

Maike Rehage

Identifikation und Charakterisierung der
nukleären Funktion und DNA-Interaktion von
RGS2 in myeloischen Zellen

2011

Biochemie

Identifikation und Charakterisierung der nukleären Funktion und
DNA-Interaktion von RGS2 in myeloischen Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Maike Rehage
aus Georgsmarienhütte
2011

Dekan	Univ.-Prof. Dr. Andreas Hensel
Erster Gutachter	Univ.-Prof. Dr. K.-H. Klempnauer
Zweiter Gutachter	Univ.-Prof. Dr. H. Serve
Tag der mündlichen Prüfung	21.10.2011
Tag der Promotion	21.10.2011

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Die akute myeloische Leukämie	3
2.1.1 Genetische Aberrationen in der AML.....	6
2.2 Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese	8
2.3 C/EBPα	13
2.4 G-Protein vermittelte Signalwege	17
2.4.1 G-Proteine und G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	17
2.4.2 RGS-Proteine	21
2.4.3 RGS2	25
2.4.3.1 Nukleäre Lokalisation von RGS2.....	30
3 PROBLEMSTELLUNG	31
4 MATERIAL UND METHODEN	33
4.1 Materialien	33
4.1.1 Geräte	33
4.1.2 Computerprogramme und Datenbanken.....	34
4.1.3 Kunststoffware und Einwegartikel.....	34
4.1.4 Chemikalien	35
4.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze.....	36
4.1.6 Lösungen und Puffer.....	37
4.1.7 Enzyme und Kits	37
4.1.8 Antikörper.....	38
4.1.9 Oligonukleotide.....	39

4.2 Arbeit mit prokaryotischen Zellen.....	43
4.2.1 Plasmide	43
4.2.2 Nährmedien für die Kultivierung prokaryotischer Zellen	45
4.2.3 Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentrationen	47
4.2.4 Anlegen von Glycerol-Gefrierkulturen aus Bakterien.....	47
4.2.5 Wachstumsbedingungen und Zellernte.....	47
4.2.6 Herstellung chemokompetenter Escherichia coli Zellen (DH5 α).....	48
4.2.7 Transformation chemokompetenter Escherichia coli Zellen (DH5 α)	48
4.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	49
4.3.1 Zelllinien	49
4.3.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	50
4.3.3 Bestimmung der Zahl vitaler Zellen	50
4.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	51
4.3.5 Verschiedene Methoden zur Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	51
4.3.6 Luciferase-Assay.....	52
4.3.7 Klonales Wachstum in Methylzellulose („Kolonie Assay“)	53
4.3.8 Immunfluoreszenz-Mikroskopie	54
4.3.9 Klonierung eines Baculovirus-Konstruktes und Generierung des	
rekombinanten Baculovirus.....	55
4.4 Molekularbiologische Methoden.....	59
4.4.1 Restriktionsspaltung von Plasmiden	59
4.4.2 Ligation.....	60
4.4.3 Einsatz von DNA-Polymerase I zur Herstellung von glatten Enden	60
4.4.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	60
4.4.5 Phenol-Chloroform Extraktion von DNA.....	61
4.4.6 Isolation von RNA	62
4.4.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	63
4.4.8 Herstellung von cDNA (Reverse Transkription).....	63
4.4.9 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	64
4.4.10 Ortsspezifische Mutagenese („QuikChange“)	65
4.4.11 Quantitative Echtzeit-PCR (Taqman).....	68
4.4.12 DNA-Sequenzierung	69
4.4.13 Agarose-Gelelektrophorese	70
4.4.14 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen.....	71

4.5	Proteinbiochemische Methoden	71
4.5.1	Erstellung von Proteinlysaten	71
4.5.2	Zellfraktionierung	72
4.5.3	Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Test)	74
4.5.4	SDS-PAGE.....	74
4.5.5	Coomassiefärbung von SDS–Gelen	75
4.5.6	Immuno-Blot (Western Blot).....	76
4.5.7	Entfernen gebundener Antikörper von Membranen	76
4.5.8	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	77
4.5.9	GST-Pulldown	78
4.5.10	Co-Immunopräzipitation	79
4.5.11	Chromatin-Immunopräzipitation	80
4.5.12	DNA-Bindungs-Assays	83
4.5.13	DNA-Bindungsstellen-Selektion.....	84
4.5.14	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).....	88
4.5.15	ABCD-Assay (avidin-biotin complex DNA-binding assay)	92
5	ERGEBNISSE	95
5.1	RGS2 ist ein nukleäres Protein	95
5.2	RGS2 ist ein DNA-bindendes Protein	98
5.3	RGS2 bindet an eine Signalsequenz im Foxa2 Promotor	101
5.4	RGS2 bindet an den C/EBPα-Promotor	108
5.5	Interaktion von RGS2 und C/EBPα	115
5.6	Funktionelle Charakterisierung einzelner Regionen von RGS2	116
5.6.1	Subzelluläre Lokalisation trunkierter RGS2 Mutanten	118
5.6.2	DNA Bindungsfähigkeit trunkierter RGS2 Mutanten	120
5.6.3	Bindung und Aktivierung des C/EBP α -Promotors durch trunkierte RGS2 Mutanten	121
5.6.4	Interaktion der trunkierten RGS2 Mutanten mit C/EBP α	124
5.6.5	Einfluss der verschiedenen RGS2-Deletionsmutanten auf das Flt3-ITD..... vermittelte klonale Wachstum in Methylzellulose.....	127

5.6.6	Zusammenfassung der untersuchten Eigenschaften der RGS2-Deletionsmutanten	128
6	DISKUSSION.....	129
6.1	RGS2 ist ein nukleäres Protein	129
6.2	RGS2 ist ein DNA-bindendes Protein.....	133
6.2.1	RGS2 bindet an eine Zielsequenz im Foxa2-Promotor.....	136
6.2.2	RGS2 bindet an eine Zielsequenz im C/EBP α -Promotor und interagiert mit C/EBP α	139
6.3	Charakterisierung funktionell wichtiger Bereiche von RGS2	144
6.4	Ausblick	155
7	LITERATUR.....	159

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg	10 ⁻⁶ Gramm
µC	mikro Curie
µl	10 ⁻⁶ Liter
µmol	10 ⁻⁶ Mol
µM (µmol/l)	10 ⁻⁶ Mol/Liter
Abb.	Abbildung
ABCD-Assay	avidin-biotin complex DNA-binding assay
AML	akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CSF	Colony stimulating factor
CLP	Lymphoide Progenitorzelle (common lymphoid progenitor)
CMP	myeloide Progenitorzelle (common myeloid progenitor)
D	Aspartat
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonate
del	Deletion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E.coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced chemiluminiscence

EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGFP	grün fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FAB	French-American-British
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell scan)
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	FLT3-Ligand
FLK	fetal liver kinase
FLT 3	fms-like tyrosine kinase 3
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAM	Goat anti-mouse
GAR	Goat anti-rabbit
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin nucleotide exchange factor
GMP	Granulocyten-Macrophagen Progenitor Zelle
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GST	Gluthation-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	human / Stunde
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxydase)
HSC	Hematopoietic Stem Cell (Hämatopoetische Stammzelle)
I	Isoleucin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified dulbecco's medium
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITD	interne tandem Duplikation (internal tandem duplication)
JMD	juxtamembranäre Domäne

kb	Kilobase(n), 1000 Basenpaare
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LT-HSC	Langzeit-repopuierende hämatopoetische Stammzelle
M	Methionin
mM (mmol/l)	10^{-3} Mol/Liter
MEP	Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitor Zelle
min	Minute(n)
MPP	Multipotente Progenitor Zelle (multipotential progenitor)
mRNA	messenger-RNA
ng	10^{-9} Gramm, Nanogramm
nm	10^{-9} Meter, Nanometer
nM	(nmol/l) 10^{-9} Mol/Liter
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NLS	Nukleäres Lokalisations Signal
OD	optische Dichte
P	Phosphor
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
pH	pondus Hydrogenii (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration)
PIP2	Phosphatidylinositol bisphosphate
PI3-K	Phosphoinositol 3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY	Phosphotyrosin
R	Arginin
RGS	Regulator of G-Protein Signaling
RIPA	Radioimmunoprecipitation-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)

RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
ST-HSC	Kurzzeit-repopulierende hämatopoetische Stammzelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TKD	Tyrosinkinasedomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (unit)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
V	Volt
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

1 ZUSAMMENFASSUNG

RGS2 gehört zur Familie der „Regulator of G-Protein Signaling“ Proteine (RGS-Proteine). Die bislang etwa dreißig identifizierten Mitglieder dieser Familie sind durch das Vorhandensein einer konservierten RGS-Domäne, mit der sie an aktivierte G α Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine binden und deren intrinsische GTPase-Aktivität verstärken, gekennzeichnet. RGS2 gilt außerdem als mutmaßliches basic Helix-Loop-Helix Protein und könnte somit transkriptionsregulierende Eigenschaften besitzen.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von RGS2 bei Vorhandensein von internen Tandemduplikationen in der juxtamembranären Domäne der Rezeptortyrosinkinase Flt3 (Flt3-ITD Mutationen) reprimiert wird. Flt3-ITD Mutationen sind eine der häufigsten Mutationen in der AML und treten bei etwa 25% der AML-Patienten auf. Weitergehende Untersuchungen an 32D Zellen zeigten, dass RGS2 eine antagonisierende Wirkung auf die durch Flt3-ITD induzierte Transformation sowie auf einige der dabei induzierten Signalwege hat. Des Weiteren konnte die Koexpression von RGS2 den durch Flt3-ITD verursachten Differenzierungsblock aufheben und die Expression von C/EBP α wiederherstellen. Ferner spielt RGS2 eine bedeutende Rolle in der myeloischen Differenzierung, denn während der granulozytären Differenzierung myeloischer Zelllinien kommt es zu einer deutlichen Induktion von RGS2 (Schwable et al. 2005).

Interessanterweise zeigt RGS2 eine vornehmlich nukleäre Lokalisation. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konzentrierten sich darauf, eine mögliche nukleäre Funktion von RGS2 zu identifizieren. Nachdem zunächst eine generelle Fähigkeit der Bindung an DNA gezeigt werden konnte, wurde anschließend durch eine Bindungsstellen-Selektion mit einer DNA-Oligo-Bibliothek nach spezifischen DNA Zielsequenzen von RGS2 gesucht. Dabei konnten eine Sequenz aus dem Foxa2 Promotor sowie diverse E-Box Motive als potentielle Bindestellen von RGS2 identifiziert werden. Die Bindung von RGS2 an die Foxa2 Sequenz wurde mittels Dot Blot Assays und Gel Shifts bestätigt. Des Weiteren zeigte sich eine Induktion von Foxa2 in Folge der RGS2 Expression sowie während der granulozytären Differenzierung von NB4 Zellen. Chromatin-IPs, Gel Shifts sowie ABCD-Assays bestätigten die Bindung von RGS2 an ein E-Box Motiv im C/EBP α -Promotor. Übereinstimmend damit konnte in Luziferase-Assays eine Aktivierung des C/EBP α -Promotors durch RGS2 gezeigt werden.

Um die Domänen von RGS2 zu charakterisieren, welche die nukleäre Lokalisation, DNA-Bindung und Interaktionen mit C/EBP α sowie dessen Promotor vermitteln, wurden

verschiedene RGS2-Deletionskonstrukte verwendet. Dabei zeigte sich eine essentielle Rolle des N-Terminus von RGS2 für diese Funktionen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die bedeutende Rolle von RGS2 in der Transformation und Differenzierung myeloischer Zellen wesentlich auf einer bislang unbekannt nukleären Funktion des Proteins als Regulator myeloischer Transkriptionsfaktoren basiert.

2 EINLEITUNG

2.1 Die akute myeloische Leukämie

Die Bezeichnung „Leukämie“ (weißes Blut) wurde im Jahre 1844 von Rudolf Virchow geprägt, der bei einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie eine erhebliche Vermehrung der weißen Blutzellen feststellte. Heute werden mit dem Begriff Leukämie die bösartigen Erkrankungen der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) beschrieben. Die normale Blutbildung wird dabei durch die unkontrollierte Proliferation der leukämischen Blasten im Knochenmark verdrängt, was zu einem Verlust reifer und funktionierender Zellen im Blut führt. Klinisch macht sich dies in einer vermehrten Neigung zu Anämien, Blutungen oder Infektionen bemerkbar.

Nach den Differenzierungsmerkmalen der leukämischen Blasten unterscheidet man zwischen myeloischen (ausgehend von Vorstufen der Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten) und lymphatischen (ausgehend von Vorstufen der Lymphozyten) Leukämien. Außerdem wird zwischen der akuten und der chronischen Verlaufsform der Leukämien differenziert. So wird die akute lymphatische Leukämie (ALL) von der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) und die akute myeloische Leukämie (AML) von der chronischen myeloischen Leukämie (CML) unterschieden.

Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine maligne Erkrankung, die durch Reifungsstörung und unkontrollierte Proliferation myeloischer Vorläuferzellen gekennzeichnet ist.

Die Inzidenz der AML beträgt ca. 2,5/100.000 Einwohner und Jahr (Becker 1997). In Deutschland sind Leukämien die neunthäufigste Todesursache bei Männern in den neuen und alten Bundesländern und bei Frauen in den neuen Bundesländern. Bei Frauen aus den alten Bundesländern stehen die Leukämien sogar an siebter Stelle der häufigsten Todesursachen.

Die akute myeloische Leukämie macht ca. 15 bis 20 % der akuten Leukämien im Kindesalter (Bhatia et al. 1995) und 80 % der akuten Leukämien der Erwachsenen aus, wobei sie bei Männern etwas häufiger auftritt als bei Frauen. Das mittlere Alter bei Diagnose einer AML beträgt 63 Jahre, so dass die AML insgesamt als eine Erkrankung des älteren Menschen angesehen werden kann (Wingo et al. 1995).

Eine AML entsteht durch einen Stufenprozess, der aus mehreren genetischen Veränderungen der hämatopoetischen Vorläuferzellen resultiert. Die Folge dieses

Prozesses ist eine Störung der Differenzierung und Ausreifung der Zellen, was dazu führt, dass sich im Knochenmark sowie im peripheren Blut unreife myeloische Zellen ansammeln. Diese leukämischen Zellen haben die Fähigkeit zur Differenzierung in reife hämatopoetische Zellen verloren, jedoch die Möglichkeit zu Teilung und Proliferation behalten. Bei dieser Erkrankung der myeloischen Vorläuferzellen kann ein Reifungsstopp auf unterschiedlichen Ebenen vorliegen, wobei bei einem Infiltrationsgrad unreifer Vorläuferzellen (Blasten) des Knochenmarks ab 20% von einer AML gesprochen wird.

Die Blutbildung ist ein dynamischer, aber stringent regulierter Prozess. Die Regulation erfolgt durch das Zusammenspiel von verschiedenen Wachstumssignalen und Transkriptionsfaktoren, die bestimmte genetische Programme bezüglich Linienspezifität und Differenzierung der Zellen aktivieren. Einige der Gene, die für diese Transkriptionsfaktoren kodieren, sind von den in der AML häufigen chromosomalen Translokationen betroffen, so dass eine ausreichende Kontrolle von Proliferation und Differenzierung der Zellen nicht mehr gewährleistet ist. Wie durch genetische Studien gezeigt wurde, handelt es sich bei der AML um eine klonale Erkrankung, die aus der Transformation einer einzigen Zelle entsteht (McCulloch 1985).

Die Ursachen für die Entstehung einer AML konnten bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden. Bekannt sind jedoch einige Faktoren, die das Risiko für die Entstehung einer AML erhöhen. Hier ist zunächst die dauerhafte Exposition einer Reihe von Chemikalien, wie z.B. Benzol oder Benzolderivate, Ethylenoxide, Pestizide sowie eine Reihe organischer Lösungsmittel zu nennen (Adamson et al. 1981). Des Weiteren erhöhen in der Tumorthherapie verwendete Chemotherapeutika das Risiko, an einer AML zu erkranken. 10 bis 20 % der neu diagnostizierten AML gelten als Therapie - assoziierte, sekundäre AML (Michels et al. 1985). Auch der Konsum von Nikotin geht mit einem 1,2-fach erhöhten Risiko für die Entwicklung einer AML einher (Severson et al. 1990). Ferner besteht ein Zusammenhang zwischen radioaktiver Strahlung und Leukämieerkrankungen (Heyssel et al. 1960; Ishimaru et al. 1979; Pobel et al. 1997). Auch eine Reihe angeborener genetischer Veränderungen wie z.B. die Trisomie 21 (Weinstein 1978) und hämatologische Erkrankungen wie das myelodysplastische Syndrom haben ein erhöhtes Risiko, in eine sekundäre AML überzugehen (Leone et al. 1999).

Die Diagnose der AML wird zunächst auf der Grundlage zytomorphologischer und zytochemischer Untersuchungen an Knochenmark und Blutaussstrichen gestellt. Eine gebräuchliche Einteilung der AML Subtypen erfolgt gemäß der Differenzierungsmerkmale der Blasten nach der FAB (French-American-British) – Klassifikation (Nosslinger et al.

2001; Bennett et al. 2002). Es werden acht verschiedene Subtypen M0 bis M7 unterschieden.

Tabelle 2.1: FAB-Klassifikation der AML-Subtypen

FAB	Subtyp	Morphologie	Zytogenetik*	Izidenz
M 0	AML ohne Ausreifung	Myeloblasten ohne Granula		< 5%
M 1	AML mit minimaler Ausreifung	Myeloblasten +/- Granula	t(9;22)	15 - 20%
M 2	AML mit Ausreifung	Myeloblasten mit Granula, einzelne Myelozyten	t(8;21)	25 - 30%
M 3	Akute Promyelozytenleukämie	Promyelozyten, deutlich granuliert	t(15;17)	5 - 10%
M 4	Akute myelomonozytäre Leukämie	Myeloblasten und Promyelozyten > 20%	Inv/del(16) bei M4eo	20 - 30 %
M 5°	Akute Monoblastenleukämie ohne Ausreifung	Große Monoblasten	t/del(11)	5%
M 5b	Akute Monoblastenleukämie mit Ausreifung	Monoblasten, Promonozyten und Monozyten; Monozytose im peripheren Blut	t(8;16)	5 - 10%
M 6	Akute Erythroleukämie	Megaloblastäre Erythropoese > 50%, Myeloblasten > 30%		5%
M 7	Akute Megakaryoblastenleukämie	Megakaryoblasten		5%

(* = nur häufigste Aberrationen)

Bei undifferenzierten Leukämien kann häufig durch Morphologie und Zytochemie allein keine sichere Diagnose der AML gestellt werden. In diesen Fällen leistet die Immunphänotypisierung eine wichtige Hilfe. Dabei werden auf der Zelloberfläche exprimierte Antigenstrukturen (CD=Cluster of Differentiation) mit Antikörpern mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Typische myeloische Marker sind CD13, CD15, CD33 und bei monozytärer Differenzierung CD14. Durch die Auswahl geeigneter Antikörperkombinationen kann die Differenzierung einer Zelle sowie deren Reife mit großer Sicherheit bestimmt werden. Ferner ist die aberrante Expression von Oberflächenmarkern auf AML-Blasten ein wichtiges Diagnosekriterium.

Ein weiterer wichtiger Grundbaustein der Diagnose ist die Zytogenetik, denn 50 bis 75% der Erwachsenen und 75 bis 85% der Kinder mit AML weisen klonale Chromosomenveränderungen auf (Mrozek et al. 1997). Die Inzidenz der verschiedenen Chromosomenaberrationen ist altersabhängig (Schoch et al. 2001a; Schoch et al. 2001b). Die prognostische Bedeutung einer Karyotypveränderung ist jedoch weitgehend altersunabhängig (Schoch et al. 2004).

Auch Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene können wichtige Hinweise zur Prognoseeinschätzung der AML geben (Mrozek et al. 2007). Hier spielen Mutationen sowie Überexpression bzw. Repression von für die normale Hämatopoese wichtigen Genen eine Rolle.

Im Jahr 2000 wurde die FAB-Klassifikation der AML durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) novelliert (Germing et al. 2000; Vardiman et al. 2002). Dieser neue Vorschlag zur Einteilung der AML berücksichtigt an erster Stelle Kriterien auf der Basis zytogenetischer und molekulargenetischer Befunde. Daneben wird aus der Zytomorphologie das Vorliegen dysplastischer Veränderungen als deskriptiver Parameter verwendet. Zusätzlich werden anamnestische Angaben wie „AML nach vorangehender Myelodysplasie“ oder „Therapie-induzierte AML“ mit einbezogen. Bei der Anzahl der Blasten wird im Knochenmark die Grenze zwischen Myelodysplasie (MDS) und AML von 30 % auf 20 % herabgesetzt (Haferlach et al. 2004). Der Vorschlag dieser neuen Klassifikation trägt der biologischen Heterogenität dieser Erkrankung Rechnung. Seine diagnostische, therapeutische, prognostische und damit auch klinische Relevanz muss in prospektiven Studien überprüft werden.

2.1.1 Genetische Aberrationen in der AML

In der molekularen Pathogenese der AML spielen chromosomale Veränderungen und die Entstehung von Fusionsproteinen eine wichtige Rolle. Durch die Bildung der Fusionsproteine gehen wichtige strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Ausgangsproteine verloren, so dass deren physiologische Funktion in der normalen Hämatopoese verloren geht oder paradox verändert ist.

Zu den chromosomalen Aberrationen gehören Deletionen (5q-, 7q-), Inversionen (inv 3), (inv 16)) sowie spezifische Translokationen (t(8;21) oder t(15;17)). Durch den Expressionsverlust bei Monosomien oder die Beeinträchtigung von wichtigen strukturellen oder funktionellen Anteilen der Ausgangsproteine in einem Fusionsprotein geht die Funktion des betroffenen Proteins für die normale Hämatopoese verloren. Dieser

Funktionsverlust ist ein wesentlicher Schritt bei der Entstehung einer Leukämie (Rowley 1998; Kelly et al. 2002).

Es wurde postuliert, dass zwei unterschiedliche Arten von Mutationen (Klasse I - und Klasse II Mutationen) zur Entstehung einer Leukämie beitragen. Mutationen der Klasse I vermitteln einen Proliferationsvorteil und/oder eine Hemmung der Apoptose, was zu einer klonalen Expansion der entsprechenden hämatopoetischen Vorläuferzellen führt. Klasse II Mutationen hingegen sind für eine Blockade der Differenzierung verantwortlich, führen alleine aber nicht zur Entstehung einer Leukämie (Downing 2003). Liegen Mutation beider Klassen vor, so kann dies zu einer AML führen (Kelly et al. 2002; Frohling et al. 2005).

Klasse I Mutationen betreffen häufig Tyrosinkinasen und führen zu deren konstitutiver Aktivierung sowie zur Aktivierung der untergeordneten Signalwege. Dazu gehören z.B. BCR/ABL, TEL/PDGFR β , N-RAS oder K-RAS Mutationen. Auch aktivierende Mutationen der Rezeptortyrosinkinase FLT3 vermitteln in hämatopoetischen Zellen proliferative Vorteile. Werden diese mutierten Gene der Klasse I alleine exprimiert, führt dies zu einer Erkrankung im Sinne eines myeloproliferativen Syndroms (MPS), die durch Leukozytose mit normaler Reifung und Funktion der Zellen charakterisiert ist.

Klasse II Mutationen resultieren in einem Funktionsverlust von Transkriptionsfaktoren, die die hämatopoetische Differenzierung steuern. Zu dieser Klasse gehören z.B. die Fusionsgene AML1/ETO, CBF β /SMMHC, PML/RAR α und NUP98/HOXA9 sowie Punktmutationen in hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren wie AML1 und C/EBP α . Treten Mutationen der Klasse II alleine auf, so führt dies zur Entstehung einer MDS-ähnlichen Erkrankung (Kelly et al. 2002).

Unabhängig vom Zeitpunkt und der Reihenfolge des Auftretens der Mutationen, kann dies bei Patienten, die beide Mutationsklassen tragen, zur Entstehung einer AML führen.

Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen belegt, die zeigen, dass Mutationen der beiden Klassen öfter gemeinsam bei AML-Patienten vorkommen als jeweils zwei Mutationen derselben Klasse (Schnittger et al. 2006).

Z.B. wurde in mehr als 70% der inv(16)-Fälle ebenfalls eine Mutation in einer Rezeptortyrosinkinase oder in N-RAS oder K-RAS gefunden (Care et al. 2003; Valk et al. 2004; Cammenga et al. 2005; Cairoli et al. 2006).

Fast die Hälfte der AML-Patienten zeigen einen normalen Karyotyp. Innerhalb dieser Gruppe stellen NPM1 mit der Mutation A (48-64%) und die Rezeptortyrosinkinase FLT3 mit der internen Tandemduplikation (ITD; 28-34%) die am häufigsten vertretenen Mutationen dar. Npm1 Mutationen sind positive prognostische Marker, sofern sie nicht

zusammen mit einer FLT3 Mutation auftreten (Dohner et al. 2005; Falini et al. 2005; Schnittger et al. 2005; Suzuki et al. 2005; Verhaak et al. 2005)

FLT3-ITD Mutationen hingegen gehen mit einer ungünstigen Prognose einher (Yokota et al. 1997; Kottaridis et al. 2001; Whitman et al. 2001; Frohling et al. 2002; Thiede et al. 2002).

2.2 Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese

Der Begriff Hämatopoese beschreibt den Vorgang der Blutbildung, bei dem ausgehend von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) alle weiteren Zellen des blutbildenden Systems im Knochenmark und Thymus eines Erwachsenen entstehen. Die Entwicklung der Hämatopoese wird über ein komplexes Netzwerk aus hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren gesteuert (Prosper et al. 2001). Diese Faktoren regulieren die bedarfsgerechte Nachbildung der unterschiedlichen Zellpopulationen, was in einem ersten Schritt über das Anregen der HSC zur Proliferation und Differenzierung erfolgt. Darüber hinaus stimulieren hämatopoetische Wachstumsfaktoren die weitere Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen mit Linienidentität sowie die funktionelle Aktivierung ausgereifter Blutzellen. Diese schrittweise erfolgenden Prozesse der Hämatopoese stehen eng mit der Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren in Verbindung.

Transkriptionsfaktoren sind spezialisierte nukleäre Proteine, mit der Fähigkeit an DNA zu binden und die Transkription ihrer Zielgene von DNA zu mRNA zu steuern. Die meisten Transkriptionsfaktoren besitzen Transaktivator- oder Repressordomänen, außerdem spielen sie im Chromatin-Umbau eine Rolle und erleichtern dadurch den Zugang für weitere Aktivator- sowie Repressorkomplexe an die DNA.

Hämatopoetische Transkriptionsfaktoren sind für die linienspezifische Differenzierung in der normalen Hämatopoese wichtig. Ihre Funktion wird zum einen durch ihre Expression, zum anderen durch Interaktionen mit weiteren Proteinen kontrolliert.

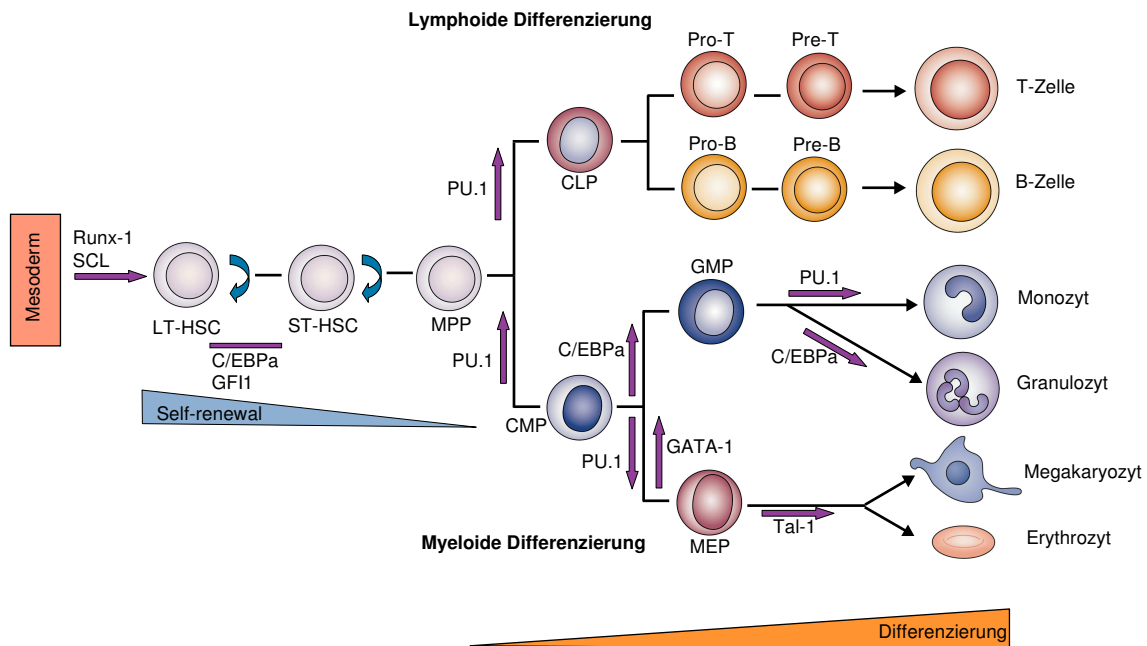


Abbildung 2.1: Die Rolle von Transkriptionsfaktoren in der hämatopoetischen Differenzierung (Tenen 2003)

Langzeit- (LT-HSC) und Kurzzeit-repopulierende (ST-HSC) hämatopoetische Stammzellen vermitteln langfristige (mehr als drei Monate) bzw. kurzfristige Repopulationsfähigkeit in letal bestrahlten Mäusen. T- und B-Zellen entwickeln sich aus gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (CLP). Granulozyten und Makrophagen (GMP) hingegen entstehen genauso wie Megakaryozyten und Erythrozyten (MEP) aus gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CMP). Diese Progenitor-Populationen können durch FACS-Analyse identifiziert und isoliert werden. Die Hochregulation des Transkriptionsfaktors PU.1 ist essentiell für die Entwicklung von CLPs aus HSCs. Die Repression von PU.1 ist hingegen wichtig für die Ausbildung von MEPs. Durch die Induktion von C/EBPα wird der Übergang von CMP zu GMP initiiert. Eine Hypothese ist, dass der Standard-Signalweg die Differenzierung von GMP zu Monozyten und Makrophagen induziert und von der PU.1-Aktivität abhängig ist. Nach diesem Modell greift C/EBPα in diesen Signalweg ein und fördert die Entwicklung von Granulozyten, dies geschieht möglicherweise durch die Inhibierung von PU.1. (Reddy et al. 2002)

Transkriptionsfaktoren mit ihren zelltypspezifischen Expressionsmustern sind Schlüsselkomponenten in der Regulation der myeloischen Differenzierung (Tenen et al. 1997). Jeder Transkriptionsfaktor induziert die Expression von charakteristischen linienspezifischen Zielgenen, wodurch in den Vorläuferzellen ein bestimmtes Differenzierungsprogramm induziert wird. Die Interaktionen zwischen verschiedenen Transkriptionsfaktoren sowie deren Expressionsstärke während kritischer Entwicklungsstadien sind für die jeweilige Entwicklung der Vorläuferzellen essentiell (Rosenbauer et al. 2007). Die Dysregulation von Expression und Aktivität von Transkriptionsfaktoren hingegen spielt bei der Entstehung von Leukämien eine bedeutende Rolle. Kommt es zu einer Störung der Funktion wichtiger Transkriptionsfaktoren, kann dies zur Entstehung einer AML führen. Dies kann z.B. durch die Bildung von

Fusionsproteinen durch chromosomale Translokationen oder durch Punktmutationen geschehen. Deshalb sind Transkriptionsfaktoren potentielle Zielstrukturen für die Therapie von Leukämien sowie weiteren Krebsarten (Tenen 2003).

Die Reifung von hämatopoetischen Vorläuferzellen ist mit zwei fundamentalen Prozessen verbunden, dem Verlust des Potentials zur Selbsterneuerung und der schrittweisen Aneignung einer spezifischen Linienidentität. Diese wechselseitigen Prozesse werden durch konkurrierende genetische Programme kontrolliert. Wenn eine Stammzelle zu differenzieren beginnt, werden Gene, welche die Selbsterneuerung der Zelle vermitteln, abgeschaltet, während Differenzierungsgene angeschaltet werden. Die Bildung von myeloischen Zellen wird durch eine relativ kleine Anzahl an Transkriptionsfaktoren reguliert. Dazu gehören Pu.1, CCAAT/Enhancer binding Proteins (C/EBP α , C/EBP β , C/EBP ϵ) (Yamanaka et al. 1997; Zhang et al. 1997), Growth Factor independent 1 (GFI1) (Hock et al. 2003), und Interferon-Regulatory Factor 8 (IRF8) (Holtschke et al. 1996) sowie auf Stammzell-Ebene runt-related transcription factor 1 (RUNX1) (Okuda et al. 1996) und stem cell leukemia factor (SCL) (Shivdasani et al. 1995) sowie andere Faktoren wie JUNB, Ikaros und Myc (Johansen et al. 2001; Passegue et al. 2001; Yoshida et al. 2006). Die Defekte in der Hämatopoese, die in knockout- Mäusen mit gezielten Deletionen dieser Transkriptionsfaktoren auftreten, sind in den meisten Fällen sehr schwerwiegend, verglichen mit den weniger gravierenden Phänotypen in Mäusen mit Deletionen anderer myeloischer Gene wie z.B. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren. Diese wichtigen Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression vieler myeloischer Gene, wie diejenigen der M-CSF- und G-CSF- sowie GM-CSF- Rezeptoren oder Gene, die für Granula-Komponenten kodieren, wie Laktoferrin und neutrophile Gelatinase.

Während der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu reifen Zellen der unterschiedlichen hämatopoetischen Linien kommt es zu einem stringent regulierten Expressionsmuster der verschiedenen Transkriptionsfaktoren, bei dem deren schrittweise Expression die Ausdifferenzierung in die unterschiedlichen hämatopoetischen Zelltypen steuert (Abbildung 2.1).

Als erstes werden Transkriptionsfaktoren exprimiert, die die Bildung des hämatopoetischen Stammzell-Pools aus frühen Stammzellen des Mesoderms induzieren. Von Bedeutung für diesen frühen Schritt sind SCL und RUNX1. Knockout-Mäuse für diese beiden Faktoren sind embryonal letal und haben nachweislich keine Hämatopoese, was darauf hindeutet, dass diese Transkriptionsfaktoren unverzichtbar für die Generierung fetaler hämatopoetischer Stammzellen sind (Shivdasani et al. 1995; Okuda et al. 1996). Die konditionale Deletion dieser Faktoren in adulten Tieren zeigte jedoch, dass sie für die

Aufrechterhaltung der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark nicht von Bedeutung sind. Ebenso hat die konditionale Deletion von SCL in Stammzellen erwachsener Tiere keinen Einfluss auf das Anwachsen, die Selbsterneuerung und die Differenzierung in myeloische bzw. lymphatische Linien (Mikkola et al. 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass es einen klaren Unterschied zwischen der Funktion hämatopoetischer Transkriptionsfaktoren während der Etablierung gegenüber der Aufrechterhaltung und Expansion des hämatopoetischen Stammzellpools gibt.

Die Bildung des frühen myeloischen transkriptionalen Netzwerkes hängt essentiell von PU.1 ab. PU.1 gehört zur Familie der ETS Transkriptionsfaktoren und wird ausschließlich in Blutzellen exprimiert (Klemsz et al. 1990). Die Deletion von PU.1 in Mäusen führt zu einem letalen Defekt in der fetalen Hämatopoese mit kompletter Abwesenheit von B-Zellen und Makrophagen (Scott et al. 1994; McKercher et al. 1996). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PU.1 die Kapazität zur Repopulation von hämatopoetischen Stammzellen beeinflusst und von Bedeutung für die Entwicklung von CMPs und CLPs ist (Scott et al. 1994; Dakic et al. 2005; Iwasaki et al. 2005). PU.1 wird in verschiedenen hämatopoetischen Linien in unterschiedlicher Stärke exprimiert. So ist der Transkriptionsfaktor in HSCs, CMPs und CLPs wie auch in B-Zellen in mäßiger Stärke nachweisbar, wird jedoch in reifen myeloiden Zellen deutlich stärker exprimiert (Back et al. 2005; Nutt et al. 2005; Rosenbauer et al. 2006). Dagegen wird die PU.1 Expression während der frühen erythrozytären sowie der T-Zell Differenzierung schrittweise herunterreguliert. Dieses dynamische Expressionsmuster entscheidet dabei über das Schicksal, in welche Richtung eine Zelle differenziert. Dabei sind definierte Expressionsstärken von PU.1 für die Differenzierung in unterschiedliche Blutzell-Typen von großer Bedeutung. Die PU.1 Expression steuert die linienspezifische Differenzierung sowohl in myeloischen als auch in lymphatischen Zellen. Unterschiedliche Stärken der PU.1 Expression sind dafür verantwortlich, ob MPPs zu B-Zellen oder Makrophagen differenzieren. Eine niedrige Expression führt zur Entwicklung von B-Zellen, während eine starke Expression die Entwicklung von Makrophagen zur Folge hat (DeKoter et al. 2000). Innerhalb der myeloischen Linie führt eine starke Expression von PU.1 zur Bildung von Makrophagen, während eine schwache PU.1 Expression die Entstehung von Granulozyten zur Folge hat (Dahl et al. 2003; Rosenbauer et al. 2004).

