoplasmatisches EGFR-Zielprotein, das nach EGFR-Aktivierung durch EGF an Tyrosin-Resten phosphoryliert wird. Eps15 spielt eine zentrale Rolle bei der Herabregulation der EGFR-Signalgebung, da es nach Phosphorylierung durch die Rezeptor-Tyrosinkinase für die Endocytose des Rezeptors über sog. Clathrin-Coated Pits verantwortlich ist (WATERMAN & YARDEN, 2001). Somit involvieren bei Leukämien mit einer t(9;11) als auch mit t(1;11) unterschiedliche chromosomale Aberrationen die gleichen Signaltransduktionswege.

### ***Tankyrase:***

Der zweite identifizierte FBP17-Interaktionspartner, Tankyrase, wurde ursprünglich als 142kD schweres Protein beschrieben, das an den Enden von Metaphase-Chromosomen lokalisiert ist und dort mit TRF1 (telomere repeat binding factor 1) interagiert (SMITH *et al.*, 1998). Tankyrase gehört zur Ankyrin-Proteinfamilie, Strukturproteinen, die das Spektrin-Cytoskelett mit der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran verbinden (BENNETT, 1992). Diese Familie wird durch den Besitz von Tandem-Wiederholungen eines 33 Aminosäuren umfassenden Motiv charakterisiert, den ANK-Wiederholungen. Tankyrase besitzt 24 dieser ANK-Module und darüber hinaus noch ein SAM-Modul (sterile alpha module), das Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann sowie eine PARP-Homologiedomäne. Diese Domäne

befähigt das Enzym dazu, sich selbst und spezifische Substrate wie TRF1 zu ADP-ribosylieren, was zu einer Inaktivierung der ribosylierten Substrate führt. Sie ist daher direkt in die Regulation der Telomerlänge eingebunden, da TRF1 als negativer Regulator der Telomerverlängerung fungiert (MACNAMARA *et al.*, 2001). Die Aufrechterhaltung der Telomerlänge wiederum ist eine Voraussetzung für immortalisiertes Zellwachstum. Die Kombination dieser Proteindomänen bei Tankyrase verknüpft somit die Eigenschaften eines Strukturproteins mit regulativen Fähigkeiten.

Gegenwärtig sind zwei Spleißvarianten von Tankyrase beschrieben (GenBank Accession AF082558 und AF082559), denen sowohl das SAM-Modul als auch die PARP-Domäne fehlt und die daher wahrscheinlich in ihren regulativen Fähigkeiten eingeschränkt sind. Der neuen Spleißvariante, die im hier gezeigten Bibliothek-Screen identifiziert wurde, fehlt ebenfalls die PARP-Domäne, jedoch besitzt sie noch einen Teil des SAM-Moduls. Dies weist darauf hin, dass diese Domänen nicht für die Interaktion mit FBP17 notwendig sind und FBP17 somit auch kein Substrat für die ADP-Ribosylierung durch Tankyrase darstellt.

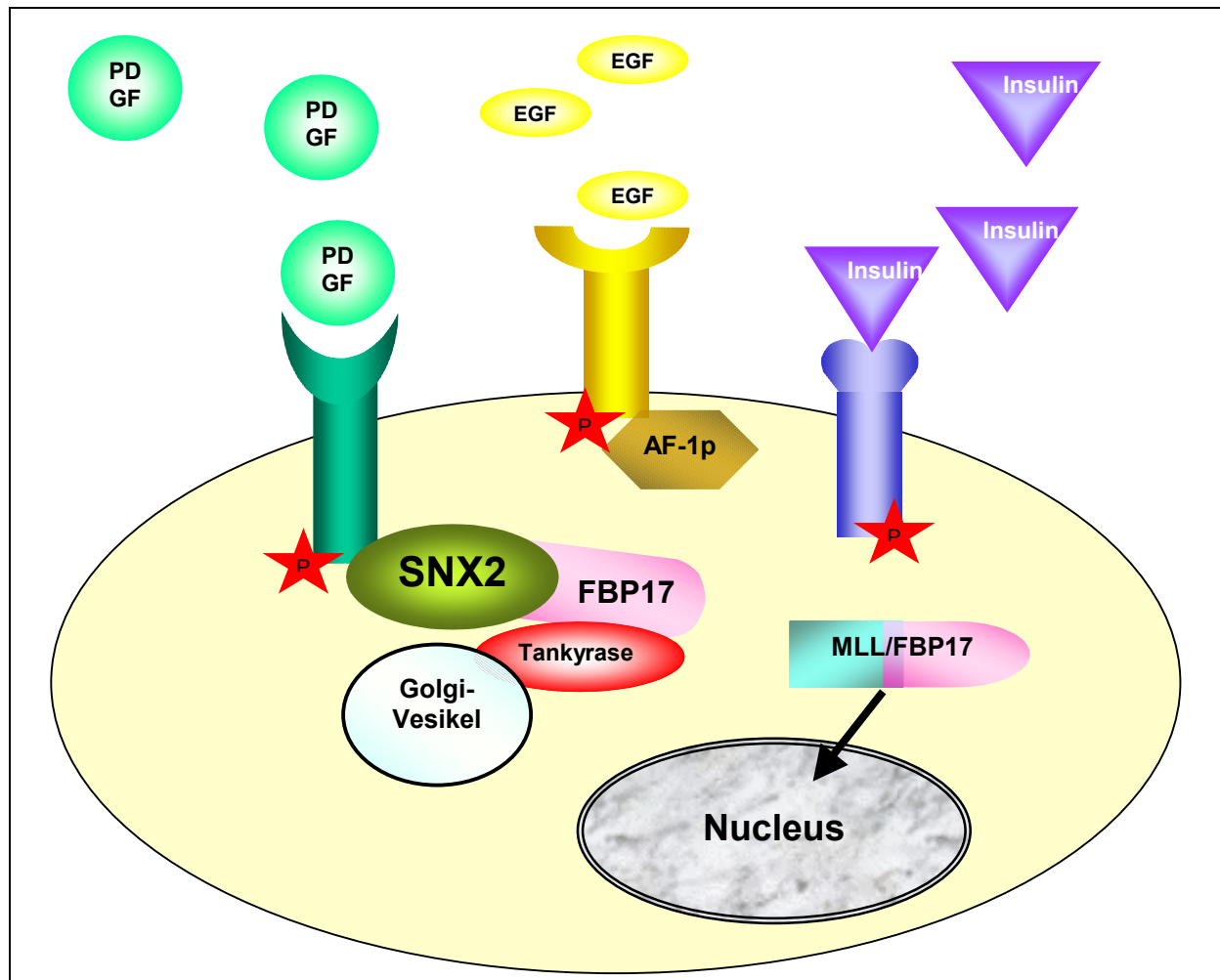
Nach Transfektion überexprimierte Tankyrase ist nicht in der Lage, in den Zellkern einzudringen, da ihr ein Kernimportsignal fehlt. Nur bei Co-Transfektion mit TRF1 wird sie in den Nucleus transportiert (SMITH & DE LANGE, 1999). Diese Beobachtung konnte bei der Transfektion GFP-fusionierter Tankyrase bestätigt werden, die ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert war. Tatsächlich ergaben spätere Untersuchungen, dass der größte Teil der zellulären Tankyrase extranucleär lokalisiert und besonders stark mit dem Golgi-Apparat assoziiert ist (PESSIN *et al.*, 1999).

Die Tatsache, dass Tankyrase nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren wie Insulin, PDGF und EGF stöchiometrisch modifiziert wird und eine spezifische Inhibierung des entsprechenden Signalweges ein Ausbleiben der Modifikation nach sich zieht, führte zu der Annahme, dass Tankyrase ein Substrat der MAP-Kinase-Kaskade ist (CHI *et al.*, 2000).

Die Interaktion zwischen Tankyrase, FBP17 und SNX2 lässt eine integrierende Rolle für FBP17 vermuten, die den SNX2-vermittelten endosomalen Proteintransport mit strukturellen und regulativen Fähigkeiten der an den Golgi-Apparat gebundenen Tankyrase verknüpft. Dies erscheint besonders interessant, wenn man die Regulation der PDGFR- und EGFR-Signalgebung durch Endocytose und Abbau der Liganden-gebundenen Rezeptor-Tyrosinkinase in Betracht zieht. Die Internalisierung des PDGF-Rezeptors und seine Abbaurate in Lysosomen ist ein wichtiger Parameter bei der Regulation der Zellantwort auf mitogene Signale (HELDIN & WESTERMARK, 1999).

Ähnliches gilt für die EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase. Ligandenbindung führt hier zur Dimerisierung des Rezeptors, Autophosphorylierung, Aktivierung einer Vielzahl von nachgeschalteten Signalmolekülen und schließlich zu lysosomalen Degradation. Da der größte Teil der EGFR-Signalgebung in der Nähe der Plasmamembran erfolgt, wird angenommen, dass die Endocytose eine wichtige Funktion bei der Herabregulation des Rezeptors hat (LEOF, 2000). Ein Beleg hierfür ist auch die Beobachtung, dass eine Rezeptor-Mutante, die nicht mehr internalisiert werden kann, zur Ausbildung eines transformierten Phänotyps führt, und zwar schon bei EGF-Konzentrationen, die keinen Einfluss auf Zellen mit einem Wildtyp-EGFR besitzen (WELLS, 1990). Auch die subzelluläre Lokalisation des Rezeptors kann eine Rolle für die Signaltransduktion spielen. So wurde gezeigt, dass für Untergruppen von Signalmolekülen die Endocytose des EGF-Rezeptors für die korrekte Weiterleitung des Signals notwendig ist (VIEIRA *et al.*, 1996).

Diese Beobachtungen lassen eine wichtige Rolle für den korrekten Transport von Rezeptormolekülen vermuten, entweder im Rahmen der Herabregulation der Signalgebung oder hinsichtlich der Aktivierung des korrekten Signalweges in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation des Rezeptors. Daher stellt die verbindende Rolle von FBP17 zwischen Endosomen-assoziiertem SNX2 und Golgi-gebundener Tankyrase möglicherweise einen regulativen Faktor in der Weiterleitung mitogener Signale dar. Die Tatsache, dass die chimäre *MLL/FBP17*-cDNA nur geringe Fähigkeiten aufweist, maligne Transformation in myeloischen Vorläuferzellen eines murinen Systems auszulösen, legt die Notwendigkeit eines zweiten Ereignisses nahe, damit der vollständig transformierte Phänotyp erreicht wird. Der Verlust des zweiten gesunden FBP17-Allels könnte möglicherweise zu der Transformation beitragen, indem die korrekte Kontrolle der mitogenen Signalgebung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen behindert wird (**Abb. IV.3**).



**Abb. V.2:** Hypothetisches Zusammenwirken zwischen SNX2, FBP17 und Tankyrase. Bei der Fusion mit MLL geht FBP17 dieser Interaktion verloren

## VI. Literatur

- Ames BN (1979)  
Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* **204**: 587-593
- Ammerpohl O (2000)  
Mechanismen der Repression durch die CpG-Methylierung der DNA und deren Bedeutung für die gewebespezifische Genexpression in Säugern. Dissertation im Fachbereich Naturwissenschaften der Justus-Liebig-Universität, Gießen
- Arber W (1974)  
DNA Modification and Restriction. *Proc. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **14**: 1-37
- Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N. (1991)  
Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* **77**: 2031-2036
- Aspenström P (1997)  
A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* **7**(7): 479-487
- Ayton PM, Cleary ML (2001)  
Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* **20**, 5695-5707
- Ayton PM, Cleary ML, Ravid K, Licht J (Hrsg., 2001)  
Transcription factors: normal and malignant development of blood cells. 1. Aufl. Wiley-Liss, New York, 2001
- Bailey R, Griswold MD (1999)  
Clusterin in the male reproductive system: localization and possible function. *Mol. Cell Endocrinol.* **151**(1-2): 17-23
- Bannister AJ, Kouzarides T (1996)  
The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**: 641-643
- Barnes PJ, Karin M (1997)  
Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *New Engl. J. Med.* **336**: 1066-1071
- Bar-Sagi D, Rotin D, Batzer A, Mandiyan V, Schlessinger J (1993)  
SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* **74**(1): 83-91
- Baud V, Karin M (2001)  
Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* **11**(9): 372-377
- Bedford MT, Chan DC, Leder P (1997)  
FBP WW domains and the Abl SH3 domain bind to a specific class of proline-rich ligands. *EMBO J.* **16**(9): 2376-2383
- Begley CG, Aplan PD, Denning SM, Haynes BF, Waldmann TA, Kirsch IR (1989)  
The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(24): 10128-10132
- Bennett V (1992)  
Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **267**(13): 8703-8706