Die PU.1 Expressionsstärke hat also einen kritischen Einfluss auf die Differenzierung myeloischer sowie lymphatischer Progenitoren.

Während PU.1 für die Entstehung von CMPs verantwortlich ist, ist die Expression von C/EBP α für den nächsten Schritt der Differenzierung, die Entwicklung von GMPs aus

CMPs, von Bedeutung. C/EBP α ist ein basic-region Leucine-zipper Transkriptionsfaktor, der im hämatopoetischen System von HSCs, myeloiden Progenitoren und Granulozyten, jedoch nicht von Makrophagen exprimiert wird (Radomska et al. 1998; Akashi et al. 2000).

C/EBP α defiziente Mäuse haben eine normale Anzahl an CMPs, jedoch GMPs und Zellen aller folgenden granulozytärer Stadien fehlen komplett. Die konditionale Deletion von C/EBP α in GMPs hat keinen Einfluss auf die normale Granulopoese *in vitro*, demzufolge ist C/EBP α nicht mehr für die Differenzierung nach dem GMP-Stadium verantwortlich (Zhang et al. 2004).

Zusätzlich zur Rolle in der myeloischen Differenzierung kontrolliert C/EBP α auch die Selbsterneuerung in hämatopoetischen Stammzellen. C/EBP α defiziente HSCs zeigten in einem murinen Transplantationsexperiment erhöhte kompetitive Repopulationsaktivität (Zhang et al. 2004). Genau wie PU.1 reguliert auch C/EBP α die Expression vieler myelo-spezifischer Gene (Tenen et al. 1997), vermittelt aber durch die Kontrolle des Zellzyklus auch eine Wachstumshemmung von Zellen (Johnson 2005).

Die Entscheidung zur Differenzierung in Makrophagen oder Granulozyten wird durch PU.1 und mindestens einen seiner Bindungspartner, dem Interferon- γ -regulatory Factor IRF8, bedingt. Die Expression von IRF8 beschränkt sich auf das hämatopoetische System und wird vor allem in HSCs, B-Zellen, dendritischen Zellen und ruhenden T-Zellen exprimiert (Driggers et al. 1990). In der myeloischen Linie wird IRF8 von Progenitor-Zellen und Makrophagen, jedoch nicht von Granulozyten exprimiert (Tamura et al. 2000). Die Expression von IRF8 wird durch Interferon γ stark induziert und hat einen negativen regulatorischen Einfluss auf IFN-Zielgene. *Irf8*^{-/-} Mäuse entwickeln ein myeloproliferatives Syndrom, welches einer chronischen myeloischen Leukämie ähnelt (Holtschke et al. 1996). Verglichen mit Wildtyp-Mäusen zeigen *Irf8*^{-/-} Mäuse eine deutliche Zunahme der Granulozyten sowie deren Vorläufer und haben weniger Makrophagen. Vermutlich erfolgt die Differenzierung beider Zelltypen aus einer bipotenten Vorläuferzelle (Scheller et al. 1999). Der molekulare Mechanismus, über den IRF8 die myeloische Differenzierung beeinflusst, ist noch nicht genau bekannt.

Wenn der GMP-Status überschritten ist, werden zwei weitere Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung von Granulozyten benötigt: GFI1 und C/EBP ϵ . GFI1 ist ein transkriptioneller Repressor, dessen Expression in HSCs, Neutrophilen sowie frühen B- und T-Zellen, nicht jedoch in erythroiden Zellen detektiert werden kann (Karsunky et al. 2002; Hock et al. 2003; Hock et al. 2006). *Gfi1*^{-/-} Mäuse entwickeln einen schweren Defekt in der Differenzierung lymphoider Progenitoren und besitzen keine neutrophilen Granulozyten. Die Entwicklung früher myeloischer Progenitoren verläuft in diesen Mäusen

normal, während die neutrophile Differenzierung über den Status der Promyelozyten hinaus blockiert ist. Dieser Phänotyp ähnelt dem von C/EBP ϵ -defizienten Mäusen. Zusätzlich zu Störungen in der Funktion von Makrophagen haben auch diese Mäuse über die Stufe der Promyelozyten hinaus eine abnormale Granulopoese (Yamanaka et al. 1997). Ebenso wie das Fehlen von PU.1 und C/EBP α hat auch die Abwesenheit von GFI1 einen Einfluss auf die Biologie der hämatopoetischen Stammzellen (Zeng et al. 2004). Verglichen mit Wildtyp-HSCs zeigen die Stammzellen von Gfi1^{-/-} Mäusen eine reduzierte Fähigkeit zur Selbsterneuerung, was auf einen Effekt von GFI1 auf den Zellyklus zurückzuführen ist (Hock et al. 2004).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine geordnete Expressionsreihenfolge der linienspezifischen Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung von Stammzellen zu reifen myeloischen Zellen erforderlich ist. Einige dieser Transkriptionsfaktoren spielen sowohl in der Kontrolle der Funktion von hämatopoetischen Stammzellen als auch während späterer Schritte in der Myelopoese eine wichtige Rolle.

2.3 C/EBP α

Das Gen, das für den Transkriptionsfaktor CEBPA kodiert, liegt auf dem langen Arm von Chromosom 19 (19q13.1) (Hendricks-Taylor et al. 1992). Es besteht aus einem einzigen Exon, welches sehr CG-reich ist (über 70%), 2783 Basenpaare umfasst und ein aus 356 Aminosäuren zusammengesetztes Protein kodiert (Antonson et al. 1995). Das Protein wurde ursprünglich als Transkriptionsfaktor in der Rattenleber entdeckt, und ihm wurde eine Funktion in der Regulation von Genen in Leber- und Fettzellen zugeschrieben (Cao et al. 1991).

C/EBP α gehört zur Familie der „Leucin-Zipper“- Transkriptionsfaktoren. Das Protein besteht aus zwei Transaktivierungsdomänen, einer Leucin-Zipper-Region, welche die Dimerisierung vermittelt, sowie einer DNA-Bindungsdomäne, die ebenfalls im Bereich der Leucin-Zipper-Region zu finden ist (

Abbildung 2.2).

Die Dimerisierung des Proteins führt zu einer Annäherung basischer Aminosäuren und ist eine notwendige Voraussetzung für die DNA-Bindung.

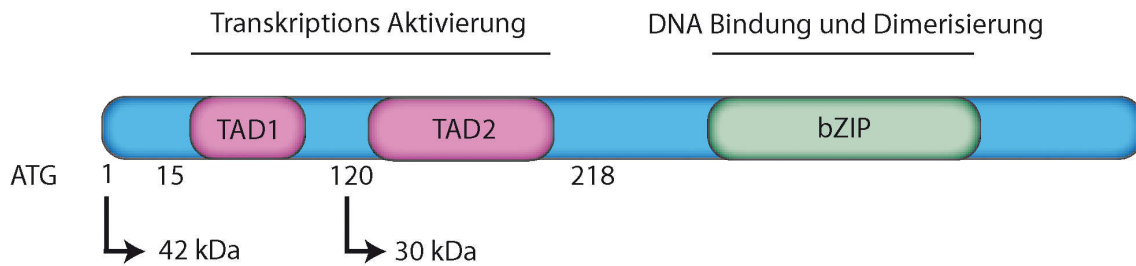


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Protein-Domänen von C/EBP α

C/EBP α besitzt zwei Transaktivierungsdomänen (TAD1 und TAD2) sowie eine bZIP-Domäne, welche die DNA-Bindung und die Heterodimerisierung mit anderen C/EBP-Proteinen vermittelt. Innerhalb der mRNA befinden sich vier potentielle Startcodons, wovon zwei zur Translation der p42 und p30 Isoformen genutzt werden.

Innerhalb der für C/EBP α kodierenden mRNA befinden sich zwei Start-Codons im gleichen Leserahmen. Dies hat die Bildung von zwei unterschiedlichen Isoformen zur Folge. Aufgrund ihrer Größe wird die kürzere Isoform als p30, die längere Isoform als p42 bezeichnet. Beide Isoformen besitzen den gleichen C-Terminus, jedoch fehlen der kürzeren Isoform die ersten 117 Aminosäuren am N-Terminus (Lin et al. 1993). Die Transaktivierungsdomänen, die mit der Translationsmaschinerie interagieren, sind nur in der p42 Isoform enthalten, während die Domänen, welche die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren sowie dem Chromatin-Remodeling-Komplex vermitteln, in beiden Isoformen vorhanden sind (Friedman et al. 1990; Nerlov et al. 1995). Beide Isoformen werden simultan exprimiert und vermutlich ist das Verhältnis zwischen den beiden Formen wichtig für Kontrolle von Proliferation und Differenzierung (Ossipow et al. 1993; Pabst et al. 2001b).

Einer der Hauptunterschiede zwischen den Isoformen liegt darin, dass lediglich die p42 Isoform in der Lage ist, die Zellproliferation zu blockieren. Ebenso hat nur p42 die Fähigkeit, Differenzierung von Adipozyten und Granulozyten zu induzieren. In Zellen kann das p42/p30 Verhältnis durch extrazelluläre Stimuli wie Rapamycin oder Proteinkinase R reguliert werden (Calkhoven et al. 2000). Wachstumsfaktoren und Nährstoffe vermitteln vermehrte Proliferation durch Aktivität der eukaryotischen Translationsinitiatoren eIF2 α /eIF4E (Rosenwald et al. 1993). Hohe Aktivität dieser Faktoren führt zu einer vermehrten Produktion von p30, weil eIF2 α und eIF4E die Translation des kurzen N-terminalen offenen Leserahmens vermitteln. Dadurch wird das Startcodon für p42 nicht erkannt und p30 wird translatiert. Unter nährstoffreichen Bedingungen führt die erhöhte p30 Produktion zu einer Verzögerung der terminalen Differenzierung von Adipozyten und Granulozyten (Calkhoven et al. 2000; D'Alo et al.

2003). Durch die Regulation des p42/p30 Verhältnisses können Zellen also direkt auf die extrazellulären Bedingungen reagieren.

C/EBP α wird in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, wie z.B. in Leberzellen, Fettgewebe, myeloischen Zellen sowie Lungengewebe (Birkenmeier et al. 1989).

C/EBP α ist von großer Bedeutung bei der Regulation der Balance von Zellproliferation und Differenzierung (Umek et al. 1991; Timchenko et al. 1996). So initiiert C/EBP α durch die Induktion von p21 und die Zerstörung des E2F Transkriptionskomplexes während der G1-Phase einen Wachstumsstopp (Timchenko et al. 1999; Porse et al. 2001). Außerdem vermittelt der Transkriptionsfaktor eine Kontrolle des Zellwachstums durch die Interaktion mit den Zyklin-abhängigen Kinasen CDK2 und CDK4 (Wang et al. 2001). Des Weiteren konnte eine direkte Verbindung zwischen dem SWI/SNF Chromatin-Remodelierungskomplex und dem C/EBP α vermittelten Wachstumsstopp gezeigt werden. In Zellen, in denen der SWI/SNF Komplex nicht vorhanden ist, kann C/EBP α keinen Zellzyklusarrest auslösen. Demzufolge scheint eine funktionale Interaktion zwischen SWI/SNF und C/EBP α eine wichtige Voraussetzung für die Kontrolle der Proliferation und die Induktion differenzierungs-assoziiierter Gene zu sein (Pedersen et al. 2001; Muller et al. 2004).

In der Hämatopoese spielt C/EBP α eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Granulozyten (Tenen 2003). Nicht-konditionales gezieltes Ausschalten von C/EBP α führt zu einer frühen Blockade der Reifung von Granulozyten, ohne die anderen hämatopoetischen Linien zu beeinflussen (Zhang et al. 1997). Andere Studien konnten zeigen, dass die Hochregulation der C/EBP α -Funktion zu einer Induktion der granulozytären sowie zu einer Hemmung der monozytären Differenzierung von bipotenten Progenitorzellen führt und auch eine Inhibition des Transkriptionsfaktors PU.1 zur Folge hat (Radomska et al. 1998; Reddy et al. 2002). Eine Schlüsselrolle von C/EBP α in der granulozytären Differenzierung liegt in der Hemmung der E2F Signalwege, die in einer Herunterregulation von c-Myc und einem Proliferationsarrest resultiert (Johansen et al. 2001). In einer Studie von 2005 wird gezeigt, dass die Zerstörung der zellzyklus-regulierenden Funktion von C/EBP α durch Mutationen ausreichend ist, um eine AML-ähnliche Transformation der granulozytären Linie hervorzurufen (Porse et al. 2005). Die intakte Funktion der DNA-Bindung, Transaktivierung und E2F-Interaktion sind für die C/EBP α vermittelte granulozytäre Differenzierung erforderlich.

Die essentielle Funktion von C/EBP-alpha bei der Ausreifung von Granulozyten findet eine Bestätigung in der Häufigkeit von C/EBP α -Mutation bei der AML.

C/EBP α - Mutationen treten bei AML-Patienten mit einer Häufigkeit von 5 bis 14% auf (Pabst et al. 2001a; Pabst et al. 2001b; Gombart et al. 2002; Preudhomme et al. 2002). Dabei werden zwei grundsätzliche Typen beobachtet:

C-terminale Mutationen innerhalb des Leserahmens zerstören die basic Zipper Region und beeinflussen dadurch die DNA-Bindung sowie die Homo- bzw. Heterodimerisierung mit anderen C/EBP-Familienmitgliedern. Diese Mutationen treten oft gemeinsam mit Mutationen im zweiten Allel auf, so dass es normalerweise zu einem Verlust der C/EBP α -Funktion kommt (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al. 2003; Mueller et al. 2006).

In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass C-terminale C/EBP α Mutationen die Proliferation von langzeit-repopulierenden hämatopoetischen Stammzellen (LT-HSCs) spezifisch erhöhen und das normale Gleichgewicht des Wachstums dieser Zellen aufheben. Dies führt zur Expansion der prämaligen hämatopoetischen Stammzellen. Treten diese Mutationen homozygot auf, so kommt es zu einer Blockade der myeloischen Differenzierung (Bereshchenko et al. 2009).

Im Gegensatz dazu haben N-terminale C/EBP α - Mutationen keinen Einfluss auf die Expansion hämatopoetischer Stammzellen sondern führen zur Bildung von myeloischen Progenitorzellen, welche die Grundlage der leukämie-initiiierenden Zellen darstellen. Biologisch resultieren Amino-terminale Frameshift Mutationen in einer vermehrten Bildung der p30 Isoform, während die Translation der p42 Isoform dadurch vorzeitig beendet wird (Nerlov 2004). Die p30 Isoform inhibiert das übriggebliebene p42 Protein in einer dominant-negativen Art und Weise.

Treten N- und C-terminale Mutationen gleichzeitig auf zwei verschiedenen Allelen auf, so werden die jeweilig vermittelten Eigenschaften kombiniert und führen zu einer Beschleunigung der Krankheitsentwicklung (Bereshchenko et al. 2009). Dadurch lässt sich auch das verhältnismäßig häufige klinische Auftreten dieser Konfiguration an C/EBP α -Mutationen erklären: 90% der Patienten mit Defekten im C/EBP α - Gen tragen unterschiedliche Mutationen auf beiden Allelen.

C/EBP α -Mutationen treten typischerweise in Patienten mit AML-M1 und- M2 auf, seltener in Patienten mit AML-M4 (Leroy et al. 2005). Treten keine Mutationen im C/EBP α -Gen auf, können andere Mechanismen der Leukämieentstehung zu einer verringerten C/EBP α -Expression und damit zu funktionellen Störungen führen. C/EBP α wird z.B. durch das Fusionsprotein AML1-ETO reprimiert (Pabst et al. 2001a). Auch

durch die Expression von Flt3-ITD kommt es zu einer Verminderung der C/EBP α mRNA (Mizuki et al. 2003; Zhang et al. 2004).

Eine aktuelle Studie zeigt, dass durch die Expression des Fusionsproteins PML-RAR α , welches typischerweise bei der APL auftritt, C/EBP α sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene vermutlich durch verstärkte Methylierung des Promotors reprimiert wird (Guibal et al. 2009).

Insgesamt zeigt sich, dass Störungen der Funktion des myeloischen Transkriptionsfaktors C/EBP α eine große Bedeutung in der Pathogenese der AML haben. Differenzierende Therapien, mit dem Ziel der Wiederherstellung der C/EBP α - Funktion, sind deshalb ein interessanter neuer Ansatzpunkt, um die Therapie bestimmter Leukämien erfolgreicher zu machen (Tallman et al. 2005).

2.4 G-Protein vermittelte Signalwege

2.4.1 G-Proteine und G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die klassischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) sind Transmembran-Rezeptoren, welche die Zellmembran siebenmal durchspannen, wobei sich das N-terminale Ende auf der extrazellulären Seite befindet und das C-terminale Ende im intrazellulären Bereich liegt. Während der letzten Jahre wurde herausgefunden, dass auch einige andere Rezeptoren und Proteine, die nicht heptahelical sind, ebenfalls einige ihrer biologischen Effekte über die Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen vermitteln (Patel 2004).

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus jeweils einer α -, einer β - sowie einer γ -Untereinheit ($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$) (Wettschureck et al. 2005). Im Ruhezustand liegt das G-Protein in seiner heterotrimeren Form vor, wobei alle drei Untereinheiten miteinander assoziiert sind. Dabei ist die α -Untereinheit an Guanin-Diphosphat (GDP) gebunden. Das GDP-gebundene Heterotrimer ist seinerseits an Rezeptoren gebunden und erhöht im Falle der Sieben-Transmembran-Rezeptoren die Affinität der Rezeptoren für ihre entsprechenden Liganden. Ligandenbindung führt zur Aktivierung des an den Rezeptor gekoppelten G-Proteins und zum Austausch des an die α -Untereinheit gebundenen GDP gegen GTP. Der limitierende Schritt in der Aktivierung der G-Proteine ist die Austauschrate zwischen GDP und GTP. Der aktivierte Rezeptor fungiert also als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor. Die GTP-gebundene aktive α -Untereinheit dissoziiert von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit, und beide Teile des G-Proteins aktivieren dann ihre spezifischen Effektor-Moleküle, z.B. Enzyme wie die Adenylatcyclase, Phospholipase C oder Ionen-Kanäle (Gilman 1987). Die induzierten

Zielmoleküle aktivieren ihrerseits biologische Signale, welche z.B. Genexpression sowie Zellwachstum, Migration und Proliferation beeinflussen.

Dissoziiert der Ligand vom Rezeptor, geht dieser wieder in den inaktiven Zustand über. Die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit hydrolysiert das gebundene GTP zu GDP, und die damit inaktiv gewordene α -Untereinheit reassoziert mit den $\beta\gamma$ -Untereinheiten wieder zum heterotrimeren G-Protein. Damit wird das vermittelte Signal wieder abgeschaltet (Abbildung 2.3).

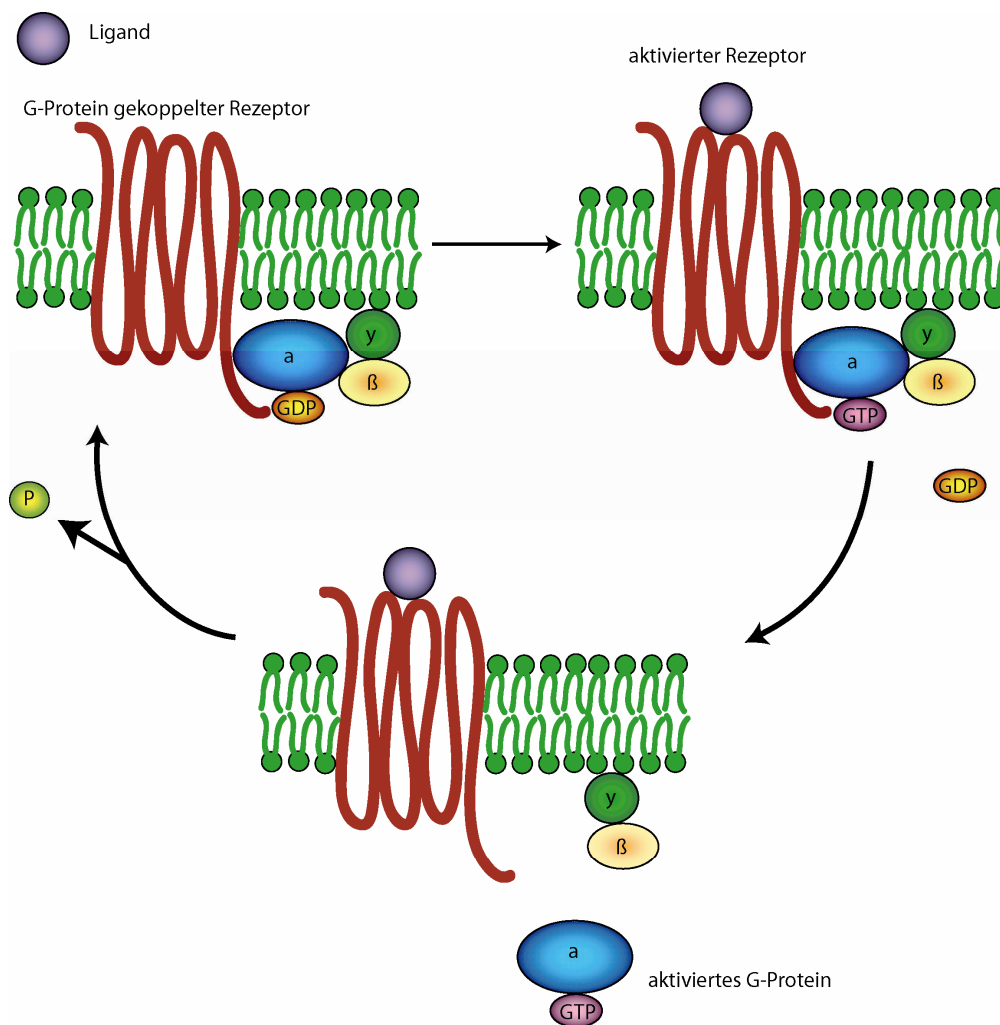


Abbildung 2.3: Der Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine

Im inaktiven Zustand ist die α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins GDP gebunden. In Folge der Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch Ligandenbindung kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP. Dadurch dissoziiert das G-Protein in die GTP-gebundene α -Untereinheit sowie β - und γ -Untereinheiten. Es kommt zur Aktivierung der untergeordneten Signalwege. Durch die Hydrolyse von GTP zu GDP geht das G-Protein wieder in seinen inaktiven Zustand über.

Die Abschaltung der aktiven $G\alpha$ -Untereinheiten wird durch zusätzliche Mechanismen reguliert. Bislang am besten erforscht ist die Beschleunigung der Abschaltung des Signals durch Aktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit durch die sogenannten Regulators of G-Protein Signalling (RGS-Proteine). Daneben sind einige weitere regulierende Faktoren beschrieben (Dohlman et al. 1997). Auf Ebene der Rezeptoren erfolgt die Regulierung der Aktivität beispielsweise über Phosphorylierung durch Proteinkinasen (Premont et al. 1995) sowie rezeptor-bindende Proteine wie Arrestine (Gurevich et al. 1995; Ferguson et al. 1996). Außerdem spielen weitere Proteine wie Phosphoducine (Bauer et al. 1992), welche mit $G\beta\gamma$ interagieren, und Recoverine (Chen et al. 1995; Faurobert et al. 1996) eine Rolle bei der Signalabschwächung. Des Weiteren sind auch Effektor-Proteine wie z.B. die Adenylatcyclase in der Lage, die Aktivierung der G-Proteine zu regulieren (Patel et al. 2001). Auf diese Weise kann die Signaltransduktion komplexer zellulärer Mechanismen sehr fein reguliert werden.

Historisch wurden die G-Proteine als Schalter von Hormonrezeptoren und Regulatoren von Second-Messenger-Systemen betrachtet (Stryer et al. 1986; Gilman 1995; Neer 1995). Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass diese Moleküle darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Integration verschiedener zellulärer Signale spielen. Sie kontrollieren eine Vielzahl essentieller zellulärer Funktionen wie z. B. Proliferation und Migration.

Bislang wurden 20 verschiedene Formen von $G\alpha$ -Untereinheiten, fünf Formen von $G\beta$ -Untereinheiten sowie 12 Isoformen von $G\gamma$ -Untereinheiten kloniert und charakterisiert (Hurowitz et al. 2000).

Die 20 Formen der $G\alpha$ -Untereinheiten werden nach Sequenzhomologien und anderen Eigenschaften wie der Aktivierung von Effektormolekülen und Hemmbarkeit durch Pharmazeutika in vier Hauptgruppen unterteilt: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$ (Neves et al. 2002).

$G\alpha_s$ aktiviert die Adenylatcyclase, wodurch es zu einer vermehrten Bildung von cAMP kommt (Schramm et al. 1984). Dies führt zur cAMP-abhängigen Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und schließlich zur Phosphorylierung zellulärer Zielproteine. In einigen Zellsystemen stimuliert cAMP das Zellwachstum, in den meisten Fällen kommt es durch cAMP/PKA jedoch zur Hemmung von Zellwachstum und Proliferation (Gottesman et al. 1986).

Im Gegensatz zu $G\alpha_s$, inhibiert $G\alpha_{i/o}$ die Adenylatcyclase und führt dadurch zu einer Verringerung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Aufgrund dessen kommt es zur Aktivierung der PI3-Kinase, welche ihrerseits AKT induziert. Dieser Signalweg unterstützt das Überleben und induziert die Proliferation der Zellen (Downward 2004).

$G\alpha_q$ aktiviert die Phospholipase $C\beta$, was zu einer verstärkten Spaltung von Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP₂) in Inositol-3-Phosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) führt. Die daraus resultierende Bindung von IP₃ an Rezeptoren des endoplasmatischen Reticulums führt zu Calcium-Freisetzung und damit zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Diacylglycerol aktiviert gleichzeitig die Proteinkinase C (PKC). Auf diese Weise werden mehrere Signalwege wie der Ras/Raf MAP-Kinase Weg sowie der Calcium-Calmodulin Weg induziert, die zur Transformation beitragen können (Radeff-Huang et al. 2004). Zudem konnte eine direkte Interaktion von $G\alpha_q$ mit p63Rho-GEF gezeigt werden, wodurch es zur Aktivierung von RhoA kommt (Lutz et al. 2007). Außerdem ist aktiviertes $G\alpha_q$ in der Lage, die PI3-Kinase zu hemmen, was zu einer verminderten AKT-Aktivierung führt. Dieser inhibitorische Mechanismus scheint unabhängig von der Phospholipase $C\beta$ abzulaufen und könnte eine inhibitorische Interaktion zwischen $G\alpha_q$ und der PI3-Kinase einschließen (Ballou et al. 2003). In Fibroblasten zeigen aktivierende Mutationen von $G\alpha_q$ ($G\alpha_qQ209L$) hingegen dosisabhängig eine transformierende oder apoptose-induzierende Wirkung: Bei schwacher Expression kommt es zur Transformation der Zellen, während bei hohem Expressionsniveau Apoptose induziert wird (Kalinec et al. 1992; Dhanasekaran et al. 1998; Howes et al. 2003).

Die $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten wurden erst relativ spät entdeckt. $G\alpha_{13}$ wurde zunächst als Onkogen identifiziert (Vara Prasad et al. 1994). Überexpression von GTPase-defizienten (konstitutiv aktiven) $G\alpha_{12}$ - und $G\alpha_{13}$ - Untereinheiten führt zu Veränderungen von Zellform, Migrationsverhalten, Genexpressionsprofil und Wachstum der Zellen. Insbesondere die Veränderungen der Zellform und des Migrationsverhaltens sind auf die Aktivierung des kleinen G-Proteins Rho zurückzuführen (Radeff-Huang et al. 2004).

Die Verbindung zwischen RhoA und der $G\alpha_{12/13}$ -Familie erfolgt durch den Rho Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) p115RhoGEF. Er bindet an $G\alpha_{12/13}$ -Proteine und wird durch $G\alpha_{13}$ aktiviert (Hart et al. 1998). Vergleichbare Interaktionen konnten auch für andere GEFs wie PDZRhoGEF, LARG sowie $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ gezeigt werden.

Während der Rho-Signalweg zunächst als sehr wichtig für die Kontrolle des Aktin-Zytoskeletts erachtet wurde, ist jetzt klar, dass RhoA außerdem mit dem kleinen G-Protein Ras kooperiert und Einfluss auf die Zellzyklus-Regulation nimmt (Pruitt et al. 2001). Außerdem ist bekannt, dass Rho-GTPasen entscheidend für die Vermittlung von Signalen zwischen hämatopoetischen Stammzellen und deren Mikroumgebung sind. Dabei spielen sie eine bedeutende Rolle für diverse Prozesse, wie die Kontrolle von Adhäsion, Migration,

Proliferation, Überleben, Seneszenz und onkogener Transformation hämatopoetischer Stammzellen (Cancelas et al. 2009).

Heterotrimere G-Proteine spielen bei weiteren Signalwegen, die für die physiologische Zellentwicklung und die maligne Transformation verantwortlich sind, eine bedeutsame Rolle. So sind die Frizzled-Rezeptoren des Wnt-Signalweges G-Protein gekoppelte Rezeptoren. „Wnt-Signalling“ spielt unter anderem eine bedeutende Rolle bei der Zellproliferation. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Wnt-Signalwege mit Entwicklung und Progression von Tumoren assoziiert sind (Polakis 2000). Bei verschiedenen soliden menschlichen Krebsarten, wie z. B. dem kolorektalen Karzinom, dem Ovarialkarzinom oder dem hepatozellulären Karzinom liegt eine aberrante Aktivierung des Wnt-Signalweges vor (Miller et al. 1999).

Ferner mehren sich die Hinweise auf eine funktionelle Interaktion zwischen G-Protein-gekoppelten und rezeptortyrosinkinase-gekoppelten Signalwegen. Obwohl heterotrimere G-Proteine und Rezeptortyrosinkinasen Teile unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden sind, ist eine Transaktivierung zwischen diesen beiden Signalwegen bekannt (Daub et al. 1996). Die Funktion von Rezeptortyrosinkinasen und heterotrimeren G-Proteinen ist also eng miteinander verzahnt, wobei die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bislang noch nicht erforscht sind.

Die beiden Beispiele illustrieren die Relevanz von G-Protein-gekoppelten Signalwegen bei essenziellen Mechanismen der Entwicklung, Differenzierung und Transformation von Zellen, wobei die molekularbiologischen Einzelheiten bislang noch wenig untersucht sind.

2.4.2 RGS-Proteine

Die „Regulators of G-Protein Signalling“ (RGS-Proteine) sind eine Familie verschiedener multifunktionaler Signalproteine, deren strukturelle Gemeinsamkeit in einer konservierten 120 Aminosäuren langen Domäne (RGS-Domäne) liegt. Mit der RGS-Domäne binden die Proteine direkt an aktivierte $G\alpha$ -Untereinheiten und verstärken deren intrinsische GTPase-Aktivität. Somit kommt es zu einer schnelleren Hydrolyse von GTP zu GDP, was zu einer beschleunigten Reassoziaton des $G\alpha\beta\gamma$ -Komplexes und schließlich zu einer schnelleren Beendigung des Rezeptorsignals führt (Abbildung 2.4).

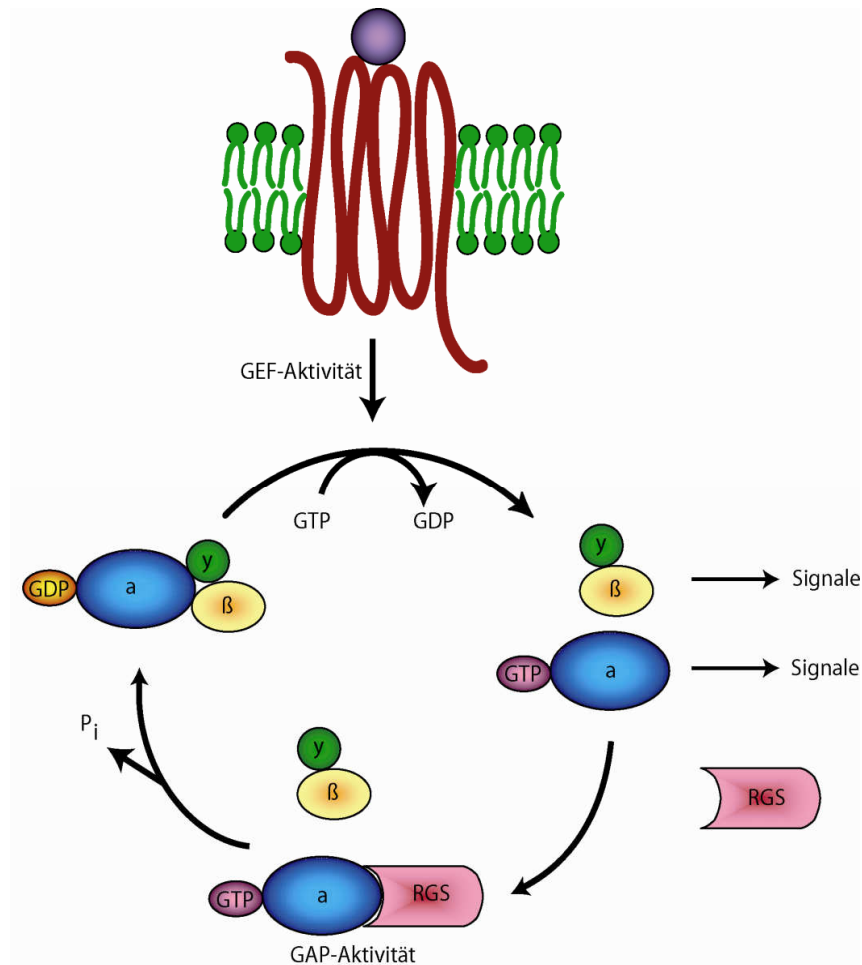


Abbildung 2.4: Die Rolle von RGS-Proteinen im G-Protein gekoppelten Rezeptor Signalweg (Neubig et al. 2002)

Bis auf die Gemeinsamkeiten in dieser strukturellen Domäne, die alle RGS-Proteine teilen, weisen die Proteine dieser Familie große Unterschiede in ihrer Größe, Struktur und der Gewebeverteilung auf.

Das erste RGS-Protein wurde 1982 mit der Beschreibung von Sst2 in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt (Chan et al. 1982).

Das erste bei Säugetieren beschriebene RGS-Protein ist BL34/1R20 (RGS1). Es wurde 1993 auf Grund seiner erhöhten Expression in Blasten von ALL-Patienten identifiziert (Hong et al. 1993).

Mittlerweile sind über 30 RGS-Proteine bekannt, die von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten in zunächst sechs verschiedene Gruppen eingeteilt wurden. Eine Arbeitsgruppe führte eine Einteilung mit den Buchstaben A bis F ein (Zheng et al. 1999), in der anderen Klassifikation leiten sich die Gruppennamen von prototypischen RGS-Proteinen ab (Ross et al. 2000). Aktuell werden die RGS-Proteine aufgrund von Sequenz-Homologien in acht

verschiedene Untergruppen eingeteilt (Willars 2006). Des Weiteren gibt es zwei Proteine (D-AKAP2 und RGS22), die multiple RGS-Domänen enthalten, jedoch nicht in eine der acht Gruppen eingeordnet werden können (Siderovski et al. 2005).

Die mRNAs einiger RGS-Proteine werden alternativ gespleißt, wobei die funktionellen Konsequenzen bislang noch nicht genau geklärt werden konnten (Chatterjee et al. 2000b; Saitoh et al. 2002; Chatterjee et al. 2003; Ding et al. 2007).

Außerdem sind bei RGS-Proteinen eine Reihe von post-translationalen Modifikationen bekannt, wie z.B. Phosphorylierung, Palmitoylierung und Sumoylierung:

Die Phosphorylierung von RGS Proteinen hat unterschiedliche Konsequenzen. In einigen Fällen führt sie zur Aktivierung der GAP-Aktivität (Ogier-Denis et al. 2000; Derrien et al. 2001; Tang et al. 2003), in anderen Fällen kann sie diese aber auch inhibieren (Chen et al. 2001; Cunningham et al. 2001). Des Weiteren hat die Phosphorylierung Einfluss auf die zelluläre Lokalisation (Burgon et al. 2001) sowie die Proteinstabilität (Derrien et al. 2003).

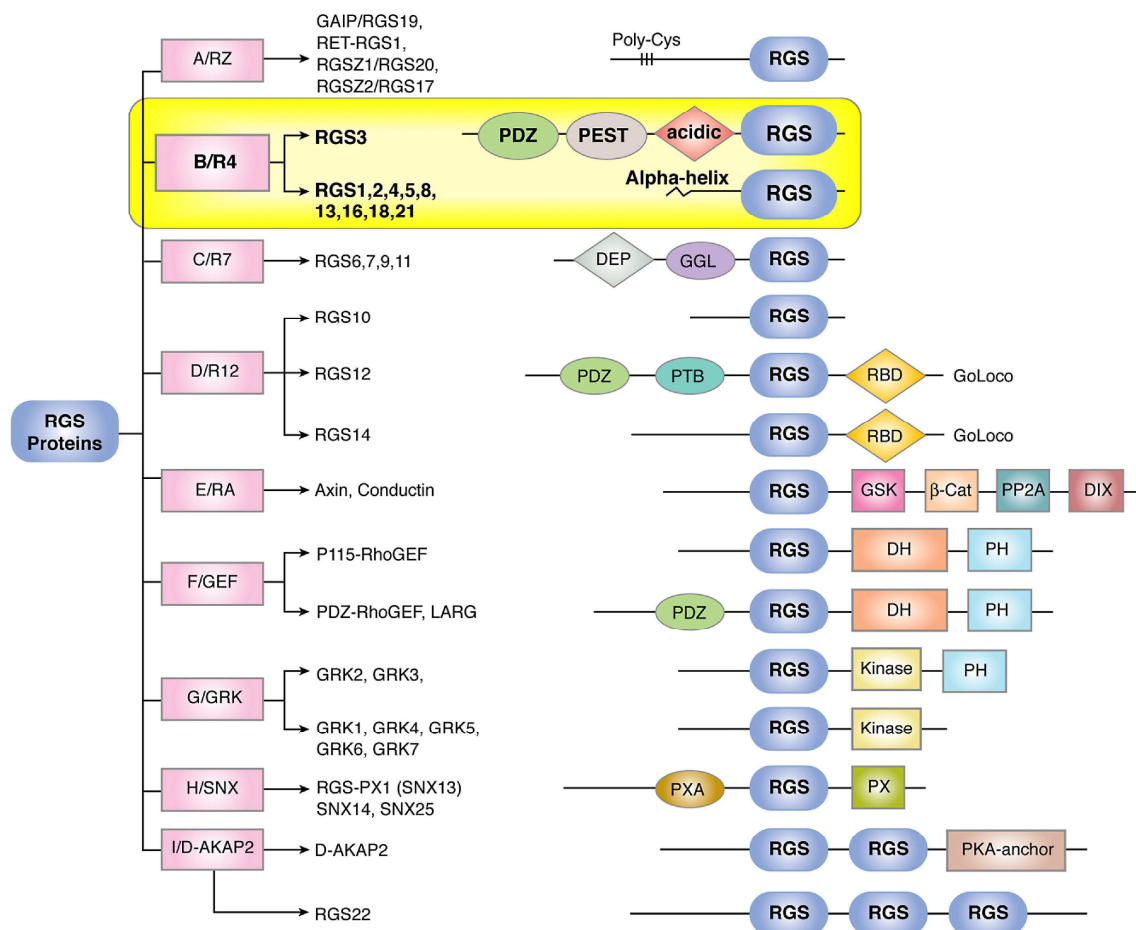


Abbildung 2.5 Einteilung der RGS-Proteine nach (Bansal et al. 2007)

Klassifikation von Säugetierproteinen, die eine RGS- oder RGS-ähnliche Domäne enthalten in verschiedene Unterfamilien.

Abkürzungen: beta-Cat, beta-Catenin-bindend; D-AKAP, dual-specificity A-kinase anchoring Protein; DEP, dishevelled/EGL-10/pleckstrin; DH, Dbl Homologie; DIX, dishevelled homologe Domäne; GAIP, Gα interagierendes Protein; GEF, guanine nucleotide exchange factor; GGL, Gγ-ähnlich;

GoLoco, G α i/o-Loco; GRK, GPCR Kinase; GSK, Glycogen Synthase Kinase 3 β -bindend; PDZ, PSD95/Dlg/ZO-1/2; PEST, Proline, Glutamine, Serine, Threonine-reich; PH, Pleckstrin Homologie; PP2A, Protein Phosphatase 2A; PTB, Phosphotyrosin bindend; PX, Phosphatidylinositol-bindend; PXA, PX-assoziiert; RBD, Ras-bindende Domäne; RGS, Regulator of G Protein Signaling Domäne; SNX, Sorting Nexin.

Neben der RGS-Domäne kommen bei den verschiedenen RGS-Proteinen eine Vielzahl struktureller Motive und Domänen vor, die die Interaktion mit weiteren Signalmolekülen vermitteln. In einigen Fällen ermöglichen diese zusätzlichen Domänen eine Kopplung von zwei unabhängigen Signalwegen. So assoziiert der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor p115RhoGEF über seine RGS-Domäne mit G α ₁₃, dient gleichzeitig zur Rekrutierung von RhoA und sorgt für einen GTP-GDP Austausch durch die DH- (dbl homology) Domäne (Kozasa et al. 1998). Mit der DH-Domäne können kleine GTPasen vom Rho- und Ras-Typ gebunden werden. G-Proteine der Rho-Familie spielen eine wichtige Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen wie z. B. Regulation von Genexpression, Zellwachstum, Zelltransformation, der Induktion von Apoptose oder Migration. Darüber hinaus sind einige Mitglieder dieser Proteinfamilie an der Ras-vermittelten Zelltransformation beteiligt (Zohn et al. 1998).

Andere Domänen sorgen für eine Rekrutierung der Proteine an die Plasmamembran. Zu dieser Art von Domänen gehören eine N-terminale amphipathische Helix (Zeng et al. 1998), eine cystein-reiche N-terminale Sequenz sowie die DEP-Domäne (Dishevelled/EGL-10/Pleckstrin) (Hoffman et al. 2000).

Des Weiteren gibt es mehrere Domänen, die es den RGS-Proteinen ermöglichen, verschiedene molekulare und funktionelle Interaktionen einzugehen. Dazu gehört zum Beispiel die GGL-Domäne (G γ -like), welche die RGS-Proteine an G β ₅-Isoformen binden kann (Snow et al. 1998), sowie das GoLoco-Motiv (Loco entspricht RGS12 in *Drosophila* (Siderovski et al. 1999), das spezifisch an GDP-gebundenes G α _i bindet und die Nukleotid-Freisetzung hemmt (Kimple et al. 2002). Die RBD-Domäne (Rap1/2-binding domain) interagiert spezifisch mit der GTP-gebundenen Form von Rap1 und Rap2 (Traver et al. 2000; Hollinger et al. 2001). Eine weitere häufig vorkommende Domäne ist das PDZ-Motiv (PSD-95/Dlg/ZO-1/2), das an verschiedene transmembrane G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bindet. Eine 19 Aminosäuren lange N-terminale Sequenz von RGS2 enthält drei spezifische Reste, die das Protein mit der Typ V Adenylatcyclase verbinden (Salim et al. 2003). RGS-Proteine erfüllen also neben ihrer katalytischen Aktivität auch die Aufgabe eines Bindegliedes zwischen heterotrimeren G-Proteinen und anderen Signalwegen.

Neben der konstitutiven oder transienten Verbindung der RGS-Proteine mit dem GPCR-Signal-Komplex an der Plasmamembran und ihrer Assoziation mit Proteinen des

Cytoplasmas kann eine große Anzahl verschiedener RGS-Proteine im Nukleus nachgewiesen werden. Diese Lokalisation scheint im Widerspruch zu der klassischen Funktion der RGS-Proteine als Inhibitoren des G-Protein Signalwegs zu stehen und lässt darauf schließen, dass es neben der GAP-Aktivierung weitere Funktionen von RGS-Proteinen gibt. Die kleineren RGS-Proteine wie RGS2, RGS4 und RGS8 können vermutlich frei in den Zellkern diffundieren, während die größeren RGS-Proteine (RGS3, RGS6, RGS7, RGS9-2, RGS12) dafür ein „Nuclear localization Signal“ (NLS) oder andere „Nukleäre-Target-Motive“ erfordern. Das NLS besteht aus einer Reihe basischer Aminosäureresten, die eine Bindung an das Protein Importin- α/β vermitteln (Christophe et al. 2000).

Bezüglich der gewebespezifischen Verteilung der RGS-Proteine konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl dieser Proteine im Gehirn bzw. im ZNS (Gold et al. 1997) und im Herzmuskel (Tamirisa et al. 1999) eine hohe Expression aufweisen. Die Expression von RGS-Proteinen in hämatopoetischen Zellen der myeloischen Reihe ist bisher wenig untersucht worden.

2.4.3 RGS2

RGS2 ist ein 221 Aminosäuren langes, 24.4 kDa großes Protein. Es besteht zum größten Teil aus der RGS-Domäne und gehört zur Gruppe B/R4 der RGS-Proteine. Entdeckt wurde es in einem Screening von cDNA-Banken, die aus aktivierten humanen Monozyten hergestellt wurden (Siderovski et al. 1994). Das Protein wurde zunächst mit dem Namen G0S8 bezeichnet, bevor es später in RGS2 umbenannt wurde, nachdem durch Sequenz-Analysen die hochkonservierte 120 Aminosäuren lange RGS-Domäne entdeckt wurde (Druey et al. 1996; Koelle et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, dass RGS2 spezifisch Bindungen mit $G\alpha_q$ -Untereinheiten eingeht und deren Aktivität negativ beeinflusst. Auf diese Weise dient es als potenter Inhibitor für die $G\alpha_q$ -vermittelte Aktivierung der Phospholipase C β (Heximer et al. 1997a; Heximer et al. 1997b). Zu beachten ist dabei auch, dass RGS2 durch nachgeschaltete Komponenten des Inositol-Lipid-Signalweges reguliert wird. So konnte eine Phosphorylierung von RGS2 durch die Proteinkinase C *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Die *In vitro* Phosphorylierung von RGS2 durch PKC vermindert die Fähigkeit zur Hemmung der $G\alpha_q$ -stimulierten Phospholipase C β -Aktivierung. Je stärker RGS2 phosphoryliert ist, umso schlechter kann es zur Erhöhung der intrinsischen GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheiten beitragen, dabei handelt es sich um einen positiven Feedback-Loop. Damit konnte zum ersten Mal eine durch

Phosphorylierung induzierte Änderung in der Aktivität eines RGS-Proteins gezeigt werden (Cunningham et al. 2001).

Des Weiteren interagiert RGS2 auch mit $G\alpha_{11}$ sowie $G\alpha_{15}$ (Beadling et al. 1999; Day et al. 2003). Eine hemmende Wirkung von RGS2 auf $G\alpha_i$ und $G\alpha_s$ wurde ebenfalls beschrieben, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als auf $G\alpha_q$ (Ingi et al. 1998; Tseng et al. 1998).

Während RGS2 nicht oder nur in geringem Ausmaß mit Mitgliedern der G_i -Familie interagiert (Heximer et al. 1997a; Heximer et al. 1997b), wurde beobachtet, dass es als schwacher Inhibitor der G_q und G_s -Protein vermittelten Aktivierung der mitogen aktivierten Protein-Kinase (MAP-Kinase bzw. ERK1/2) Signalwege fungiert (Nunn et al. ; Druey et al. 1996).

Es konnte ferner gezeigt werden, dass RGS2 direkt und selektiv an die dritte intrazelluläre Schleife des M1 muskarinergen Acetylcholin- Rezeptors bindet und so dessen Signalweg über $G\alpha_{q/11}$ modulieren kann (Bernstein et al. 2004). RGS2 agiert als Effektor Antagonist und es kommt zur Hemmung der M1 mACh rezeptor-vermittelten Phosphoinositid-Hydrolyse in Zellmembranen.

Neben der Aktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität von $G\alpha$ -Untereinheiten ist RGS2 außerdem in der Lage, über die direkte Hemmung von Adenylatzyklasen Einfluss auf die Signaltransduktion zu nehmen (Sinnarajah et al. 2001; Salim et al. 2003). Auf diese Weise wird die Akkumulation von cAMP im Zytoplasma verringert. Eine Bindung an die Adenylatzyklase erfolgt über das N-terminale Ende von RGS2, wobei drei N-terminale Alaninreste für die inhibitorische Funktion des Proteins verantwortlich zu sein scheinen.

RGS2 spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung verschiedener Zelltypen. Z.B. konnte die Induktion von RGS2 während der Differenzierung von Adipozyten beobachtet werden, dabei wurde die Bildung von Fettzellen durch RGS2 stimuliert (Imagawa et al. 1999; Nishizuka et al. 2001; Cheng et al. 2008).

Auch bei der Differenzierung von Chondrozyten spielt RGS2 eine wichtige Rolle (James et al. 2005; Appleton et al. 2006). Weiterhin scheint die Funktion von RGS2 für die Bildung von Knochen durch Osteoblasten von Bedeutung zu sein, wie einige Studien zeigen konnten (Thirunavukkarasu et al. 2002; Roy et al. 2006).

RGS2 konnte außerdem in Neuronen des Zentralen Nervensystems nachgewiesen werden, wobei die Expression des Proteins dort durch bestimmte Stimuli, die mit neuronaler Plastizität assoziiert sind, verstärkt werden kann (Burchett et al. 1998; Ingi et al. 1998).

Eine weitere Studie zeigt, dass RGS2 durch Regulation der Mikrotubuli einen Einfluss auf die Differenzierung von Neuronen nimmt (Heo et al. 2006).

Die Funktionen von RGS2 im Immunsystem sowie in neurologischen Systemen wurden in RGS2-defizienten Mäusen untersucht. Diese Mäuse zeigen eine beeinträchtigte T-Zell-Proliferation und -Aktivierung sowie zentralnervöse Störungen, wie verstärkte Ängstlichkeit und verminderte Aggressivität der Männchen (Oliveira-Dos-Santos et al. 2000). Eine andere Gruppe konnte kürzlich an den RGS2-defizienten Mäusen eine Bedeutung von RGS2 für die Aufrechterhaltung des intraokularen Drucks sowie des Überlebens von retinalen Ganglion-Zellen zeigen (Inoue-Mochita et al. 2009).

Obwohl Abnormalien im kardiovaskulären System der RGS2 knockout-Mäuse in der initialen Studie zunächst nicht beschrieben wurden, gibt es Hinweise, dass RGS2 eine Rolle bei der Regulation von Herz-Kreislauffunktionen spielt. Viele wichtige kardiovaskulär wirksame Hormone, wie z.B. Angiotensin II, Endothelin I, Thromboxan A₂ und Noradrenalin aktivierenden Rezeptoren, die an Gα_q koppeln. Diese Hormone sind potente Vasokonstriktoren und stehen mit der Pathogenese von Hypertonie in Verbindung. Außerdem wird die RGS2-Expression in Geweben, die für die Blutdruck-Regulation wichtig sind, sehr fein reguliert. Dazu gehören das Zentrale Nervensystem (Burchett et al. 1998; Ingi et al. 1998), die glatte Gefäßmuskulatur (Grant et al. 2000) sowie die Niere (Chen et al. 1997). Im Jahr 2003 konnte dann anhand der RGS2-defizienten Mauslinie gezeigt werden, dass die Abwesenheit von RGS2 zu Bluthochdruck führt. Erklären lässt sich dies durch die vermehrte Aktivität der PLC-β, was in der erhöhten Produktion von DAG und IP3 sowie der Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ resultiert. Dadurch wird die Myosin-Leicht-Ketten Kinase aktiviert, und es kommt zur anhaltenden Kontraktion der glatten Muskulatur und damit schließlich zur Erhöhung des Blutdrucks. Wie erste Daten zeigen, scheint RGS2 auch in der Pathogenese des Bluthochdrucks beim Menschen eine Rolle zu spielen. Patienten mit Bluthochdruck zeigen eine verminderte RGS2-Expression in Fibroblasten und peripheren mononukleären Zellen des Blutes, sowie eine verstärkte Reaktion auf Angiotensin II (Semplicini et al. 2006). Die Reduktion der RGS2 Expression korreliert mit einem Polymorphismus (C1114G) in Patienten mit Bluthochdruck. Des Weiteren gibt es einen Bericht über eine seltene kodierende Mutation (Q2L), welche nur in Patienten mit Bluthochdruck beobachtet wird, und zu einer Destabilisierung der RGS2 Expression führt (Yang et al. 2005). Obwohl die detaillierten molekularen Mechanismen noch nicht bekannt sind, weisen diese Studien auf eine Rolle von RGS2 in der Pathogenese des Blutdrucks hin. RGS2 könnte somit als neues Zielmolekül für die Entwicklung von Medikamenten gegen Hypertonus dienen (Heximer et al. 2003; Tang et al. 2003).

Die spezifischen Funktionen von RGS2 werden durch verschiedene Bereiche des Proteins vermittelt. Eine wichtige Bedeutung für die Funktion scheint vor allem der aminoterminalen

Anteil von RGS2 zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass diese Domäne für die nukleäre bzw. membranständige Lokalisation des Proteins verantwortlich ist (Heximer et al. 2001). Des Weiteren interagiert dieser Teil des Proteins mit verschiedenen weiteren Signalproteinen, wie G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Bernstein et al. 2004) und Spinophilin (Wang et al. 2005), dem epithelialen Calcium-Kanal TRPV6 (Schoeber et al. 2006) sowie Tubulin (Heo et al. 2006). Die vielseitige N-terminale Domäne von RGS2 bringt demzufolge die Carboxy-Terminale GAP-Domäne des Proteins durch Interaktion mit Zielproteinen in die jeweilige kontext-spezifische Lokalisation.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass alternative Translations-Initiation zur Expression verschiedener RGS2-Protein-Produkte führt, die sich in ihrer aminoterminalen Architektur und ihren funktionalen Charakteristika unterscheiden (Gu et al. 2008). Durch alternative Translations-Initiation von vier verschiedenen Start-Kodons an den Positionen 1, 5, 16 und 33 kommt es zur Expression verschieden großer RGS2-Produkte mit unterschiedlicher Funktion. Während die Produkte der offenen Leserahmen eins bis vier keine Unterschiede in der Hemmung von $G\alpha_q$ oder der Lokalisation zeigen, können Proteine der offenen Leserahmen drei und vier die Typ V Adenylatzyclase im Gegensatz zum WT RGS2 nicht hemmen (Gu et al. 2008). Dies ist durch die Hemmung der direkten Interaktion von RGS2 mit der Adenylatzyclase bedingt und betrifft dabei nicht die klassische Funktion als RGS-Protein.

Kürzlich konnte eine weitere neue Funktion von RGS2 in der Kontrolle der Proteinsynthese gezeigt werden. RGS2 bindet an den Transkriptionsfaktor eIF2B ϵ (Eukaryotic Initiation Factor 2B ϵ Untereinheit) und hemmt die Translation von mRNA. Diese neue Funktion von RGS2 ist unabhängig von der Fähigkeit der Regulation von G-Protein-Signalwegen und wird durch 37 Aminosäuren innerhalb der konservierten RGS-Domäne vermittelt (Nguyen et al. 2009).

In Bezug einer möglichen Rolle bei der Entstehung von Krebserkrankungen ist RGS2 eines der am besten untersuchten RGS-Proteine. Veränderungen in der RGS2-Expression konnten mit der Entstehung von ovarial Krebs (Hurst et al. 2009), Brustkrebs (Smalley et al. 2007), Prostatakrebs (Cao et al. 2006), Blasenkrebs (Berman et al. 2004), Mantezellymphom (Zhu et al. 2002), kolorektalen Karzinomen (Jiang et al. 2010) sowie akuter myeloischer Leukämie (Schwable et al. 2005) assoziiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Vielzahl von Brustkrebs-Proben im Vergleich zu normalem Gewebe eine erhöhte RGS2 Expression auftritt (Smalley et al. 2007). Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch eine signifikant verringerte RGS2 Expression in Prostatakrebs-Zelllinien sowie in Gewebeproben von Prostatakrebs-Patienten (Cao et al. 2006). Auch bei kolorektalen

Karzinomen ist die RGS2- Expression deutlich reprimiert, wobei eine niedrige RGS2- Expression außerdem mit einer schlechteren Prognose der Patienten einhergeht (Jiang et al. 2010).

Im Folgenden soll näher auf die Rolle von RGS2 in der Hämatopoese und der Entstehung von Leukämie eingegangen werden.

Bereits kurz nach seiner Entdeckung wurde die Expression von RGS2 mittels RT-PCR in gesunden und malignen Zellen der Hämatopoese untersucht.

Die Expression von RGS2 war dabei weder in CD34-positiven Vorläuferzellen, noch im Knochenmark von gesunden Spendern oder von Patienten mit CML in chronischer Phase nachweisbar. Die mRNA für RGS2 fand sich jedoch in einem Großteil der Proben von Patienten mit AML, ALL und CML im Blastenschub (Wu et al. 1995). Diese Daten stehen im Widerspruch zu einer Microarray-Analyse mit fast 100 gesunden Geweben humanen und murinen Ursprungs. Hier wurde im hämatopoetischen Gewebe meist eine überdurchschnittliche RGS2-Expression gefunden (Su et al. 2002).

In einer Microarray-Analyse zur Bestimmung FLT3-ITD typischer Genexpressionsmuster konnte eine Repression von RGS2 durch FLT3-ITD gezeigt werden (Mizuki et al. 2003). Im Gegensatz dazu zeigen Zellen mit FLT3-Wildtyp eine deutliche Induktion der RGS2- Expression unter Stimulation mit dem spezifischen Liganden FL. Diese wurden *in vitro* auf mRNA-Level durch Real-Time RT PCR sowie auf Proteinebene im Westernblot bestätigt. Außerdem wurde gezeigt, dass die RGS2-mRNA-Expression in der Mehrheit der untersuchten AML-Patienten im Vergleich zu gesundem Knochenmark reprimiert ist.

Eine darauf aufbauende Studie beschäftigt sich mit der Funktion von RGS2 in der Transformation und Differenzierung von myeloischen Zellen. Hier konnte ein hemmender Effekt von RGS2 auf die FLT3-ITD- vermittelte Transformation gezeigt werden. Ferner konnte durch eine RGS2-Überexpression der FLT3-ITD- vermittelte Differenzierungsblock myeloischer Zellen überwunden werden. Dabei wurde durch die Koexpression von RGS2 die Expression von C/EBP α , die von Flt3-ITD reprimiert wird, wieder hergestellt. Des Weiteren konnten durch RGS2-Überexpression einige der FLT3-ITD induzierten Signalwege antagonisiert werden, wie z.B. der AKT/GSK3 β Signalweg (Schwable et al. 2005). Zusammenfassend nimmt RGS2 vor allem in der granulozytären Differenzierung eine bedeutende Funktion ein und spielt eine zentrale Rolle in der Transformation und Differenzierung myeloischer Zellen.

2.4.3.1 Nukleäre Lokalisation von RGS2

Bemerkenswert ist, dass ein großer Anteil von RGS2 im Nukleus lokalisiert ist, so dass eine nukleäre Funktion dieses Proteins nahe liegt (Chatterjee et al. 2000a). Offensichtlich vermittelt der N-Terminus des Proteins neben der Membranlokalisation ebenso die nukleäre Lokalisation von RGS2. Vermutlich erfolgt dies über ein dort vorhandenes nukleäres Rückhaltesignal (Heximer et al. 2001; Gu et al. 2007).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass es infolge der Aktivierung von $G\alpha_q$ oder $G\alpha_s$ zu einer Translokation von RGS2 aus dem Nukleus an die Plasmamembran kommt (Roy et al. 2003). Möglicherweise wird RGS2 also von der Plasmamembran ferngehalten und somit in inaktivem Zustand gehalten, so lange seine Funktion dort nicht benötigt wird.

Über die Art des Transportes in den Nukleus gibt es bislang keine eindeutigen Ergebnisse, sondern lediglich verschiedene Hypothesen. Kleine RGS- Proteine wie RGS2 können passiv in den Nukleus diffundieren, während größere RGS-Proteine nur durch ein nukleäres Lokalisationssignal über aktiven Transport in den Zellkern gelangen können. Möglicherweise erfolgt auch ein Kotransport gemeinsam mit anderen Proteinen. Eine weitere Hypothese ist die konstitutive Lokalisation von RGS2 im Nukleus direkt nach der Expression. Dem gegenüber steht die Möglichkeit des regulierten Transports abhängig vom Phosphorylierungsstatus des Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierung von Proteinen eine nukleäre Lokalisation zur Folge hat (Penta et al. 1995; Burgon et al. 2001; von Blume et al. 2007). Die nukleäre Funktion von RGS-Proteinen ist bislang noch nicht geklärt. Möglicherweise haben diese Proteine zumindest indirekt einen Einfluß auf die Regulation der Transkription oder der Apoptose (Burchett 2003).

In dieser Arbeit soll eine nukleäre Funktion von RGS2 näher untersucht werden.

3 PROBLEMSTELLUNG

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass RGS2 eine zentrale Rolle in der malignen Transformation hämatopoetischer Zellen spielt und vor allem für die granulozytäre Differenzierung von großer Bedeutung ist (Schwable et al. 2005).

Durch die hemmende Wirkung von RGS2 auf $G\alpha$ Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine können jedoch nicht alle in myeloischen Zellen beobachteten Funktionen von RGS2 erklärt werden. Insbesondere die Rolle von RGS2 in der Differenzierung myeloischer Zellen, sowie die Induktion der C/EBP α – Expression können nicht direkt mit den klassischen $G\alpha_q$ -vermittelten Signalwegen in Zusammenhang gebracht werden und bedürfen weitergehender Erklärungen. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen eine hauptsächlich nukleäre Lokalisierung von RGS2 (Chatterjee et al. 2000a) in nicht-hämatopoetischen Zellen, zudem gilt dieses Protein aufgrund seiner Struktur als potenzielles „Basic Helix-Loop-Helix-Protein“ und hat somit möglicherweise transkriptionsregulierende Eigenschaften. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Lokalisation von RGS2 in myeloischen Zellen, sowie dessen Bindung an DNA und seine nukleäre Funktion eventuell als möglicher Transkriptionsfaktor untersucht werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

ABI PRISM 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, CA, USA
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, CA, USA
Begasungsbrutschrank	WTB Binder, Tuttlingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Cleanbench Herasafe	Heraeus Sepatech, Osterode
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5417R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Cryofuge M7000	Heraeus Sepatech, Osterode
Elektrophoresekammer Sub Cell® GT	BioRad, München
Entwicklermaschine Agfa Curix 60	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Elektroporator Gene Pulser II	BioRad, München
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage Mettler AM100	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Gel Doc 1000	BioRad, München
Liquid Scintillations- und Luminescence Counter (1450 Microbeta)	Wallac, Turku, Finnland
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Mini-Protean II®	BioRad, München
Mikroskop CKX41	Olympus, Melville, NY, USA
Mikroskop CKX41 mit BrennerU RFL T	Olympus, Melville, NY, USA
Neubauer Zahlkammer 0,0025mm ²	Merck, Bruchsal
Photometer UV-VIS Spectrophotometer	Shimadzu
pH-Meter MP225	Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Schweiz
Pipetus-Akku	Hirschmann, Eberstadt
Powerpack Biometra	BioRad, München
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sigma 4K15	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode
Sonifiziergerät, Digital Sonifier	Branson, Danbury, USA

Schüttler, Pilot-Shake TM	Adolf Kühner AG Basel, Schweiz
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex VF2 Janke und Kunkel	IKA-Labortechnik, Deutschland
Westernblotdetektion	Intas, Göttingen
Waage Mettler PM2000	Mettler-Toledo GmbH, Giessen

4.1.2 Computerprogramme und Datenbanken

Word	Microsoft®
Excel	Microsoft®
Endnote 7	Thomson ISI ResearchSoft
Cellquest®	Becton Dickinson, Heidelberg
Primer Express®	Applied Biosystems
MacVector®	Oxford Molecular Group, Campbell CA
Sequence Detector v1.6	Applied Biosystems, CA, USA
Adobe Photoshop®	Adobe Systems Inc. San Jose, CA, USA
Adobe Illustrator®	Adobe Systems Inc. San Jose, CA, USA
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
ExPASy Proteomics Server	http://www.expasy.org/
Signal Scan Analysis (Transfac Database)	http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/signal/

4.1.3 Kunststoffware und Einwegartikel

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falcon Serologische Pipetten	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Falcon Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Plastikware für die Zellkultur	NUNC Brand Products, Dänemark bzw. Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0.5ml, 1.5ml, 2ml)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
96-Well PCR-Platten	Abgene, Epsom, UK
Cryotubes	NUNC Brand Products, Dänemark

FACS-Tubes	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
SDS-PAGE-Fertiggele	BioRad, München
Immobilon PVDF-Membran	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Filme (Hyperfilm)	Amersham Pharmacia, Uplala, Schweden
Elektroporationsküvetten, 4mm Spalt	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Halb-Mikro-Küvetten, 10x4mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Printed Filtermat A	Wallac, Turku, Finnland
MultiLex A	Wallac, Turku, Finnland
Sample Bag	Wallac, Turku, Finnland

4.1.4 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in der p.a. Qualität von Sigma (Taufenkirchen), Riedel-de-Häen (Seelze), Gibco Invitrogen Corporation (Karlsruhe), Mo Bio Laboratories (Kalifornien) oder Invitrogen Barker Deventer (Holland) bezogen.

A/G-Agarose beads	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Albumin Standard	Thermo Scientific, Rockford, USA
Agarose, Low melt	BioRad, München
DEPC	Canberra-Packard GmbH, Dreieich, D
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP's)	Roche, Mannheim, D
ECL-plus Reagent	GE Healthcare, Fairfield, USA
Ethidiumbromid, 1 %	Roth, Karlsruhe
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Gene Ruler™ 6x Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot, D
NovexR Bis-Tris Gel, 4-12%, 10%	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGER MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
NBT-BCIP® Solution	Sigma, Taufenkirchen, D
Proteinase Inhibitor Complete	Boehringer, Mannheim, D
Random Hexamers	Applied Biosystems, CA, USA
SeeBlue® Protein Marker	Invitrogen, Carlsbad, USA

Sephadex G-50 fine DNA Grade	GE Healthcare, Fairfield USA
Sequa-brene™	Sigma, Taufkirchen, D
Tetrazyklin Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen, D
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
FL	Prepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA
IL-3	Prepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA
[Methyl- ³ H] Thymidin, 4,8 TBq/mmol	Amersham Biosciences, Upsala, Schweden
³² P-γATP (10μCi/μl)	Amersham Biosciences, Upsala, Schweden
Dynabeads®-M280 Streptavidin	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe

4.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Bovines Serum Albumin	Sigma, Taufkirchen, D
Blasticidin Calbiochem	San Diego, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, D
Dulbecco´s Medium (DMEM)	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, D
L-Glutamin (1mM final)	PAA Laboratories, Linz, A
Iscoves modified Dulbeccos medium	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Linz, A
Ampicillin/Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
RPMI1640	GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen, D
Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Neomycin (G418)	Calbiochem San Diego, Ca, USA
StemPro 2,3% Methylcellulose	Gibco, BRL

WEHI-konditioniertes Medium

WEHI-konditioniertes Medium ist der IL3-haltige Überstand der Zelllinie WEHI 3B, die ständig in Kultur gehalten wird. Für die Kultivierung der Zelllinie wird IMDM Medium mit 10% FCS, Penicillin/Streptomycin und β-Mercaptoethanol ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M) verwendet. Die

Zellen werden abzentrifugiert (400g, 5min), der Überstand steril filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

PBS (steril für die Zellkultur)

80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

4.1.6 Lösungen und Puffer

WB Laufpuffer	3g Tris Base, 14,4g Glyzin, 1g SDS ad 1L ddH ₂ O
WB Ladepuffer	50mM Tris HCl pH 6,8, 0,075% SDS, 5% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau ad 50 mL ddH ₂ O
WB Transfer-Puffer	3g Tris Base, 14,4g Glyzin, 1g SDS, 200mL Methanol ad 1L ddH ₂ O
RIPA-Zell-Lysepuffer	150mM NaCl, 1% NP40, 0.5 % DOC, 0.1 % SDS, 50mM Tris (pH 8) und Proteinase Inhibitor (Complete, Boehringer Mannheim)
PBS-T	0,1% Tween-20 [®] in PBS
DEPC-H ₂ O	2mL DEPC in 1 l ddH ₂ O ü.N. bei RT gerührt, 2x autoklaviert
FACS-Puffer	0,5% humanes Serum Albumin, 0,1% NaN ₃ in PBS

4.1.7 Enzyme und Kits

BCA-Protein-Assay-Kit	Pierce, Bonn
BigDye Terminator Sequencing Kit 3.1	Applied Biosystems, CA, USA
ECL Western-Blot-Detektionskit (ECL Plus)	Amersham Pharmacia, Uplala, Schweden
Eppendorf Fast Plasmid	Eppendorf, Hamburg, D
Nanofectin Reagenz	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
Ultra Clean [™] DNA purification Kit	Mo Bio Laboratories, CA, USA
TRIZOL-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
qPCR Mastermix Plus	Eurogentec, Köln
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, CA, USA
Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega, Madison, USA
DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit	Roche, Mannheim
Qiagen Plasmid Prep	Qiagen GmbH, Hilden, D

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Alkalische Phosphatase	Promega, Mannheim, D
Biotherm™ DNA-Polymerase	Natutec, Frankfurt, D
Go-Taq Flexi® DNA-Polymerase	Promega, Mannheim, D
Proteinase K	Merck, Darmstadt, D
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach, D
M-MLV Reverse Transkriptase Kit	Promega, Mannheim, D
RNase freie DNase	Qiagen GmbH, Hilden, D
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim, D
RNase OUT™	Invitrogen, Carlsbad, USA

4.1.8 Antikörper

Die für den Western-Blot verwendeten Primär- und Sekundärantikörper wurden in PBS/1%BSA/Tween20/0,01 % NaN₃ angesetzt und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper

Spezifität	Spender-Spezies	Klonalität	Label	Hersteller	Anwendung
RGS2	Maus	Monoklonal	-	Abnova	WB, IP
RGS2	Maus	Monoklonal	-	Abcam	WB, IF
C/EBP α	Kaninchen	Polyklonal (14AA)	-	Santa Cruz Biotechnology	WB
Foxa2	Kaninchen	Polyklonal	-	Santa Cruz Biotechnology	WB
GFP	Kaninchen	Polyklonal	-	Santa Cruz Biotechnology	WB
FLAG	Maus	Monoklonal (M2) F3165	-	Sigma	WB, IP
PARP	Maus	Monoklonal (5A5)	-	Santa Cruz Biotechnology	WB
γ -Tubulin	Maus	Monoklonal (C11)	-	Santa Cruz Biotechnology	WB

Digoxigenin	Schaf	Polyklonal	Alkalische Phosphatase	Roche Applied Science	Dot Blot
β -Aktin	Maus	Monoklonal (8C-15)	-	Sigma	WB
Kaninchen IgG	Ziege	Polyklonal	HRP	Dianova	WB
Maus IgG	Ziege	Polyklonal	HRP	Dianova	WB
Maus IgG	Ziege	Polyklonal	Alexa-488	Invitrogen	Immunfluoreszenz
Normal rabbit IgG	Ziege	Polyklonal	-	Santa Cruz Biotechnology	IP Kontrolle
Normal mouse IgG	Ziege	Polyklonal	-	Santa Cruz Biotechnology	IP Kontrolle

HRP = horse raddish peroxidase

4.1.9 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, im Folgenden auch Primer genannt, wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bzw. von MWG (Ebersberg) bezogen. Die mit Fam und Tamra markierten Sonden wurden von Eurogentec (Köln) synthetisiert.