- Benoist C, Chambon P (1981)  
In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature* **290**: 304-310
- Bernard OA, Mauchauffe M, Mecucci C, Van den Berghe H, Berger R (1994)  
A novel gene, AF-1p, fused to HRX in t(1;11)(p32;q23), is not related to AF-4, AF-9 nor ENL. *Oncogene* **9**(4): 1039-1045
- Bernard O, Guglielmi P, Jonveaux P, Cherif D, Gisselbrecht S, Mauchauffe M, Berger R, Larsen CJ, Mathieu-Mahul D (1990)  
Two distinct mechanisms for the SCL gene activation in the t(1;14) translocation of T-cell leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* **1**(3): 194-208
- Bird AP (1986)  
CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**: 209-213
- Bird AP, Wolffe AP (1999)  
Methylation-induced repression – belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**: 451-454
- Bishop JM (1991)  
Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**: 235-248
- Boehm T, Rabbitts TH (1989)  
The human T cell receptor genes are targets for chromosomal abnormalities in T cell tumors. *FASEB J.* **3**: 2344-2359
- Bojesen SE (1999)  
Molecular characterisation of the rare translocation t(5;11)(q31;q23) identifies a novel MLL partner gene – a candidate tumor suppressor gene of acute myelogenous leukemia on chromosome 5q31. Dissertation im Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen
- Bonnet D, Dick JE (1997)  
Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hemtopoietic cell. *Nature Med.* **3**: 730-737
- Borkhardt A (2002)  
Tumorsuppressorgene. *Die gelben Hefte* **42**(3): 81-90
- Borkhardt A, Bojesen S, Haas OA, Fuchs U, Bartelheimer D, Loncarevic IF, Bohle RM, Harbott J, Repp R, Jaeger U, Viehmann S, Henn T, Korth P, Scharf D, Lampert F (2000)  
The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**: 9168-9173
- Bos JL (1989)  
RAS oncogenes in human cancer : a review. *Cancer Res.* **49**(17): 4682-4689
- Boyes J, Bird A (1992)  
Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* **11**(1): 327-333
- Braman J, Papworth C, Greener A (1996)  
Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol. Biol.* **57**: 31-44
- Briggs MR, Kadonaga JT, Bell SP, Tijan R (1986)  
Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, SP1. *Science* **234**: 47-52
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M. (1984)  
Amplification of *N-MYC* in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease state. *Science* **224**: 1121-1124

- Brown JL, Mucci D, Whiteley M, Dirksen ML, Kassis JA (1998)  
The Drosophila Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Mol. Cell* **1**(7):1057-1064
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999)  
Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**(6):857-868
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987)  
XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming reca *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Biotechniques* **5**: 376-379
- Buratowski S (1994)  
The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* **77**: 1-3
- Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C (1988)  
Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**: 487-525
- Chan DC, Bedford MT, Leder P (1996)  
Formin binding proteins bear WWP/WW domains that bind proline-rich peptides and functionally resemble SH3 domains. *EMBO J.* **15**(5): 1045-1054
- Chang CC, Zhang J, Lombardi L, Neri A, Dalla-Favera R (1995)  
Rearranged NFKB-2 genes in lymphoid neoplasms code for constitutively active nuclear transactivators. *Mol. Cell Biol.* **15**(9): 5180-5187
- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR (1991)  
The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* **65**(6): 1053-1061
- Chen C, Okayama H (1987)  
High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2745-2752
- Chi NW, Lodish HF (2000)  
Tankyrase is a golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles. *J. Biol. Chem.* **275**(49): 38437-38444
- Clark EA, Brugge JS (1995)  
Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268** (5208): 233-239
- Cleary ML (1991)  
Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell* **66**: 619-622
- Colot V, Rossignol JL (1999)  
Eukaryotic DNA-methylation as an evolutionary device. *Bioessays* **21**(5): 402-411
- Comings DE (1973)  
A general theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **70**, 3324-3328
- Corvera S, D'Arrigo A, Stenmark H (1999)  
Phosphoinositides in membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**(4): 460-465
- Cowell JK (1982)  
Double minutes and homogenously staining regions: gene amplification in mammalian cells. *Ann. Rev. Genet.* **16**: 21-59
- Creusot F, Acs G, Christman JK (1982)  
Inhibition of DNA methyltransferases and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J. Biol. Chem.* **257**(4): 2041-2048

- Cross SH, Meehan RR, Nan X, Bird A (1997)  
A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat. Genet.* **16**(3): 256-259
- Cui X, De Vivo I, Slany R, Miyamoto A, Firestein R, Cleary ML (1998)  
Association of SET domain and myotubularin-related proteins modulates growth control. *Nat. Genet.* **18**(4): 331-337
- Cummings EE  
100 Selected Poems. 58. Aufl., Grove Press, New York, 1999
- Davie JR (1998)  
Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 173-178
- De Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR (1982)  
A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **300**: 765-767
- Detmers PA, Zhou D, Polizzi E, Thieringer R, Hanlon WA, Vaidya S, Bansal V (1998)  
Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in beta 2-integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst. *J. Immunol.* **161**(4): 1921-1929
- DiMartino JF, Cleary ML (1999)  
MLI rearrangements in haematological malignancies: lessons from clinical and biological studies. *Br. J. Haematol.* **106**(3): 614-626
- DiMartino JF, Miller T, Ayton PM, Landewe T, Hess JL, Cleary ML, Shilatifard A (2000)  
A carboxy-terminal domain of ELL is required and sufficient for immortalization of myeloid progenitors by MLL-ELL. *Blood* **96**(12): 3887-3893
- DiMartino JF, Ayton PM, Chen EH, Naftzger CC, Young BD, Cleary ML (2002)  
The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10. *Blood* **99**(10): 3780-3785
- Domer PH, Fakharzadeh SS, Chen CS, Jockel J, Johansen L, Silverman GA, Kersey JH, Korsmeyer SJ (1993)  
Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(16): 7884-7888
- Durrin LK, Mann RK, Kayne PS, Grunstein M (1991)  
Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell* **65**(6): 1023-1031
- Ebina Y, Takahara Y, Kishi F, Nakazawa A (1983) LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene. *J. Biol. Chem.* **258**: 13258-13261
- Estojak J, Brent R, Golemis EA (1995)  
Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Mol. Cell Biol.* **15**: 5820-5829
- Fankhauser C, Reymond A, Cerutti L, Utzig S, Hofmann K, Simanis V (1995)  
The *S. pombe cdc15* gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis. *Cell* **82**(3): 435-444
- Fields S, Song O (1989)  
A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-247
- Freeman NL, Lila T, Mintzer KA, Chen Z, Pahk AJ, Ren R, Drubin DG, Field J (1996)  
A conserved proline-rich region of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization. *Mol. Cell. Biol.* **16**(2): 548-556

- Friend SH, Horowitz JM, Gerber MR, Wang XF, Bogenmann E, Li FP, Weinberg RA (1987)  
Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**: 9059-9063
- Fuchs U, Rehkamp G, Haas OA, Slany R, König M, Bojesen S, Bohle RM, Damm-Welk C, Ludwig WD, Harbott J, Borkhardt A (2001)  
The human formin-binding protein 17 (FBP17) interacts with sorting nexin, SNX2, and is an MLL-fusion partner in acute myelogenous leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**: 8756-8761
- Fujisawa K, Madaule P, Ishizaki T, Watanabe G, Bito H, Saito Y, Hall A, Narumiya S (1998)  
Different Regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules. *J. Biol. Chem.* **273**: 18943-18949
- Fung YK, Murphree AL, T'Ang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF (1987)  
Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* **236**: 1657-1661
- Gout I, Dhand R, Hiles ID, Fry MJ, Panayotou G, Das P, Truong O, Totty NF, Hsuan J, Booker GW (1993)  
The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell* **75**(1): 25-36
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990)  
Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 4645-4649
- Greenblatt J (1991)  
Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell* **66**: 1067-1070
- Greger V, Debus N, Lohmann D, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B (1994)  
Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum. Genet.* **94**(5): 491-496
- Grunstein M (1997)  
Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**: 349-352
- Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R (1993)  
Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**: 791-803
- Haft CR, de la Luz Sierra M, Bafford R, Lesniak MA, Barr VA, Taylor SI (2000)  
Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Mol. Biol. Cell* **11**(12): 4105-4116
- Haft CR, de la Luz Sierra M, Barr VA, Haft DH, Taylor SI (1998)  
Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol. Cell. Biol.* **18**(12): 7278-7287
- Heldin CH, Westermark B (1999)  
Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* **79**(4): 1283-1316
- Hendrich B, Bird A (1998)  
Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell Biol.* **18**(11): 6538-6547
- Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB (1996)  
Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res.* **56**(4): 722-727
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM (1994)  
Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**(21): 9700-9704
- Hess JL, Yu BD, Li B, Hanson R, Korsmeyer SJ (1997)  
Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* **90**(5): 1799-1806

- Hildebrand JD, Taylor JM, Parsons JT (1996)  
An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol. Cell. Biol.* **16**(6): 3169-3178
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. (1991)  
Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**: 7276-7280
- Horazdovsky BF, Davies BA, Seaman MN, McLaughlin SA, Yoon S, Emr SD (1997)  
A sorting nexin-1 homologue, Vps5p, forms a complex with Vps17p and is required for recycling the vacuolar protein-sorting receptor. *Mol. Biol. Cell* **8**(8): 1529-1541
- Houldsworth J, Mathew S, Rao PH, Dyomina K, Louie DC, Parsa N, Offit K, Chaganti RS (1996)  
REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* **87**(1): 25-29
- Hu YF, Luscher B, Admon A, Mermod N, Tjian R (1990)  
Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev.* **4**(10): 1741-1752
- Hunter T (1991)  
Cooperation between oncogenes. *Cell* **64**, 249-270
- Impey S, Goodman RH (2001)  
CREB signaling--timing is everything. *Sci. STKE* **2001**(82): PE1
- Ingram DA, Hiatt K, King AJ, Fisher L, Shivakumar R, Derstine C, Wenning MJ, Diaz B, Travers JB, Hood A, Marshall M, Williams DA, Clapp DW (2001)  
Hyperactivation of p21(ras) and the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, cooperate to alter the proliferation of neurofibromin-deficient mast cells in vivo and in vitro. *J. Exp. Med.* **194**(1): 57-69
- Jenuwein T, Laible G, Dorn R, Reuter G (1998)  
SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cell Mol. Life Sci.* **54**(1): 80-93
- Jerpseth B, Callahan M, Greener A (1997)  
New Competent Cells for Highest Transformation Efficiencies. *Strategies* **10**(2): 37-38
- Joh T, Yamamoto K, Kagami Y, Kakuda H, Sato T, Yamamoto T, Takahashi T, Ueda R, Kaibuchi K, Seto M (1997)  
Chimeric MLL products with a Ras binding cytoplasmic protein AF6 involved in t(6;11) (q27;q23) leukemia localize in the nucleus. *Oncogene* **15**(14): 1681-1687
- Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, Bruderlein S, du Manoir S, Bentz M, Moller P, Lichter P (1996)  
Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood* **87**(4): 1571-1578
- Jüttermann R, Li E, Jaenisch R (1994)  
Toxicity of 5-aza-2'deoxyctidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**: 11797-11801
- Kannan P, Buettner R, Chiao PJ, Yim SO, Sarkiss M, Tainsky MA (1994)  
N-ras oncogene causes AP-2 transcriptional self-interference, which leads to transformation. *Genes Dev.* **8**(11): 1258-1269
- Karin M, Liu Z, Zandi E (1997)  
AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 240-246
- Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M (2001)  
Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* **6**(10): 857-868

- Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H, Clifford P (1968)  
Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res.* **28**: 1300-1310
- Knudson AG (1983)  
Model hereditary cancers of man. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Academic Press) **29**: 17-25
- Knudson AGJ (1971)  
Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **68**: 820-823
- Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999)  
Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**: 630-634
- Kulozik AE, Hentze MW, Hagemeyer C, Bartram CR (2000)  
Molekulare Medizin. Grundlagen – Pathomechanismen – Klinik. 1. Aufl. de Gruyter, Berlin, 2000
- Kuriyama M, Harada N, Kuroda S, Yamamoto T, Nakafuku M, Iwamatsu A, Yamamoto D, Prasad R, Croce C, Canaani E, Kaibuchi K (1996)  
Identification of AF-6 and canoe as putative targets for Ras. *J. Biol. Chem.* **271**(2): 607-610
- Kurten RC, Cadena DL, Gill GN (1996)  
Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science* **272**: 1008-1010
- Laemmli UK (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E, Eisenman RN (1997)  
Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* **89**(3): 349-356
- Lahiri DK, Nurnberger J (1991)  
A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl. Acids Res.* **19**: 5444
- Landmann R, Muller B, Zimmerli W (2000)  
CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes. Infect.* **2**(3): 295-304
- Lania A, Mantovani G, Spada A (2001)  
G protein mutations in endocrine diseases. *Eur. J. Endocrinol.* **145**(5): 543-559
- Lavau C, Du C, Thirman M, Zeleznik-Le N (2000)  
Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia. *EMBO J* **19**(17): 4655-4664
- Lavau C, Luo RT, Du C, Thirman MJ (2000)  
Retrovirus-mediated gene transfer of MLL-ELL transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**(20): 10984-10989
- Lavau C, Szilvassy SJ, Slany R, Cleary ML (1997)  
Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *EMBO J.* **16**(14): 4226-4237
- Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C (1996)  
The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* **14**(3): 281-291
- Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP (1993)  
A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**(1): 73-84