Tabelle 4.2: Verwendete PCR-Primer

Primer Name	Verwendung	Zielsequenz (5'-3')
muRGS2-Sonde	Detektion von RGS2 Transkripten mit RT-PCR (murin)	Fam-TGC AAG CAA CGG CCC CAA G-Tamra
muRGS2-FW	Detektion von RGS2 Transkripten mit RT-PCR (murin)	CTG CGT ACC CAT GGA CAA GA
muRGS2-REV	Detektion von RGS2 Transkripten mit RT-PCR (murin)	CAT TTT CTC CCG CTT CTC CTC
muC/EBP α -Sonde	Detektion von C/EBP α Transkripten mit RT-PCR (murin)	Fam-AGA CAT CAG CGC CTA CAT CGA CCC G-Tamra
muC/EBP α -FW	Detektion von C/EBP α Transkripten mit RT-PCR (murin)	CTG GGC GGA TCT GCG A
muC/EBP α -REV	Detektion von C/EBP α Transkripten mit RT-PCR (murin)	ACT CGT CGT TGA AGG CGG

muGAPDH-Sonde	Detektion von GAPDH Transkripten mit RT-PCR (murin)	Vic-TCC CGT AGA CAA AAT GGT GAA GGT CGG T-Tamra
muGAPDH-FW	Detektion von GAPDH Transkripten mit RT-PCR (murin)	TTG TGC AGT GCC AGC CTC
muGAPDH-REV	Detektion von GAPDH Transkripten mit RT-PCR (murin)	CCA ATA CGG CCA AAT CCG
huRGS2-Sonde	Detektion von RGS2 Transkripten mit RT-PCR (human)	Fam-AGA AGC GAG AAA AGA TGA AAC GGA CCC TT -Tamra
huRGS2-FW	Detektion von RGS2 Transkripten mit RT-PCR (human)	CAG GCA GTG GCC ACA AGA GCG A
huRGS2-REV	Detektion von RGS2 Transkripten mit RT-PCR (human)	TTT GTA AGA AGT AGC TCA AAC GGG
huGAPDH-Sonde	Detektion von GAPDH Transkripten mit RT-PCR (human)	Vic-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC-Tamra
huGAPDH-FW	Detektion von GAPDH Transkripten mit RT-PCR (human)	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C
huGAPDH-REV	Detektion von GAPDH Transkripten mit RT-PCR (human)	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC
huFOXA2-Sonde	Detektion von FOXA2 Transkripten mit RT-PCR (human)	Fam-TAC GCC TTC AAC ACA CCG TTC TCC AT-Tamra
huFOXA2-FW	Detektion von FOXA2 Transkripten mit RT-PCR (human)	ATGCTGGGAGCGGTGAAG
huFOXA2-REV	Detektion von FOXA2 Transkripten mit RT-PCR (human)	TTAAGAGGAGTTCATAATGGGC
C/EBP α Promotor - 144 FW	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	GAGTCGACACCAAAATGCCATA
C/EBP α Promotor - 144 REV	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	AGCTATTAGCTGATAAGCAAAAGCA
C/EBP α Promotor - 698 FW	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	CATCCTCTGATCACACTGGAATGA
C/EBP α Promotor - 698 REV	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	ATAAGACCATCCTGAGCTGTTCTCA
C/EBP α Promotor - 877 FW	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	GAGGAAGACATACATGCTGAAAGATG
C/EBP α Promotor - 877 REV	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	AGAGGCGACCTAGGACC TTAAA

C/EBP α Promotor - 1375 FW	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	ATAAATGCTCCGTGAGATAAAAGCA
C/EBP α Promotor - 1375 REV	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	GGACAAGGGTGT ^{TT} TGACAGGTT
C/EBP α Promotor - 1666 FW	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	CCAGCTGACTGCATATGACATATCT
C/EBP α Promotor - 1666 REV	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	GTCGCTGACAGAATCCT ^{TTTT} TACTG
C/EBP α Promotor - 2056 FW	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	TCTGTTCAAAAGCATCAAGCTAAAA
C/EBP α Promotor - 2056 REV	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	CATATTCTCAGTGATTAATGGCTCAAC
C/EBP α Promotor - 2733 FW	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	AGGTCACGGAACACGGACAA
C/EBP α Promotor - 2733 REV	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	CG ^{TTTT} TGCACCCCGAAGA
C/EBP α Promotor - 3073 FW	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	GGTGTCCCGAACACT ^T GACTAGA
C/EBP α Promotor - 3073 REV	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	CGATAGGAT ^T GCT ^T AGGCT ^T ACCA
C/EBP α Promotor - 3508 FW	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	GGGTCC ^T AGCGCC ^T ACTACT
C/EBP α Promotor - 3508 REV	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	CTCT ^{TT} TCGCC ^C CAGCT ^{TT} CTCT
C/EBP α Promotor - 3948 FW	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	TCACCGCCT ^T TGGAAAGTCA
C/EBP α Promotor - 3948 REV	RT-PCR Primer für C/EBP α Promotor (murin)	GGATCGAAGGCGCCAGTAG
RGS2 del N79 fw BamH1	Klonierung von trunkiertem RGS2 del N79	CGGGATCCCGATGCTGTGGTCAGAAGCAT ^{TT} GA
RGS2 del N79 rev Not1	Klonierung von trunkiertem RGS2 del N79	TTGCGGCCGCT ^{TTAAT} CATGTAGCATGAGGCT CTGTGGTGAT
RGS2 del C199 fw BamH1	Klonierung von trunkiertem RGS2 del C199	CGGGATCCCGATGCAAAGTGCTATGT ^{TT} CCTTG G
RGS2 del C199 rev Not1	Klonierung von trunkiertem RGS2 del C199	TTGCGGCCGCT ^{TTAAT} CAACACAAGTCC ^T GGT AGAAT

RGS2 del C116 fw BamH1	Klonierung von trunkiertem RGS2 del C116	CGGGATCCCGATGCAAAGTGCTATGTTCTTG G
RGS2 del C116 rev Not1	Klonierung von trunkiertem RGS2 del C116	TTGCGGCCGCTTTAATCAGGCCAGCCAGAATT CAATAT
RGS2 del C83 fw BamH1	Klonierung von trunkiertem RGS2 del C83	CGGGATCCCGATGCAAAGTGCTATGTTCTTG G
RGS2 del C83 rev Not1	Klonierung von trunkiertem RGS2 del C83	TTGCGGCCGCTTTAATCATTCTGACCACAGCT GTGC
RGS2 83- 199 fw BamH1	Klonierung von trunkiertem RGS2 83- 199	CGGGATCCCGATGGCATTGACGAGCTGCT
RGS2 83- 199 rev Not1	Klonierung von trunkiertem RGS2 83- 199	TTGCGGCCGCTTTAATCAACACAAGTCTTGGT AGA
EGFP- RGS2 fw BamH1	Klonierung eines EGFP-RGS2 Fusionskonstruktes	CGAGCTCGGATCCGCCATGCAAAGTGC
EGFP- RGS2 rev Not1	Klonierung eines EGFP-RGS2 Fusionskonstruktes	GCACTTTGCATGGCGGATCCGAGCTCG
Oligo R76	Bibliothek für RGS2 Bindungsstellen Selektion	CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTGNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGAGGCGAA TTCAGTGCAACTGGAGC
R76 fw	Primer für Bibliothek R76	GCTGCAGTTGCACTGAATTCGCCCTC
R76 rev	Primer für Bibliothek R76	CAGGTCAGTTCAGCGGATCCTGTGCG
Oligo T fw	Sonde für EMSA	TTTTTTTGTTTGTTTTGTGTTGTTTT
Oligo T rev	Sonde für EMSA	AAAACAACACAAAACAAACAAAAAAA
C/EBPa USF fw	Sonde für EMSA	TACCGACCACGTGGGCGCGGGGGCGAC
C/EBPa USF rev	Sonde für EMSA	GTCGCCCCCGCGCCCACGTGGTTCGGTA
C/EBPa USF Biotin fw	Oligo für ABCD- Assay	Biotin- AGGGGGCCCCCGCTACCGACCACGTGGGCGC GGGGGCGACGGC
C/EBPa USF Biotin rev	Oligo für ABCD- Assay	GCCGTGCCCCCGCGCCCACGTGGTTCGGTAG CGGGGGCCCCCT
C/EBPa del signal motifs Biotin fw	Oligo für ABCD- Assay (negativ Kontrolle)	Biotin- AGTACCGACGGCGCGGGGGCGACGGCGCGG GGGCGACGGC

C/EBPa del signal motifs Biotin rev	Oligo für ABCD- Assay (negativ Kontrolle)	GCCGTCGCCCCCGCGCCGTCGCCCCCGCGCCG TCGGTACT
mu: murin		
hu: human		

4.2 Arbeit mit prokaryotischen Zellen

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden mit den in Tabelle 4.3 aufgeführten Bakterienstämmen durchgeführt.

Tabelle 4.3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
Escherichia coli DH5 α	F- ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK-, mK+), <i>pboA</i> , <i>supE44</i> , λ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>
Escherichia coli DB 3.1	F- <i>gyrA462 endA1</i> Δ (<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r _B -, m _B -) <i>supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>xyt-5</i> λ - <i>leu mtl1</i>
Escherichia coli BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdS_B</i> (r _B -m _B -) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)
Escherichia coli DH10Bac	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ - <i>rpsL nupG</i> /pMON14272/pMON7124
Escherichia coli XL10-Gold	Tet ^r D(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI_qZDM15 Tn10</i> (Tet ^r) <i>Amy Cam^r</i>] ^a

4.2.1 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Plasmide sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Tabelle 4.4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Funktion	Größe	Referenz
pRL SV40 Renilla	Expression	3,7 kb	Promega
pTRE2Hyg	Expression	5,3 kb	Clontech

pcDNA3.1	Expression	5,4 kb	Invitrogen
pFASTBac HTc	Expressionsvektor für Sf9 Zellen	5,5 kb	Invitrogen
pGEX5X2	GST-Expressionskonstrukt für <i>E.coli</i> BL21	4,9 kb	GE Healthcare

Die in dieser Arbeit konstruierten Hybridplasmide sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Tabelle 4.5: In dieser Arbeit konstruierte Hybridplasmide

Plasmid	Funktion	Größe
pTRE2Hyg-FLAG-RGS2	FLAG-RGS2 Expressionskonstrukt	6,1 kb
pFASTBac HTc-FLAG	FLAG-Expressionskonstrukt für Sf9 Zellen	5,5 kb
pFASTBac HTc-FLAG - RGS2	FLAG-RGS2 Expressionskonstrukt für Sf9 Zellen	6,2 kb
pcDNA3.1-C/EBPa	C/EBPa Expressionskonstrukt	6,1 kb
pTRE2Hyg-RGS2	RGS2 Expressionskonstrukt	6 kb
pXP1-huC/EBPa Promotor	Luziferase-Konstrukt humaner C/EBPa Promotor	6,1 kb
pcDNA3.1-EGFP	EGFP-Expressionskonstrukt	7 kb
pcDNA3.1-EGFP-RGS2	EGFP-RGS2 Expressionskonstrukt	7,7 kb
pcDNA3.1-EGFP-RGS2 delta N79	EGFP-RGS2 Deletions Mutante	7,4 kb
pcDNA3.1-EGFP-RGS2 delta C199	EGFP-RGS2 Deletions Mutante	7,6 kb
pcDNA3.1-EGFP-RGS2 delta C116	EGFP-RGS2 Deletions Mutante	7,4 kb
pcDNA3.1-EGFP-RGS2 delta C83	EGFP-RGS2 Deletions Mutante	7,3 kb

pcDNA3.1-EGFP-RGS2 delta 83-199	EGFP-RGS2 Deletions Mutante	7,4 kb
pGEX5X2-bMyb	GST-bMyb Expressionskonstrukt für <i>E.coli</i> BL21	5,5 kb
pGEX5X2-RGS2	GST-RGS2 Expressionskonstrukt für <i>E.coli</i> BL21	5,6 kb
pGEX5X2-C21	GST-C21 Expressionskonstrukt für <i>E.coli</i> BL21	5,3 kb
pGEX5X2-RGS2 delta N79	GST-RGS2 Deletions Mutante delta N79	5,3 kb
pGEX5X2-RGS2 delta C199	GST-RGS2 Deletions Mutante delta C199	5,5 kb
pGEX5X2-RGS2 delta C116	GST-RGS2 Deletions Mutante delta C116	5,4 kb
pGEX5X2-RGS2 delta C83	GST-RGS2 Deletions Mutante delta C83	5,3 kb
pGEX5X2-RGS2 83-199	GST-RGS2 Deletions Mutante 83-199	5,4 kb
pcDNA3.1 -RGS2	RGS2 Expressionskonstrukt	7 kb
pcDNA3.1- RGS2 delta N79	RGS2 Deletions Mutante delta N79	6,7 kb
pcDNA3.1- RGS2 delta C199	RGS2 Deletions Mutante delta C199	6,9 kb
pcDNA3.1- RGS2 delta C116	RGS2 Deletions Mutante delta C116	6,7 kb
pcDNA3.1- RGS2 delta C83	RGS2 Deletions Mutante delta C83	6,4 kb
pcDNA3.1-RGS2 delta 83-199	RGS2 Deletions Mutante 83-199	6,7 kb

4.2.2 Nährmedien für die Kultivierung prokaryotischer Zellen

Nachfolgend sind die verwendeten Nährlösungen aufgeführt. Sie werden vor Verwendung für 20 min. bei 121° C autoklaviert. Feste Medien wurden durch den Zusatz von 1,5% (w/v) Agar zu einer entsprechenden Nährlösung hergestellt.

Luria-Bertani- (LB-)Medium (Sambrook 1998)

Das LB-Medium wird nach folgendem Rezept hergestellt:

NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
ddH ₂ O	ad 1 l, pH 7,5

X-Gal- Medium (Sambrook 1998)

X-Gal Medium besteht aus LB-Medium mit den folgenden Zusätzen:

1 M IPTG	1,0 ml/l
4% (w/v) X-Gal (in N,N'- Dimethylformamid)	1,0 ml/l

Bei Bedarf wird dem Medium ein Antibiotikum zur Selektion zugesetzt.

SOB-Medium

Das SOB-Medium besteht aus ähnlichen Bestandteilen wie das LB-Medium, allerdings in anderen Konzentrationen. Es wird außerdem durch KCl, MgCl₂ und MgSO₄ angereichert.

Wird das SOB-Medium zusätzlich mit Glukose versetzt, wird es als SOC-Medium bezeichnet.

Trypton	10 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	0,28 g
KCl	0,083 g
ddH ₂ O	ad 492,5 ml

Dieser Ansatz wird autoklaviert, anschließend werden folgende Substanzen steril hinzugegeben:

MgCl ₂ (2M)	2,5 ml
MgSO ₄ (1M)	5 ml
(Glukose, 1M	1 ml)

4.2.3 Antibiotika-Stammlösungen und Endkonzentrationen

Die Antibiotika-Stammlösungen werden nach (Sambrook 1998) angesetzt, steril filtriert und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Die Antibiotika werden den autoklavierten Nährmedien nach Abkühlen auf ca. 50°C in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Tabelle 4.6: Eingesetzte Antibiotikakonzentrationen für Plasmide

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in ddH ₂ O	50 µg/ml
Gentamicin	10 mg/ml in ddH ₂ O	7 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in Ethanol	100 µg/ml

4.2.4 Anlegen von Glycerol-Gefrierkulturen aus Bakterien

Von *E. coli* Kolonien, die Plasmide mit neuen Inserts oder häufig verwendete Plasmide tragen, werden standardmäßig Glycerin-Gefrierkulturen angelegt. Dafür werden 500µl der entsprechenden Über-Nacht- Kultur entnommen und mit 500µl 40%igem Glycerol versetzt. Die Glycerol-Kulturen werden bei -80°C gelagert.

4.2.5 Wachstumsbedingungen und Zellernte

Anzuchten in Flüssigmedien werden in Erlenmeyerkolben vorgenommen mit einem Volumenverhältnis Gefäß zu Flüssigkeit von 1:10. Die Hauptkulturen werden mit gut gewachsenen Vorkulturen beimpft, wobei das Inokulum 0,5 - 2%, (v/v) des Volumens der Hauptkultur beträgt.

E.coli -Zellen werden bei 37°C in einem Rotationsinkubator inkubiert. Die Zellernte aus 300 - 500 ml Kulturen erfolgt durch 20 min. Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C .

Zellsuspensionen mit einem Volumen bis zu 2 ml werden in Eppendorfreaktionsgefäßen durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min geerntet.

4.2.6 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* Zellen (DH5 α)

Chemokompetente *E. Coli* Zellen werden für die Transformation und Anreicherung von Plasmiden benötigt.

Die Herstellung erfolgt aus einem tiefgefrorenen Vorrat an DH5 α . Daraus werden mit der sterilen Impföse Zellen entnommen und auf einer LB-Agarplatte zur Vereinzelung ausgestrichen. Die Platte wird über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird eine der Kolonien gepickt und in 25 ml LB-Medium bei 225 rpm und 37°C über Nacht inkubiert. 2.5 ml dieser Vorkultur werden in einen Erlenmeyerkolben mit 225 ml LB-Medium überführt und unter Schütteln bei Raumtemperatur bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert (frühe log-Wachstumsphase). Dann wird die Kultur in 50 ml Falcon Gefäße überführt und für 10 min auf Eis inkubiert.

Anschließend werden die Zellen bei 4000 rpm und 4° C geerntet. Die Zellpellets werden in insgesamt 80 ml eiskaltem Transformationspuffer aufgenommen, resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut unter oben genannten Bedingungen pellettiert und in insgesamt 20 ml Transformationspuffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wird zu jeweils 150 μ l in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert. Die Reaktionsgefäße werden bei -80° C vorgekühlt und das Aliquotieren erfolgt auf Trockeneis. Die Aliquots werden kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80° C gelagert.

Transformationspuffer

Pipes (100mM)	25 ml
CaCl ₂ (1M)	3,75 ml
KCl (1M)	62,5 ml
ddH ₂ O	ad 236,25 ml, pH 6,7
MnCl ₂ (1M)	13,75 ml

4.2.7 Transformation chemokompetenter *Escherichia coli* Zellen (DH5 α)

Die chemokompetenten DH5 α werden auf Eis aufgetaut. 50 μ l der Zellen werden mit 1 μ l zu transformierender DNA für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Hitzeschock bei 42 °C für 45 s werden die Proben mit 800 μ l SOC- oder LB-Medium versetzt und bei 37 °C für 1 h geschüttelt. Im Anschluß wird zentrifugiert (Raumtemperatur, 10 000 \times g, 3 min), 800 μ l des Überstands verworfen und das Pellet mit dem restlichen Überstand resuspendiert. Die

Suspension wird auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden selektiven Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

4.3.1 Zelllinien

Tabelle 4.7: Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	ATCC-Nr.
32D Clone 3	Murine myeloische Progenitor Zelllinie. IL-3-abhängig. Wächst in Suspension.	CRL-11346
U937	Diese Zelllinie wurde aus einem humanen histiozytischen Lymphom etabliert. Sie kann u.a. durch TPA terminal zu Monozyten differenzieren.	CRL-1593.2
HL60	Aus humaner AML (FAB M2) etabliert. Kann sowohl monozytär sowie granulozytär differenzieren. c-Myc positiv.	CCL-240
NB4	Etabliert aus AML (FAB M3) einer Frau. t(15;17) positiv, durch ATRA zu Granulozyten differenzierbar	n.v.
Cos7	Nierenzelllinie vom „African green monkey“	ACC 60
293T	gut transfizierbares Derivat der humanen primären embryonalen Nieren Zelllinie 293 (ACC 305), enthält ein Plasmid mit der Temperatur-sensitiven Mutante des SV-40 large T-antigen (tsA1609)	ACC 635
SF-9	etabliert aus der Zelllinie IPLB-SF-21-AE, hergestellt aus Ovar von <i>Spodoptera frugiperda</i> , Zellen können mit MNPV oder anderen Baculoviren infiziert werden	ACC 125

Des Weiteren standen stabil mit FLT3-WT bzw. FLT3-ITD transfizierte 32D-Zellen zur Verfügung.

Humane FLT3-WT bzw. FLT3-ITD Konstrukte wurden unter Kontrolle der 5'LTR des Moloney murine sarcoma Virus in einen Expressionsvektor (pAL) kloniert. 32D Zellen wurden mit 10µg Plasmid-DNA sowie mit 1µg pMAM/BSL (Kakan Pharmaceutical, Japan) transfiziert und mit 15µg/ml Blastocidin selektiert (Mizuki et al. 2000).

Zusätzlich wurden stabile Zelllinien aus 32D Zellen mit FLAG bzw. FLAG-RGS2 Expressionskonstrukten hergestellt. Dafür wurden 32D Zellen mit 10µg der jeweiligen Plasmid-DNA transfiziert und anschließend mit 15µg/ml Blastocidin selektiert.

4.3.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen werden bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 90% und mit einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert. Die IL3-abhängige murine Zelllinie 32Dcl3 wird in RPMI 1640 mit 20mM HEPES kultiviert. Dem Medium werden außerdem 10% FCS, 10% WEHI (IL3-haltiger Überstand der Zelllinie WEHI-3b), 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin sowie 1% Natriumpyruvat hinzugefügt.

Die Zelllinien U937, HL60 und NB4 werden in RPMI 1640 ohne HEPES kultiviert. Hier wird zusätzlich 1% L-Glutamin sowie 1% Penicillin/Streptomycin zugegeben.

Die adhärenenten Zelllinien Cos7 und HEK293T werden in DMEM-Medium mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Das Ablösen adhärenenter Zellen erfolgt mit 1% Trypsin und das Waschen von Zellen mit sterilem PBS.

Um die Zellkonzentration konstant bei etwa 0.3 bis 1.5 x10⁶ Zellen pro ml zu halten, werden die Zellen alle zwei bis drei Tage gesplittet und bekommen frisches Medium.

Die Insekten-Zelllinie Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) wird ebenfalls unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wachsen bei 27°C, es ist kein CO₂-begaster Inkubator erforderlich. Das Medium für Sf9 Zellen ist das „TNM-FH fully-supplemented Insect Cell Culture Medium“ von der Firma BD Biosciences. Die Zellen werden alle 3 bis 5 Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet, um die Zellkonzentration konstant bei etwa 1x10⁵ pro ml zu halten. Dafür werden die adhärenenten Zellen mit einem Cell-Scraper vom Flaschenboden abgekratzt und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Die Zellen werden für die Expression von Proteinen mit Hilfe des Baculovirus-Systems verwendet.

4.3.3 Bestimmung der Zahl vitaler Zellen

Die Bestimmung der Zahl vitaler Zellen erfolgt mit Hilfe der Trypanblaufärbung. Dazu werden 20 µl Zellsuspension mit Trypanblau (0,16 %) im Verhältnis 1:2 gemischt, in eine Neubauerzählkammer gegeben und unter dem Mikroskop gezählt. Der Farbstoff wird nicht von vitalen Zellen aufgenommen.

Die Zellzahl der Zellsuspension wird mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = (Z/2) \times f \times 10^4$$

wobei Z = gezählte Zellen in 2 Großquadraten und f = Verdünnungsfaktor sind.

4.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die einzufrierenden Zellen werden für 5 min bei 400g abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in einer Dichte von 1×10^7 in 1 ml Medium mit 20%FCS sowie 10% DMSO aufgenommen und in einem Cryoröhrchen in einer Einfrierbox zunächst zwei Tage bei -80°C eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff auf Dauer gelagert werden können. Das Auftauen der Zellen erfolgt in einem 37°C Wasserbad. Die aufgetauten Zellen werden direkt in vorgewärmtes Medium überführt, bei 400g für 5 min. abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert.

4.3.5 Verschiedene Methoden zur Transfektion von eukaryotischen Zellen

Suspensionszellen lassen sich in der Regel durch Elektroporation transfizieren. Für die Transfektion von 32D Zellen werden 1×10^7 Zellen aus der Kultur entnommen, einmal in Medium gewaschen und für die Elektroporation in $300 \mu\text{l}$ Medium aufgenommen. Zu den Zellen werden $15 \mu\text{g}$ der zu transfizierenden Plasmid-DNA in eine Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 4mm gegeben. Die Elektroporation erfolgt im Gene-Pulser II der Firma BioRad bei 300V und $0.975 \mu\text{F}$. Vor und nach der Elektroporation werden die Zellen auf Eis gehalten. Anschließend werden die Zellen in vorgewärmtem Medium mit allen notwendigen Zusätzen aufgenommen. Zur Herstellung einer stabilen Zelllinie erfolgt die Selektion mit dem entsprechenden Antibiotikum über mehrere Wochen, bis die Zellen in Anwesenheit des Selektionsantibiotikums ein stabiles Wachstum zeigen. Bei einer transienten Transfektion wird in der Regel am Folgetag der Transfektion der entsprechende Versuch angesetzt.

Die Transfektion von adhären Zellen erfolgt mit dem Nanofectin I - Reagenz der Firma PAA. Für die Transfektion von Zellen in einer 10cm Schale werden am Vortag 2×10^6 Zellen in 10ml Medium ausplattiert. Für die Transfektion wird $8 \mu\text{g}$ DNA eingesetzt. Die DNA wird in $500 \mu\text{l}$ 150mM NaCl aufgenommen. In einem zweiten Reaktionsgefäß werden $25 \mu\text{l}$ Nanofectin I und $500 \mu\text{l}$ 150mM NaCl gemischt. Beide Ansätze werden gevortext und kurz abzentrifugiert, bevor die Nanofectin-Lösung zur DNA-Lösung gegeben wird. Nun wird wiederum gevortext und abzentrifugiert, und es erfolgt eine

Inkubation von 30 min. bei Raumtemperatur. Während dieser Inkubationszeit bilden sich Nanopartikel einer definierten Größe aus den Nanofektin-Molekülen und der DNA. Diese Partikel haben dann die optimale Größe, um von den Zellen effektiv durch Endozytose aufgenommen zu werden. Des Weiteren wird die DNA, sobald sie in das Zytoplasma der Zellen aufgenommen wurde, durch die Struktur des Nanofektin vor dem enzymatischen Abbau geschützt. Somit kann eine sehr effektive Transfektion erreicht werden. Während der Inkubation des Nanofektins mit der DNA werden die Zellen einmal gewaschen und in 9ml frischem DMEM-Medium mit 10% FCS, jedoch ohne P/S aufgenommen. Nach Ende der Inkubationszeit wird die DNA-Nanofektin-Lösung (1ml) vorsichtig auf die Zellen aufgetropft und mit dem Medium durch leichtes Schwenken vermischt. Für kleinere Transfektions-Ansätze werden die Mengenangaben der Reagenzien entsprechend angepasst.

4.3.6 Luciferase-Assay

Luciferasen sind Enzyme, die die Oxidation von Luciferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff katalysieren. Die bei der Katalyse frei werdende Energie wird zu mehr als 90 % in Form von sichtbarem Licht abgegeben und bildet die Grundlage der Biolumineszenz. Die spezie-spezifischen Luciferasen unterscheiden sich in der Art ihrer Reaktionsmechanismen, in der Erfordernis weiterer Cofaktoren wie ATP, Magnesium-Ionen oder Flavinmononukleotide (FMN) und in den Wellenlängen des emittierten Lichts. Im Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System kommen zwei verschiedene Enzyme zum Einsatz: zum einen *Firefly* aus *Photinus pyralis*, zum anderen *Renilla* aus *Renilla reniformis* (Wood et al., 1984). Die Luziferase *Renilla* wurde in den Vektor SV40-pRL-null kloniert und dient im Luciferase-Assay als Kontrollreporter. Die Kotransfektion des Kontrollreporters dient als interne Kontrolle. Durch Normalisierung auf diese können experimentelle Schwankungen durch Unterschiede in der Transfektionseffizienz oder Vitalität der Zellen minimiert werden. SV40-pRL-null trägt keine Enhancer oder Promotorelemente, das monomere Enzym benötigt keine posttranslationalen Modifikationen und ist deshalb als Reporter direkt nach der Translation aktiv.

Mit Hilfe des Luciferase-Assays kann die Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren gemessen werden. Dazu wird ein Vektor verwendet, bei dem *Firefly* als Reporter gen unter der Kontrolle der zu untersuchenden Promotorsequenz steht.

In diesem Fall soll die Aktivierung des C/EBP α -Promotors durch RGS2 analysiert werden werden.

Zur Untersuchung wird dafür ein C/EBP α -Reporter-Konstrukt eingesetzt, das zusammen mit einem RGS2-Expressionskonstrukt bzw. dem entsprechenden Leervektor in 32D Zellen bzw. HEK293T Zellen transfiziert wird. Das C/EBP α -Reporter-Konstrukt besteht aus der humanen C/EBP α -Sequenz 562 bp aufwärts der Translationsstartstelle. Diese Sequenz wurde in einen promotorlosen Luziferase Vektor kloniert (Pabst et al. 2001a). Die Normalisierung erfolgt durch Kotransfektion des Renilla-Konstruktes (SV40-pRL-null-Renilla) im Verhältnis 1:50. Die Analyse der Zellen erfolgt 24h bis 48h nach der Transfektion.

Suspensionszellen werden bei Raumtemperatur abzentrifugiert (5 min, $400 \times g$), zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und für 30 min. mit 200 μ l Passive Lysis Buffer (Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System) bei 4 °C inkubiert. Adhärente Zellen werden in den Platten zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 1xPLB für 15 min unter Schütteln bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend erfolgt die Analyse unter Verwendung des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems (Promega), das durch schrittweise Zugabe der Luciferase-Substrate die Messung beider Enzym-Aktivitäten in einem Ansatz ermöglicht. Zunächst wird die Firefly-Luziferase durch Zugabe des Substrates Luziferase Assay Reagent II (LARII) gemessen. Durch anschließende Zugabe des Stop & Glow Reagenz wird die Firefly Aktivität unterdrückt und die Aktivität der Renilla Luziferase induziert. Die genaue Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers. Die Messung wird am Luminometer TD-20/20 bei einer Sensitivität von 60 % durchgeführt. Abschließend werden die Ergebnisse durch Division der *Firefly*- durch die *Renilla*-Werte normalisiert.

4.3.7 Klonales Wachstum in Methylzellulose („Kolonie Assay“)

Für die Kolonie-Assays wurden 32D Zellen transient mit Flt3-ITD und den entsprechenden RGS2-Konstrukten transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte das Ausplattieren der Kolonie-Assays in Methylzellulose. Dafür wurden die transfizierten 32D Zellen zunächst abzentrifugiert, mit IMDM gewaschen und auf eine Dichte von 500 Zellen pro μ l eingestellt. Pro Triplikat wurden 460 μ l dieser Zellsuspension pro 35 mm Zellkulturschale in 1 ml Medium (IMDM mit 1% Methylcellulose, 20% FCS, 1 ng/ml IL-3 und ggf. 0,6 ng/ml Neomycin) ausgesät. Die Koloniezahlen wurden an den angegebenen Tagen festgestellt.

4.3.8 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie werden Antikörper mit gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoffen verwendet, die bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge Licht einer definierten Wellenlänge abstrahlen und so im Mikroskop sichtbar und voneinander unterscheidbar sind.

Je nach eingesetztem Antikörper kann so entweder direkt (Primärantikörper an Farbstoff gekoppelt) oder indirekt (Sekundär- oder Tertiärantikörper an Farbstoff gekoppelt) ein Epitop und damit ein bestimmtes Protein sichtbar gemacht werden. Somit ist eine Lokalisation des Moleküls auf mikroskopischer Ebene möglich.

In dieser Arbeit wird ausschließlich indirekte Immunfluoreszenz angewendet, bei der der Sekundärantikörper mit Alexa-488 markiert ist. Durch Bindung an den entsprechenden Primärantikörper kommt es zur spezifischen Färbung des zu untersuchenden Proteins.

Des Weiteren werden in der vorliegenden Arbeit Zellen analysiert, die ein EGFP-Fusionsprotein exprimieren. Für diese Ansätze erfolgt keine Antikörper-Färbung, sondern nur eine Gegenfärbung mit Hoechst 33342, um den Nukleus sichtbar zu machen.

Für die Immunfluoreszenzfärbung mit dem RGS2-Antikörper (Abcam) werden 32D Zellen verwendet.

Es werden zunächst Cytospins erstellt, wobei die Zellen bei 1000 rpm für 10 Minuten auf einen Objektträger zentrifugiert werden. Der Objektträger wird für einige Minuten an der Luft getrocknet, anschließend werden die Zellen für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Es erfolgt ein kurzer Waschschriff in PBS, gefolgt von der Blockierung mit 5% FCS in PBS mit 0,2% Triton X-100 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Das Triton X-100 sorgt dabei für die Permeabilisierung der Zellmembranen.

Anschließend werden die Zellen wiederum kurz in PBS gewaschen.

Die Färbung für RGS2 erfolgt mit dem RGS2 Antikörper der Firma Abcam (Kaninchen, polyklonal). Dieser wird in einer Verdünnung von 1:500 in 5% Blockierungs-Lösung eingesetzt und über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle wird die entsprechende Isotypen-Kontrolle für den RGS2- Antikörper eingesetzt.

Die Objektträger werden danach dreimal 15 Minuten in PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgt. Als sekundärer Antikörper wird ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper der Firma Invitrogen verwendet. An diesen Antikörper ist Alexa Fluor 488 gekoppelt, das bei 495 nm angeregt werden kann und dann im grünen Bereich bei 519 nm emittiert.

Der sekundäre Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:1000 in 5% Blockierungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Objektträger wiederum dreimal für je 15 Minuten in PBS gewaschen. Um Salze zu entfernen, werden sie anschließend einmal kurz in ddH₂O geschwenkt, bevor die Färbung der Nuklei mit Hoechst 33342 erfolgt. Dafür werden die Objektträger für fünf Minuten mit 0,1mM Hoechst 33348 Dye in ddH₂O inkubiert.

Abschließend erfolgt erneut ein kurzer Waschschrift in ddH₂O, dann werden die Objektträger mit Mowiol-488 eingedeckelt und die Färbungen am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Für die Lokalisationsstudien mit RGS2-Deletionsmutationen werden HEK 293T Zellen auf Deckgläschen ausplattiert und am nächsten Tag mit den entsprechenden EGFP-RGS2 Deletionsmutanten transfiziert.

Die Lokalisationsanalyse mit dem Fluoreszenzmikroskop erfolgt nach 24h. Dafür werden die Zellen wie zuvor beschrieben mit 4% Paraformaldehyd fixiert und die Membranen mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Die Nuklei werden mit Hoechst 33342 gegengefärbt, und die Zellen werden für die Analyse mit Mowiol 488 eingedeckelt.

Die eingedeckelten Objektträger können bis zur Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt werden.

Die Präparate werden am konfokalen Laserscanmikroskop der Firma Zeiss analysiert.

4.3.9 Klonierung eines Baculovirus-Konstruktes und Generierung des rekombinanten Baculovirus

Ein großer Vorteil der Expression und Aufreinigung von Proteinen in Insektenzellen gegenüber Bakterien ist, dass die Proteine in diesem Zellsystem mit allen eukaryotischen postranslationalen Modifikationen versehen werden.

Die Herstellung eines rekombinanten Baculovirus erfolgt mit dem Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System von Invitrogen. Dieses stellt eine schnelle und effiziente Methode zur Herstellung von Baculoviren dar (Ciccarone et al. 1998) und basiert auf einer ortsspezifischen Transposition einer Expressions-Kassette mit dem „Gene of Interest“ in einen Baculovirus-Shuttle Vector (Bacmid), der dann in *E. coli* vermehrt wird (Luckow et al. 1993).

Zunächst wird FLAG-RGS2 in den Vektor pFASTBac HTc kloniert. Dieser besitzt einen starken Polyhedrin-Promotor, der die Expression großer Mengen von Protein ermöglicht

und erhält außerdem N-terminal ein 6-faches His-Tag. Die Expressionskassette wird vom linken und rechten Arm des Tn7 Transposons flankiert und enthält außerdem eine Gentamicin-Resistenz.

Das pFASTBac Donor Plasmid wird daraufhin in DH10Bac kompetente *E. coli* transformiert. Diese Zellen enthalten einen Baculovirus-Shuttle-Vektor (Bacmid) mit einer mini-attTn7 Erkennungssequenz und einem Helfer-Plasmid. Nach der Transformation des pFASTBac-Expressions-Plasmids erfolgt die Transposition zwischen dessen Mini-Tn7 Element und der Mini-attTn7 Erkennungsstelle auf dem Bacmid, somit wird ein rekombinantes Bacmid generiert. Die Transpositions-Reaktion wird von Helfer-Proteinen reguliert, die durch das Helfer-Plasmid in den DH10Bac Zellen bereitgestellt werden.

Anschließend kann die Bacmid-DNA isoliert und in Insektenzellen zur Herstellung eines rekombinanten Baculovirus transfiziert werden.

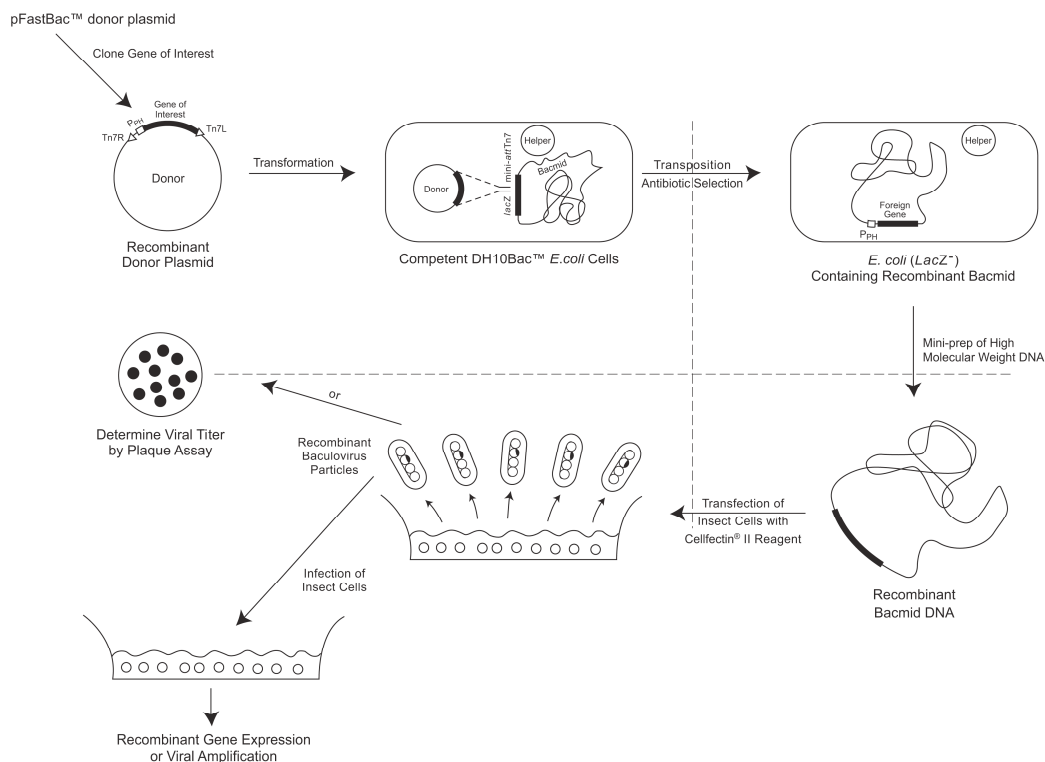


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Baculovirus-Expressions-Systems nach Invitrogen

Klonierung von pFASTBac-FLAG-RGS2 und pFASTBac-FLAG

Das FLAG-RGS2-Konstrukt wurde in die BamHI und NotI Schnittstellen von pFASTBac HTc kloniert. Um nur das FLAG-Tag als Kontrolle zu erhalten, wurde durch ortsspezifische Mutagenese ein Stop-Codon vor dem 5'-Ende von RGS2 eingefügt.