- Lee JH, Voo KS, Skalnik DG (2001)  
Identification and characterization of the DNA binding domain of CpG-binding protein. *J. Biol. Chem.* **276**(48): 44669-44676
- Lee LG, Connell CR, Bloch W. (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3761-3766
- Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY (1987)  
Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification and sequence. *Science* **235**, 1394-1399
- Leof EB (2000)  
Growth factor receptor signalling: location, location, location. *Trends Cell. Biol.* **10**(8): 343-348
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991)  
The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**:453-456
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC (2001)  
Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* **3**(9): 802-808
- Liu J, Wilson TE, Milbrandt J, Johnston M (1993)  
Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. In: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **5**: 125-137
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL (1990)  
Use of Uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**: 125-128
- Look AT (1997)  
Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**: 1059-1064
- Lozzio CB, Lozzio BB (1973)  
Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J. Natl. Cancer Inst.* **50**: 535-538
- Ludwig WD, Thiel E (1993)  
Diagnosis of acute leukemia with morphologic, immunologic and cytogenetic procedures. *Internist* **34**: 498-510
- Lübbert M, Mirro J, Kitchingman G (1992)  
Prevalence of N-RAS Mutations in children with acute myeloid leukemia. *Oncogene* **7**: 263-268
- Luque I, Gelinas C (1997)  
Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **8**(2): 103-111
- Ma C, Staudt LM (1996)  
LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias. *Blood* **87**(2):734-745
- Ma J, Ptashne M (1988)  
A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**: 113-119
- MacNamara B, Wang W, Chen Z, Hou M, Mazur J, Gruber A, Porwit-MacDonald A (2001)  
Telomerase activity in relation to pro- and anti-apoptotic protein expression in high grade non-Hodgkin's lymphomas. *Haematologica* **86**(4): 386-393
- Maconochie M, Nonchev S, Morrison A, Krumlauf R (1996)  
Paralogous Hox genes: function and regulation. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 529-556
- Magrath I (1990)  
The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv. Cancer Res.* **55**: 133-270

- Marks PA, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA (2001)  
Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr. Opin. Oncol.* **13**: 477-483
- Marks PA, Richon VM, Rifkind RA (2000)  
Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**: 1210-1216
- Martin KH, Slack JK, Boerner SA, Martin CC, Parsons JT (2002)  
Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science* **296**(5573): 1652-1653
- Mass RL, Zeller R, Woychik RP, Vogt TF, Leder P (1990)  
Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant limb deformity alleles. *Nature* **346**: 853-855
- Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA, Hirshman MF, Sakamoto K, Goodyear LJ, Iannaccone M, Accili D, Cantley LC, Kahn CR (2002)  
Reduced expression of the murine p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J. Clin. Invest.* **109**(1): 141-149
- McCormick F (1998)  
Why Ras needs Rho. *Nature* **394**: 220-221
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000)  
AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**: 782-787
- Mendelsohn AR, Brent R (1994)  
Biotechnology applications of interaction traps/two hybrid systems. *Curr. Opinion on Biotechnol.* **5**: 482-486
- Mermoud N, Williams TJ, Tjian R (1988)  
Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro. *Nature* **332**: 557-561
- Miller JR (2001)  
The wnts. *Genome Biol.* **3**(1): reviews 3001.1-3001.5
- Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD (1996)  
The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**(7): 1261-1270
- Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW (1994)  
Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**(21): 9926-9930
- Morton CJ, Campbell ID (1994)  
SH3 domains. Molecular 'Velcro'. *Curr. Biol.* **4**(7): 615-7
- Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986)  
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Quant. Biol.* **51**: 263-273
- Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG (1998)  
Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. *Cancer Res.* **58**(4): 591-593
- Nakamura H, Sudo T, Tsuiki H, Miyake H, Morisaki T, Sasaki J, Masuko N, Kochi M, Ushio Y, Saya H (1998)  
Identification of a novel human homolog of the Drosophila dlgl, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. *FEBS Lett.* **433**(1-2): 63-67

- Namba M, Nishitani K, Hyodoh F, Fukushima F, Kimoto T (1985)  
Neoplastic transformation of human diploid fibroblasts (KMST-6) by treatment with  $^{60}\text{Co}$  gamma rays. *Int J Cancer*. **35**(2): 275-80.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998)  
Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**: 386-389
- Newmark PA, Boswell RE (1994)  
The mago nashi locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*. *Development* **120**(5): 1303-1313
- Nissen MS, Langan TA, Reeves R (1991)  
Phosphorylation by cdc2 kinase modulates DNA binding activity of high mobility group I nonhistone chromatin protein. *J. Biol. Chem.* **266**(30): 19945-19952
- Nordheim A (1994)  
Transcription factors. CREB takes CBP to tango. *Nature* **370**: 177-178
- Ogata K, Arakawa M, Kasahara T, Shiori-Nakano K, Hiraoka K (1983)  
Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *J. Immunol. Meth.* **65**: 75-82
- Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1997)  
The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* **389**: 994-999
- Ohba T, Ishino M, Aoto H, Sasaki T (1998)  
Interaction of two proline-rich sequences of cell adhesion kinase beta with SH3 domains of p130Cas-related proteins and a GTPase-activating protein, Graf. *Biochem. J.* **330**(Pt 3): 1249-1254.
- Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD, Sakai T (1993)  
CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* **8**(4):1063-1067
- Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ (1998)  
Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* **394**: 295-299
- Olsson TG, Silverstein RA, Ekwall K, Sunnerhagen P (1999)  
Transient inhibition of histone deacetylase activity overcomes silencing in the mating-type region in fission yeast. *Curr. Genet.* **35**(2): 82-87
- Palacios IM (2002)  
RNA processing: splicing and the cytoplasmic localisation of mRNA. *Curr. Biol.* **12**(2): R50-52
- Parks WT, Frank DB, Huff C, Renfrew Haft C, Martin J, Meng X, de Caestecker MP, McNally JG, Reddi A, Taylor SI, Roberts AB, Wang T, Lechleider RJ (2001)  
Sorting nexin 6, a novel SNX, interacts with the transforming growth factor-beta family of receptor serine-threonine kinases. *J. Biol. Chem.* **276**(22):19332-19339
- Peltz GA, Gallis B, Peterlin BM (1987)  
Monoclonal antibody immunoprecipitation of cell membrane glycoproteins. *Anal. Biochem.* **167**(2): 239-244
- Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S (1999)  
Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J. Biol. Chem.* **274**(5): 2593-2596

- Petermann R, Mossier BM, Aryee DNT, Kovar H (1998)  
A recombination based method to rapidly assess specificity of two-hybrid clones in yeast. *Nucl. Acids Res.* **26**(9): 2252-2253
- Pinto A, Zagonel V (1993)  
5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) and 5-azacytidine in the treatment of acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes: past, present and future trends. *Leukemia* **7** Suppl. 1: 51-60
- Ponder BAJ (1980)  
Genetics and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **605**(4): 369-410
- Prasad R, Yano T, Sorio C, Nakamura T, Rallapalli R, Gu Y, Leshkowitz D, Croce CM, Canaani E (1995)  
Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**(26): 12160-12164
- Printen JA, Sprague GF (1994)  
Protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**: 609-619
- Prives C (1994)  
How loops, beta sheets, and alpha helices help us to understand p53. *Cell* **78**(4):543-546
- Qiu RG, Abo A, McCormick F, Symons M (1997)  
Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol. Cell Biol.* **17**(6): 3449-3458
- Qiu RG, Chen J, McCormick F, Symons M (1995)  
A role for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**(25): 11781-11785
- Rabbitts T, Boehm T (1991)  
Structural and functional chimaerism results from chromosomal translocation in lymphoid tumours. *Adv. Immunol.* **50**: 119-146
- Rabbitts T (1994)  
Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372**: 143-149
- Rao KM (2001)  
MAP kinase activation in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **69**(1): 3-10
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000)  
Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599
- Redner RL, Wang X, Liu JM (1999)  
Chromatin remodeling and leukemias: new therapeutic paradigms. *Blood* **94**(2): 417-428
- Reeves R, Langan TA, Nissen MS (1991)  
Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**(5): 1671-1675
- Riley DJ, Lee WH (2002)  
Prospects for tumor suppressor gene therapy: RB as an example. in: Tumor Suppressing viruses, genes, and drugs – innovative cancer therapy approaches. 1. Aufl., Academic Press, San Diego (USA), 2002
- Rocco JW, Sidransky D (2001)  
p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp. Cell Res.* **264**(1): 42-55
- Rothwarf DM, Karin M (1999)  
The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE* **1999**(5): RE1

- Rowley JD (1984)  
Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. *Cancer Res.* **44**: 3159-3168
- Rubnitz JE, Morrissey J, Savage PA, Cleary ML (1994)  
ENL, the gene fused with HRX in t(11;19) leukemias, encodes a nuclear protein with transcriptional activation potential in lymphoid and myeloid cells. *Blood* **84**(6): 1747-1752
- Rubnitz, JE, Look AT (1998)  
Molecular Genetics of Childhood Leukemias. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **20**(1): 1-11
- Saha V, Young BD, Freemont PS (1998)  
Translocations, fusion genes and acute leukemia. *J. Cell. Chem. Suppl.* **30/31**: 264-276
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988)  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Salicioni AM, Xi M, Vanderveer LA, Balsara B, Testa JR, Dunbrack RL Jr, Godwin AK (2000)  
Identification and structural analysis of human RBM8A and RBM8B: two highly conserved RNA-binding motif proteins that interact with OVCA1, a candidate tumor suppressor. *Genomics* **69**(1): 54-62
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)  
Molecular Cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, USA, 1989
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)  
DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**: 5463-5467
- Schneider C, Newman RA, Sutherland DR, Asser U, Greaves MF (1982)  
A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J. Biol. Chem.* **257**(18): 10766-10769
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G (1977)  
Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* **19**: 621-626
- Schwartz MA, Assoian RK (2001)  
Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J. Cell Sci.* **114**(Pt 14): 2553-2560
- Seimiya H, Smith S (2002)  
The telomeric poly(ADP-ribose) polymerase, Tankyrase 1, contains multiple binding sites for telomeric repeat binding factor 1 (TRF1) and a novel acceptor, 182-kDa Tankyrase-binding protein (TAB182). *J. Biol. Chem.* **277**(16): 14116-14126
- Seminario MC, Wange RL (2001)  
Signaling pathways of D3-phosphoinositide-binding kinases in T cells and their regulation by PTEN. *Semin. Immunol.* **14**(1): 27-36
- Seyffert W, Gassen HG, Hess O, Jäckle H, Fischbach KF (Hrsg.) (1998)  
Seyffert – Lehrbuch der Genetik. 1. Aufl., Fischer, Jena 1998
- Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999)  
CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 821-861
- Shen JC, Rideout WM 3rd, Jones PA (1992)  
High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase. *Cell* **71**(7): 1073-1080
- Shivadasani RA, Orkin SH (1996)  
The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* **87**: 4025-4039

- Shuman S (1994)  
Novel Approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using *Vaccinia* DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**: 32678-32684
- Simon J (1995)  
Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during *Drosophila* development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**(3): 376-385
- Slany RK, Lavau C, Cleary ML (1998)  
The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol. Cell Biol.* **18**(1):122-9
- Smith DB, Johnson KS (1988)  
Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40
- Smith S, de Lange T (1999)  
Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes. *J. Cell Sci.* **112** ( Pt 21): 3649-3656
- Smith S, Gariat I, Schmitt A, de Lange T (1998)  
Tankyrase, a poly(ADP-ribose)polymerase at human telomeres. *Science* **282**: 1484-1487
- Smith S, Gariat I, Schmitt A, de Lange T (1998)  
Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* **282**: 1484-1487
- Smithgall TE, Rogers JA, Peters KL, Li J, Briggs SD, Lionberger JM, Cheng H, Shibata A, Scholtz B, Schreiner S, Dunham N (1998)  
The c-Fes family of protein-tyrosine kinases. *Crit. Rev. Oncog.* **9**(1): 43-62
- Steube KG, Gignac SM, Hu ZB, Teepe D, Harms D, Kabisch H, Gaedicke G, Hansen-Hagge T, Macleod RA, Quentmeier H, Drexler HG (1997)  
In vitro culture studies of childhood myelodysplastic syndrome: establishment of the cell line MUTZ-1. *Leuk. Lymphoma* **25**(3-4): 345-63
- Strachan T, Read AP (1996)  
Molekulare Humangenetik. 1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996
- Strehl S, Borkhardt A, Slany R, Fuchs U, König M, Haas OA  
The human LASP1 gene is fused to MLL in an acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q21). Zur Publikation eingereicht.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990)  
Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**: 60-89
- Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, Bork P (1995)  
Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett.* **369**(1): 67-71
- Tate PH, Bird AP (1993)  
Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**(2): 226-231
- Teasdale RD, Loci D, Houghton F, Karlsson L, Gleeson PA (2001)  
A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. *Biochem J.* **358**(Pt 1): 7-16
- Thanos CD, Goodwill KE, Bowie JU (1999)  
Oligomeric structure of the human EphB2 receptor SAM domain. *Science* **283**: 833-836
- Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK (1997)  
Hox homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **11**(6): 1221-1237

- Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML (1992)  
Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* **71**(4): 691-700
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979)  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **76**: 4350-4354
- Tufan AC, Daumer KM, DeLise AM, Tuan RS (2002)  
AP-1 transcription factor complex is a target of signals from both Wnt-7a and N-cadherin-dependent cell-cell adhesion complex during the regulation of limb mesenchymal chondrogenesis. *Exp. Cell Res.* **273**(2): 197-203
- Turner BC, Zhang J, Gumbs AA, Maher MG, Kaplan L, Carter D, Glazer PM, Hurst HC, Haffty BG, Williams T (1998)  
Expression of AP-2 transcription factors in human breast cancer correlates with the regulation of multiple growth factor signalling pathways. *Cancer Res.* **58**(23): 5466-5472
- Vachtenheim J, Horakova I, Novotna H (1994)  
Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of H-ras protooncogene is frequent and is associated with H-ras allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **54**(5): 1145-1148
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997)  
Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**(18): 2295-2322
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997)  
Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* **22**(7): 267-272
- Varmus H (1984)  
The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann. Rev. Genet.* **18**: 553-612
- Verreault A, Kaufman PD, Kobayashi R, Stillman B (1998)  
Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr. Biol.* **8**(2): 96-108
- Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane-Robinson C, Allis CD, Workman JL (1996)  
Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J.* **15**(10): 2508-2518
- Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL (1996)  
Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* **274**: 2086-2089
- Vogt TF, Jackson-Grusby L, Rush J, Leder P (1993)  
Formins: phosphoprotein isoforms encoded by the mouse limb deformity locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**(12): 5554-5558
- Wagener C (1996)  
Molekulare Onkologie. 1. Aufl., Thieme, Stuttgart, 1996
- Waterman H, Yarden Y (2001)  
Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett.* **490**(3): 142-152
- Weinberg RA (1991)  
Tumor suppressor genes. *Science* **254**: 1138-1146
- Wells A, Welsh JB, Lazar CS, Wiley HS, Gill GN, Rosenfeld MG (1990)  
Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor. *Science* **247**: 962-964

- Wisdom R (1999)  
AP-1: one switch for many signals. *Exp. Cell Res.* **253**(1): 180-185
- Wolfe SL (1993)  
Molecular and cellular biology. 1. Aufl., Wadsworth, Belmont (USA), 1993
- Woods DF, Hough C, Peel D, Callaini G, Bryant PJ (1996)  
Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J. Cell Biol.* **134**(6): 1469-1482
- Woychik RP, Generoso WM, Russell LB, Cain KT, Cacheiro NL, Bultman SJ, Selby PB, Dickinson ME, Hogan BL, Rutledge JC (1990)  
Molecular and genetic characterization of a radiation-induced structural rearrangement in mouse chromosome 2 causing mutations at the limb deformity and agouti loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**(7): 2588-2592
- Xu Y, Hortsman H, Seet L, Wong SH, Hong W (2001)  
SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P. *Nat. Cell Biol.* **3**(7): 658-666
- Yang H, Kaelin WG (2001)  
Molecular pathogenesis of the von Hippel-Lindau hereditary cancer syndrome: implications for oxygen sensing. *Cell Growth Differ.* **12**(9): 447-455
- Yang RB, Mark MR, Gurney AL, Godowski PJ (1999)  
Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. *J. Immunol.* **163**(2): 639-643
- Yano T, Nakamura T, Blechman J, Sorio C, Dang CV, Geiger B, Canaani E (1997)  
Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7286-7291
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990)  
Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by Trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**(28): 17174-17179
- Yu BD, Hanson RD, Hess JL, Horning SE, Korsmeyer SJ (1998)  
MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**(18): 10632-6
- Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ (1995)  
Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378**: 505-508
- Zelevnik-Le NJ, Harden AM, Rowley JD (1994)  
11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**(22): 10610-10614
- Zhao XF, Colaizzo-Anas T, Nowak NJ, Shows TB, Elliott RW, Aplan PD (1998)  
The mammalian homologue of mago nashi encodes a serum-inducible protein. *Genomics* **47**(2): 319-322
- Zhao XF, Nowak NJ, Shows TB, Aplan PD (2000)  
MAGOH interacts with a novel RNA-binding protein. *Genomics* **63**(1): 145-148

## **VI. Erklärung**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig ausgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Gießen, 2002

Uta Fuchs

## **VII. Danksagung**

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung einer Vielzahl von Personen nicht möglich gewesen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Dabei sind zuerst meine Betreuer zu nennen: PD Dr. Borkhardt, dem ich für die Bereitstellung des Themas und der finanziellen Mittel sowie für eine engagierte Begleitung besonderen Dank schulde, Prof. Pingoud, der meine Vertretung gegenüber dem Fachbereich als Erstkorrektor dieser Arbeit übernommen hat, sowie Prof. Renkawitz und Prof. Reiter.

Die praktische Durchführung der Versuche erfolgte im onkogenetischen Forschungslabor des Zentrums für Kinderheilkunde der Universität Gießen. Hier möchte ich mich bei den Kolleginnen und Kollegen für ihre Hilfe durch Rat und Tat bedanken: Claudia Keller, Dr. Christine Damm-Welk, Dr. Monika Wilda, Stefanie Garkisch, Dr. Willi Wößmann, Simone Schwalm, Gönni Rehkamp, Dominique Bartelheimer, Cathrin Link, Heike Mettal, Irmgard Klose sowie Dr. Kerstin Busch.

Für die gute Einarbeitung und internationale Zusammenarbeit danke ich Dr. Stig Bojesen, Kopenhagen.

Im Institut für Genetik der Universität Gießen möchte ich mich besonders für ihre methodische Hilfe bei Dr. Ole Ammerpohl (jetzt Stockholm, Schweden) und Jörn Böke bedanken.

Besonderer Dank gilt auch PD Dr. Robert Slany, Erlangen, für die gute Zusammenarbeit und seine tatkräftige Hilfe bei methodischen Problemen.

Für die immunohistochemischen Untersuchungen danke ich Prof. Rainer M. Bohle, Pathologie, Gießen.

Patientenmaterial und Know how wurden vom Chromosomenlabor, Kinderklinik Gießen, unter der Leitung von Prof. Jochen Harbott und Dr. Susanne Viehmann zur Verfügung gestellt, sowie vom St. Anna Kinderspital in Wien, Österreich, durch Prof. Oskar Haas und Margit König.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft und der Abteilung Hämatologie/Onkologie der Kinderklinik Gießen unter der Leitung von Prof. Alfred Reiter danke ich für die finanziellen Mittel.

In erster Linie gilt mein Dank jedoch meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Opferbereitschaft die Verwirklichung meines Berufswunsches nicht möglich gewesen wäre.

## **VIII. Anhang**

### **VIII.1 GRAF-Promotorsequenz**

Promotorsequenz und Start-ATG der kodierenden Sequenz, GenBank-Accession AF196313.

```

1      aatattctcc cattcttgct attcccccat caaggggtac agtctaactc ccttcctttg
61     aggctgggtg ggcttatgag ttgcttgtag ccaatgaagg tggtagaagt atgtggcttc
121    caagtgattc agggcaggca agggccaaaa ttgcagctta gcccaggagg cttcttggtc
181    ttgcccagaa aagaattcaa gggcaagcca gtggttaagag aaagcaactt tcattgaatc
241    agtgctgctc ccttggtgaa cagggtatc ccataggagg tgtgctcagg atgggcagtg
301    tacagggtct ttggcacctg tacctatacc tacctttaat tatatgctaa ttaagaggtg
361    gggtatttag aactttctgg aaaggaggca gggagtctcc agaaccatat aaggtaactt
421    ccaggccatt gccatggcct gttgcaatgg catttgtaac ttgtcatggc aatggtggaa
481    gtgtctctat gctaattgag agtgagggca actaaaagtg tcttttttcc ttgcctgctg
541    gtttctgctg gctgcttcac tgaatcccgt ttggaatgaa tcctgggttg atcagtgggg
601    ttgtgattgg aaaacaagtc ctgcaggcct ctcacctcac aaggctaggt cataaaagg
661    gatgcacctt tctccttgct agctgtatat gttcacactg gagccttaag gctgccatac
721    tgggaggaag cctaaactgg gccacagaga aaggccatat ggagaagccc tgagtctacc
781    tgaaaagtgg gatgcccagc taaccatcca ctccctcagc tcctgtcacc atccaactgc
841    aatcacatga gagacctcaa gccttgggct tccctaattt tctaaccac agagattgtg
901    gagagaaaga gataaatga ttgctgttgt cttaaaccat taacttttgg tatcatttat
961    tctgtattaa tagataacca gaacacctac ctttaggtgc tcaagataaa gcattaaaca
1021   gatttacttt catagggttt ccattctaaa tctttctcat ctttggcaag tgaaaaacaa
1081   ttgtttttgg gttgtaatta tctatcagat agctgtctgg acctgctatc aagtctaaat
1141   ttgtagatac acctatcaaa gagatcacat tgcacttatt tatacattta cttatttatt
1201   ttacaatttt ttgtagagat gggggggggtc tcgctgtgtt gccaagatg gtcttgaact
1261   cttgaccca agcaatctc tcacctggcc tccaaaagtt atggattaca ggtgtgagcc
1321   accatgctcc atttatgaat ttaatacatt aattgctttc ttaatataga tgggacacct
1381   ctgaccctc ctgagtgaat aatccatgtt cccaagcacc caggccttct atcctatcac
1441   aaggcatggg tatcgcttgt ttacttccat ctcacctaat accaccagca gctaaattca
1501   ttctgttatt catctttgta ttcttacct ctaggctagt gcctgcacat agcagacct
1561   tttaaaaaac aaaccaaccc aaacaaacat gaagccccc cgtagctgaa ggagggtctg
1621   tggttcctag acatagagat aatttattca aggacagtcc ctatcctcca ggagttaaca
1681   attcagcact agacacctg tgggaccag cctgacaagt gcaacgagtg agatgccaga
1741   attgagtcct gcggtcgaac agagggacta cagggaacg cactgggcgt gggaggtgga
1801   gatggctctg ggaaaggatc cattcattta ttctacattt atcaatcacc gtagcacaca
1861   cagcacatag taagtgtca atatctgtta ttaaatgcc gccactgtgc taggtgccag
1921   gatgcaacag cggacaagaa aattgcagg gcacttgccc tcgtggggct taccgtgtag
1981   cgaaggatga caggcagtag actgtcatct tattatgtaa aattgtgcta gatgcagagc
2041   aggaaaataa caggcggctg aaattctagt aatgatgtga gtccttcgg ctgaggggaa

```

2101 ccgtgggagg gttctgagca ggagtggccg tgagggggac ggaccgtagg gggcgggaag  
 2161 actgcaggca agagctggta attttaagat gcaaataaca tttttctgcc tgactggaag  
 2221 aggagcgggt ggtcgctcgg gattctcccg gagcaggggg ctgtattttg agtgtaaaat  
 2281 cggttgcccc gcagtgcagg gcaggcgggt gtgaaatgca gccctagtcg ccagggtttt  
 2341 catgcttggc acatcgaggt ttttcggccc ccaggaccag cagactcgcc atgcgtggct  
 2401 cggattcggg ctggagcagg cgggcaaggt agcgggggag ggtgcacagc aacgctcacc  
 2461 cctagggtttc ggggtctgca acgctgggag ggcaagagga ggcggagttt gcgctgcgga  
 2521 cctaggcggt ggcgagggcc acgccccag ccgcagaccc tgcctccagg cccctttgat  
 2581 tggatcaaga ccgcggaagg gccgggctgc ctcgggcggc ctgaggggtg ggcaggggag  
 2641 ggtgcgctga ttggcccggc ggggattaat tcatcgctag caggttcgag cggcccagac  
 2701 accggcgggg cggccgaggc tgctgtgaga gggcgctcga ggctgccgag agctagctag  
 2761 cgaaggaggc ggggagggcg cgtctgcact cgctcgcccg ctgctcgct acccggcgcc  
 2821 gctgcgggtc cgcgctgcgt ttcttgcctg cgatccgctc cgttgcccgc gcccggaaca  
 2881 gcagcacctc ggccgggtcc gagctcgctt cgggagtcct gcgcgcggc ggacaccgag  
 2941 cgcgagagtga gccagcgcca cacctgtgga gccggcgccc gtcgggggag ccggccgggg  
 3001 tcccgcgcgc tgagtgtctt gggcgggggg cggcccgggc cccggcgagg gcgcgcccc  
 3061 cggatgggag ccgcgcgcac **cATG**ggggtc ccagcgctcg agttcagcga ctgctgcctc  
 3121 gatagtcgac atttccgaga gacgctcaag tcgcacgaag cagagctgga caagaccaac  
 3181 aaattcatca aggagctcat caaggacggg aagtcactca taagcgcgct caagtgagtg  
 3241 tcccagagccc ctcggggagc cggctccggg gcgggaggaa ctgggaggtg gcgcttacc  
 3301 cgggttgccc gcgcgtctgc cgggtttctg ctcccgtac actgggggac ggggtgc

## VIII.2 GRAF-Sequenz

Kodierende Sequenz, GenBank-Accession Y10388.