Zur Überprüfung der korrekten Klonierung wurden beide Konstrukte vor der Verwendung sequenziert.

Transformation der Expressionskonstrukte in DH10Bac chemokompetente E. coli

Die Transformation der Expressionskonstrukte in DH10Bac chemokompetente Zellen erfolgt nach Protokoll, mit dem Unterschied, dass die Zellen nach dem Hitzeschock für 4h bei 37°C geschüttelt werden.

Die Bakterien werden nach der Transformation auf LB-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetrazyklin, 100 µg/ml Bluo-gal, and 40 µg/ml IPTG zur Selektion ausgestrichen und für 48h bei 37°C inkubiert.

Insertionen der Mini-Tn7 Stelle in die Mini-attTn7 Anlagerungsstelle auf dem Bacmid zerstören die Expression des LacZ α -Peptids, so dass Kolonien, die das rekombinante Bacmid enthalten, weiß sind. Klone mit dem unveränderten Bacmid erscheinen hingegen blau. Nur die weißen Klone werden für die Analyse verwendet.

Um den Phänotyp der Kolonien zu verifizieren, werden sie gepickt und nochmals auf den entsprechenden LB-Platten ausgestrichen und über Nacht inkubiert.

Aus einer einzelnen Kolonie wird dann eine 5ml-Kultur in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, and 10 µg/ml Tetrazyklin angeimpft und für 24h bis zur stationären Phase im Brutschrank unter Schütteln inkubiert.

Die Isolation des Bacmids erfolgt mit dem S.N.A.P.TM MiniPrep Kit (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers.

Transfektion von Insektenzellen (Sf9) mit dem Baculovirus Konstrukt

Es werden 5×10^5 Sf9 Zellen pro Loch einer 6-Loch Zellkultur-Platte in TNM-FH Medium ausgesät. Am nächsten Tag werden die Zellen mit Hilfe von Nanofektin nach den Angaben des Herstellers mit dem Bacmid transfiziert. Pro Ansatz werden 1µg DNA eingesetzt (FLAG-RGS2 sowie FLAG).

Die Zellen werden für drei Tage im Brutschrank inkubiert, bevor der baculovirus-haltige Überstand abgenommen und abzentrifugiert wird. Der Überstand wird für die Infektion weiterer Insektenzellen bei 4°C aufbewahrt.

Die erfolgreiche Transfektion der Insektenzellen lässt sich an Veränderungen des Phänotyps erkennen. Die Zellen schwellen an, beenden die Teilung, werden granulär und lösen sich schließlich vom Boden ab, bevor die komplette Lyse erfolgt. Bevor dies geschieht, werden Proteinlysate aus den transfizierten Zellen hergestellt und die Expression des zu untersuchenden Proteins im Westernblot überprüft. In diesem Fall wird dafür ein Anti-FLAG Antikörper verwendet.

Infektion von Insektenzellen mit dem Baculovirus (small scale)

Der nach der Transfektion der Sf9 Zellen erhaltene virale Überstand besitzt einen vergleichsweise geringen Titer von in der Regel 1×10^6 bis 1×10^7 plaque forming units (pfu)/ml. Dieser Stock wird deshalb verwendet, um weitere Sf9 Zellen zu infizieren und den Titer durch virale Amplifikation zu erhöhen. Dies führt zur Produktion eines höher konzentrierten viralen Überstands von 1×10^7 bis 1×10^8 pfu/ml, der für die Infektion von Insektenzellen in größerem Maßstab und zur Aufreinigung von Proteinen benutzt werden kann.

Dafür werden wiederum 5×10^5 Sf9 Zellen in einer 6-Loch-Platte in TNM-FH-Medium ausgesiedelt. Am nächsten Tag werden die Zellen einmal gewaschen und das TNM-FH-Medium wird gegen Baculo-Gold serumfreies Medium ausgetauscht.

Es werden dann 250 μ l Virus-Überstand (FLAG-RGS2 sowie FLAG) aus der ersten Infektion zu den Zellen gegeben und die Zellen damit für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Wenn die Zellen phänotypische Anzeichen der Infektion zeigen, kann der Viren-Überstand abgenommen und für weitere Infektionen bei 4°C gelagert werden.

Auch hier werden wiederum Proteinlysate aus den Zellen hergestellt und die Expression von RGS2 im Westernblot überprüft.

Infektion von Insektenzellen mit dem Baculovirus (large scale)

Um im großen Maßstab Protein in Insektenzellen zu exprimieren, werden 2×10^7 Sf9 Zellen mit dem viralen Überstand aus der small scale-Infektion infiziert.

Dafür werden die Sf9 Zellen zunächst in 100 ml TNM-FH Medium in einen Erlenmeyerkolben ausgesiedelt. Unter langsamem Schütteln bei 100rpm werden sie für drei Tage bei 27°C inkubiert. Das Schütteln führt dazu, dass die Zellen in Suspension wachsen und somit eine größere Zelldichte erreicht werden kann.

Die Zellen werden dann bei 400g für fünf Minuten abzentrifugiert und zweimal in PBS gewaschen. Anschließend werden sie in 100 ml Baculo-Gold serumfreien Medium resuspendiert und in einen sauberen Erlenmeyerkolben gegeben. Für die Infektion erfolgt die Zugabe von 2 ml Baculovirus-Überstand aus der ersten Infektion (FLAG-RGS2 sowie FLAG). Die Zellen werden wiederum für zwei Tage bei 100 rpm und 27°C geschüttelt, bevor sie für die Lyse und Aufreinigung des Proteins verwendet werden.

Lyse von infizierten Sf9-Zellen und Aufreinigung des rekombinanten RGS2

Die mit FLAG-RGS2 bzw. FLAG infizierten Sf9 Zellen werden nach zweitägiger Infektion abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen.

Anschließend erfolgt die Lyse in 8 ml IP-Lysepuffer.

IP-Lysepuffer

Tri-HCl (pH 7.4)	50mM
NaCl	150mM
EDTA	1mM
Triton X – 100	1%
+ Proteinase-Inhibitor	

Die Zellen werden in Lyse-Puffer aufgenommen und zunächst für eine Minute gevortext. Anschließend werden sie für 30 Minuten auf Eis inkubiert und zwischendurch regelmäßig geschüttelt. Die Zelldebris werden bei 14000 rpm und 4°C für 15 min. abzentrifugiert und dann verworfen. Das Lysat kann als komplettes Zellysate bei -80° C eingefroren werden.

Mit 2 ml des Lysats wird sofort die Protein-Aufreinigung fortgesetzt.

200µl FLAG-M2 Affinity-Gel (Sigma) werden zweimal mit 200µl PBS und einmal mit 200µl Lyse-Puffer gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den einzelnen Waschschritten erfolgt jeweils bei 1000 g und 4°C für fünf Minuten. Schließlich werden die gewaschenen FLAG-Beads zum Lysat gegeben und über Nacht bei 4°C rotiert. Währenddessen bindet der FLAG-Antikörper an das FLAG-Tag des aufzureinigenden Proteins.

Nach dem Abzentrifugieren wird der Überstand verworfen, und die Beads werden viermal mit je 2 ml Lyse-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Nach dem letzten Waschschriff wird 200µl Lyse-Puffer auf die FLAG-Beads mit dem gekoppelten aufgereinigten Protein gegeben. Die Proben können nun bei -80°C gelagert werden und dann jederzeit für die entsprechenden Versuche verwendet werden.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Restriktionsspaltung von Plasmiden

Die für Klonierungen notwendigen Spaltungen von cDNA und Plasmiden erfolgen mit Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme erkennen palindromische Zielsequenzen und hydrolysieren diese, was zur Aufspaltung der DNA führt.

Die entsprechenden Enzyme der Firmen New England Biolabs und Invitrogen werden gemäß Herstellerangaben in den zugehörigen Puffern eingesetzt.

4.4.2 Ligation

Die Ligation von sogenannten “klebrigen Enden” (sticky ends) oder “glatten Enden” (blunt ends) erfolgt mit Hilfe des Enzyms DNA-T4-Ligase. Dabei wird die endständige 5'-Phosphatgruppe kovalent mit der freien 3'-OH-Gruppe verknüpft.

Das zu ligierende DNA-Insert mit kohäsiven Enden wird im drei- bis fünffachen Überschuss eingesetzt. Das Verhältnis lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{ng des Vektors} \cdot \text{kb Größe des Inserts}}{\text{kb Größe des Vektors}} \cdot \text{molares Verhältnis von} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{ng des Inserts}$$

Ein 10 µl Ansatz wird neben Insert und Vektor aus 1 µl T4-DNA-Ligase, 2 µl 5 × T4-DNA-Ligase Puffer und einem entsprechenden Volumen Wasser erstellt. Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend zur Transformation von *E. coli* DH5α eingesetzt.

4.4.3 Einsatz von DNA-Polymerase I zur Herstellung von glatten Enden

Die DNA-Polymerase I, auch großes Klenow-Fragment genannt, besitzt Polymeraseaktivität und eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, aber keine 5'-3' Exonukleaseaktivität mehr. Durch Zugabe dieses Enzyms werden 5' - Überhänge aufgefüllt und 3' - Überhänge abgebaut, so dass die *sticky ends* zu *blunt ends* werden.

4.4.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die analytische Plasmidisolierung aus Bakterien werden 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Plasmid tragenden *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmidisolierung wird mit Hilfe des FastPlasmid™ Kit (Eppendorf) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Dabei werden 2 ml der Übernacht-Bakterienkultur geerntet, in 400 µl Lysis Puffer aufgenommen und für 30 Sekunden gevortext. Das Lysat wird auf ein Fast-Plasmid- Mini-Säulchen aufgebracht und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend werden 400 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen erneut zentrifugiert, um es von Isopropanolresten zu befreien. Abschließend wird die Plasmid-DNA mit 30 - 50 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die isolierte DNA wird langfristig bei -20° C gelagert.

Die präparative Plasmidisolierung erfolgt mit Hilfe des JET Star 2.0 Plasmid Purification MAXI Kit entsprechend den Angaben des Herstellers (MaxiPrep).

Die Bakterien werden in 250 ml LB-Medium inklusive des entsprechenden Antibiotikums über Nacht bei 37°C und 225rpm inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wird das Pellet in 10 ml Puffer E1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt durch Zugabe von 10 ml Puffer E2. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Proteine durch Zugabe von 10 ml Puffer E3 ausgefällt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 8500 rpm für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird der klare Überstand des Lysats durch eine zuvor mit 30 ml Puffer E4 äquilibrierte Maxi-Präp-Säule gefiltert. Die DNA bindet dabei an die Membran der Säule und kann nach Waschen mit 60 ml Puffer E5 durch Zugabe von 15 ml Puffer E6 eluiert werden. In einem Glas-Zentrifugen-Röhrchen wird die DNA durch Zugabe von 10.5 ml Isopropanol gefällt und kann bei 10000 rpm und 4°C für 30 min pelletiert werden. Nach einmaligem Waschen in 75% Ethanol wird die DNA in 200 bis 1000 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

TE-Puffer

Tris-HCl 10 mM, pH 7,4

EDTA 1 mM

4.4.5 Phenol-Chloroform Extraktion von DNA

Die Isolation von DNA erfolgt mit Hilfe von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) der Firma Invitrogen.

Durch Zugabe dieses Reagenzes werden die in der Probe enthaltenen Proteine denaturiert und in der organischen Phase aufgenommen. Die DNA löst sich in der wässrigen Phase und kann aus dieser durch Fällung mit Ethanol isoliert werden.

Der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wird im gleichen Mengenverhältnis zu der DNA-enhaltenden Probe gegeben und diese durch mehrmaliges Umwenden gründlich gemischt. Es erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 13000rpm und 4°C für 15 min. Der wässrige Überstand, welcher die DNA enthält, wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgt durch Zugabe von 2.5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat. Die Probe wird wiederum gründlich gemischt und bei 13000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die DNA ist danach als Pellet erkennbar und wird einmal in 75% Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet getrocknet wurde, wird es in 10 bis 20 µl ddH₂O aufgenommen.

4.4.6 Isolation von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgt mit TRIzol (Invitrogen), einer monophasischen Lösung von Phenol und Guanidin-Isothiocyanat.

1. Homogenisierung

Mit 1 ml TRIzol werden $5-10 \times 10^6$ Zellen durch mehrfaches Pipettieren lysiert. Anschließend werden die Proben 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Dissoziation der Kernproteine zu ermöglichen.

2. Phasenseparation

Nach Hinzufügen von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml TRIzol werden die Reaktionsgefäße 15 sec kräftig geschüttelt und dann für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Proben 15 min bei 12 000 g bei 4°C zentrifugiert. Es erfolgt eine Auftrennung in eine untere rote Chloroform-Phenol-Phase, eine die denaturierten Proteine enthaltende weißliche Zwischenphase und eine obere wässrige Phase, welche die Nukleinsäuren enthält.

3. Präzipitation der RNA

Die wässrige Phase wird vorsichtig mit der Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgt die Fällung der RNA mit 0,5 ml Isopropanol. Die Proben werden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 10 min bei 12 000 g und 4°C zentrifugiert. Die RNA lässt sich daraufhin als Pellet erkennen.

4. Waschen der RNA

Die folgenden Schritte finden auf Eis statt. Nach der Entfernung des Überstandes wird das Pellet in 1 ml 75% Ethanol suspendiert und durch erneutes Zentrifugieren bei 7500 g und 4°C wieder ausgefällt. Auf diese Weise wird das RNA-Pellet zweimal gewaschen. Anschließend wird die RNA für 10 min luftgetrocknet und dann in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

5. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt photometrisch, wie im folgenden Abschnitt (4.4.7) beschrieben.

4.4.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen in wässriger Lösung bei 280 nm liegt, ist es außerdem möglich, durch eine Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm die Reinheit der Nukleinsäurelösung zu überprüfen. Das Verhältnis dieser Absorptionswerte ist ein Maß für die Reinheit. Je größer der Quotient aus spezifischem (E_{260}) zu unspezifischem Signal (E_{280}) ist, desto reiner ist die Nukleinsäureprobe. Ist der Quotient kleiner als 1,7, liegen Verunreinigungen vor, bei Werten zwischen 1,7 und 2,0 handelt es sich um eine reine Nukleinsäurelösung. Die bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessene Extinktion beträgt eins ($E_{260}=1$) für doppelsträngige DNA der Konzentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und einzelsträngige RNA der Konzentration 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Konzentrationsbestimmung aller verwendeten Nukleinsäuren erfolgt mit dieser Methode.

4.4.8 Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)

Als Ausgangsmaterial dient die zuvor isolierte RNA. Mit dem Enzym Reverse Transkriptase, einer aus Retroviren stammenden RNA abhängigen DNA-Polymerase, wird ein DNA-Strang hergestellt, der zur RNA komplementär ist und als cDNA (complementary DNA) bezeichnet wird. Die hier verwendete Reverse Transkriptase entstammt dem Moloney murine leukemia-Virus (MMLV) und wird rekombinant in *E. coli* hergestellt. Als Substrat der Reversen Transkriptase dienen die Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP, die zusammen als dNTPs bezeichnet werden. Diese werden unter Abspaltung von Pyrophosphat an das 3'-Ende des neu geschriebenen Strangs angehängt. Für die Substraterkennung durch die Reverse Transkriptase ist die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen erforderlich. Als Primer dient ein Oligonukleotid, das nur aus Thyminnukleotiden besteht und so spezifisch mit dem für mRNA charakteristischen PolyA-Schwanz am 3'-Ende hybridisiert, nicht aber mit der rRNA und tRNA.

Die genaue Versuchsanordnung wird im Folgenden beschrieben:

Reaktionsansatz 1:

1 µg RNA in 15,75µl DEPC-Wasser

1 µl Oligo-dT-Primer

1 µl RNase out

Der Reaktionsansatz wird fünf Minuten bei 70°C (Denaturierung der mRNA), dann fünf Minuten auf Eis und schließlich zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zugabe von Reaktionsansatz 2:

5 µl M-MLV-5x-Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT)

1,25 µl dNTP (10mM)

1 µl M-MLV-RT

Es folgt eine Inkubation von einer Stunde bei 42°C und anschließendes Erhitzen auf 70°C über 15 Minuten. Schließlich wird die so gewonnene cDNA auf ein Endvolumen von 100µl mit DEPC-Wasser verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wird die cDNA bei – 20°C gelagert.

4.4.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Reaktionsgemisch eines PCR-Ansatzes (*polymerase chain reaction*) setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 1.) Matrizen-DNA (*template*-DNA)
- 2.) Oligonukleotide (*Primer*)
- 3.) thermostabile DNA-Polymerase
- 4.) Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)

Zur exponentiellen Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragmentes durchläuft der PCR-Ansatz in einem Thermocycler wiederholt Zyklen von Denaturierung, *Primer*-Anlagerung (*Annealing*) und Kettenverlängerung (*Elongation*). Die *Primer* werden spezifisch für das zu amplifizierende DNA-Fragment konstruiert. Neben den zur *template*-DNA komplementären Bereichen enthalten die *Primer* zum Teil an den 5'-Enden die Erkennungssequenzen spezieller Restriktionsendonukleasen. Diese Erkennungssequenzen

können im Anschluss an die PCR von den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert werden, wodurch eine Klonierung der PCR-Produkte in entsprechend hydrolysierte Vektoren ermöglicht wird. Die *Primer* werden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf eine Konzentration von 10 pmol/ μl eingestellt. Die dNTP's liegen als 10 mM Lösung vor. Die Kettenverlängerung erfolgt mit Hilfe der Biotherm™ DNA-Polymerase. Die PCR-Reaktionsansätze werden in 0,2 ml Reaktionsgefäße pipettiert.

Ein PCR-Ansatz mit der Biotherm™ DNA-Polymerase setzt sich wie folgt zusammen:

Template DNA	1 μl
Primer fw (100 nM)	1 μl
Primer rv (100 nM)	1 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
MgCl ₂ (25 mM, optional)	2 μl
DMSO (optional)	2,5 μl
10x Biotherm Buffer	2,5 μl
Biotherm DNA Polymerase (2 U/ μl)	0,25 μl
ddH ₂ O	ad 25 μl

Eine PCR wird nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

Denaturierung	95° C	5 min
Denaturierung	95° C	10 sek
Annealing	5-10° C unter T _m des Primers	30 sek
Elongation	72° C	1 min pro kb
finale Elongation	72° C	4 min

Die Schritte 2-4 werden 35x wiederholt. Bei Verwendung einer anderen Polymerase als der Taq-Polymerase kann die Elongationstemperatur variieren.

4.4.10 Ortsspezifische Mutagenese („QuikChange“)

Um gezielt Aminosäuren auszutauschen, werden Punktmutationen in das entsprechende Gen eingeführt. Dazu werden zwei komplementäre Primer verwendet, die in ihrer Mitte den gewünschten Basenaustausch tragen. Die Primer werden nach den Vorgaben der

Firma Stratagene konstruiert. Dafür wird das im Internet auf der Homepage der Firma (<http://labtools.stratagene.com/QC>) bereitgestellte Programm verwendet.

Als Template dient das Plasmid mit dem zu mutierenden Gen. Auf den ersten Schritt, die Denaturierung des Plasmids, folgt im Anlagerungsschritt die Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge des Plasmids. Im Syntheseschritt wird das gesamte restliche Plasmid kopiert. Damit besitzen am Ende der Reaktion alle DNA Stränge die entsprechende Mutation mit Ausnahme der Template-DNA. Diese ist im Gegensatz zu den *in vitro* gebildeten Tochtersträngen methyliert, da sie durch Plasmidisolierung aus Zellen gewonnen wird (keine Plasmide aus *dam-* / *dcm-* Stämmen verwenden). Daher können die Parentalstränge nach beendeter Synthese mit *DpnI*, das selektiv nur methylierte DNA angreift, abgebaut werden. Es bleiben nur die *in vitro* gebildeten Stränge, die die gewünschte Mutation tragen, übrig.

Für die ortsspezifische Mutagenese wird das „QuikChange–Kit“ der Firma Stratagene verwendet. Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Der Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

10 x Reaktions Puffer	5 µl
Plasmid (10ng)	2 µl
Primer fw (100ng/µl) (125ng)	1.25 µl
Primer rv (100ng/µl) (125ng)	1.25 µl
dNTP mix (10mM)	1 µl
ddH ₂ O (Endvolumen von 49 µl)	38.5 µl
PfuTurbo DNA polymerase (2.5 U/µl)	1 µl

Der Ansatz wird im Thermocycler mit dem folgenden Programm inkubiert:

Tabelle 4.8: PCR-Programm für ortsspezifische Mutagenese

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	30 sec
2	12	95°C	30 sec
		55°C	60 sec
		68°C	60 sec/kb des Plasmids

Nach beendeter Reaktion wird der Reaktionsansatz mit 1 μ l *DpnI* (1 U/ μ l) versetzt und 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Es werden dann 4 μ l aus diesem Ansatz entnommen und in chemokompetente XL10-Gold- Bakterien transformiert.

Tabelle 4.9: Für die ortsspezifische Mutagenese verwendete Oligonukleotide

Name	Oligosequenz (5' - 3')	Funktion
RGS2_delN79_QC_fw	CCTGAGGAAGCACAGGGATCCCGA TGCTGTGGTCAGAAGGC	Klonierung von RGS2 del N79
RGS2_delN79_QC_rev	GCCTTCTGACCACAGCATCGGGAT CCCTGTGCTTCCTCAGG	Klonierung von RGS2 del N79
RGS2_delC116_QC_fw	GAATTCTGGCTGGCCTGATGTGAA GACTTC	Klonierung von RGS2 del C116
RGS2_delC116_QC_rev	GAAGTCTTCACATCAGGCCAGCCA GAATTC	Klonierung von RGS2 del C116
RGS2_delC199_QC_fw	CTACCAGGACTTGTGTTGAAAAAA GCCACAAATC	Klonierung von RGS2 del C199
RGS2_delC199_QC_rev	GATTTGTGGCTTTTTTCAACACAAG TCCCTGGTAG	Klonierung von RGS2 del C116
RGS_Box_BamH1_QC_fw	CAGCTGTGGTCAGAAGGATCCCGA TGGCATTGACGAGCTG	Klonierung von RGS2 83-199
RGS_Box_BamH1_QC_rev	CAGCTCGTCAAATGCCATCGGGAT CCTTCTGACCACAGCTG	Klonierung von RGS2 83-199
RGS_Box_Not1_QC_fw	CTACCAGGACTTGTGTTGATGCGG CCGCAAAAAGCCACAAATCACC	Klonierung von RGS2 83-199
RGS_Box_Not1_QC_rev	GGTGATTTGTGGCTTTTTTGCGGC CGCATCAACACAAGTCCTGGTAG	Klonierung von RGS2 83-199
RGS2_delC83_fw	CAGCTGTGGTCAGAATGAGCATTT GACGAGCTG	Klonierung von RGS2 del C83
RGS2_delC83_rev	CAGCTCGTCAAATGCTCATTCTGAC CACAGCTG	Klonierung von RGS2 del C83

4.4.11 Quantitative Echtzeit-PCR (Taqman)

Das Prinzip der Real-Time-PCR (TaqMan)

In der Real-Time PCR ist während der Amplifikation eine Quantifizierung der PCR-Produkte möglich. So lässt die Real-Time PCR zuverlässige Rückschlüsse auf die Menge an eingesetzter cDNA zu. Die Real Time RT PCR macht sich die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq Polymerase zunutze. Eine spezielle Sonde, deren 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff markiert ist und deren 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff trägt, hybridisiert während der PCR zunächst zwischen den Primern an den Matrizen-cDNA-Strang. Die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes wird dabei durch die räumliche Nähe zum Quencher unterdrückt. In der Extensionsphase trifft dann die Taq-Polymerase auf die Sonde, wobei durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase die Sonde geschnitten wird. Die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird unterbrochen, und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal, das mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector erfasst wird. Das detektierte Signal ist sequenzspezifisch, da nicht vollständig bindende Sonden vor der Aktivierung der Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase vom DNA-Strang verdrängt werden, es also nicht zu einem Signal kommt. Entsprechend der Anreicherung des PCR-Produktes nimmt die Fluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus zu. Der ABI PRISM 7700 Sequence Detector misst die Fluoreszenzsignale in Echtzeit und erstellt für jede Probe eine Amplifikationskurve, die die Signalintensität (ΔR_n) in Relation zur Zykluszahl zeigt. Der sogenannte Threshold Cycle (Ct-Wert) entspricht dabei der Zykluszahl, bei der ein Anstieg der Reporterfluoreszenz über einen bestimmten Schwellenwert erfolgt. Der Ct-Wert ist abhängig von der eingesetzten Startkopienzahl. In einem PCR-System mit 100% Effizienz führt eine Verdopplung der Startkopienzahl zu einer Abnahme des Ct-Wertes um einen Zyklus. Da die verwendete Polymerase AmpliTaq Gold eine signifikante Aktivität schon bei Temperaturen von über 55°C zeigt, können bei dem TaqMan PCR Programm die Einzelschritte Annealing und Extension zu einem Schritt zusammengefasst werden. Es kann also auf eine separate Extension bei 72°C verzichtet werden.

Ein Ansatz für die Real-Time-PCR besteht aus 6,2µl 2X Mastermix, 2,75µl doppelt destillierten Wasser, 3pmol Forward- bzw. Reverse-Primer sowie 6pmol Sonde. Die Reaktion wird wie angegeben durchgeführt:

- 1) Äquilibration 50°C 120sec
- 2) Denaturierung 95°C 180sec
- 3) Hybridisierung 55°C 15sec
- 4) DNA-Synthese 60°C 60sec

Es erfolgen 40 PCR-Zyklen mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector der Firma Applied Biosystems.

Um die Messungen quantifizieren zu können, werden Standardkurven aus cDNA bekannter Konzentration erstellt. Darin wird die Expression der Zielsequenz sowie der endogenen Referenz Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH: House-Keeping-Gene) gemessen. Für jede einzelne Probe wird über den jeweiligen Ct-Wert die diesem Wert entsprechende Menge an Zielsequenz bzw. an endogener Referenz berechnet. Dann werden die Zielsequenzwerte durch Division auf die endogene Referenz normalisiert. Die Ergebnisse drücken somit ein relatives Expressionsniveau aus.

Wird keine Standard-Kurve zur Quantifizierung eingesetzt, lässt sich die relative Expression bezogen auf GAPDH nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Relative Expression} = 100/2^{(CT(\text{Gen}) - CT(\text{GAPDH}))}$$

4.4.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde unter Verwendung des BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 durchgeführt. Dabei erfolgte die Sequenzierreaktion mit Hilfe von zusätzlichen, fluoreszenzfarbstoff- markierten Didesoxynukleotiden. Jedes der vier verschiedenen Didesoxynukleotide ist mit einem unterschiedlichen Farbstoff markiert. Bei der im Anschluss an die Sequenzierreaktion ablaufenden automatisierten Sequenzierung werden die DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge mittels einer Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt und der Fluoreszenzfarbstoff mittels eines Lasers angeregt. Der Reaktionsansatz einer Sequenzierreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

DNA	100 - 300 ng
Primer (1µM)	1,5 µl
3.1 Puffer 5x	2 µl
3.1 Enzymmix	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

PCR-Programm :

- | | | |
|----|---------------------|-----------|
| 1. | 96 °C | 4 min |
| 2. | 96 °C | 20 s |
| 3. | 50 °C | 10 s |
| 4. | 60 °C | 2 min |
| 5. | zurück zu Schritt 2 | 35 Zyklen |
| 6. | 4 °C | unendlich |

Das PCR-Produkt wird anschließend über Sephadex Säulen aufgereinigt. Dazu wird Sepharose in eine Multiscreen-Filterplatte gefüllt und mit 250µl Wasser pro Ansatz versetzt. Dies muss für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C quellen. Dann wird die Platte für 5 min bei 910xg zentrifugiert und mit 200µl Wasser gewaschen. Die aufzureinigende DNA aus der Sequenzierreaktion wird auf 20µl Volumen mit H₂O aufgefüllt und auf jeweils ein Säulchen gegeben. Die Platte wird erneut zentrifugiert und die Proben im ABI PRISM Sequence Detector sequenziert.

Die Ergebnisse der Sequenzierung werden mit Hilfe der Programme Chromas und NCBI Blast visualisiert und überprüft.

4.4.13 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenüberprüfung von DNA-Fragmenten, die durch Restriktion oder bei der PCR entstanden, werden diese mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Dazu werden 1,5 bis 2 % Agaroselösungen mit TAE hergestellt, in der Mikrowelle erhitzt, in einer entsprechenden Kammer mit Kamm zum Gel gegossen und nach dem Erkalten in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur gelegt. 10 µl der Proben werden mit 2 µl 6 × DNA-Ladepuffer versetzt und neben 6 µl eines DNA-Standards in die Geltaschen pipettiert. Die Trennung erfolgt für ca. 1,5 h bei 100 V.

Zur Detektion der DNA-Fragmente werden die Gele für ca. 20 min in einem Ethidiumbromidbad geschwenkt.

Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, so dass diese unter Anregung von UV-Licht sichtbar wird und fotografiert werden kann.

TAE-Puffer

Tris-Base	4,84 g
Eisessig	1,022 ml
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	2 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml

4.4.14 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen erfolgt mit dem UltraClean™ 15 DNA Purification Kit der Firma MoBio.

Die Bande mit der DNA wird aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Gewicht bestimmt. Dann wird die dreifache Menge an ULTRASALT Solution hinzugegeben und nach gründlichem Mischen bis zum kompletten Schmelzen der Bande bei 55°C inkubiert (etwa 5 min). ULTRASALT ist Natriumiodid, das die Wasserstoffbrücken, welche die auspolymerisierte Agarose zusammenhalten, aufbricht.

Dann erfolgt die Zugabe von 5µl ULTRABIND. Unter mehrmaligem Schütteln wird die Lösung für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. ULTRA BIND ist eine 50:50 Mischung von Silicia und Puffer. Während der Inkubation bindet die DNA an das Silicia und kann damit bei 14000 rpm für 5 sec abzentrifugiert werden. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit ULTRA WASH gewaschen. Um den Überstand komplett zu entfernen, erfolgt zweimalige Zentrifugation nach dem Waschschrift. Anschließend wird das Pellet in der doppelten Menge ddH₂O, die an ULTRABIND eingesetzt wurde, resuspendiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wird dabei vom Silicia gelöst und geht in die wässrige Phase über. Zum Schluss wird sie durch erneute Zentrifugation (14000rpm, 1 min) vom Pellet getrennt und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Erstellung von Proteinlysaten

Die Zellen werden aus der Kultur entnommen, durch Zentrifugation sedimentiert und einmal in eiskaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgt für 30 min auf Eis in 100-500µl RIPA-Lyse-Puffer. Um Zelldebris zu entfernen und das reine Proteinlysate zu erhalten, werden die Lysate anschließend für 15 min bei 20000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält die Proteine und kann bei -80°C gelagert werden.

PBS

Na ₂ HPO ₄	80 mM
NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM, pH 7,5

RIPA-Puffer

NaCl (5M)	15 ml
NP-40 (Igepal)	5 ml
10% DOC	25 ml
10% SDS	5 ml
Tris-HCl (1M)	25 ml
H ₂ O	425 ml
	500ml

Vor Verwendung des RIPA-Puffers wird dieser zur Inhibition von Proteasen und Phosphatasen mit folgenden Substanzen versetzt:

RIPA-Puffer	5 ml
Complete Inhibitor	200 µl
Na ₃ VO ₄	23 µl
NaF (0,5 M)	250 µl

4.5.2 Zellfraktionierung

Etwa 1×10^7 Zellen werden aus der Kultur entnommen, einmal in PBS gewaschen und vorsichtig in 200µl Sucrose-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgt durch Inkubation für fünf Minuten auf Eis. Durch den NP-40 enthaltenden Sucrose-Puffer wird die Integrität der Zellmembranen aufgelöst und das Zytosol freigesetzt, ohne die Zellkerne zu zerstören. Die noch intakten Zellkerne werden danach durch Zentrifugation bei 1500xg für fünf Minuten sedimentiert. Der Überstand, der die cytoplasmatischen Proteine beinhaltet, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Zellkerne werden einmal vorsichtig in 900µl Sucrose Puffer (ohne NP-40) gewaschen, um eine Kontamination mit cytoplasmatischen Extrakten weitestgehend zu verhindern.

Für die Lyse der Zellkerne werden diese in 50µl hypotonem Low-Salt Puffer resuspendiert, anschließend werden langsam 50µl High-Salt-Puffer unter vorsichtigem Mischen zugetropft. Es erfolgt eine Inkubation bei 4°C auf dem Drehrad für 20 Minuten. Dadurch wird das Kernplasma extrahiert, während die Kernhülle intakt bleibt und die genomische DNA zurückhält. Die verbleibende Kernhülle wird von den Kernextrakten durch Zentrifugation (30 min, 10.000g bei 4°C) separiert. Der Überstand enthält die nukleären Proteine und kann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden.

Sucrose Puffer

1M Sucrose	32ml
0.5M CaCl ₂	600µl
1M MgAc	200µl
<u>0.5M EDTA</u>	<u>20µl</u>
ddH ₂ O	auf 100ml

Vor Gebrauch frisch zugeben:

- 0.1M DTT 1:100
- Complete Inhibitor
- 0.5% NP-40

Low Salt Puffer

0.5M HEPES, pH 7.9	4ml
Glycerol	25ml
1M MgCl ₂	150µl
1M KCl	2ml
<u>0.5Mm EDTA</u>	<u>40µl</u>
ddH ₂ O	auf 100ml

Vor Gebrauch frisch zugeben:

- 0.1M DTT 1:100
- Complete Inhibitor

High Salt Puffer

0.5M HEPES, pH 7.9	4ml
Glycerol	25ml
1M MgCl ₂	150µl
1M KCl	80ml
<u>0.5Mm EDTA</u>	<u>40µl</u>
ddH ₂ O	auf 100ml

Vor Gebrauch frisch zugeben:

- 0.1M DTT 1:100
- Complete Inhibitor
- 1% NP-40

4.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Test)

Bevor Protein-Lysate für weitere Versuche eingesetzt werden können, muss die Proteinkonzentration bestimmt werden, um eine gleichmäßige Beladung des Gels zu gewährleisten. Dies erfolgt mit Hilfe eines Kits (BCA-Assay) der Firma Pierce.

Dazu werden zunächst Lösung A und B des BCA-Kits im Verhältnis 1:50 vermischt. Dann gibt man jeweils 5µl Lysat bzw. 5µl einer seriell verdünnten Standardreihe aus BSA zu einem ml der Mischung aus Lösung A und B. Alle Proben werden gevortext und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird die Extinktion bei 562nm im Photometer gemessen und aus den Messwerten mit Hilfe der Standardreihe die Proteinkonzentration errechnet.

4.5.4 SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich die Größe eines Proteins sowie seine Zusammensetzung aus Untereinheiten ermitteln. Die Proteine sind in einem Puffer gelöst, der ein stark negativ geladenes Detergens enthält, das Natriumdodecylsulfat (SDS). Dieses Detergens bindet an hydrophobe Regionen der Proteinmoleküle und führt zur Entfaltung der Proteine in gestreckte Polypeptidketten. Die einzelnen Proteinmoleküle werden aus ihren Verbindungen mit anderen Proteinen oder Lipiden herausgetrennt.

Durch das Versetzen mit SDS umgibt sich jedes Proteinmolekül mit einer großen Anzahl negativ geladener Detergenzmoleküle. Dadurch wird die eigene Ladung des Proteins unbedeutend, und alle Proteine wandern beim Anlegen einer Spannung zur positiven Elektrode. Proteine gleicher Größe verhalten sich dabei identisch. Als Ergebnis entsteht aus einer komplexen Proteinmischung eine Reihe voneinander abgetrennter Proteinbanden, die entsprechend ihrer molekularen Massen angeordnet sind. Unter Verwendung von bekannten Markerproteinen kann anhand der relativen Wanderungsgeschwindigkeit der Banden auf das Molekulargewicht der jeweiligen Proteine geschlossen werden.

Für die Auftrennung der Proteine werden fertige Minigele der Firma BioRad verwendet. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins werden Gradienten-Gele von 4-15% oder einfache Gele von 12% bzw. 15% eingesetzt.