1 gcacc**ATG**gg gctcccagcg ctcgagttca gcgactgctg cctcgatagt ccgcacttcc  
 61 gagagacgct caagtcgcac gaagcagagc tggacaagac caacaaattc atcaaggagc  
 121 tcatcaagga cgggaagtca ctcataagcg cgctcaagaa tttgtcttca gcgaagcgga  
 181 agtttgcaga ttctttaaatt gaatttaaatt ttcaagtgcac aggagatgca gaaacagatg  
 241 atgagatgtg tatagcaagg tctttgcagg agttttgccac tgcctcagg aatcttgaag  
 301 atgaacggat acggatgatt gagaatgcca gcgaggtgct catcactccc ttggagaagt  
 361 ttcgaaagga acagatcggg gctgccaaag aagccaaaaa gaagtatgac aaagagacag  
 421 aaaagtattg tggcatctta gaaaaacact tgaatttgtc ttccaaaaag aaagaatctc  
 481 agcttcagga ggcagacagc caagtggacc tggtcgggca gcatttctat gaagtatccc  
 541 tggaaatatgt cttcaagggt caggaagtcc aagagagaaa gatgtttgag tttgtggagc  
 601 ctctgctggc cttctgcaa ggactcttca ctttctatca ccatgggttac gaactggcca  
 661 aggatttcgg ggacttcaag acacagttaa ccattagcat acagaacaca agaaatcgct  
 721 ttgaaggcac tagatcagaa gtggaatcac tgatgaaaaa gatgaaggag aatccccctg  
 781 agcacaagac catcagtcac tacaccatgg agggatacct ctacgtgcag gagaaacgct  
 841 actttggaac ttcttgggtg aagcactact gtacatatca acgggattcc aaacaaatca

```

901   ccatggtacc atttgaccaa aagtcaggag gaaaaggggg agaagatgaa tcagttatcc
961   tcaaatcctg cacacggcgg aaaacagact ccattgagaa gaggttttgc tttgatgtgg
1021  aagcagtaga caggccaggg gttatcacca tgcaagcttt gtcggaaggg gaccggaggc
1081  tctggatgga agccatggat ggccgggaac ctgtctacaa ctcgaacaaa gacagccaga
1141  gtgaagggac tgcgcagttg gacagcattg gcttcagcat aatcaggaaa tgcattccatg
1201  ctgtggaaac cagagggatc aacgagcaag ggctgtatcg aattgtgggg gtcaactcca
1261  gagtgcagaa gttgctgagt gtcttgatgg accccaagac tgcttctgag acagaaacag
1321  atatctgtgc tgaatgggag ataaagacca tcaactagtgc tctgaagacc tacctaagaa
1381  tgcttccagg accactcatg atgtaccagt ttcaaagaag tttcatcaaa gcagcaaaac
1441  tggagaacca ggagtctcgg gtctctgaaa tccacagcct tgttcatcgg ctcccagaga
1501  aaaatcggca gatgttacag ctgctcatga accacttggc aaatgttgct aacaaccaca
1561  agcagaattt gatgacgggtg gcaaaccctt gtgtggtggt tggaccact ctgctgaggc
1621  ctcaggaaga aacagtagca gccatcatgg acatcaaatt tcagaacatt gtcattgaga
1681  tcctaataga aaaccacgaa aagatatatta acaccgtgcc cgatatgcct ctcaccaatg
1741  cccagctgca cctgtctcgg aagaagagca gtgactccaa gcccccgctc tgcagcgaga
1801  ggcccctgac gctcttcac accgttcagt caacagagaa acaggaacaa aggaacagca
1861  tcatcaactc cagtttgaa tctgtctcat caaatccaaa cagcatcctt aattccagca
1921  gcagcttaca gcccaacatg aactccagtg acccagacct ggctgtgggtc aaacccaccc
1981  ggcccaactc actcccccg aatccaagcc caacttcacc cctctcgcca tcttgccca
2041  tgttctcggc accatccagc cctatgccca cctcatccac gtccagcgac tcatccccgc
2101  tcagcacacc gttccggaag gcaaaagcct tgtatgcctg caaagctgaa catgactcag
2161  aactttcggt cacagcaggc acggtcttcg ataatgttca cccatctcag gagcctggct
2221  ggttgagggg gactctgaac ggaaagactg gcctcatccc tgaaaattac gtggagttcc
2281  tcTAA

```

### **VIII.3 FBP17-Sequenz**

Kodierende Sequenz ohne Start-ATG, GenBank Accession AF265550.

```

1     ggctgtggaa cggcggggag gaggagccgc cgaggagacc ccgggcgagg agctgcgagc
61    cggaggaggc cgcgcggact ccgggctttc cgccgtcgcg gggatctcgg ggggcaaagg
121   gatcgccggg gagggggacc agagagccgc gcccgccgcg cggagcgccc cttcgcgtcc
181   cctgcaccat gagctggggc accgagctct gggatcagtt tgacaactta gaaaaacaca
241   cacagtgggg aattgatatt cttgagaaat atatcaagtt tgtgaaagaa aggacagaga
301   ttgaactcag ctatgcaaag caactcagga atctttcaaa gaagtaccaa cctaaaaaga
361   actcgaagga ggaagaagaa tacaagtata cgatcatgtaa agctttcatt tccaacctga
421   acgaaatgaa tgattacgca gggcagcatg aagttatctc cgagaacatg gcattcacaga
481   tcattgtgga cttggcacgc tatgttcagg aactgaaaca ggagaggaaa tcaaactttc
541   acgatggccg taaagcacag cagcacatcg agacttgctg gaagcagctt gaatctagta
601   aaaggcgatt tgaacgcgat tgcaaagagg cggacagggc gcagcagtac tttgagaaaa
661   tggacgctga catcaatgtc acaaaagcgg atgttgaaaa ggcccgacaa caagctcaaa

```

```

721  tacgtcacca aatggcagag gacagcaaag cagattactc atccattctc cagaaattca
781  accatgagca gcatgaatat taccatactc acatcccca catcttccag aaaatacaag
841  agatggagga aaggaggatt gtgagaatgg gagagtccat gaagacatat gcagaggttg
901  atcggcaggt gatcccaate attgggaagt gcctggatgg aatagtaaaa gcagccgaat
961  caattgatca gaaaaatgat tcacagctgg taatagaagc ttataaatca gggtttgagc
1021 ctcttgagga cattgaattt gaggattaca ctacagccat gaagcgact gtgtcagata
1081 acagcctttc aaattccaga ggagaaggca aaccagacct caaatctggt ggcaaattca
1141 aaggaaagtt atggccgttc atcaaaaaaa ataagcttat gtccctttta acatcccccc
1201 atcagcctcc ccctccccct cctgcctctg cctcaccctc tgctgttccc aacggcccc
1261 agtctcccaa gcagcaaaaag gaaccctctc cccaccgctt caacgagttc atgacctcca
1321 aacccaaaat cactgcttc aggagcctaa agcgtgggct ttctctcaag ctgggtgcaa
1381 caccggagga ttctagcaac ctcccacctg aacaaagaag gaaaaagctg cagcagaaag
1441 tcgatgagtt aaataaagaa attcagaagg agatggatca aagagatgcc ataacaaaaa
1501 tgaaagatgt ctacctaaag aatcctcaga tgggagaccc agccagtctg gatcacaaat
1561 tagcagaagt cagccaaaat atagagaaac tgcgagtaga gaccagaaa tttgaggcct
1621 ggctggctga ggttgaaggc cggctcccag cagcgagcga gcaggcgcg cggcagagcg
1681 gactgtacga cagccagaac ccacccacag tcaacaactg cgcccaggac cgtgagagcc
1741 cagatggcag ttacacagag gagcagagtc aggagagtga gatgaaggtg ctggccacgg
1801 attttgacga cgagtttgat gatgaggagc ccctccctgc catagggacg tgcaaagctc
1861 tctacacatt tgaaggctag aatgaaggaa cgatttccgt agttgaagga gaaacattgt
1921 atgtcataga ggaagacaaa ggcgatggct ggaccgcgat tcggagaaat gaagatgaag
1981 agggttatgt cccacttca tatgtcgaag tctgtttgga caaaaatgcc aaagattccT
2041 AG

```

## **VIII.4      Geräte**

Folgende Geräte kamen im Zuge dieser Arbeit zur Anwendung:

| <b>Gerät</b>                              | <b>Hersteller</b>           |
|-------------------------------------------|-----------------------------|
| Agarose-Gelelektrophoresekammern          | von Keutz                   |
| Autoklav                                  | Wolf, Tecnomara             |
| Autoradiographieverstärkerfolie           | DuPont                      |
| Blotkammer                                | BioRad                      |
| Brutschrank                               | Memmert                     |
| Brutschrank mit CO <sub>2</sub> -Begasung | Heraeus                     |
| Filmkassetten                             | Siemens                     |
| Gefrierschränke –20°C                     | Liebherr                    |
| Gefriertruhen –80°C                       | Colora                      |
| Geltrockner Geldryer 583                  | BioRad                      |
| Magnetrührer                              | Monotherm, Janke und Kunkel |
| Mikroliterpipetten                        | Gilson                      |
| Mikroskope                                | Zeiss, Olympus              |
| Mikrozentrifugen                          | Hettich, Eppendorf          |

| Gerät                             | Hersteller                 |
|-----------------------------------|----------------------------|
| PCR-Gerät GeneAmp PCR System 9600 | Applied Biosystems         |
| PCR-Gerät Tpersonal Kombi         | Whatman Biometra           |
| pH-Meter                          | Schott                     |
| Powersupply                       | Consort                    |
| Quarzküvetten                     | Pharmacia Biotech          |
| Reinstwasseranlage                | Millipore                  |
| Röntgenfilmentwickler             | Agfa                       |
| Schüttelinkubator                 | GFL, Braun                 |
| SDS-Gelelektrophoresekammer       | BioRad                     |
| SequenziererABI373A               | Applied Biosystems         |
| Sofortbild-Kamera                 | Polaroid                   |
| Spektralphotometer Ultrospec 1000 | Pharmacia Biotech          |
| Taumelschüttler                   | Heidolph                   |
| UV-Transilluminator               | UVP                        |
| Vakuummzentrifuge                 | von Keutz                  |
| Vortexer                          | Janke und Kunkel, Heidolph |
| Waagen                            | Ohaus, Vibra               |
| Zentrifugen                       | Hettich                    |

### **VIII.5 Verbrauchsmaterialien**

An Verbrauchsmaterialien wurden die nachfolgend genannten Produkte eingesetzt:

| Produkt                           | Hersteller                     |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Einmalküvetten                    | Roth                           |
| Einwegkanülen                     | Terumo                         |
| Einwegspritzen                    | Braun, Sherwood                |
| Filterpapier                      | Whatman, Schleicher und Schüll |
| Glas Beads (425-600µm)            | Sigma                          |
| Kryoröhrchen                      | Nalgene                        |
| Mikrotiterplatten                 | Greiner, Nalgene               |
| Nitrocellulosemembranen           | Amersham                       |
| PCR-Gefäße                        | Eppendorf, Greiner             |
| Petrischalen                      | Greiner                        |
| Pipettenspitzen                   | Roth                           |
| Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2 ml | Eppendorf, Sarstedt, Griern    |
| Röntgenfilme Hyperfilm ECL        | Amersham                       |
| serologische Pipetten             | Greiner                        |
| Sofortbildfilme                   | Polaroid                       |
| Sterilfilter                      | Schleicher und Schüll          |
| Zentrifugenröhrchen               | Greiner, Falcon                |

## VIII.6 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden eingesetzt:

| Produkt                                 | Hersteller                 | Produkt                           | Hersteller                |
|-----------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Acrylamid                               | <i>Gibco</i>               | Agar                              | <i>Roth</i>               |
| Agarose                                 | <i>Roth, PegLab</i>        | 3-Amino-1,2,4-triazol             | <i>Sigma</i>              |
| Ammoniumpersulfat                       | <i>Aldrich</i>             | Ampicillin                        | <i>Sigma</i>              |
| Antikörper                              | <i>Santa Cruz, Sigma</i>   | Antikörper, HRP-konjugiert        | <i>Sigma</i>              |
| Aprotinin                               | <i>Sigma</i>               | ATP                               | <i>Roche</i>              |
| 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-azadC)         | <i>Sigma</i>               | Benzamidin                        | <i>Sigma</i>              |
| Borsäure                                | <i>Merck</i>               | Bromphenolblau                    | <i>Sigma</i>              |
| BSA                                     | <i>New England Biolabs</i> | Calciumchlorid                    | <i>Merck</i>              |
| Chloroform                              | <i>Merck</i>               | Coomassie Brilliantblau R-250     | <i>Merck</i>              |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                 | <i>Merck</i>               | DNA-Längenstandard                | <i>MBI</i>                |
| DTT (1,4-Dimercapto-butan-2,3-Diol)     | <i>Sigma</i>               | dNTP-Mix (10mM)                   | <i>Roth</i>               |
| ECL Western blotting detection reagents | <i>Amersham</i>            | EDTA                              | <i>Sigma</i>              |
| EDTA/Blue Dextran                       | <i>Applied Biosystems</i>  | Essigsäure                        | <i>Merck</i>              |
| Ethanol                                 | <i>Riedel de Haen</i>      | Ethidiumbromid                    | <i>Quantum Appligene</i>  |
| Fötale Kälberserum (FCS)                | <i>Gibco, PAA</i>          | Formamid                          | <i>Merck, Kodak</i>       |
| L-Glutamin                              | <i>Gibco</i>               | Glycerol                          | <i>Sigma</i>              |
| Harnstoff                               | <i>Roth</i>                | Hefeextrakt                       | <i>Roth</i>               |
| Hefemedien                              | <i>Clontech</i>            | Herring Testes Carrier DNA        | <i>Clontech</i>           |
| HPLC -Wasser                            | <i>Baker</i>               | Isopropanol                       | <i>Baker</i>              |
| Kaliumacetat                            | <i>Sigma</i>               | Kaliumchlorid                     | <i>Sigma</i>              |
| Kanamycin                               | <i>Sigma</i>               | Laemmli Sample Buffer             | <i>BioRad</i>             |
| Leupeptin                               | <i>Sigma</i>               | Lithiumchlorid                    | <i>Sigma</i>              |
| Lithiumacetat                           | <i>Sigma</i>               | β-Mercaptoethanol                 | <i>Sigma</i>              |
| Methanol                                | <i>Riedel de Haen</i>      | Natriumacetat                     | <i>Applied Biosystems</i> |
| Natriumchlorid                          | <i>Roth</i>                | Natriumfluorid                    | <i>Sigma</i>              |
| Natriumhydrogenphosphat                 | <i>Merck</i>               | Natriumhydroxid (Plätzchen)       | <i>Roth</i>               |
| Natriumhydroxid (Lösung)                | <i>Merck</i>               | Natriumorthovanadat               | <i>Sigma</i>              |
| Oligonucleotide                         | <i>Roth, MWG</i>           | Penicillin/Streptomycin           | <i>Gibco</i>              |
| Pepstatin A                             | <i>Sigma</i>               | Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol | <i>Roth</i>               |
| PMSF (Phenylmethyl-sulfonylfluorid)     | <i>Sigma</i>               | Polyethylenglykol                 | <i>Sigma</i>              |
| Protease-Inhibitor Cocktail             | <i>Sigma</i>               | Protein-Längenstandard            | <i>BioRad, Sigma</i>      |
| Radiochemikalien                        | <i>Amersham</i>            | Random Primer Hexamer             | <i>Gibco</i>              |
| RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor         | <i>Gibco</i>               | Roti-Block                        | <i>Roth</i>               |

| <b>Produkt</b>           | <b>Hersteller</b>         | <b>Produkt</b>                             | <b>Hersteller</b>   |
|--------------------------|---------------------------|--------------------------------------------|---------------------|
| Salzsäure                | <i>Merck</i>              | SDS                                        | <i>Sigma</i>        |
| TaqMan-Primer und Sonden | <i>Applied Biosystems</i> | TEMED (Tetramethylethyldiamin)             | <i>Roth</i>         |
| TNF $\alpha$             | <i>Sigma</i>              | Trichostatin A (TSA)                       | <i>Biomol</i>       |
| Tris                     | <i>Roth, USB</i>          | Triton-X                                   | <i>Sigma</i>        |
| Trizol                   | <i>Gibco</i>              | Trypsin/EDTA (0,5g/l Trypsin; 0,2g/l EDTA) | <i>Gibco</i>        |
| X-Gal (50mg/ml)          | <i>Promega</i>            | Zellkulturmedien                           | <i>Gibco, Sigma</i> |

### **VIII.7 Komplettsysteme (Kits)**

#### Isolierung genomischer DNA:

Camgen™ Mammalian Genomis Mini DNA Purification Kit      Whatman

#### Isolierung von Plasmid-DNA:

Minipräp (5 ml Kulturvolumen):

QIAprep® Miniprep      Qiagen

E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I      PeqLab

Midipräp (25-100 ml Kulturvolumen):

Qiagen® Plasmid Midi Prep      Qiagen

#### Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Yeastmaker™ Yeast Plasmid Isolation kit      Clontech

#### Reverse Transkription:

SuperScript™ First Strand Synthesis System für RT-PCR      Gibco

#### Quantitative PCR:

TaqMan™ Universal PCR Master Mix      Applied Biosystems

#### In vitro Transkription und Translation:

TNT™ SP6 Quick coupled Transcription/Translation System      Promega

TNT™ T7 Quick coupled Transcription/Translation System      Promega

#### Interaktionstests:

Matchmaker™ LexA Two-Hybrid System      Clontech

Matchmaker™ One-Hybrid System      Clontech

#### Mutagenese:

QuikChange™ Multi Site-Directed Mutagenesis Kit      Stratagene

#### Sequenzierung:

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit  
Applied Biosystems

#### Luciferase Assays:

Dual-Luciferase™ Reporter Assay System      Promega

#### Untersuchung von Signaltransduktionswegen:

Mercury™ Pathway Profiling Luciferase System      Clontech

## VIII.8 Enzyme

### ***DNA-Polymerasen:***

Folgende DNA-Polymerasen wurden in PCR-Reaktionen verwendet:

| Polymerase                  | Hersteller   | Puffer                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AmpliTaq Gold [5U/ $\mu$ l] | Perkin Elmer | Gene Amp 10x PCR Buffer<br>(100mM Tris-HCl, pH 8,3; 500mM KCl; 15mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,01% (w/v) Gelatine)                                                                     |
| Taq [5U/ $\mu$ l]           | Gibco        | 10x PCR Buffer<br>(100mM Tris-HCl, pH 8,4; 500mM KCl)<br>zuzüglich 1,5mM MgCl <sub>2</sub> im Reaktionsansatz                                                                     |
| Pfu [2,5U/ $\mu$ l]         | Stratagene   | 10x Cloned <i>Pfu</i> Buffer<br>(200mM Tris-HCl, pH 8,8; 20mM MgSO <sub>4</sub> ; 100mM KCl; 100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 1% Triton X-100; 1mg/ml BSA) |
| Superscript II              | Gibco        | 250mM Tris-HCl, pH8,3; 375mM KCl; 15mM MgCl <sub>2</sub>                                                                                                                          |

### ***Restriktionsendonucleasen:***

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von der Firma New England Biolabs. Die jeweils beigelegten Reaktionspuffer hatten folgende Zusammensetzung:

| Puffer 1 (1x)                                                              | Puffer 2 (1x)                                                             | Puffer 3 (1x)                                                              | Puffer 4 (1x)                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 10mM Bis Tris<br>Propan-HCl<br>10mM MgCl <sub>2</sub><br>1mM DTT<br>pH 7,0 | 10mM Tris-HCl<br>10mM MgCl <sub>2</sub><br>50mM NaCl<br>1mM DTT<br>pH 7,9 | 50mM Tris-HCl<br>10mM MgCl <sub>2</sub><br>100mM NaCl<br>1mM DTT<br>pH 7,9 | 20mM Tris-Acetat<br>10mM MgAcetat<br>50mM KAcetat<br>1mM DTT<br>pH 7,9 |

Es kamen die nachfolgend aufgelisteten Restriktionsenzyme zur Anwendung:

| Enzym    | Konzentration | Puffer      |
|----------|---------------|-------------|
| BamHI    | 5U/ $\mu$ l   | 2           |
| BglII    | 10U/ $\mu$ l  | 3           |
| EcoRI    | 20U/ $\mu$ l  | alle Puffer |
| Hind III | 20U/ $\mu$ l  | 2           |
| NcoI     | 10U/ $\mu$ l  | 4           |
| NotI     | 10U/ $\mu$ l  | 3           |
| Sall     | 20U/ $\mu$ l  | 3           |
| XbaI     | 20U/ $\mu$ l  | 2           |
| XhoI     | 20U/ $\mu$ l  | 2           |

### ***Phosphatasen:***

Zur Dephosphorylierung restriktionsverdauter DNA-Fragmente wurde alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP; [10U/ $\mu$ l]) der Firma New England Biolabs eingesetzt.

10x Reaktionspuffer: 100mM NaCl  
50mM Tris-HCl  
10mM MgCl<sub>2</sub>  
1mM DTT  
pH 7,9

***Ligasen:***

Bei Klonierungen wurde zur Ligation überhängender Enden T4 DNA-Ligase der Firma New England Biolabs verwendet (20U/μl).

1x Reaktionspuffer: 50mM Tris-HCl (pH 7,8)  
10mM MgCl<sub>2</sub>  
10mM DTT  
1mM ATP  
25μg/ml BSA

***Weitere Enzyme:***

Proteinase K                      Gibco  
Dpn I                                Stratagene

## **VIII.9      Längenstandards**

***DNA-Längenstandards:***

DNA Molecular Weight Marker III (Roche):

564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148 und 21226 bp.

DNA Molecular Weight Marker VI (Roche):

154, 234, 298 394, 453, 517, 653, 1033, 1230, 1766, 2176 bp.

GeneRuler DNA Ladder Mix (MBI):

100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp.

***Protein-Längenstandards:***

Precision Protein Standard Prestained (BioRad): 10, 15, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 kD.

SDS 7B (Sigma): 26,6, 36,5, 48, 58, 84, 116, 180 kD.

### **VIII.10 DNA-Vektoren**

Es wurden folgende DNA-Vektoren verwendet:

| <b>Name</b>               | <b>Größe</b> | <b>Replikations-<br/>ursprung</b> | <b>Selektions-<br/>marker</b> | <b>Promotor</b>        | <b>Hersteller</b> |
|---------------------------|--------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------|
| pCRII -TOPO               | 3,9 kb       | pUC<br>f1                         | Ampicillin<br>Kanamycin       | SP6<br>T7              | Invitrogen        |
| pGL3-Basic                | 4,8 kb       | Col E1-abgeleitet<br>f1           | Ampicillin                    | -                      | Promega           |
| pGL3-Promoter             | 5 kb         | Col E1-abgeleitet<br>f1           | Ampicillin                    | SV40                   | Promega           |
| pRL-TK                    | 4kb          | Col E1                            | Ampicillin                    | HSV-TK<br>T7           | Promega           |
| pcDNA3.1D/<br>V5-His-TOPO | 5,5 kb       | pUC<br>SV40                       | Ampicillin<br>Neomycin        | P <sub>CMV</sub><br>T7 | Invitrogen        |
| pCMV-Tag 2B               | 4,3 kb       | Col E1<br>f1(-)<br>SV40           | Kanamycin<br>Neomycin         | P <sub>CMV</sub><br>T3 | Stratagene        |
| pcDNA3.1/NT-<br>GFP-TOPO  | 6,2 kb       | pUC<br>SV40                       | Ampicillin<br>Neomycin        | P <sub>CMV</sub><br>T7 | Invitrogen        |
| pDsRed1-N1                | 4,7 kb       | pUC<br>SV40<br>f1                 | Kanamycin<br>Neomycin         | P <sub>CMV</sub>       | Clontech          |
| pGEX-2T                   | 5,9 kb       | pBR322                            | Ampicillin                    | P <sub>tac</sub>       | Amersham          |
| pHISi                     | 6,8 kb       | Col E1                            | Ampicillin<br>Ura3            | P <sub>minHIS3</sub>   | Clontech          |
| pHISi-1                   | 5,4 kb       | Col E1                            | Ampicillin                    | P <sub>minHIS3</sub>   | Clontech          |
| pLacZi                    | 6,9 kb       | Col E1                            | Ampicillin<br>URA3            | P <sub>CYC1</sub>      | Clontech          |
| pACT2                     | 8,1 kb       | 2μ<br>Col E1                      | Ampicillin<br>LEU2            | P <sub>ADH1</sub>      | Clontech          |
| pLexA                     | 10,2 kb      | 2μ<br>pBR                         | Ampicillin<br>HIS3            | P <sub>ADH1</sub>      | Clontech          |
| pB42AD                    | 6,45 kb      | 2μ<br>pUC                         | Ampicillin<br>TRP1            | P <sub>GAL1</sub>      | Clontech          |
| p8OP-lacZ                 | 10,3 kb      | 2μm<br>pBR                        | Ampicillin<br>URA3            | -                      | Clontech          |

### **VIII.11 Bakterienstämme**

Es wurden verschiedene *E.coli*-Stämme eingesetzt, die alle bereits vom Hersteller chemisch kompetent vertrieben wurden und bei –80°C gelagert werden konnten.