Die Proteinlysate werden zunächst mit 5-fachem SDS-Proben-Puffer versetzt und für 5 min gekocht. Die Elektrophorese wird in einem SDS-haltigen Laufpuffer durchgeführt. Die Proben werden in der Elektrophorese initial für etwa 10 min bei 60V und weiter bei einer konstanten Spannung von 100V mit einem geeignetem Größenstandard aufgetrennt.

4.5.5 Coomassiefärbung von SDS–Gelen

Die Coomassiefärbung beruht auf der Anlagerung des Coomassiefarbstoffes an hydrophobe Bereiche der Proteine. Nach der SDS–PAGE werden die Gele in einer Schale mit Färbelösung bedeckt. Das Gel wird mit der Färbelösung unter leichtem Schütteln für mindestens 30 min inkubiert. Nach Abgießen der Färbelösung wird das Gel kurz mit Wasser gespült und über Nacht mit Entfärber geschüttelt. Der Entfärber wird danach ausgetauscht und das Gel nochmals einige Stunden entfärbt, bis nur noch die Banden in blau zu erkennen sind.

Zur Dokumentation kann das Gel in Folie eingewickelt und eingescannt werden.

Coomassie-Färbelösung

10 % (v/v) Essigsäure

40 % (v/v) Methanol

0,1 % (w/v) Coomassie Blau R-250

Coomassie-.Entfärber

10 % (v/v) Essigsäure

20 % (v/v) Ethanol

4.5.6 Immuno-Blot (Western Blot)

Vor der spezifischen Identifizierung durch Antikörperhybridisierung müssen gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert werden. Diese Übertragung erfolgt durch Elektrotransfer in einer Wet-Blot-Apparatur der Firma Bio-Rad (München). Das zuvor mit Transferpuffer gewaschene Polyacrylamidgel wird nach dem Lauf mit einer luftblasenfrei aufgelegten, zuvor in Methanol äquilibrierten PVDF-Membran zwischen zwei in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren in die Wet-Blot-Apparatur gegeben. Der Elektrotransfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgt über Nacht bei 4°C und einem Stromfluss von 20V. Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wird die Membran 1h in 5% Magermilchpulver in PBS-T bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wird die Membran dreimal 10 min mit PBS-T bei Raumtemperatur gewaschen, bevor sie mit dem Primärantikörper (verdünnt in 5% Milchpulver in PBS-T) über Nacht bei 4°C bzw. eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wird. Es folgen wiederum drei zehninütige Waschschrte in PBS-T. Die Markierung des Primärantikörpers wird durch einstündige Inkubation mit einem entsprechenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper in PBS-T/5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur erreicht. Anschließend wird die Membran erneut dreimal 10 min in PBST gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgt durch chemische Lumineszenz mit dem ECL Western-Blot-Detektionskit (ECL Plus). Die Lumineszenz wird entweder in einem elektronischen Detektionssystem (Intas) oder durch Auflegen eines Röntgenfilmes detektiert.

4.5.7 Entfernen gebundener Antikörper von Membranen

PVDF-Membranen, auf denen verschiedene Proteine mit mehreren Antikörpern nachgewiesen werden sollen, werden zwischen den einzelnen immunologischen Nachweisreaktionen „gestrippt“. Dabei werden die Antikörper der vorherigen Analysen von der Membran gewaschen, indem diese nacheinander für 5 min mit Wasser, 0,2 M NaOH und erneut dreimal mit Wasser gewaschen wird. Im Anschluss wird die Membran mit Milchpulverlösung in PBS abgesättigt, mit PBST gewaschen und dann mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert.

4.5.8 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

BL21 *E. coli*, die mit dem zu exprimierenden Gen im pGEX5X-Vektor transformiert wurden, werden in 7 ml LB-Ampicillin-Medium über Nacht bei 37°C und 225 Upm inkubiert. Diese Starter-Kultur wird am nächsten Tag in 250 ml frisches Medium überführt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,7 bei 30°C geschüttelt. Die Expression der GST-Fusionsproteine wird durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Nach fünfständigem Wachstum bei 30°C und 225 Upm werden die Zellen bei 4300 Upm und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Die Bakterien werden einmal in 25 ml PBS gewaschen und danach in 25 ml Puffer 1 aufgenommen. Zum Aufschluss der Zellen werden diese für insgesamt 30 sec mit jeweils 2 sec Pause zwischen den Intervallen mit Ultraschall behandelt. Danach wird 125 µl Triton X-100 zugegeben und es erfolgt eine Zentrifugation bei 10000 g und 4°C für 20 min, um die Zelldebris zu pelletieren.

In der Zwischenzeit werden 500 µl GST-Agarose-Beads zweimal mit 1 ml Puffer 1 gewaschen. Die gewaschenen Beads werden dann zum Protein-enthaltenden Überstand der Bakterien gegeben und über Nacht bei 4°C rotiert. Während der Inkubation bindet das exprimierte GST-Fusionsprotein an die GST-Agarose Beads und kann somit aufgereinigt werden.

Am nächsten Morgen werden die Beads je einmal in 5 ml Puffer 1 bis 4 gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den Waschschritten erfolgt jeweils bei 400 g und 4°C für etwa 10 sek. Zum Schluss werden die GST-Agarose Beads mit dem gebundenen GST-Fusionsprotein in 1 ml Puffer 4 aufgenommen und können für etwa drei Wochen bei 4°C gelagert werden.

Zur Überprüfung des Erfolges der Aufreinigung werden die Proben auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Zusätzlich wird zur Quantifizierung der Proteinkonzentration eine Verdünnungsreihe aus BSA (0,5 mg/ml bis 5 mg/ml) aufgetragen. Die Banden werden durch Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blau visualisiert und die Proteinkonzentration kann anhand der Stärke der BSA-Banden abgeschätzt werden.

GST-Puffer 1 (Lysispuffer)

TEA-HCl	20 mM	1,86 g
NaCl	150 mM	4,35 g
0,5 M EDTA	10 mM	10 ml
100 mM PMSF	1 mM	5 ml
Triton-X 100	0,5%	2,5 ml
β-Mercaptoethanol	0,1%	0,5 ml

GST-Puffer 2 (Waschpuffer)

TEA-HCl	20 mM	1,86 g
NaCl	150 mM	4,35 g
0,5 M EDTA	10 mM	10 ml
β -Mercaptoethanol	0,1%	0,5 ml

GST-Puffer 3 (Waschpuffer)

TEA-HCl	20 mM	1,86 g
NaCl	150 mM	4,35 g
β -Mercaptoethanol	0,1%	0,5 ml

GST-Puffer 4 (Waschpuffer)

TEA-HCl	20 mM	1,86 g
β -Mercaptoethanol	0,1%	0,5 ml

4.5.9 GST-Pulldown

Mit Hilfe des GST-Pulldowns können Interaktionen zwischen Proteinen *in vitro* nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wird die Bindung von RGS2 und C/EBP α untersucht.

Rekombinantes GST-RGS2 bzw. GST als Negativkontrolle wird in BL21 Bakterien exprimiert und, wie oben beschrieben, aufgereinigt. 10 μ g der GST-gekoppelten rekombinanten Proteine werden dann mit 500 μ g RIPA-Protein-Lysat aus transient mit C/EBP α bzw. dem entsprechenden Leervektor transfizierten 293T Zellen über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Während der Inkubation sollte das GST-RGS2-Fusionsprotein einen Komplex mit C/EBP α ausbilden. Dieser wird am nächsten Morgen dreimal in je 1ml RIPA Puffer gewaschen. Die Sensitivität und Spezifität der Versuche kann dabei durch die Stringenz (den Salzgehalt) des Puffers und die Anzahl der Waschschrte gesteuert werden. Die gebundenen Proteine werden mit Laemmli-Puffer unter fünf-minütigem Aufkochen eluiert, und im Westernblot wird die Proteinexpression des Bindungspartners analysiert.

4.5.10 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation ist eine Methode zur Detektion von Protein-Interaktionen *in vivo*.

Dazu werden aus den zu untersuchenden Zellen zunächst Proteinlysate erstellt. Eingesetzt werden dazu mindestens 1×10^7 Zellen, wobei von allen zu vergleichenden Proben die gleiche Zellzahl verwendet wird.

Die entsprechend vorbehandelten Zellen werden nach einmaligem Waschen in PBS in 1ml Binding Buffer (50mM HEPES, pH 7.5; 150mM NaCl; 0.1% TWEEN-20; 1mM EDTA; 250mM EGTA; 10% Glycerol; 1mM DTT; 1mM PMSF) aufgenommen und für 30 min bei 4°C lysiert. Um Zelldebris zu entfernen und das reine Proteinlysate zu erhalten, werden die Lysate anschließend für 15 min bei 20000g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und der Überstand für die Immunpräzipitation verwendet.

Zunächst erfolgt die Bestimmung der Proteinkonzentration, damit die Lysate auf die gleiche Konzentration eingestellt werden können. Als Erstes werden 30µg Proteinlysate jeder Probe abgenommen und als Ladekontrollen aufbewahrt. In der Regel wird dann 1mg Protein pro Ansatz für die IP eingesetzt und die Probe auf 1 ml Volumen mit dem entsprechenden Lyse-Puffer aufgefüllt.

Es werden 3µg des spezifischen Antikörpers gegen das zu präzipitierende Protein zugegeben, und die Proben werden über Nacht bei 4°C rotiert. Während dieser Inkubationszeit bindet der Antikörper an das entsprechende Antigen. Um unspezifische Bindung des Antikörpers auszuschließen, werden als Negativkontrolle außerdem 3µg der Isotypenkontrolle des entsprechenden Antikörpers zu einem zweiten Ansatz der gleichen Proben gegeben.

Am nächsten Tag erfolgt die Zugabe von je 40µl A/G-Agarose Beads und eine erneute Inkubation bei 4°C unter Rotieren für 1h. Währenddessen binden die A/G-Agarose-Beads an den zugegebenen spezifischen Antikörper bzw. die Isotypenkontrolle. An den Antikörper wiederum ist bereits das zu untersuchende Protein gebunden und kann dann mittels der Agarose-Beads präzipitiert werden.

Anschließend werden die Beads bei 1000 rpm für eine Minute bei 4°C abzentrifugiert, und die Proben werden fünfmal in je 500 µl Lysispuffer gewaschen. Hier wird die Sensitivität und Spezifität des Versuchs ebenso wie schon beim GST-Pulldwon (4.5.9) durch die Stringenz des Puffers und die Anzahl der Waschschrte gesteuert.

Nach Zugabe von 40 µl 2xSDS-Ladepuffer werden alle Proben für 5 min gekocht und anschließend gemeinsam mit den zuvor vorbereiteten Ladekontrollen zur weiteren Analyse auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Daraufhin erfolgt ein Westernblot mit dem entsprechenden Antikörper gegen das interagierende Protein. Es sollte dabei nur in der Probe, in der beide Proteine vorhanden sind und miteinander interagieren, eine Bande in der entsprechenden Höhe auftreten.

Konkret soll in diesem Fall untersucht werden, ob RGS2 mit C/EBP α interagiert. Dafür wurden HEK293T Zellen transient mit RGS2 sowie C/EBP α und den entsprechenden Leervektorkontrollen transfiziert. Die Durchführung der Co-Immunopräzipitation erfolgte 24h nach der Transfektion. Dabei wurde der RGS2- Antikörper für die IP eingesetzt, der Westernblot erfolgte dann gegen C/EBP α .

4.5.11 Chromatin-Immunopräzipitation

Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) ist eine Methode um *in vivo* die Bindung von Proteinen an bestimmte DNA-Sequenzen zu untersuchen.

Dafür werden die Protein-Protein sowie die Protein-DNA-Interaktionen zunächst durch Zugabe von Formaldehyd fixiert (Crosslinking). Die anschließende Fragmentierung des Chromatins ermöglicht die Immunpräzipitation von Protein-DNA-Komplexen. Der Nachweis der Sequenzen erfolgt nach dem Lösen der kovalenten Bindungen (Decrosslinking) mittels PCR durch Amplifikation der Promotorregion, an die der Proteinkomplex gebunden hat.

Die für die Chromatin-IP eingesetzten Zelllinien, in diesem Fall 32D Leervektor, 32D FLAG-RGS2 sowie 32D Flt3-ITD FLAG-RGS2 werden am Vortag ausgebracht und über Nacht kultiviert. Nach 24h werden pro Zelllinie 1×10^7 Zellen geerntet und für die Chromatin-IP verwendet.

Zunächst erfolgt das Crosslinking durch Zugabe von 37% Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 1% zu den in normalem Medium wachsenden Zellen. Die Kulturen werden unter leichtem Schwenken für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Crosslinking zu beenden, erfolgt die Zugabe von 2M Glycin zu einer Endkonzentration von 1.25M und eine erneute Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur.

Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und in eiskaltem PBS gewaschen.

Die Lyse der Zellen erfolgt für 10 min auf Eis in 1ml RIPA-Puffer, dem Proteinase-Inhibitor, Natrium-Orthovanadat sowie TSA zugesetzt wurden.

Zur Fragmentierung des Chromatins in Stücke mit einer Länge von etwa 300 Nukleotiden werden die Proben nach der Lyse mit Ultraschall behandelt. Dafür werden die Proben auf Eis gehalten und bei einer Amplitude von 30% für insgesamt 1 min 40 sek sonifiziert.

Dabei wird die Ultraschallbehandlung jeweils für 5 sek mit Unterbrechungen von 5 sek durchgeführt.

Um Zelldebris zu entfernen, werden die Proben im Anschluss für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf ein Gesamtvolumen von 1.5 ml aufgefüllt.

Daraufhin erfolgt das so genannte Preclearing. Dabei werden die Proben durch Zugabe von 40µl A/G-Plus-Agarose Beads für eine Stunde unter ständigem Rotieren bei 4°C prä-immunopräzipitiert. Unspezifische Präzipitate werden danach durch eine einminütige Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C entfernt. Der chromatin- und proteinhaltige Überstand wird in neue Reaktionsgefäße überführt und dient als Ausgangsmaterial für die folgende Immunpräzipitation.

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels des BCA-Assays werden 100µg jeder Probe als Input-Kontrolle abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Jeweils zweimal 0.5mg jeder Probe werden in silikonisierte Reaktionsgefäße gegeben und auf 1ml Reaktionsvolumen aufgefüllt. Es werden 3µg des entsprechenden Antikörpers bzw. der zugehörigen Isotypenkontrolle zugegeben. In diesem Fall ist der Antikörper gegen das FLAG-Tag von RGS2 gerichtet, es handelt sich um den FLAG-M2-Antikörper von Sigma. Als Isotypenkontrolle wird Maus-IgG1 eingesetzt, ebenfalls von der Firma Sigma. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgt über Nacht bei 4°C unter ständigem Rotieren.

Am nächsten Tag werden zu jeder Probe 40µl A/G Plus Agarose-Beads gegeben, die an die zugegebenen Antikörper binden, und für eine Stunde bei 4°C rotiert. Auf diese Weise ist es möglich, die Zielproteine zu präzipitieren.

Die Beads werden anschließend für eine Minute bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen und es erfolgen fünf Waschschrte in jeweils 400µl Puffer. Zunächst wird in Low-Salt-Wash-Buffer, dann in High-Salt-Wash-Buffer, danach in LiCl-Buffer und zum Schluss zweimal in TE-Buffer gewaschen. Gewaschen wird jeweils durch fünfminütiges Schütteln der Proben bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation bei 2000 rpm.

Danach muss die gebundene DNA von den Agarose-Beads eluiert werden. Dies erfolgt in zwei Elutions-Schritten mit jeweils 100 µl Elutionspuffer unter Rotation für 15 min bei Raumtemperatur.

Durch Zugabe von 8µl 5M NaCl und 2µl Ribonuclease A (32.5mg/ml) und Inkubation bei 65°C über Nacht wird das Crosslinking rückgängig gemacht. In diesen Schritt werden auch die Input-Kontrollen wieder mit einbezogen.

Am nächsten Tag erfolgt der Verdau der gebundenen Proteine durch Zugabe von 16µl Verdau-Puffer und Inkubation für eine Stunde bei 42°C. Die verbleibende DNA wird danach mit Hilfe des Qiagen PCR-Purification Kits nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und kann danach für die PCR mit spezifischen Primern für die zu untersuchende Promotorregion eingesetzt werden.

In diesem Fall waren dies Primer in der Promotor-Region von C/EBP α . Die Analyse der PCR erfolgte entweder durch das Auftragen der Produkte auf ein Agarose-Gel oder mittels quantitativer Echtzeit-PCR (Taqman).

Low Salt Puffer

0,1% SDS	50mg
1% Triton X-100	0,5ml
2mM EDTA (0,5M)	0,2ml
20mM Tris-HCl pH 8,1 (1M)	1ml
150mM NaCl (5M)	1,5ml

High Salt Puffer

0,1% SDS	50mg
1% Triton X-100	0,5ml
2mM EDTA (0,5M)	0,2ml
20mM Tris-HCl pH 8,1 (1M)	1ml
150mM NaCl (5M)	5ml

LiCl-Puffer

0,25M LiCl	539mg
1% NP-40 (10%)	5ml
1% DOC (10%)	5ml
1mM EDTA (0,5M)	0,1ml
10mM Tris-HCl pH 8,1 (1M)	0,5ml

TE-Puffer

10mM Tris-HCl pH 8,0 (1M)	0,5ml
1mM EDTA (0,5M)	0,1ml

4.5.12 DNA-Bindungs-Assays

Um die DNA-Bindungsfähigkeit von RGS2 zu untersuchen wurde folgender Versuch entwickelt:

Genomische DNA wird aus 32D Zellen isoliert und mittels Ultraschall in Fragmente einer Größe von etwa 300 Nukleotiden geschnitten.

Die so erhaltenen DNA Fragmente werden mit Hilfe eines Digoxigenin-Labeling-Kits (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I, Roche) zufällig mit Digoxigenin markiert. Daraufhin erfolgt die Inkubation der markierten DNA mit GST-RGS2 bzw. GST und GST-C21 (Rhotekin) als Negativkontrollen sowie GST-bMyb als Positivkontrolle in folgendem Ansatz:

2 x Binding Buffer	10 μ l
GST-Fusions Protein	5 μ l
Dig-markierte gDNA	1.5 μ l
<u>ddH₂O</u>	<u>3.5μl</u>
	20 μ l

Die Proben werden für 30 Minuten bei 20°C inkubiert und danach dreimal in jeweils 1 ml Binding Buffer gewaschen. Die Zentrifugation erfolgt dabei bei 1000 rpm und Raumtemperatur, wobei nach jeden Waschschrift 50 μ l Probenvolumen im Reaktionsgefäß belassen werden.

Nach dem letzten Waschschrift werden von diesen 50 μ l Restvolumen je 5 μ l auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgetragen. Anschließend erfolgt das Crosslinking der DNA an die Membran durch Bestrahlung mit UV-Licht für 3 min. Die Membran wird zwei Minuten in Maleinsäurepuffer gewaschen und anschließend für 45 min in Blockier-Lösung geblockt. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Digoxigenin-Antikörper, um positive Bindungsreaktionen sichtbar zu machen. Der Antikörper wird 1:2000 in Blockier-Lösung verdünnt und für 45 min bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Die Membran wird dann zweimal für 15 min in Waschpuffer gewaschen, bevor sie für 5 min in Detektionspuffer äquilibriert wird. Die Detektion erfolgt durch Umsetzung von NBT/BCIP Substrat durch alkaline Phosphatase. Dazu werden 40 μ l NBT/BCIP Lösung in 2ml Detektionspuffer verdünnt. Positive Bindungsreaktionen werden als dunkel gefärbte Punkte auf der Membran sichtbar.

2 x Bindungs-Puffer

40mM Tris HCl pH8,0

1mM EDTA

0,5% BSA

2mM DTT

20% Glycerol

100mM KCl

4.5.13 DNA-Bindungsstellen-Selektion

Die Selektion von spezifischen DNA Bindungsstellen von RGS2 wurde mit einigen Abwandlungen nach dem Protokoll von Jackson und Treisman durchgeführt (Pollock and Treisman, 1990).

Ausgangsmaterial ist eine Bibliothek aus Oligonukleotiden mit definierten 25 Nukleotide-Sequenzen an den 5'- und 3'- Enden (Bibliothek R76). Der Kern der Oligonukleotide besteht aus einer Sequenz von 26 zufällig angeordneten Nukleotiden, die die eigentliche Bibliothek darstellen.

Die definierten Enden der Bibliothek dienen als Bindungssequenzen für spezifische Primer.

Erstellung einer doppelsträngigen Oligo-Bibliothek

Zunächst muss die Bibliothek aus einzelsträngigen Oligos doppelsträngig gemacht werden. Dies geschieht mit Hilfe eines PCR-Zyklus.

Folgender PCR-Ansatz wird angesetzt:

10 x Taq Puffer	2µl
Bibliothek R76 (10µM)	2µl
forward Primer (10µM)	3µl
Taq Polymerase	1µl
dNTPs (10mM)	2µl
<u>ddH₂O</u>	<u>10µl</u>
	20µl

Es erfolgt ein PCR-Zyklus mit folgenden Bedingungen:

94°C	1 min
62°C	3 min
72°C	9 min

Anschließend wird das PCR-Produkt auf einem 4%igen Agarose-Gel aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des MoBio Ultra Clean - DNA-Purification Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die so erhaltene Oligo-Bibliothek kann für die Bindungsstellen-Selektion eingesetzt werden.

Selektion der DNA-Bindungsstellen von RGS2

Für die Selektion von DNA-Bindungsstellen von RGS2 werden rekombinantes GST-RGS2, bzw. GST als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Die Fusionsproteine wurden zuvor in BL21 Bakterien exprimiert und aufgereinigt.

Um die Ergebnisse dieser Versuche zu bestätigen, wurden in späteren Ansätzen rekombinantes FLAG-RGS2 sowie FLAG als Negativ-Kontrolle auf die gleiche Weise eingesetzt. Diese rekombinanten Proteine wurden in Insektenzellen exprimiert und daraus aufgereinigt.

Zunächst werden 5µg des rekombinanten RGS2 in Bindungs-Puffer mit 4µg Poly [dI:dC] prä-inkubiert. Diese Prä-inkubation dient dazu, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und somit die Selektion stringenter zu machen.

Dies geschieht in folgendem Ansatz:

2 x Bindungs-Puffer	50µl
GST-RGS2 (1mg/ml)	5µl
Poly [dI:dC] (0.5mg/ml)	8µl

Es erfolgt eine Inkubation für 30 min bei 20°C unter leichtem Schütteln.

Danach werden 5µl der Bibliothek R76 zugegeben und es wird wiederum für 1h bei 20°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dabei werden die DNA-Protein-Komplexe gebildet. Die Proben werden daraufhin dreimal in je 500µl 1 x Bindungs-Puffer gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den einzelnen Waschschritten erfolgt bei 500xg für eine Minute bei Raumtemperatur.

Anschließend muss die gebundene DNA von den Proteinen eluiert werden, dies erfolgt durch Zugabe von 250µl Recovery-Puffer und Inkubation bei 45°C für eine Stunde. Die DNA wird dann mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Ethanol unter Zugabe von

3M Natriumacetat gefällt. Die so erhaltene DNA wird in 10 µl ddH₂O aufgenommen und zur Vervielfältigung der spezifischen RGS2-Bindungsstellen in einer PCR amplifiziert.

Der Ansatz ergibt sich wie folgt:

10 x Taq Puffer	2.5µl
forward Primer (10µM)	2µl
reverse Primer (10µM)	2µl
dNTS (10mM)	2.5µl
selektierte DNA	10µl
Taq Polymerase	1µl
<u>ddH₂O</u>	<u>5µl</u>
	25µl

Es wird folgendes PCR-Programm verwendet:

<u>94°C</u>	<u>1 min</u>	
94°C	1 min	
62°C	1 min	20 Zyklen
<u>72°C</u>	<u>1 min</u>	
72°C	8 min	

Das PCR-Produkt wird auf einem 4%igen Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel aufgereinigt.

Die so erhaltene DNA sollte angereicherte Sequenzen, die spezifisch an RGS2 binden, enthalten.

Um diese Sequenzen weiter anzureichern, wird die aus der ersten Selektion erhaltene DNA wiederum als Ausgangsmaterial für den nächsten Selektionszyklus eingesetzt. Diese Vorgehensweise wird für fünf Selektionszyklen wiederholt, um die bestmögliche Anreicherung von RGS2-spezifischen DNA-Bindungsstellen zu erreichen.

Klonierung und Sequenzierung der in der Selektion erhaltenen DNA

Die PCR mit der isolierten DNA aus der letzten Runde der Selektion wird im Gegensatz zu den vorherigen Ansätzen nicht mit Taq-Polymerase, sondern mit Pfx-Polymerase durchgeführt. Dadurch erhält das PCR-Produkt glatte Enden und kann im Anschluß mit

Hilfe des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing der Firma Invitrogen für die Sequenzierung in den Vektor pCR4-blunt kloniert werden.

Für die Klonierung wird das PCR-Produkt nicht vorher aufgereinigt sondern direkt ein Teil des PCR Ansatzes entnommen.

Der Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

pCR4-Blunt TOPO Vector	1µl
Salzlösung	1µl
<u>PCR-Produkt</u>	<u>4µl</u>
	6µl

Die Reaktion wird für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Der pCR4-blunt TOPO Vektor wird im linearisierten Zustand geliefert, an seine 3'-Enden ist Topoisomerase I (isoliert aus Vaccinia Virus) gebunden.

Die Topoisomerase I kann einen DNA-Strang mit dem Vektor verbinden und wird dabei freigesetzt.

Topoisomerasen dienen der Relaxation von DNA-Strängen, indem sie Phosphodiesterbindungen spalten und dabei eine kovalente Bindung mit der DNA ausbilden. Durch eine chemische Reaktion mit einer 5'-Hydroxylgruppe eines anderen DNA-Stranges wird die Topoisomerase freigesetzt und die DNA-Stränge werden verbunden. Die Topoisomerase am pCR4-blunt TOPO Vektor verknüpft zugesetzte DNA mit dem Vektor in einer Reaktion analog zum Verbinden entwundener Stränge. Ein Schema dieser Reaktion ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

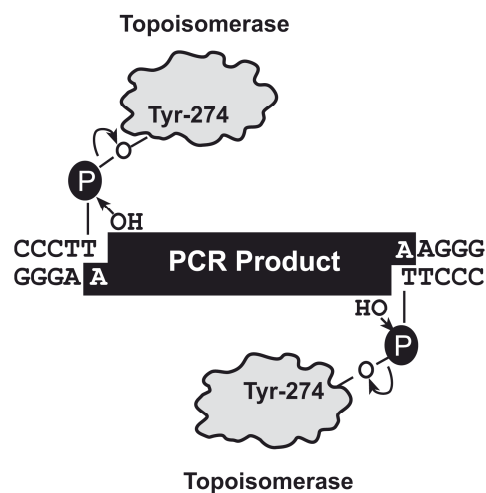


Abbildung 4.2: TOPO-Klonierung nach Invitrogen

Nach der Inkubation des TOPO-Klonierungs-Ansatzes wird dieser nach Angaben des Herstellers in die mit dem Kit gelieferten kompetenten Zellen (Top 10 F') transformiert. Der Vektor trägt zur Selektion der positiven Klone eine Ampicillin-Resistenz sowie das für *E.coli* letale Gen *cadB*. Dieses wird bei erfolgreicher Klonierung durch das PCR-Produkt ersetzt, so dass nur Bakterien, die ein erfolgreich kloniertes Plasmid tragen, überleben können.

Mit dieser Methode können PCR-Produkte schnell und unkompliziert kloniert werden.

Anschließend werden die gewachsenen Klone gepickt und die DNA wird im Miniprep-Maßstab isoliert.

Die PCR für die Sequenzierung erfolgt mit dem T7-Primer und wird nach Protokoll durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen wird mit dem Chromas-Programm vorgenommen.

Außerdem erfolgt ein Vergleich mit den Promotorsequenzen sämtlicher Säugetiere. Dies geschieht durch Einlesen der Sequenz in eine spezielle Datenbank (TRANSFAC® - Gene Transcription Factor Database) in der Daten über Transkriptionsfaktoren, deren experimentell nachgewiesenen Bindungsstellen und deren regulierte Gene enthalten sind und zum Vergleich herangezogen werden können (Wingender et al. 1996).

2 x Bindungs-Puffer

40mM Tris HCl pH8,0

1mM EDTA

0,5% BSA

2mM DTT

20% Glycerol

100mM KCl

Recovery-Puffer

0,5M Ammonium Acetat

1mM EDTA

0,1% SDS

4.5.14 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Mit Hilfe des EMSA-Assays werden spezifische Interaktionen zwischen Proteinen und DNA-Sequenzen untersucht. Dabei wird ein Zellysate oder ein aufgereinigtes Protein mit

einer radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid-Sequenz (Sonde) inkubiert und der Komplex anschließend in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dadurch wird die an das Protein gebundene Sonde, aufgrund ihrer verringerten Laufgeschwindigkeit, von der ungebundenen Sonde getrennt (Gel-Shift). Die Position der radioaktiven Sonde im Gel und somit die Bindung an das Protein wird anschließend autoradiographisch dargestellt. Um die Spezifität der gebundenen Sonde oder deren Kompetition mit anderen DNA-Sequenzen zu untersuchen, können parallel Ansätze mit einer Verdünnungsreihe mit zusätzlichen, nicht radioaktiv markierten Sonden durchgeführt werden. Dabei sollte sich das Signal durch die Kompetition mit der nicht radioaktiven Sonde abschwächen. Zur Bestätigung der Spezifität des an die Sonde gebundenen Proteins wird einem zusätzlichen Ansatz ein spezifischer Antikörper gegen das Protein beigemischt, was die Masse des DNA-Protein-Komplexes erhöht und zu einer verringerten Laufgeschwindigkeit im Gel führt (Super-Shift). Allerdings kann die Bindung des Antikörpers, insbesondere wenn dessen Epitop im DNA-bindenden Bereich des Proteins lokalisiert ist, auch zu einer Abschwächung der Protein-DNA-Bindung und folglich des Signals im EMSA-Assay führen.

Herstellung von radioaktiv markierten Oligonukleotid Sonden

Für die Herstellung doppelsträngiger endmarkierter Oligonukleotid-Sonden werden einzelsträngige Oligonukleotide mit den entsprechenden Bindungsstellen in sense- und antisense-Orientierung synthetisiert (Invitrogen).

Die einzelsträngigen Oligonukleotide werden zunächst in folgendem Ansatz doppelsträngig gemacht:

48µl Annealing Puffer (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA)

1µl sense Oligo (10µM)

1µl antisense Oligo (10µl)

Der Ansatz wird für 10 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend langsam über mehrere Stunden abgekühlt. Die doppelsträngigen Oligonukleotide können bei -20°C aufbewahrt werden.

Die Markierung der Oligonukleotide mit ³²P erfolgt mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase der Firma NEB.

Der Ansatz hierfür setzt sich wie folgt zusammen:

dsOligo (1.75 μ M)	2 μ l
T4 PNK	1 μ l
10 x PNK-Puffer	1 μ l
³² P γ -ATP (10 μ Ci/ μ l)	1 μ l
<u>ddH₂O</u>	<u>5μl</u>
	10 μ l

Die Kinase-Reaktion erfolgt durch Inkubation bei 37°C für 30 Minuten. Dabei wird ³²P von der γ -Position des ATP an die 5'-OH Enden der Oligonukleotide gehängt. Anschließend wird 40 μ l TE-Puffer zu jeder Probe gegeben, und die markierte Sonde wird mit Hilfe von „Micro Bio-Spin 30“ Säulen der Firma Biorad von nicht-inkorporiertem ³²P γ -ATP nach Anleitung des Herstellers getrennt.

Die radioaktiv markierten Oligonukleotide können bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Die Bindungsreaktionen für die electrophoretic mobility shift assays setzten sich wie folgt zusammen:

5 x Bindungs Puffer	5 μ l
BSA (10 μ g/ μ l)	0,25 μ l
Poly (dI:dC) 0.5 mg/ml	1 μ l
Nukleärer Extrakt (10 μ g)	x μ l
³² P-Oligonukleotid	3 μ l
Nicht radioaktiv markierter Kompetitor (100-fach)	x μ l
Antikörper (2 μ g)	x μ l
<u>ddH₂O</u>	<u>x μl</u>
	25 μ l

Für die Reaktionen mit Antikörpern werden die nukleären Extrakte zunächst für 15 Minuten zusammen mit dem entsprechenden Antikörper auf Eis inkubiert. Anschließend wird die radioaktiv markierte Sonde hinzugegeben, und es erfolgt eine Inkubation aller Proben für 30 Minuten auf Eis, bei der die Bindung der zu untersuchenden Proteine an die Ziel-Sequenzen in den Oligonukleotiden erfolgt.

Nach der 30-minütigen Inkubation erfolgt die Auftrennung der Bindungsreaktionen in einem 4%igen nativen Acrylamid-Gel bei 100V für etwa 3h in 0,5x TBE Puffer. Vor der Beladung des Gels wird an dieses für etwa eine Stunde eine Spannung von 80V angelegt, um es zu äquilibrieren.

Nach dem Lauf wird das Gel durch Anlegen von Vakuum bei 60°C für 3 Stunden getrocknet. Die radioaktiven Banden können dann durch Auflegen eines Filmes sichtbar gemacht werden.

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.10 dargestellt.

4% Acrylamid-Gel

10xTBE	3.75ml
Glycerol	1.875ml
30% Acrylamid	10ml
30%APS	187.5µl
TEMED	63.75µl
ddH ₂ O	59ml

10 x TBE Puffer

1M Tris-HCl
100mM EDTA
833,4 mM Borat

5 x Bindungs-Puffer

50mM HEPES-KOH (pH 7,9)
250mM KCl
12,5mM MgCl ₂
50% glycerol
5mM DTT

Tabelle 4.10: Im EMSA verwendete Oligonukleotide

5'-3'Oligonukleotidsequenz	Name	Ziel-Sequenz
TTTTTTTGTGGTTTGTGGTTGTTTT	Oligo T sense	GTTTGTTTT
AAAACAACACAAAACAAAACAAAAA	Oligo T antisense	
TACCGACCACGTGGGCGCGGGGGCGAC	C/EBP α -USF-sense	CACGTG
GTCGCCCCCGCGCCCACGTGGTCCGGTA	C/EBP α -USF-antisense	

4.5.15 ABCD-Assay (avidin-biotin complex DNA-binding assay)

Der ABCD-Assay ist eine weitere Methode zur Bestimmung von DNA-Protein-Interaktionen. Dem ABCD-Assay liegt das Prinzip eines Pulldowns zugrunde.

Etwa 1×10^7 Zellen werden aus der Kultur entnommen, einmal in PBS gewaschen und anschließend in Triton-X Lysis Puffer für 15 Minuten lysiert. Das Lysat wird danach zur kompletten Lyse der Zellkerne sonifiziert. Um Zelldebris zu entfernen und das reine Proteinlysate zu erhalten, werden die Lysate anschließend für 15 min bei 20000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält nun die nukleären Proteine.

Triton X-100 Lyse-Puffer

1% Triton X-100

150mM NaCl

50mM Tris-HCl, pH 7,4

2mM EDTA

Der nukleäre Zellextrakt wird mit einem biotinylierten, doppelsträngigen Oligonukleotid und magnetischen Streptavidin Beads bei 4°C unter Rotieren für mindestens zwei Stunden inkubiert. Dabei binden die zu untersuchenden Proteine an die spezifischen Bindestellen des Oligonukleotids. Das biotinylierte Oligonukleotid wiederum bindet an die magnetischen Streptavidin Beads, so dass ein Komplex aus DNA, Zielprotein und magnetischen Beads entsteht. Dieser Komplex kann dann mit Hilfe eines Magneten vom unspezifischen Protein-Überstand getrennt werden. Die Streptavidin-Beads werden dreimal

gewaschen, anschließend werden die gebundenen Proteine mit Laemmli-Puffer durch fünfminütiges Aufkochen eluiert und im Westernblot analysiert. Eine schematische Darstellung des Ablaufs eines Oligo-Pulldowns ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

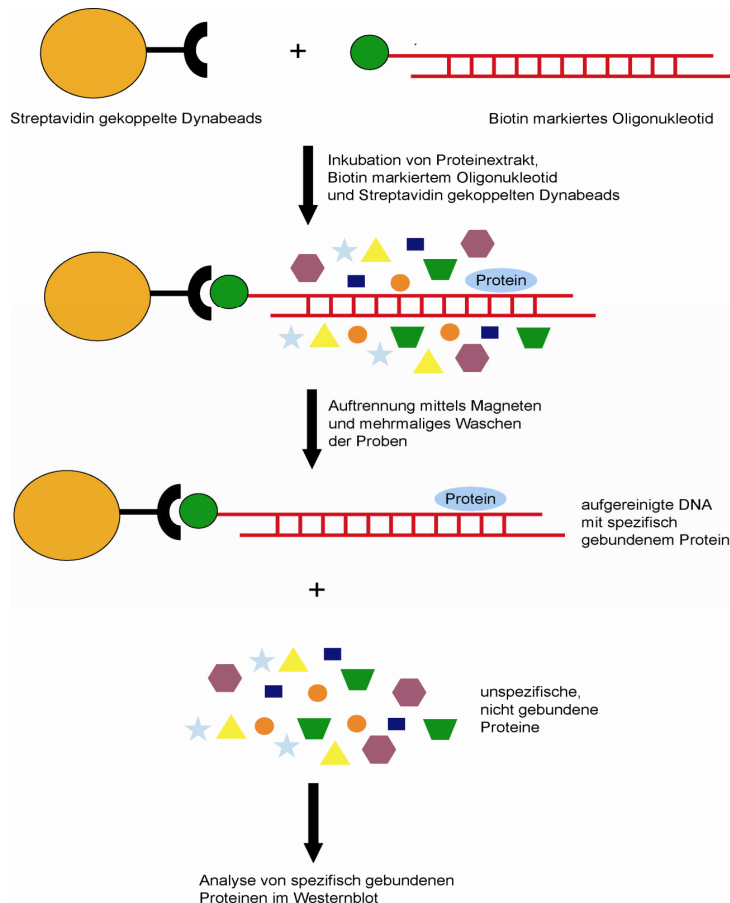


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Ablaufs eines ABCD-Assay

Der Ansatz für den ABCD-Assay setzt sich wie folgt zusammen:

1x Bindungs Puffer	300µl
NP-40 (1% Endkonzentration)	5µl
Biotinyliertes Oligonukleotid (1µg Endkonz.)	2µl
Streptavidin Magnetic Beads (100µg Endkonz.)	10µl
Salmon Sperm DNA (100ng Endkonz.)	1µl
<u>Nukleärer Extrakt (200µg)</u>	<u>X µl</u>
	500µl

1 x Bindungs Puffer:

25mM HEPES, pH 7,5

50mM KCl

1mM EDTA

10mM MgCl

5% Glycerol

1mM DTT

Tabelle 4.11: Im ABCD-Assay verwendete Oligonukleotide

5'-3'Oligonukleotidsequenz	Name	Zielsequenz
Biotin- AGGGGGCCCCCGCTACCGACCACGTGGGCGC GGGGGCGACGGC	C/EBPa_USF_btn_fw	CACGTC
GCCGTCGCCCCCGCGCCACGTGGTCGGTAGC GGGGGCCCCCT	C/EBPa_USF_btn_rev	CACGTC

5 ERGEBNISSE

5.1 RGS2 ist ein nukleäres Protein

Die klassische Funktion von RGS2 als Aktivator der intrinsischen GTPase-Aktivität von G α -Untereinheiten findet an der Zellmembran statt. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Interaktion von G α q mit Flt3-ITD haben Hinweise auf eine wichtige Rolle dieses Moleküls für die Autoaktivierung von Flt3-ITD und der sich daraus ergebenden Transformation myeloischer Zellen gezeigt. Durch die hemmende Wirkung von RGS2 auf G α q können jedoch nicht alle in myeloischen Zellen beobachteten Funktionen von RGS2 erklärt werden. Insbesondere die Rolle von RGS2 in der Differenzierung myeloischer Zellen, die auch in Abwesenheit transformierender Rezeptortyrosinkinasen beobachtet wurde, sowie die Induktion der C/EBP α – Expression werden vermutlich über andere Mechanismen vermittelt und bedürfen weitergehender Untersuchungen. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten eine hauptsächlich nukleäre Lokalisierung von RGS2 (Heximer et al. 2001) in nicht-hämatopoetischen Zellen, zudem gilt dieses Protein aufgrund seiner Struktur als potenzielles „Basic Helix-Loop-Helix-Protein“ (Siderovski et al. 1994) und hat somit möglicherweise transkriptionsregulierende Eigenschaften.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Lokalisationsstudien zu RGS2 durchgeführt. In HEK293T Zellen konnte die nukleäre Lokalisation von RGS2 in Fibroblasten bestätigt werden.

Abbildung 5.1 a zeigt konfokalmikroskopische Aufnahmen von HEK293T Zellen, die mit einem GFP-RGS2 Fusionsprotein bzw. GFP als Kontrolle transient transfiziert wurden. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt. Es lässt sich deutlich die vorwiegend nukleäre Lokalisation des GFP-RGS2-Fusionsproteins erkennen, während in der Kontrolle GFP gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt ist.

Um die Lokalisation von RGS2 in myeloischen Zellen zu untersuchen, wurden 32D Zellen (eine murine myeloische Progenitorzelllinie) gewählt. Die Zellen wurden fixiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen RGS2 inkubiert. Nach der Färbung mit einem Alexa-488 markierten Sekundäntikörper lässt sich für RGS2 ein grünes Signal erkennen. Auch hier wurden zusätzlich die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt und die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop erstellt (Abbildung 5.1 b). Auch in diesen Zellen zeigt sich, wie schon zuvor in Fibroblasten beschrieben, eine vorwiegend nukleäre Lokalisation von RGS2.

Um diese Ergebnisse an einer weiteren myeloischen Zelllinie zu bestätigen, wurden nukleäre und zytoplasmatische Extrakte aus NB4 Zellen erstellt und die Lokalisation von RGS2 mittels Westernblot untersucht (Abbildung 5.1 c). Auch in diesen Zellen zeigt sich im Vergleich zur zytoplasmatischen Fraktion eine erhöhte Expression von RGS2 in der nukleären Fraktion. Als Ladekontrollen dienen PARP für die nukleäre sowie Tubulin für die zytoplasmatische Fraktion.

RGS2 zeigt also nicht nur in in Fibroblasten sondern auch in myeloischen Zellen eine vorwiegend nukleäre Lokalisation.

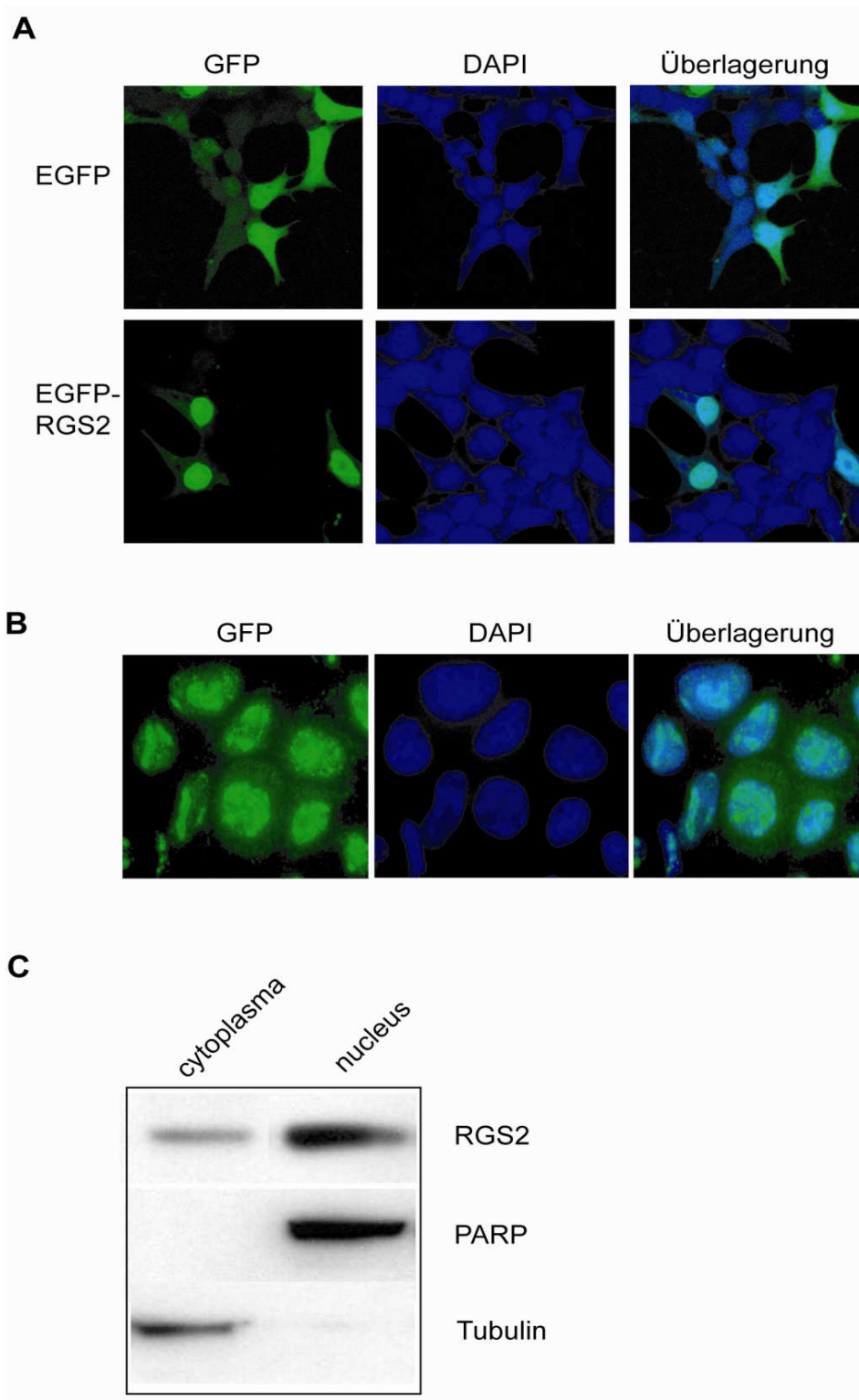


Abbildung 5.1: Subzelluläre Lokalisation von RGS2.

A: Konfokale Aufnahmen transient transfizierter 293T Zellen: EGFP bzw. EGFP-RGS2 (grün), DAPI (blau) zur Gegenfärbung der Zellkerne sowie Überlagerung beider Bilder. B: Immunfluoreszenz für RGS2 (grün) und DAPI (blau) zur Gegenfärbung der Zellkerne sowie Überlagerung beider Bilder in 32D Zellen. C: Westernblot für RGS2, PARP und Tubulin in zytoplasmatischem sowie nukleärem Extrakt aus fraktionierten NB4 Zellen.

5.2 RGS2 ist ein DNA-bindendes Protein

Die Beschreibung von RGS2 als mutmaßliches „Basic Helix Loop Helix“ Protein sowie seine vornehmlich nukleäre Lokalisierung legen die Vermutung nahe, dass RGS2 neben seiner klassischen Funktion der Regulation von G-Protein- Signalwegen eine weitere nukleäre Funktion haben und mit DNA interagieren könnte.

Um dies zu überprüfen wurde zunächst in einem einfachen Versuch die Fähigkeit der DNA Bindung von RGS2 untersucht. Dazu wurden Digoxigenin-markierte Fragmente genomischer DNA mit GST-RGS2 sowie GST-bMyb (Positivkontrolle) und GST-C21 (Rho-Bindungsdomäne von Rhotekin, Negativkontrolle) sowie GST inkubiert und die Versuchsansätze anschließend im Sinne eines GST-Pulldown-Experiments mit Glutathion-Beads inkubiert und gewaschen. Die gebundene DNA wurde mittels Dot-Blot detektiert. Abbildung 5.2 zeigt ein positives Signal im Ansatz mit GST-RGS2 und der Positivkontrolle GST-bMyb, während in den Ansätzen mit GST-C21 und GST alleine kein Signal nachweisbar ist.

Somit konnte gezeigt werden, dass RGS2 grundsätzlich an DNA bindet.

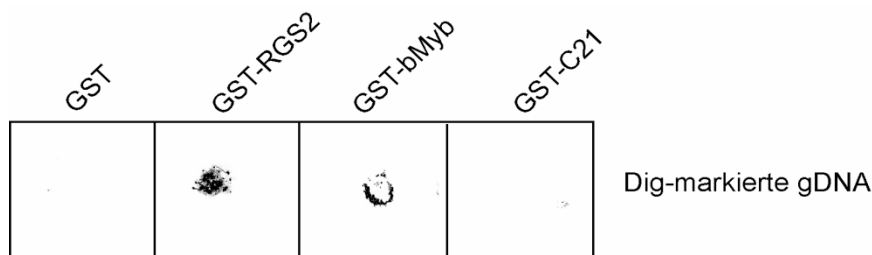


Abbildung 5.2: RGS2 bindet genomische DNA.

Dot-Blot Analyse zur Untersuchung der DNA-Bindung von GST-RGS2. GST-bMyb dient als Positiv- GST bzw. GST-C21 als Negativkontrolle.

Sowohl die Lokalisierung, als auch die DNA-Bindung von RGS2 unterstützen die Hypothese einer nukleären Funktion dieses Proteins.

Zur genaueren Identifizierung der DNA-Zielsequenzen von RGS2 wurde aus einer DNA-Bibliothek mit zufälligen Sequenzen eine Selektion RGS2 - bindender Sequenzen mittels GST-RGS2 sowie GST als Negativkontrolle über mehrere Runden durchgeführt (Abbildung 5.3).

Die genaue Versuchsdurchführung ist unter 4.5.13 beschrieben. In Abbildung 5.5 ist beispielhaft eine PCR für die selektierten Oligonukleotide nach einem Zyklus der Bindungsstellen-Selektion dargestellt. Es zeigen sich sowohl für die GST-Kontrolle als auch für GST-RGS2 spezifische Banden bei etwa 76 bp, die anschließend für den nächsten Zyklus der Bindungsstellen-Selektion eingesetzt bzw. für die abschließende Sequenzierung kloniert werden.

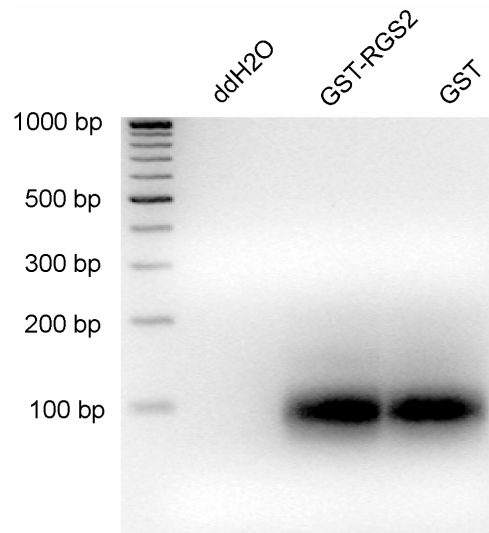


Abbildung 5.5: Beispielhafte Darstellung einer PCR für die angereicherten Oligonukleotide nach der Bindungsstellen-Selektion.

Mit Hilfe dieses Versuchs wurde wiederholt eine Thymidin-reiche Sequenz mit wenigen Guanin-Nukleotiden angereichert. Um die Eigenschaften der Sequenz genauer zu untersuchen, wurde sie mit Hilfe einer Datenbank mit Promotorsequenzen sämtlicher Säugetiere verglichen. Es handelt sich dabei um die TRANSFAC[®] - Gene Transcription Factor Database, in der Daten über Transkriptionsfaktoren, deren experimentell nachgewiesenen Bindungsstellen und die regulierten Gene enthalten sind und zum Vergleich herangezogen werden können (Knuppel et al. 1994; Wingender et al. 1996). Die selektierte Sequenz wurde dort eingelesen und mit den enthaltenen Daten verglichen. Das Ergebnis zeigt, dass ein Teil dieser Sequenz (GTTTGTTT) als Signal-Sequenz im Promotor des Hepatocyte-nuclear factor 3 beta beschrieben wurde. Dies trifft sowohl für das murine als auch für das humane Gen zu. Der Hepatocyte-nuclear factor 3 beta (HNF3- β) wird unter anderem auch als Forkheadbox A2 (Foxa2) bezeichnet. Dieser Transkriptionsfaktor gehört zur Familie der Forkhead Box Proteine, die eine konservierte, aus 110 Aminosäuren bestehende DNA-Bindedomäne besitzen. Foxa2 wird während der frühen Embryonalentwicklung exprimiert und aktiviert und spielt eine wichtige Rolle für die Ausbildung von Ektoderm, Mesoderm und Endoderm (Friedman et al. 2006). In der späteren Organogenese ist Foxa2 für die Entwicklung von Leber (Lee et al. 2005a),

Pankreas (Lee et al. 2005b) und Lunge (Wan et al. 2005) von großer Bedeutung. Außerdem besitzt Foxa2 wie alle Foxa-Gene wichtige Funktionen bei der Steuerung des Metabolismus, beispielsweise bei der Aufrechterhaltung der Glukose-Homeostase (Shen et al. 2001; Lantz et al. 2004; Lee et al. 2005b). Ferner wurde Foxa2 als Zielgen von C/EBP α und als Tumorsuppressor beim Bronchialkarzinom beschrieben (Halmos et al. 2004).

Die in dieser Arbeit gefundene Gensequenz liegt nicht nur in der Promotorregion von FOXA2, sondern wird von diesem Protein auch gebunden und ist somit eine Zielsequenz für die Funktion von FOXA2 als Transkriptionsfaktor.

Des Weiteren wurden zahlreiche Sequenzen mit einem E-Box-Motiv (CANNTG), der Zielsequenz von Basic Helix-Loop-Helix Proteinen, jedoch bei letzteren ohne Anreicherung einer einzelnen Sequenz, gefunden.

Die Bindungsstellen-Selektion wurde auf die gleiche Art und Weise, wie bereits für GST-RGS2 beschrieben, mit FLAG-RGS2 bzw. FLAG als Negativkontrolle durchgeführt. Dieser Versuch lieferte die gleichen Ergebnisse wie zuvor für das GST-markierte RGS2 beschrieben.

Die Ergebnisse der Bindungsstellen-Selektion sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Ergebnisse der Bindungsstellen Selektion für RGS2

Selektierte Sequenz	Signal Sequenz	Promotor	Regulierender Transkriptionsfaktor
TTTTTTGTTTGTGGTTGTTTT	GTTTGT	hepatocyte Nuclear factor 3-beta	Foxa2 (HNF3 beta)
NNNNNNNCCANNTGNNNNNN	CANNTG	verschiedene	basic helix loop helix Transkriptionsfaktoren

5.3 RGS2 bindet an eine Signalsequenz im Foxa2 Promotor

Um die Bindung von RGS2 an die in der Selektion gefundene FOXA2 bindende Sequenz zu bestätigen, wurden zunächst wieder Dot Blot-Experimente durchgeführt (Abbildung 5.6 a). In diesem Fall wurde die Effektivität der Bindung von GST-RGS2 und den oben beschriebenen Kontrollproteinen GST, GST-bMyb sowie GST-C21 an die selektierte Sequenz mit der Foxa2 Bindungsstelle untersucht. Hier zeigte sich, dass die Bindung von GST-RGS2 an die selektierte Sequenz weitaus stärker war, als diejenige der

Kontrollproteine. Somit ist die selektierte Sequenz tatsächlich spezifisch für die Bindung an RGS2.

Abbildung 5.6 b zeigt ein weiteres Dot Blot Experiment zur Bestätigung der Spezifität der Bindung von RGS2 an die selektierte FOXA2 bindende Sequenz. Hierfür wurde die für die Bindungsstellen- Selektion verwendete Oligo-Bibliothek mit Digoxigenin markiert und mit GST-RGS2 sowie GST-bMyb inkubiert. Den verschiedenen Ansätzen wurde in zunehmenden Anteilen die unmarkierte selektierte Sequenz als Kompetitor zugegeben. Im unteren Teil der Abbildung ist die Stärke der Bindung nach densitometrischer Quantifizierung der Dots zur Verdeutlichung in einem Balkendiagramm dargestellt. Es zeigt sich, dass die Bindung von RGS2 an die markierte Bibliothek durch Zugabe der unmarkierten Sequenz verdrängt wird und zurückgeht, bei bMyb ist dies nicht der Fall. Somit konnte in diesem Kompetitions-Experiment die Spezifität der selektierten Sequenz für RGS2 bestätigt werden.

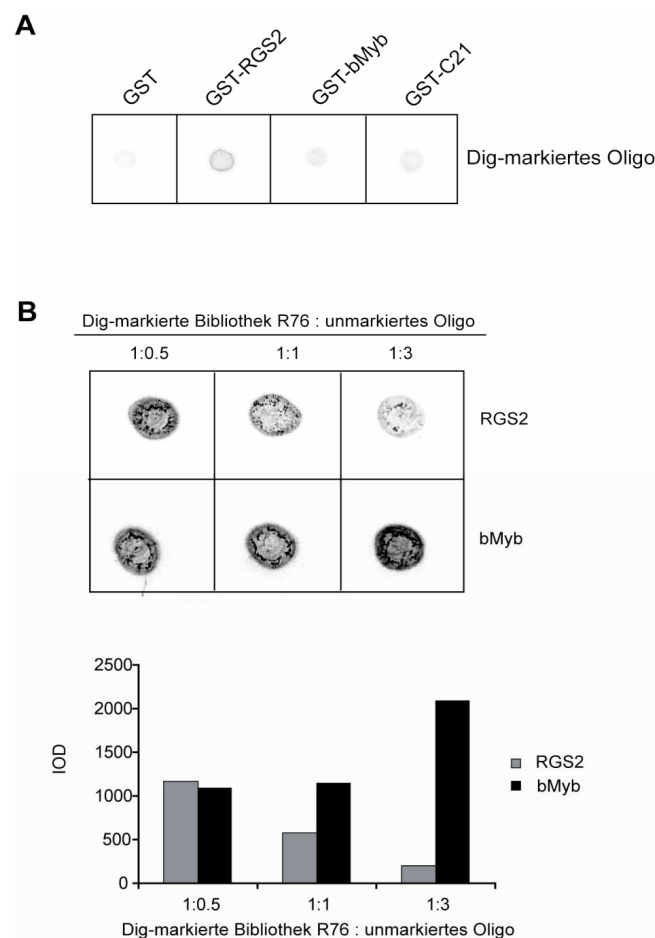


Abbildung 5.6: Bestätigung der Bindung von RGS2 an die isolierte FOXA2 Bindungsstelle. A: Dot-Blot Analyse mit GST, GST-RGS2, GST-bMyb und GST-C21 mit einer die FOXA2 Bindungsstelle enthaltenden Dig-markierten DNA-Sequenz (Oligo). B: Dot-Blot-Analyse mit einer Dig-markierten zufälligen DNA-Bibliothek und der unmarkierten FOXA2 Bindungssequenz (Oligo) als Kompetitor.

Im nächsten Schritt wurde die Bindung von RGS2 an die selektierte Sequenz mit der Foxa2-Bindungsstelle in Gel Shift Experimenten (EMSA) untersucht.

Abbildung 5.7 a zeigt einen Gel Shift mit nukleärem Extrakt aus RGS2 überexprimierenden HEK 293T Zellen. Als ³²P-markierte Sonde wurde ein doppelsträngiges DNA-Oligo verwendet, das die selektierte RGS2 Zielsequenz beinhaltet. Es zeigt sich die Bildung eines Protein/DNA Komplexes im Gel, der größer als die freie DNA ist. Gibt man die unmarkierte Sonde in hundertfach molarem Überschuss hinzu, verschwindet der Komplex durch Competition. Dies ist nicht der Fall, wenn eine unspezifische unmarkierte DNA-Sonde als Kompetitor hinzugegeben wird.

In Abbildung 5.7 b ist die Dosisabhängigkeit von der Menge an unspezifischer Kompetitor-DNA gezeigt. Für diesen Versuch wurden nukleäre Extrakte aus FLAG-RGS2 überexprimierenden 32D Zellen verwendet. Auch hier lässt sich, nach Inkubation mit der selektierten Sequenz als Sonde, die Bildung eines Protein/DNA-Komplexes erkennen. Dieser wird durch Competition mit der unmarkierten Sonde konzentrationsabhängig schwächer.

Des Weiteren sollte durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers gegen RGS2, bzw. gegen das entsprechende Tag, das Vorhandensein von RGS2 in dem detektierten Protein/DNA-Komplex bestätigt werden. Durch die zusätzliche Bindung des Antikörpers an den bereits vorhandenen Protein/DNA Komplex kommt es zu einer Zunahme von dessen Masse. Dadurch wandert dieser im Gel langsamer und stellt sich im Gel weiter oben dar (Super-Shift). Für diesen Versuch wurden nukleäre Extrakte aus EGFP-RGS2 exprimierenden HEK 293T Zellen hergestellt und wie zuvor im Gel Shift eingesetzt (Abbildung 5.7c). Wie schon in den vorherigen Experimenten lässt sich auch hier ein Rückgang des Signals durch spezifische Competition erkennen. Durch Zugabe eines Antikörpers gegen EGFP lässt sich eine leichte Abschwächung des Signals zeigen. Möglicherweise verhindert die Bindung des Antikörpers eine weitere Bindung von DNA an EGFP-RGS2. Daher kommt es nicht zur Ausbildung eines Supershifts, sondern lediglich zu einer Abschwächung der Signalintensität. Die Zugabe von Antikörper gegen RGS2 sowie die Zugabe der entsprechenden Isotypenkontrolle zeigen keinen Einfluss auf die Stärke des Signals. Möglicherweise ist bei der Ausbildung eines RGS2-DNA-Komplexes das für die Bindung des RGS2-Antikörpers notwendige Epitop nicht mehr zugänglich, so dass der Antikörper den Komplex nicht binden kann.

Abbildung 5.7 d zeigt einen Gel Shift mit nukleären Extrakten aus FLAG-RGS2 exprimierenden Sf9 Zellen. Auch hier zeigt sich wieder der Rückgang des Signals durch

spezifische Konkurrenz. Die Zugabe eines Antikörpers gegen RGS2 bzw. der Isotypenkontrolle hat keinen Einfluss auf die Bildung des Protein/DNA-Komplexes oder dessen Größe. Als Negativkontrolle diente nukleärer Extrakt aus FLAG exprimierenden Sf9 Zellen, hier zeigte sich keine Protein/DNA-Komplexbildung.

Zusammenfassend kommt es in Gel Shift Assays mit Lysaten aus RGS2 überexprimierenden Zellen und der in der Bindungsstellenselektion gefundenen Foxa2 Zielsequenz zu einer Komplexbildung. Zwar ist nach Zugabe eines Antikörpers gegen RGS2 oder das daran fusionierte Tag kein Supershift zu beobachten, jedoch sprechen die Konkurrenzexperimente und die Tatsache, dass es mit dem FLAG-Tag alleine nicht zur Protein/DNA-Komplexbildung kommt, für eine spezifische Bindung von RGS2 an die selektierte FOXA2 Bindungssequenz.

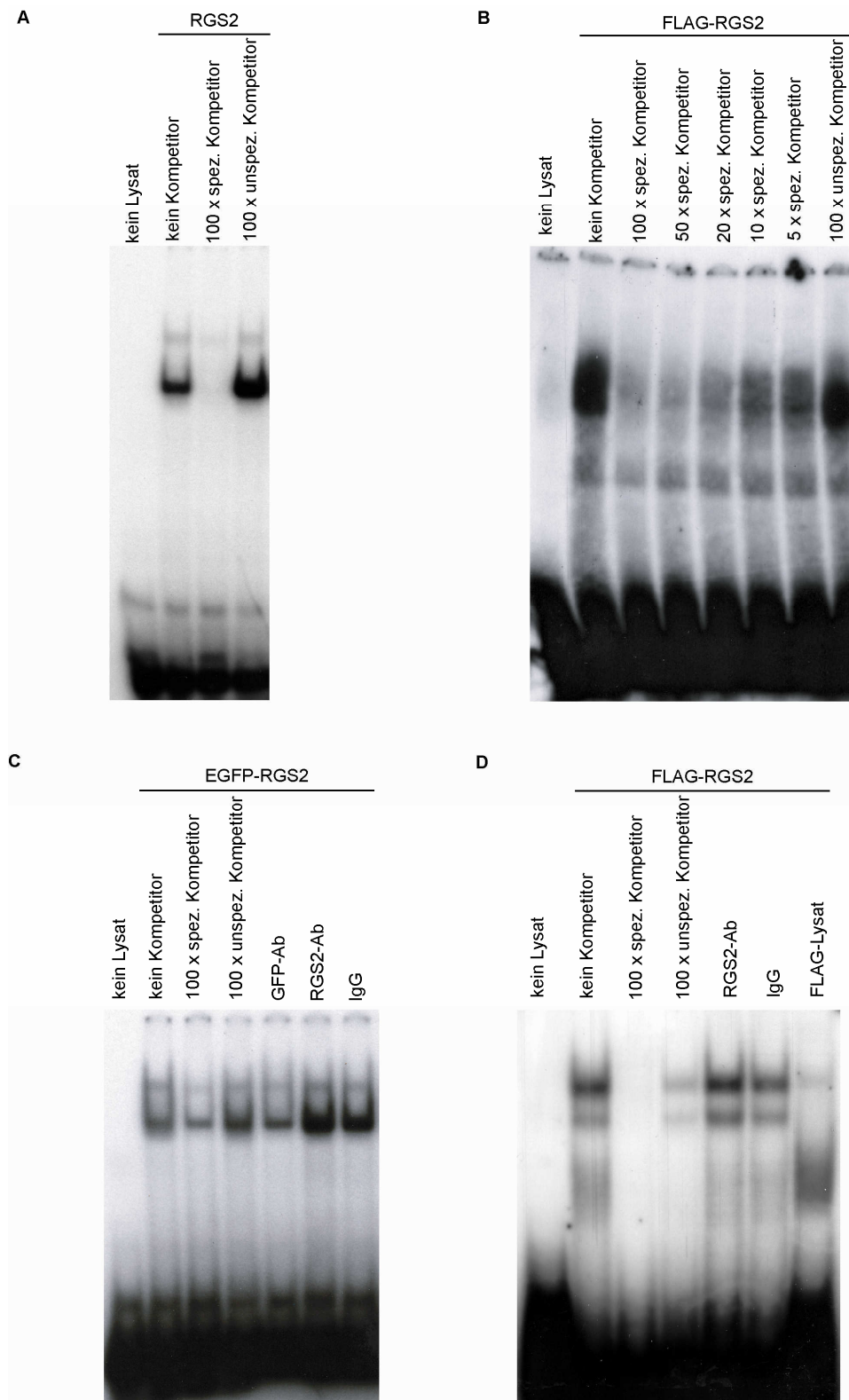


Abbildung 5.7: Untersuchung der Bindung von RGS2 an die isolierte FOXA2 Bindungsstelle mittels Gel Shift Assays.

A: Gel-Shift Assay mit nukleärem Extrakt aus RGS2 überexprimierenden 293T Zellen. Als Sonde wurde die Foxa2 Bindungssequenz verwendet. Die Competition erfolgte mit einer unmarkierten Sonde mit der Foxa2 Bindungssequenz bzw. einer unspezifischen Kompetitorsequenz. B: Gel-Shift Assay mit nukleärem Extrakt aus FLAG-RGS2 überexprimierenden 32D Zellen. Als Sonde wurde die Foxa2-Bindungssequenz eingesetzt, Competition wie unter A. C: Gel Shift Assay mit nukleärem

Extrakt aus EGFP-RGS2 überexprimierenden 293T Zellen. Als Sonde wurde die Foxa2-Bindungssequenz eingesetzt, Konkurrenz wie unter A. Außerdem wurde RGS2- sowie GFP-Antikörper und die entsprechende IgG Kontrolle eingesetzt. D: Gel Shift Assay mit nukleärem Extrakt aus FLAG-RGS2 bzw. FLAG überexprimierenden Sf9 Zellen. Als Sonde wurde die Foxa2-Bindungssequenz eingesetzt, Konkurrenz wie unter A. Außerdem wurde RGS2- Antikörper sowie die entsprechende IgG Kontrolle eingesetzt.

In der Bindestellen-Selektion wurde ein regulatorisches Element im Foxa2 Promotor als RGS2- bindende DNA-Sequenz identifiziert und die Spezifität der Bindung von RGS2 an diese Sequenz mittels Dot-Blot- und Gel-Shift Analysen bestätigt. Im nächsten Schritt wurde deshalb untersucht, ob RGS2 einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von Foxa2 hat. Zu diesem Zweck wurden Real-Time RT PCRs zur Messung der FOXA2 Expression auf mRNA Ebene durchgeführt. Abbildung 5.8 a zeigt die RGS2 bzw. Foxa2 Expression in transient transfizierten 293T Zellen. Die Zellen wurden mit EGFP bzw. EGFP-RGS2 Konstrukten transfiziert, und die mRNA wurde nach 48h isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Diagramme zeigen die relative Expression der untersuchten Gene normalisiert auf das Referenz-Gen GAPDH. Im oberen Teil der Abbildung ist die RGS2-Expression dargestellt. 293T Zellen exprimieren kaum endogenes RGS2, die Expression wird durch Transfektion mit dem entsprechenden Konstrukt um ein Vielfaches gesteigert. Foxa2 wird bereits endogen in 293T Zellen exprimiert. Durch die Transfektion mit RGS2 zeigt sich eine schwache Induktion der Foxa2 Expression auf etwa den 1,5 fachen Wert im Vergleich zum Leervektor.

In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass RGS2 während der granulozytären Differenzierung myeloischer Zellen deutlich induziert wird. Um zu überprüfen, ob die Foxa2 Expression analog zur Induktion von RGS2 ansteigt, wurde die Foxa2 Expression zunächst auf mRNA-Ebene während der Differenzierung von NB4-Zellen untersucht. NB4 Zellen wurden durch Zugabe von 1 μ M ATRA für 24h bzw. 48h differenziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (0h, 24h, 48h) wurden Proben für die mRNA-Isolation entnommen und mittels Real-Time RT PCR untersucht (Abbildung 5.8 b). Der obere Teil des Diagrammes zeigt die Expression von RGS2. Hier zeigt sich im Verlauf der granulozytären Differenzierung eine deutliche Induktion (bis zu acht-fach) von RGS2 im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen. Für Foxa2 lässt sich sogar eine noch deutlichere Zunahme der Expression erkennen, eine bis zu 25-fache im Vergleich zu undifferenzierten Zellen nach 48h Differenzierung.

Um die Dynamik der Foxa2 Expression während der granulozytären Differenzierung auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden wiederum NB4-Zellen mit 1 μ M ATRA differenziert und zu den angegebenen Zeitpunkten Lysate für die Analyse im Westernblot

hergestellt. Der Westernblot wurde mit Antikörpern gegen RGS2 und Foxa2 sowie β -Aktin als Ladekontrolle inkubiert (Abbildung 5.8 c). Auch auf Proteinebene zeigt sich eine deutliche Induktion sowohl für RGS2 als auch für Foxa2.

Zusammenfassend werden die Expressionen von RGS2 als auch Foxa2 während der granulozytären Differenzierung von NB4 Zellen analog induziert. Da die unmittelbare Induktion der Foxa2- Expression durch RGS2 alleine in 293T Zellen nur minimal ist, liegt die Vermutung nahe, dass für die starke Zunahme der Foxa2 Expression in der granulozytären Differenzierung RGS2 alleine nicht ausreichend ist, und weitere Faktoren notwendig sind.

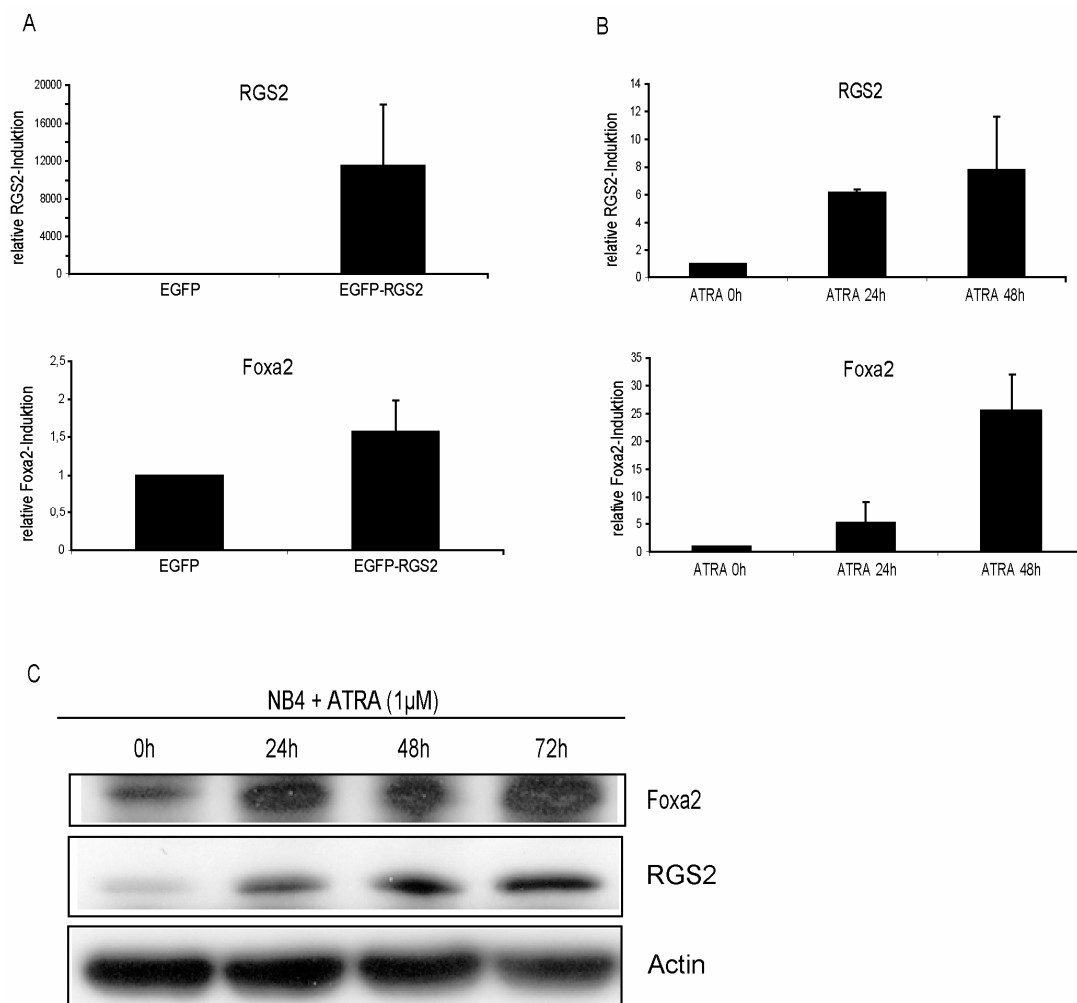


Abbildung 5.8: Expressionsanalyse von Foxa2

A: Real-Time RT-PCR für humanes RGS2 sowie Foxa2 in transient transfizierten 293T Zellen. Die Zellen wurden transient mit EGFP bzw. EGFP-RGS2 Konstrukten transfiziert und nach 48h wurde die RNA isoliert. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression von RGS2 und Foxa2 bestimmt. B: NB4 Zellen wurden mit ATRA für die Induktion der granulozytären Differenzierung behandelt. Als Negativ-Kontrolle wurde ETOH eingesetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen aus der Kultur genommen und die RNA isoliert. C: Westernblot für Foxa2 und RGS2 in mit ATRA differenzierten NB4 Zellen. Die Zellen wurden mit 1 μ M ATRA differenziert und zu den angegebenen Zeitpunkten in RIPA-Puffer lysiert. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

Eine Hypothese für das Zusammenspiel zwischen RGS2 und Foxa2 ist eine mögliche Interaktion beider Proteine. Es wäre denkbar, dass RGS2 und Foxa2 in einem Komplex an DNA binden und die Expression von Zielgenen induzieren.