***Epicurian Coli SoloPack Gold*** (Stratagene; BULLOCK *et al.*, 1987)

Genotyp: Tet<sup>R</sup>Δ(*mcrA*)183Δ(*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup>]<sup>a</sup>

***XL10-Gold*** (Stratagene; JERPSETH *et al.*, 1997)

Genotyp: Tet<sup>R</sup> Δ(*mcrA*)183 Δ(*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup>]<sup>a</sup>

***TOP10*** (Invitrogen ; GRANT *et al.*, 1990)

Genotyp: F - *mcrA* .(*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ö 80*lacZ* M15 .*lacX74 deoR recA1 araD139.(ara-leu)7697 galU galK rpsL* (Str R ) *endA1 nupG*

***TOP10F'*** (Invitrogen)

Der Genotyp des TOP10F'-Bakterienstammes ist identisch mit TOP10 und enthält zusätzlich ein F'-Episom. Darüber hinaus enthält er den *lacI<sup>q</sup>* Repressor für die induzierbare Expression von *trc*, *tac* und *lac* Promotoren unter Zusatz von IPTG. Er ist daher bei Verwendung eines entsprechenden Vektors und Zugabe von X-Gal zum Medium für ein Blau/Weiß-Screening geeignet.

Genotyp : F' {*lacI<sup>q</sup> Tn10* (Tet<sup>R</sup> )} *mcrA* .(*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) F 80*lacZ* M15 .*lacX74 deoR recA1 araD139 .(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG*

***BL21*** (Novagen; STUDIER *et al.*, 1990)

Genotyp: F' *ompT gal[dmc][lon] hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)* mit DE3, einem λ-Phagen, der das T7 RNA-Pol. Gen trägt.

Dieser Stamm wurde von Dr. Ammerpohl, Institut für Genetik der Universität Gießen, bereits chemisch kompetent zur Verfügung gestellt.

**VIII.12 Hefestämme**

Für das Yeast Two Hybrid System wurde der Hefestamm EGY48 (ESTOJAK *et al.*, 1995) verwendet, der bereits mit p8op-*lacZ* prätransformiert von der Firma Clontech vertrieben wird.

Genotyp von EGY48: *MATα, ura3, his3, trp1, LexA<sub>op(x6)</sub>-Leu2*. als Reporter dient bei diesem Stamm das *LEU2* Gen, als Transformationsmarker dienen *his3*, *trp1* und *ura3*.

Für das Yeast One Hybrid System wurde der Hefestamm YM4271 (LIU *et al.*, 1993) eingesetzt.

Genotyp von YM4271: *MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *lys2-801*, *ade2-101*, *ade5*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *tyr1-501*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *ade5* : : *hisG*. Als Transformationsmarker dienen hier *his3* und *trp1*.

### **VIII.13 Zelllinien**

Die mit einer ACC-Nummer gekennzeichneten Zelllinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ; <http://www.dsmz.de>) erworben.

#### ***K562*** (LOZZIO *et al.*, 1973; ACC 10)

Bei diesen Zellen handelt es sich um eine humane chronisch myeloische Leukämie-Zelllinie. Sie besitzt ein Philadelphia-Chromosom resultierend aus einer t(9;22)(q34;q11) und exprimiert das M-BCR-ABL Fusionsgen mit einer Fusion von BCR-Exon b3 und ABL-Exon a2 (M-BCR/ABL für Major Breakpoint Cluster Region).

Die in Suspension wachsenden Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS kultiviert.

#### ***Daudi*** (KLEIN *et al.*, 1968; ACC 78)

Diese Zelllinie wurde 1967 aus dem Biopsie-Material eines Burkitt-Lymphoms etabliert. Die Zellen exprimieren das Proto-Onkogen BCL-2, wachsen in Suspension und wurden in RPMI mit 10% FCS kultiviert.

#### ***Kasumi-1*** (ASOU *et al.*, 1991 ; ACC220)

Kasumi-1 wurde aus einer akuten myeloischen Leukämie des Subtyps M2 etabliert. Die Zellen exprimieren das ETO-AML1-Fusionsgen aufgrund einer Translokation t(8;21)(q22;q22). Die Suspensionskulturen wurden in RPMI mit 10% FCS gezüchtet.

#### ***Jurkat*** (SCHNEIDER *et al.*, 1977; ACC 282)

Bei dieser Suspensionszelllinie handelt es sich um eine humane T-Zell Leukämielinie. Sie wurde ebenfalls in RPMI mit 10% FCS kultiviert.

#### ***Mutz-1*** (STEUBE *et al.*, 1997; ACC13)

Mutz-1 wurde aus einer Patientin mit MDS und Fanconi-Anämie etabliert. Sie wächst in Suspension in RPMI-Medium mit 10% FCS.

#### ***293T***

293T ist eine humane embryonale Nierenzelllinie die für Transfektionsassays Verwendung gefunden hat. Aufgrund der Expression des large T-Antigens in den Zellen, können Plasmide mit einem SV40 Replikationsursprung transient transfiziert werden und ergeben hohe Expressionsniveaus. Die Zelllinie wurde uns von PD Dr. R. Slany, Erlangen, zur

Verfügung gestellt. Diese semiadhärenten Zellen wachsen als Monolayer in DMEM mit 10% FCS.

***KMST6*** (NAMBA *et al.*, 1985)

KMST-6 ist eine nicht tumorigene immortalisierte humane Fibroblasten Zelllinie, die aus normalen embryonalen Fibroblasten durch  $\gamma$ -Bestrahlung erzeugt wurde. Die Zellen wurden uns von der Firma CellGenix (Freiburg) zur Verfügung gestellt.

Die als Monolayer adhärent wachsenden Zellen wurden in Eagle's Medium mit 10% FCS kultiviert.

## **VIII.14     Antikörper**

***GRAF-Antikörper:***

Gegen Aminosäuren 677-692 des humanen GRAF Proteins wurde in Hasen von der Firma Eurogentec ein polyklonales Antiserum erzeugt, das in Western Blots in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde.

***FBP17-Antikörper:***

Zum direkten Nachweis von FBP17 in Western Blots diente ein polyklonales Antiserum erzeugt in Hasen. Die Produktion des Antiserums, gerichtet gegen Aminosäuren 194-207 des humanen FBP17 Proteins, erfolgte bei der Firma Eurogentec. Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

***Antikörper gegen markierte Proteine:***

Zur Detektion Peptid-markierter Proteine und für Immunopräzipitationen wurden folgende Antikörper eingesetzt:

***c-MYC Antikörper:***

Hierbei handelte es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper (Klon9E10) der Firma Clontech. Er erkennt Aminosäuren 410-419 des humanen p62-c-MYC Proteins. Im Western Blot wurde dieser Antikörper in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt, für Immunopräzipitationen gekoppelt an Protein A Agarose Beads (Clontech).

***anti-FLAG M2-Antikörper:***

Dieser Antikörper wurde zur Detektion von FLAG-markierten Proteinen eingesetzt. Es handelt sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper der Firma Stratagene gegen das synthetische FLAG-Epitop (NH<sub>2</sub>-DYKDDDDK-COOH), der in Western Blots in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt wurde.

*GFP-Antikörper:*

GFP-Fusionsproteine wurden mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers der Firma Invitrogen gegen in *E.coli* exprimiertes GFP nachgewiesen. Der in Hasen erzeugte Antikörper wurde in Western Blots in der Verdünnung 1:5000 verwendet.

*HA-Antikörper:*

HA-Fusionsproteine wurden mit einem polyklonalen Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology detektiert. Der in Hasen generierte Antikörper wurde in der Verdünnung 1:500 bei Western Blots eingesetzt.

*Sekundäre Antikörper:*

Als sekundäre Antikörper im Western Blot wurden Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierte, in Ziegen erzeugte Antikörper der Firmen Santa Cruz und Sigma eingesetzt (goat-anti-mouse IgG-HRP; goat-anti-rabbit IgG-HRP). Die Verdünnung betrug jeweils 1:5000.

**VIII.15 PCR-Primer und TaqMan-Sonden***Primer zur Klonierung von Promotor-Fragmenten:*

Zur Klonierung von Promotor-Fragmenten in pGL3-Basic wurden Sense-Primer mit einer Bgl II-Schnittstelle (5'-GCA AGA TCT ...-3') verwendet. Die Antisense-Primer trugen eine Hind III-Schnittstelle (5'-GCA AAG CTT ...-3').

| sense      | Sequenz (5' → 3')             | anti-sense    | Sequenz (5' → 3')              |
|------------|-------------------------------|---------------|--------------------------------|
| <b>205</b> | GAACAGCAGCACCTCGGCCGGGTCCGAGC | <b>1074</b>   | GCCGCTCGAACCTGCTAGCGATG        |
| <b>287</b> | CTGTTATTAAATGCCAGCCACTGTGCTAG | <b>1334</b>   | TGGCTCACTCCGCGCGCGGTGT         |
| <b>365</b> | GAGGCTGCTGTGAGAGGGCGCTCGAGG   | <b>1361</b>   | ACGGCCGCCGGCTCCACAGGTGT        |
| <b>395</b> | CGAGCGGCCAGACACCGGCGGGGCGG    | <b>365</b>    | CCTCGAGCGCCCTCTCACAGCAGCCTC    |
| <b>445</b> | GGAGGGTGCGCTGATTGGCCCGGCGGG   | <b>395</b>    | CCCCGCCGGTGTCTGGGCCGCTCG       |
| <b>467</b> | TCTAGTAATGATGTGAGCTCCTTCGGC   | <b>406</b>    | GTGTCTGGGCCGCTCGAACCTGCTACG    |
| <b>500</b> | GGATCAAGACCGCGGAAGGCCGGGCGTCC | <b>419</b>    | GCTCGAACCTGCTAGCGATGAATTAATCC  |
| <b>504</b> | GTGGGCGGGTTCTGAGCAGGAGTGCC    | <b>426</b>    | GCTAGCGATGAATTAATCCCCGCCGG     |
| <b>523</b> | CCTGCCTCCAGGCCCTTTGATTG       | <b>463</b>    | CCTCCCCTGCCCGACCCTCAGGC        |
| <b>534</b> | CAGCCGCAGACCCTGCCTCCAG        | <b>500</b>    | GGACGCCCCGCCCTTCCGCGGTCTTGATCC |
| <b>545</b> | GGCCACGCCCCAGCCGAGACCCTGC     | <b>75</b>     | GCGGGACCCCGCCGGCTCCCCGACGGCC   |
| <b>576</b> | GAGTTTGCGCTGCGGACCTAGGCGTTGG  | <b>75 alt</b> | GCGGGGCCCCGCGCGGTCCCCGACGGCC   |
| <b>779</b> | CAGGCGGTGGTGAAATGCAGCCCTAG    | <b>83</b>     | CCGGCCGGCTCCCCGACGCCGCGGCTCC   |
| <b>986</b> | ACCGTGGGCGGGTTCTGAGCAGGAGTG   | <b>96</b>     | CCGACGGCCCGCGGTCCACAGGTGTGGCGC |

**Primer zur Klonierung von GRAF:**

Zur Klonierung in pLexA:

GRAF Start EcoRI neu II: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGGGGCTCCCAGCGCTC-3'

GRAF Stop Not I: 5'-GCAGCGGCCGCTTAGAGGAACTCCACGTAATTTTCAGGGATG-3'

Zur Klonierung in pGEX-2T:

GRAF Start BamH I: 5'-GCAGGATCCTGCACCATGGGGCTCCCAGCGCTCGAGTTCAG-3'

GRAF Stop EcoR I: 5'-GCAGAATTCCTTAGAGGAACTCCACGTAATTTTCAGGGATG-3'

Zur Klonierung in pcDNA3.1/D-TOPO mit *myc*-Markierung:GRAF Start myc: 5'-CACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGATGGGGC  
TCCCAGCGCTCGAG-3'

GRAF Stop: 5'-TTAGAGGAACTCCACGTAATTTTCAGGGATG-3'

Zur Klonierung in pDsRed-N1:

GRAF Start EcoRI neu II: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGGGGCTCCCAGCGCTC-3'

GRAF Ende BamH I: 5'-GCAGGATCCCGGAGGAACTCCACGTAATTTTCAGG-3'

**Primer zur Mutagenese von GRAF:**

Stop 1611: 5'-GTGTTTGGACCCACTTAACTGTGACTGAGGCCTCAG-3'

**Sequenzierungsprimer für GRAF:**

| sense         | Sequenz 5'→3'                      | antisense         | Sequenz 5'→3'                           |
|---------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------|
| GRAF Start    | GCACCATGGGGCTCCCAGCGCTC            | Stig 16B do       | AATTTGTTGGTCTTGTCAGCTCTGCTTCG TGCG      |
| Stig 12B      | ATTCATCAAGGAGCTCATCAAGG ACGGGAAG   | Stig 18A do       | GGCATTCTCAATCATCCGTATCCGTTTCATC         |
| U seq 474 up  | GAATCTCAGCTTCAGGAGGCAG             | Stig 20 int do    | GTGTTCTGTATGCTAATGGTTAACTGTGTC          |
| Stig 6 int up | AGATGTTTGAGTTGTGGAGCCC CTGCTGG     | Graf 1400 do      | TGAAACTGGTACATCATGAGTGGTCCTGG           |
| U seq 866 up  | CTACTGTACATATCAACGGGATTCC          | Ex/Ex ext do 1620 | TCAGCAGAGTGGGTCCAAACACCACACCA AGG       |
| U seq 1154 up | GCAGTTGGACAGCATTGGCTTCAG           | AF5 int do        | AGCTGGGCATTGGTGAGAGGCATATCGGG CACGGTGTT |
| g6 up         | TGCTTCTGAGACAGAAACAGATAT CTGTGCTG  |                   |                                         |
| AF5-4 int up  | ACATTGTCATTGAGATCCTAATAG AAAACCACG |                   |                                         |
| U seq 1998 up | CCGAATCCAAGCCCAACTTCAC             |                   |                                         |

**Primer zur Klonierung von FBPI7:**

Rekombinationsprimer zur Klonierung in pLexA:

LexA+KIA554 up: 5'-GTTATTCGCAACGGCGACTGGCTGGAATTCTGCACCAGGAGCTGCG  
AGCCGGAGGAGGCC-3'LexA+KIA554 do: 5'-CGAGCGGCCGCCATGGTCGACGGATCCCCGGCTTTGGCATTTCATGTC  
CAAACAGACT-3'

Zur Klonierung in pcDNA3.1/D-TOPO mit *myc*-Markierung:

FBP17 Start *myc* (F1): 5'-CACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAGGAGCTGC  
GAGCCGGAGGAGG-3'

FBP17 up 2 *myc* (F2): 5'-CACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGGAGAGTCC  
ATGAAGACATATGCAG-3'

FBP17 Stop (R1): 5'-CTAGGAATCTTTGGCATT TTTGTCCAAACAG-3'

FBP17 do 2 Stop (R2): 5'-CTAGTCCTGGGCGCAGTTGTTGACTGTG-3'

FBP17 do 3 Stop (R3): 5'-CTATGAAAGGCTGTTATCTGACACAGTGCG-3'

Zur Klonierung in pDsRed-N1:

KIA up EcoR I neu: 5'-GCAGAATTCTGCACCATGAGGAGCTGCGAGCCGGAGGAGGCC-3'

FBP17 Ende BamH I: 5'-GCAGGATCCCCGGAATCTTTGGCATT TTTGTCCAAACAGAC-3'

### **Sequenzierungsprimer für FBP17:**

| sense              | Sequenz 5' → 3'            | antisense     | Sequenz 5' → 3'             |
|--------------------|----------------------------|---------------|-----------------------------|
| KIA seq up 159     | CTCTGGGATCAGTTTGACAACCTTAG | KIA1 down int | GCATAGCTGAGTTCAATCTCTGTCC   |
| KIA seq up 929     | GTAAAAGCAGCCGAATCAATTGATC  | FBP17<br>do 2 | GTCCTGGGCGCAGTTGTTGACTGTG   |
| KIA seq up<br>1602 | CTGGCTGGCTGAGGTTGAAGGCC    | FBP17<br>do 3 | TGAAAGGCTGTTATCTGACACAGTGCG |
| FBP17 up 2         | GGAGAGTCCATGAAGACATATGCAG  |               |                             |

### **Primer zur Klonierung der Rho-Familienmitglieder:**

Bei einigen GTPasen war die Auswahl von externen Primern für eine Nested- oder Semಿನested-PCR möglich.

#### ***RhoA* (GenBank Accession L25080)**

RhoA up EcoR I: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGGCTGCCATCCGGAAGAACTGGTG-3'

RhoA do Not I: 5'-GCACGCCGGCGTCACAAGACAAGGCAACCAGATTTTTTC-3'

#### ***RhoB* (GenBank Accession NM\_004040)**

RhoB do ex: 5'-TCTAGCACCTTGCAGCAGTTGATGCAG-3'

Rho B up EcoR I: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGGCGGCCATCCGCAAGAAGCTG-3'

RhoB up Xho I: 5'-GCACTCGAGGTAGTCGTAGGCTTGGATG-3'

#### ***RhoC* (GenBank Accession NM\_005167)**

RhoC up ex: 5'-CTCTCTTCCTGCAGCCTGGGAACCTTCAG-3'

RhoC do ex: 5'-CAGTATGGAGCCCTCAGGAGGCTG-3'

RhoC up EcoR I: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGGCTGCAATCCGAAAGAAGCTGGTG-3'

RhoC do Xho I: 5'-GCACTCGAGTCAGAGAATGGGACAGCCCCTCCGACG-3'

#### ***RhoG* (GenBank Accession NM\_001665)**

RhoG up ex: 5'-GAGGCACTCCT CACTACAGCAACTG-3'

RhoG do ex: 5'-GTCCTTAAGGCACAGCTGAGGCGGACAAG-3'

RhoG up EcoR I: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGCAGAGCATCAAGTGCGTGGTGGTG-3'

RhoG do Xho I: 5'-GCACTCGAGTCACAAGAGGATGCAGGACCGCCACG-3'

*cdc42 (GenBank Accession NM\_001791)*

cdc42 up ex: 5'-GAGAAGCTGAGGTCATCATCAGATTTG-3'  
 cdc42 do ex: 5'-GTATGATGCCGACACCAGCTGTGCAGAAAGG-3'  
 cdc42 up EcoR I: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGCAGACAATTAAGTGTGTTGTTGTGG-3'  
 cdc42 do Xho I: 5'-GCACTCGAGTCATAGCAGCACACACCTGCGGCTCTTC-3'

*TTF (GenBank Accession NM\_004310)*

TTF up ex: 5'-GTGTGCTGCAGCTGCCCACTGAG-3'  
 TTF do ex: 5'-GTGCATACATAAGTGTGTGTGAAG-3'  
 TTF up EcoR I: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGCTGGAGTTCCATCAAGTGCCTGTTG-3'  
 TTF do Xho I: 5'-GCACTCGAGTTAGAAATCTTGCATCATTGATGGAG-3'

*Rac1 (GenBank Accession NM\_006908)*

Rac1 up EcoR I: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGCAGGCCATCAAGTGTGTGGTGGTG-3'  
 Rac 1 do Xho I: 5'-GCACTCGAGTTACAACAGCAGGCATTTTCTCTTCCTC-3'

*Rac2 (GenBank Accession NM\_002872)*

Rac 2 do ex: 5'-GACCCATCTAGGTGGGAGCGCTG-3'  
 Rac2 up EcoR I: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGCAGGCCATCAAGTGTGTGGTG-3'  
 Rac2 do Xho I: 5'-GCACTCGAGCTAGAGGAGGCTGCAGGCGCG-3'

***Primer zur Klonierung von Formin (GenBank Accession NM\_010230):***

Die mit FBPs interagierende Domäne murinen Formins wurde mittels Seminested-PCR amplifiziert:

Formin kurz up EcoR I: 5'-GCAGAATTCGGCACCATGCTGCAGGCTCAGTTTGAAGTCAAGAC-3'  
 Formin kurz ex do: 5'-AATATGAGGCTCTTCTAAGGAGTC-3'  
 Formin kurz int do XhoI: 5'-GCACTCGAGGGGTATTCTGGTCCAATACAAAGG-3'

***Primer zur Klonierung von p53 in pDsRed-N1:***

p53 up EcoR I: 5'-GCAGAATTCGCACCATGCCTGTCACCGAGACCCCTGGGCC-3'  
 p53 Ende BamH I: 5'-GCAGGATCCTCTGAGTCAGGCCCCACTTTCTTGAC-3'

***Identifikationsprimer für pB42AD:***

ID pB42 up: 5'-CCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGG-3'  
 ID pB42 do: 5'-CATAAGGGTAGGAGGCATCTCCACTCAG-3'

***Primer zur Amplifikation und Klonierung von pB42AD-Inserts:***

Uni pB42 up EcoR I: 5'-GCCACCATGCTGCCAGATTATGCCTCTCCCGAATTC-3'  
 Uni pB42 do Xba I: 5'-GCATCTAGATCATAAATCATAAGAAATTCGCTTATTTAGAAG-3'

***Primer zur Klonierung der TNKS-Deletionsmutanten mit FLAG-Markierung in pcDNA3.1D:***

TNKS up FLAG: 5'-CACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGAATTCGCGGCCGCG  
 TCGACTGTTG-3'  
 TNKS do 1300 Stop: 5'-TTAACTCAGAATCTGCTGCACTGCTTC-3'  
 TNKS up 1300 FLAG: 5'-CACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGAGAGTACACCTAT  
 ACGTACTTC-3'

**Primer zur Klonierung von FAK2 mit HA-Markierung in pcDNA3.1D:**

FAK2 wurde mit Hilfe einer Nested-PCR und zusätzlichen internen Primern amplifiziert.

|                 |                                                                         |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|
| FAK2 ex up:     | 5'-GACTGCAATGTGCCGATCTTAG-3'                                            |
| FAK2 ex do:     | 5'-CAAAGTGGCAAGGGAAGGTGACTC-3'                                          |
| FAK2 int up HA: | 5'-CACCATGTACCCTTATGATGTGCCAGATTATGCCTCTATGTCTGGGG<br>TGTCCGAGCCCCTG-3' |
| FAK2 int do:    | 5'-TCACTCTGCAGGTGGGTGGGCCAG-3'                                          |
| FAK2 1621 up:   | 5'-CTCGACCACCCGCACATCGTGAAGC-3'                                         |
| FAK2 1652 do:   | 5'-CAGGTGGGCTCCTCTTCAATGATGC-3'                                         |

**Plasmid-Sequenzierungsprimer:**

| Name              | Sequenz 5' → 3' bzw. Hersteller |
|-------------------|---------------------------------|
| T7                | New England Biolabs             |
| T3                | New England Biolabs             |
| SP6               | New England Biolabs             |
| M13 forward       | New England Biolabs             |
| M13 reverse       | New England Biolabs             |
| GFP forward       | Invitrogen                      |
| BGH reverse       | Invitrogen                      |
| pLexA seq up 2072 | GTCAGCAGAGCTTCACCATTGAAG        |
| pLexA seq do 2310 | CAGGAAAGAGTTACTCAAGAACAAG       |
| pB42 seq up 773   | GGATGTTAACGATACCAGCCTCTTGC      |
| pB42 seq do 931   | GGTAGACAAGCCGACAACCTTGATTGG     |
| DsRed seq up      | CCATTGACGCAAATGGCC              |
| DsRed seq do neu  | CTCGATCTCGAACTCGTGGC            |

**TaqMan-Primer und Sonden:**

TaqMan-Primer und Sonde für GRAF:

|                      |                                        |
|----------------------|----------------------------------------|
| GR.Gen-1662F:        | 5'-CAGAACATTGTCATTGAGATCCTAATAGA-3'    |
| GR.Gen-1743R:        | 5'-GGGCATTGGTGAGAGGCATA-3'             |
| Sonde: GR.Gen-1692T: | 5'-AACCACGAAAAGATATTTAACACCGTGCCCGA-3' |

TaqMan-Primer und Sonde für ABL:

|                     |                                 |
|---------------------|---------------------------------|
| ABL-F:              | 5'-CAACACTGCTTCTGATGGCAA-3'     |
| ABL-R:              | 5'-CGGCCACCGTTGAATGAT-3'        |
| Sonde: ABL-T-Sonde: | 5'-CAACACCCTGGCCGAGTTGGTTCAT-3' |