Um zu untersuchen, ob RGS2 und Foxa2 miteinander interagieren, wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt, jedoch konnte unter den bislang gewählten Versuchsbedingungen keine direkte Interaktion beider Proteine festgestellt werden. Die Klärung des Zusammenspiels von Foxa2 und RGS2 in der Hämatopoese bedarf weiterer Untersuchungen, die über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgehen.

5.4 RGS2 bindet an den C/EBP α -Promotor

In der Bindungsstellen-Selektion für RGS2 wurden neben der oben beschriebenen Foxa2 Bindungssequenz mehrere DNA-Sequenzen gefunden, die ein E-Box Motiv enthalten. E-Box Motive sind Zielsequenzen für Transkriptionsfaktoren der Basic-Helix-Loop-Helix Familie, zu denen RGS2 aufgrund seiner Struktur mutmaßlich gehört. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass RGS2 die Expression von C/EBP α induziert (Schwable et al. 2005). Der Promotor von C/EBP α wiederum enthält ein E-Box Motiv an Position -275, das für dessen Aktivierung essentiell ist (Christy et al. 1991). Die Induktion der C/EBP α Expression durch RGS2 könnte daher durch Bindung von RGS2 an diese Promotorsequenz und konsekutive transkriptionelle Aktivierung erfolgen.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde zunächst mittels Gel Shifts die Bindung von RGS2 an das in der Literatur beschriebene E-Box Motiv im C/EBP α Promotor überprüft. Abbildung 5.9 a) zeigt einen Gel Shift Assay mit nukleären Extrakten aus EGFP-RGS2 exprimierenden HEK 293T Zellen. Als ^{32}P -markierte Sonde wurde eine doppelsträngige DNA Sequenz aus dem C/EBP α Promotor, die das E-Box Motiv enthält, verwendet. Durch Inkubation der DNA mit dem nukleären Extrakt bildete sich ein DNA/Protein-Komplex. Nach Zugabe der unmarkierten Sonde in hundertfachem molarem Überschuss verschwand das Signal durch spezifische Konkurrenz. Durch Zugabe von unspezifischer Konkurrenz-DNA wurde das Signal lediglich leicht abgeschwächt. Die Inkubation mit einem Antikörper gegen GFP führt ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der Signalstärke. Vermutlich hemmt die Bindung des Antikörpers an GFP-RGS2 die Bindung an DNA. Die entsprechende Isotypenkontrolle hat keinen Einfluss auf die DNA-Bindung des Proteins.

RGS2 scheint demzufolge spezifisch an das E-Box Motiv im C/EBP α Promotor zu binden.

Da C/EBP α selbst an das hier untersuchte E-Box Motiv seines eigenen Promotors binden kann (Christy et al. 1991; Legraverend et al. 1993), wurde der Einfluss einer Koexpression von RGS2 und C/EBP α auf die Bindung an die entsprechende Sequenz im C/EBP α Promotor untersucht (Abbildung 5.9 b). Auch bei nukleären Extrakten von HEK 293T Zellen, in denen beide Proteine gleichzeitig überexprimiert wurden, zeigte sich eine DNA/Protein - Komplexbildung, deren Signal durch die Zugabe unmarkierter spezifischer Sonde abgeschwächt wird.

Die Inkubation mit Antikörpern gegen C/EBP α bzw. GFP führte ebenfalls zu einer deutlichen Abschwächung der Bildung dieses Komplexes. Die Zugabe der entsprechenden Isotypenkontrolle hingegen zeigte keinen Einfluss.

Diese Experimente lassen darauf schließen, dass sowohl RGS2 als auch C/EBP α an das oben beschriebene E-Box Motiv im Bereich des C/EBP α -Promotors binden. Die Tatsache, dass sich die Bildung des DNA-Protein- Komplexes sowohl durch den Anti-GFP- als auch durch den Anti-C/EBP α - Antikörper hemmen lassen, legt die Vermutung nahe, dass beide Proteine die DNA in ein und demselben Komplex binden.

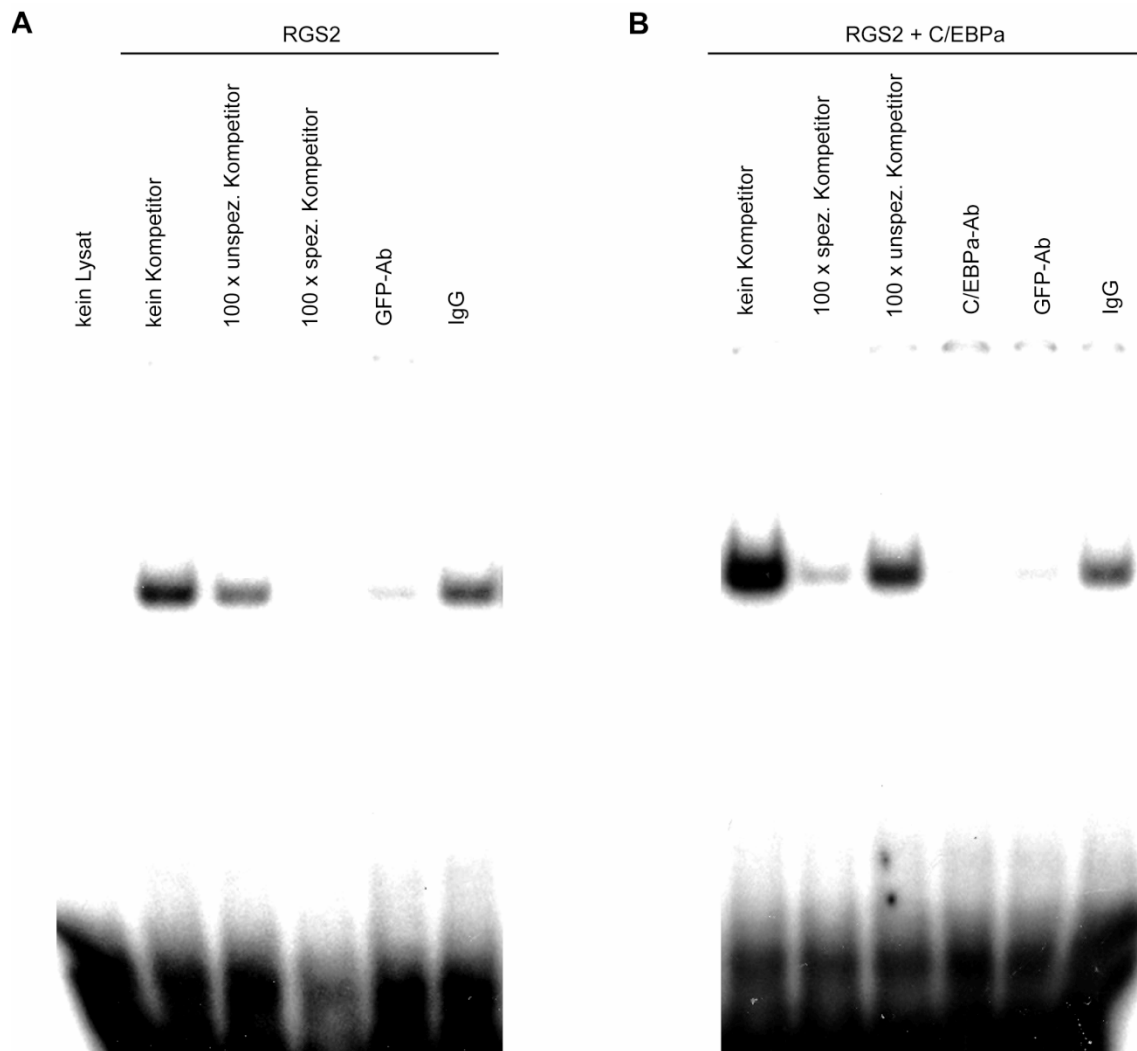


Abbildung 5.9: Untersuchung der Bindung von RGS2 an die E-Box Sequenz im C/EBP α -Promotor mittels Gel-Shift Assays.

A: Gel Shift Assay mit nukleärem Extrakt aus EGFP-RGS2 überexprimierenden 293T Zellen. Als Sonde wurde ein 23 Nukleotide langer Ausschnitt des C/EBP α -Promotors verwendet, in dessen Kern die E-Box Sequenz liegt. Für Wettbewerbs-Experimente wurde eine unspezifische Sonde eingesetzt. Des Weiteren wurde zur Bestätigung der Spezifität der Komplexbildung durch RGS2 ein GFP-Antikörper bzw. die entsprechende IgG-Kontrolle im Sinne eines Supershift-Assays eingesetzt. B: Gel Shift Assay mit nukleärem Extrakt aus EGFP-RGS2 und C/EBP α überexprimierenden 293T Zellen. Als Sonde wurde ein 23 Nukleotide langer Ausschnitt des C/EBP α -Promotors verwendet, in dessen Kern die E-Box Sequenz liegt. Für Wettbewerbs-Experimente wurde eine unspezifische Sonde eingesetzt. Des Weiteren wurde zur Bestätigung der Spezifität der Komplexbildung ein GFP- sowie C/EBP α - Antikörper bzw. die entsprechende IgG-Kontrolle im Sinne eines Supershift-Assays eingesetzt.

In den vorangegangenen Gel- Shift- Experimenten konnte gezeigt werden, dass RGS2 an das E-Box-Motiv im C/EBP α Promotor bindet.

Jedoch war in den Gel-Shift-Experimenten nach Zugabe eines spezifischen Antikörpers kein sog. Supershift sondern lediglich eine Abschwächung des Signals des DNA/Proteinkomplexes zu erkennen, was vielfältige Gründe haben kann. Um die Spezifität der Bindung von RGS2 an das C/EBP α Promotor-Fragment zu bestätigen,

wurde die Interaktion von RGS2 mit dieser DNA Sequenz mit einer weiteren Methode, einem sog. ABCD-Assay (avidin-biotin complex DNA-binding assay) überprüft.

Dabei wird das zu untersuchende doppelsträngige DNA-Oligonukleotid mit Biotin markiert und zusammen mit magnetischen Streptavidin-Beads sowie nukleärem Zellextrakt inkubiert. Anschließend wird der DNA-Proteinkomplex an Streptavidin-Beads gekoppelt und gewaschen. Die Analyse des gebundenen Proteins erfolgt mittels Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper.

Abbildung 5.10 zeigt einen ABCD-Assay, der mit nukleären Extrakten aus transient transfizierten HEK 293T Zellen durchgeführt wurde. Die Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für EGFP, EGFP-RGS2, C/EBP α sowie EGFP-RGS2 und C/EBP α in Kombination transfiziert. Da bereits bekannt ist, dass C/EBP α seinen eigenen Promotor im Bereich der oben beschriebenen E-box Sequenz bindet und aktiviert, wurde dessen Bindung an das Promotorfragment als Positivkontrolle mitgemessen. Zur Verifikation der Proteinexpression wurden jeweils 2% des für den Oligo-Pulldown verwendeten Extraktes als Ladekontrolle aufgetragen. Das doppelsträngige DNA-Oligonukleotid, das für den Pulldown eingesetzt wurde, enthält das E-Box Motiv aus dem C/EBP α Promotor. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, zu dem keine DNA sondern nur die Streptavidin-gekoppelten Beads gegeben wurden.

Die Detektion des Westernblots erfolgte mit Antikörpern gegen RGS2 sowie C/EBP α , als Kontrolle wurde der Blot ebenfalls mit einem EGFP-Antikörper gefärbt.

Der RGS2-Blot zeigt, dass sowohl aus dem Lysat RGS2 exprimierender Zellen als auch aus dem Lysat RGS2 und C/EBP α koexprimierender Zellen RGS2 mittels des DNA-Oligos aus dem C/EBP α Promotor präzipitiert werden kann. RGS2 bindet also an diese DNA Sequenz. Anhand der Ladekontrolle lässt sich erkennen, dass RGS2 in beiden nukleären Extrakten gleich stark exprimiert wird. Jedoch lässt sich aus dem Lysat von RGS2 und C/EBP α koexprimierenden Zellen weniger RGS2 präzipitieren, was auf eine Abschwächung der Bindung von RGS2 an den C/EBP α Promotor bei Koexpression von C/EBP α schließen lässt.

Mit dem C/EBP α Westernblot für die gleichen Proben wurde bestätigt, dass C/EBP α selbst, wie bereits in der Literatur beschrieben, an das Oligonukleotid aus seinem eigenen Promotor bindet. In diesem Fall lässt sich, im Vergleich zum C/EBP α enthaltenden nukleären Extrakt, eine verstärkte Präzipitation von C/EBP α bei Koexpression von RGS2 und C/EBP α erkennen.

Um auszuschließen, dass EGFP alleine an das Oligo aus dem C/EBP α -Promotor bindet, wurde der Blot außerdem mit einem anti-GFP- Antikörper angefärbt. Hier zeigten sich deutliche Banden in der Ladekontrolle für die GFP-getaggten Proteine. Der Oligo-Pulldown zeigt, dass EGFP alleine nicht an das Oligo aus dem C/EBP α -Promotor bindet. Die Negativkontrolle, in der keine DNA sondern nur die Beads eingesetzt wurden, zeigt weder eine Präzipitation von RGS2 noch von C/EBP α . Mit Hilfe dieses Versuches konnte die Spezifität der Bindung von RGS2 und C/EBP α an den C/EBP α -Promotor bestätigt werden.

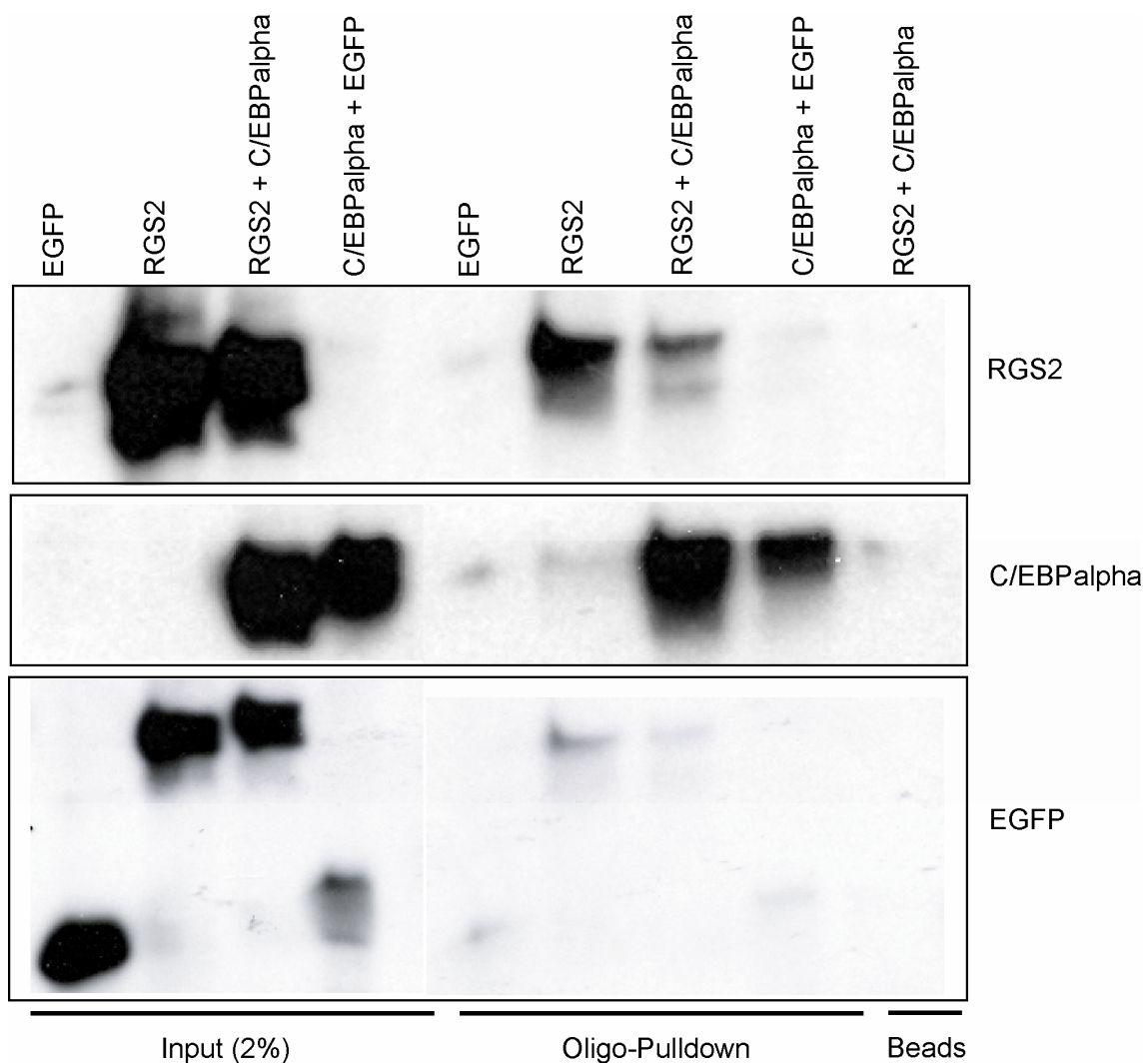


Abbildung 5.10: RGS2 bindet an ein E-Box Motiv im C/EBP α -Promotor.

ABCD-Assay mit nukleären Extrakten von 293T Zellen mit Überexpression von EGFP, EGFP-RGS2, C/EBP α oder EGFP-RGS2 und C/EBP α . Zur Detektion wurde ein anti-RGS2, ein anti-C/EBP α sowie ein anti-GFP Antikörper verwendet.

Wie oben gezeigt, ist RGS2 in der Lage, an eine regulatorisch wichtige E-Box Sequenz im C/EBP α - Promotor zu binden. Um zu überprüfen, ob RGS2 die genomische DNA im

Bereich dieser E-Box-Sequenz bindet, wurde eine Chromatin-IP von RGS2 für diesen DNA Bereich durchgeführt. Für diesen Versuch wurden 32D Zellen, die stabil mit einem FLAG-RGS2-Konstrukt bzw. einem Konstrukt nur mit dem FLAG-Tag transfiziert wurden, eingesetzt. Die IP erfolgte mit einem Antikörper gegen FLAG bzw. der entsprechenden Isotypenkontrolle als Negativkontrolle. Anschließend wurde eine PCR mit Primern, die das E-Box Motiv an Position -275 auf dem C/EBP α -Promotor einschließen, durchgeführt. Es zeigte sich eine eindeutige Bindung von RGS2 an die untersuchte Promotorregion von C/EBP α (Abbildung 5.11 a).

Somit konnte eine Bindung von FLAG-RGS2 an die untersuchte Promotorsequenz gezeigt werden.

Neben dem schon beschriebenen, für die transkriptionelle Regulation wichtigen E-Box-Motiv an Position -275, finden sich noch weitere E-Box-Motive in der 5'upstream-Region von C/EBP α . Zur Identifikation weiterer potentieller Zielsequenzen von RGS2 innerhalb des C/EBP α -Promotors wurden wiederum Chromatin-IPs in 32D FLAG-RGS2-Zellen durchgeführt. Die ChIP erfolgte wie zuvor mit dem FLAG-Antikörper bzw. der entsprechenden Isotypenkontrolle. Für die PCR wurden 10 verschiedene Primer-Paare benutzt, die von -3948 bis -144 auf dem C/EBP α -Promotor verteilt sind. Die Angaben beziehen sich auf die Entfernung von der Transkriptions-Start-Stelle (0). Die Auswertung erfolgte mittels Real-Time PCR. In Abbildung 5.11 b sind die Ergebnisse in Form eines Diagramms dargestellt. Auf der X-Achse ist die Lage der einzelnen für die PCR eingesetzten Primer, ausgehend von der Transkriptions-Start-Stelle, angegeben. Die ct -Werte jeder einzelnen PCR wurden zunächst auf die jeweiligen Input-Kontrollen normalisiert, um Unterschiede in der Effizienz der einzelnen PCR-Reaktionen zu berücksichtigen. Anschließend wurden die Werte für die Bindung von RGS2 an den einzelnen Positionen auf dem Promotor auf den Mittelwert aller Positionen bezogen. Diese Daten sind auf der Y-Achse angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die rote Kurve zeigt die Bindungs-Effektivität von FLAG-RGS2 an die verschiedenen Stellen auf dem Promotor, die schwarze Kurve zeigt die entsprechenden Werte für die Isotypenkontrolle.

Während die Kurve für die Isotypenkontrollen erwartungsgemäß nur geringe Schwankungen zeigt, liegen die Werte für die Chromatin-IP von RGS2 in allen Fällen deutlich darüber.

Erkennbar ist, dass die Bindung von RGS2 an den C/EBP α -Promotor an drei unterschiedlichen Positionen deutlich erhöht ist. Es handelt sich dabei um die Regionen -3508, -1666 und -698. In den Regionen um -3508 sowie -1666 befinden sich in der

Promotorsequenz jeweils E-Box -Motive. In der Region um -698 befindet sich kein E-Box-Motiv, d.h. die Bindung von RGS2 in diesem Bereich muss an eine andere Zielsequenz erfolgen.

Um die funktionelle Relevanz der gefundenen Bindung von RGS2 an den C/EBP α -Promotor zu untersuchen, wurde ein Luziferase-Assay mit einem 2120bp langen Fragment des C/EBP α -Promotors durchgeführt. Dafür wurden HEK 293T Zellen mit einem EGFP-RGS2 Fusionskonstrukt bzw. einem EGFP-Leervektor und dem C/EBP α -Promotorkonstrukt sowie einem Renilla-Konstrukt zur Normalisierung transfiziert. Abbildung 5.11 c zeigt, dass die Expression von RGS2 im Vergleich zum Leervektor zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität des C/EBP α -Promotors führt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RGS2 an mehreren Stellen an den C/EBP α -Promotor bindet und die Induktion der C/EBP α -Expression durch eine transkriptionelle Aktivierung des Promotors reguliert.

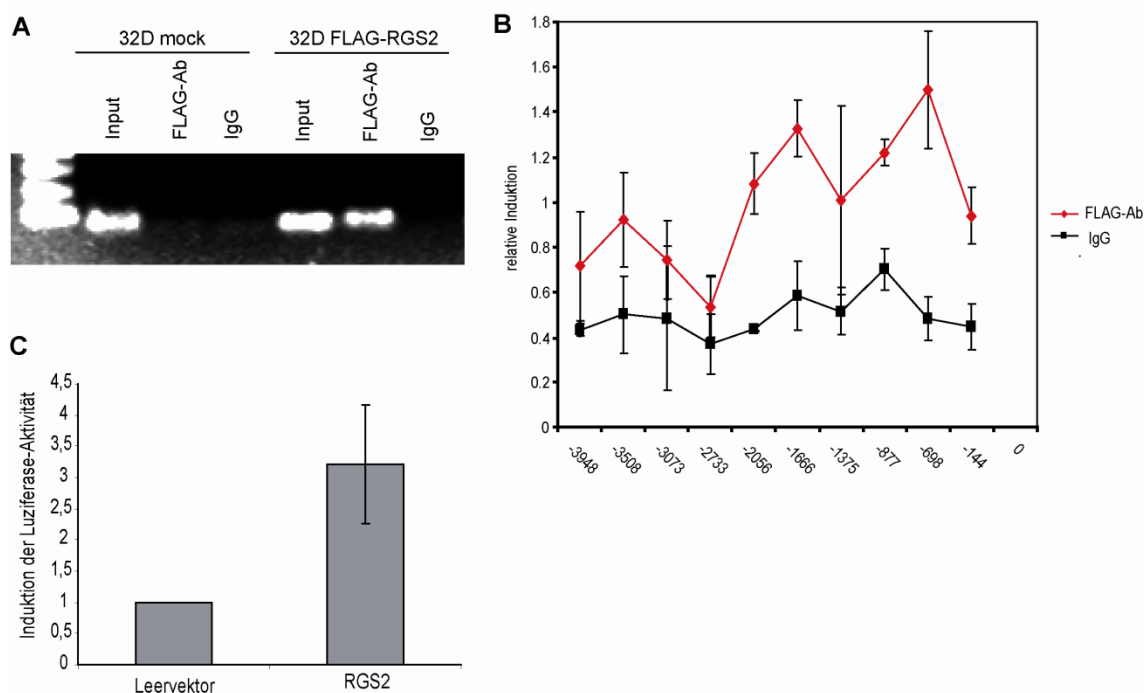


Abbildung 5.11: RGS2 bindet und aktiviert den C/EBP α -Promotor

A: Chromatin-IP mit nukleären Extrakten von 32D Zellen mit Überexpression von FLAG oder FLAG-RGS2. Die IP erfolgte mit einem Anti-FLAG-Antikörper bzw. der entsprechenden IgG Kontrolle. Für die PCR wurden spezifische Primer für den Bereich einer E-Box-Sequenz -275bp upstream im C/EBP α Promotor verwendet. B: Chromatin-IP mit nukleären Extrakten aus mit FLAG-RGS2 transfizierten 32D Zellen. Die IP erfolgte mit einem FLAG-Antikörper bzw. der entsprechenden IgG Kontrolle. Für die Real-Time PCR wurden Primer von 0 bis -3948bp auf der 5' upstream Sequenz von C/EBP α verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. C: Luziferase-Assay mit einem 2120bp Fragment des C/EBP α Promotors in 293T Zellen mit und ohne RGS2 Überexpression

5.5 Interaktion von RGS2 und C/EBP α

Die oben gezeigten Experimente zeigen, dass RGS2 die Expression von C/EBP α transkriptionell durch Bindung und Aktivierung von dessen Promotor induziert. Außerdem zeigen die Gel-Shift-Experimente und die ABCD-Assays, bei Koexpression von RGS2 und C/EBP α , Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung beider Proteine bei der Bindung an den C/EBP-alpha-Promotor.

Im Folgenden sollte deshalb überprüft werden, ob RGS2 und C/EBP α unmittelbar miteinander interagieren.

Zunächst wurde die Interaktion in GST-Pulldown-Experimenten untersucht. Aufgereinigtes rekombinantes GST-RGS2 sowie GST als Negativkontrolle wurden mit einem Lysat aus C/EBP α -transfizierten HEK 293T Zellen inkubiert und nach mehrmaligem Waschen im Westernblot für C/EBP α analysiert. In Abbildung 5.12 a ist das repräsentative Ergebnis eines GST-Pulldowns gezeigt. Die Ladekontrolle lässt die Expression der beiden C/EBP α -Isoformen p42 sowie p30 erkennen. Die größere Isoform C/EBP α p42 kann, im Gegensatz zur kleineren Isoform p30, mittels GST-RGS2 präzipitiert werden. Die Negativkontrolle mit GST zeigt keine Bindung von C/EBP α , was auf eine spezifische Interaktion zwischen RGS2 und C/EBP α schließen lässt.

Um diese Interaktion zu bestätigen, wurden Ko-immunpräzipitationen von RGS2 und C/EBP α aus Lysaten von HEK 293T durchgeführt, in denen beide Proteine koexprimiert wurden (Abbildung 5.12 b). Die IP erfolgte mit einem Antikörper gegen RGS2 bzw. mit der entsprechenden Isotypenkontrolle. Zur Detektion des Westernblots wurde ein C/EBP α -Antikörper sowie ein RGS2-Antikörper zur Kontrolle der Immunpräzipitation eingesetzt.

Die Inputkontrolle dient zur Überprüfung der Expression. Mit dem Antikörper gegen RGS2 zeigt sich, im Gegensatz zur Isootypenkontrolle, eine Ko-Immunpräzipitation von C/EBP α . Die Detektion desselben Blots mit RGS2-Antikörper zeigt, dass die Immunpräzipitation mit dem RGS2-Antikörper funktioniert.

Aus diesen Versuchen lässt sich schließen, dass RGS2 und C/EBP α direkt miteinander interagieren.

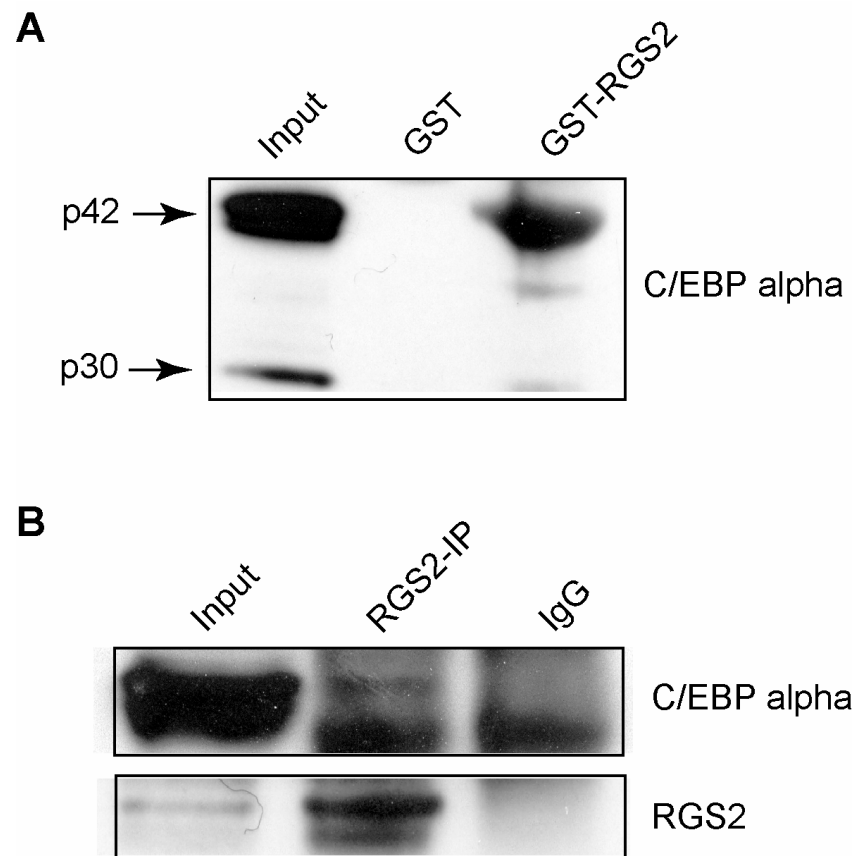


Abbildung 5.12: RGS2 interagiert mit C/EBP α

A: GST-Pulldown-Experiment mit aufgereinigtem GST bzw. GST-RGS2 und Zellysat aus C/EBP α exprimierenden HEK 293T Zellen. Westernblot mit C/EBP α Antikörper. B: Ko-Immunpräzipitation von RGS2 und C/EBP α in mit RGS2 und C/EBP α transfizierten HEK 293T Zellen. Für die IP wurde ein RGS2-Antikörper eingesetzt, der Westernblot wurde mit einem C/EBP α - bzw. RGS2-Antikörper als Kontrolle detektiert.

5.6 Funktionelle Charakterisierung einzelner Regionen von RGS2

RGS2 ist ein relativ kleines RGS-Protein, das fast ausschließlich aus der RGS-Domäne besteht. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, gibt es einige Studien, in denen bestimmten Regionen von RGS2 spezifische Funktionen zugeordnet werden konnten. Jedoch lassen die bislang vorliegenden Daten keine Rückschlüsse darauf zu, welche Region von RGS2 für dessen nukleäre Lokalisation und Interaktion mit DNA verantwortlich ist. Zur Klärung dieser Frage wurden die in Abbildung 5.13 gezeigten trunkierten RGS2-Konstrukte hergestellt.

Die Mutation RGS2 del N79 wurde konstruiert, da bereits durch andere Gruppen gezeigt wurde, dass der N-Terminus von RGS2 von Bedeutung für die Lokalisation des Proteins ist (Heximer et al. 2003), jedoch die GTPase-aktivierende Funktion nicht beeinflusst (Bernstein et al. 2004). Infolge der Deletion der N-terminalen 78 Aminosäuren des

Proteins kommt es zu Veränderungen in der zellulären Lokalisation: das trunkierte Protein ist zu geringeren Anteilen im Zellkern zu finden, außerdem erfolgt, im Gegensatz zum Wildtyp-RGS2, nach $G\alpha_q$ -Aktivierung keine Translokation an die Membran. Bei der Mutation RGS2 del C199 fehlt lediglich der aus 12 Aminosäuren bestehende C-terminale Teil, welcher sich hinter der RGS-Domäne befindet. Diese Mutation wurde von anderen Gruppen als essentiell für die Interaktion von RGS2 mit der Typ V Adenylylzyklase beschrieben (Salim et al. 2003).

Die Deletionsmutante RGS2 del C116 wurde ebenfalls bereits zuvor charakterisiert (Nguyen et al. 2009). Bei dieser Mutation fehlt ein essentieller Teil der RGS-Domäne am C-Terminus. Dadurch wird die GTPase-aktivierende Funktion von RGS2 signifikant verringert.

Die Mutation RGS2 del C83 besteht nur aus dem N-terminalen Teil des Proteins, der vor der RGS-Domäne liegt, während die Mutation RGS2 83-199 ausschließlich die RGS-Domäne umfasst.

Mit Hilfe dieser verschiedenen RGS2-Deletionsmutanten können sowohl der Einfluss des N- bzw. des C-Terminus als auch die Bedeutung der RGS-Domäne für die Lokalisation und DNA-bindende Funktion von RGS2 untersucht werden.

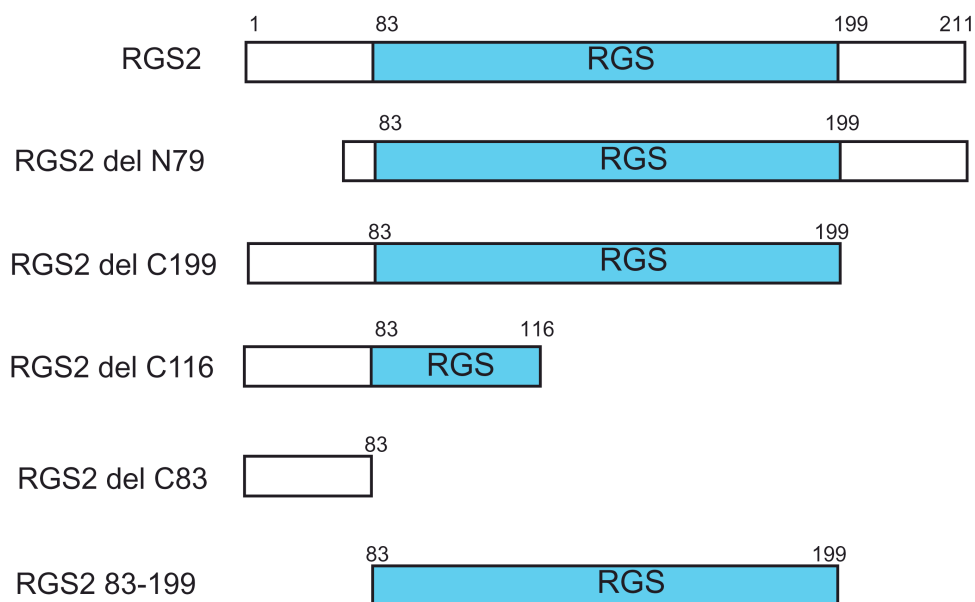


Abbildung 5.13: Schematische Übersicht der trunkierten RGS2 Mutanten

5.6.1 Subzelluläre Lokalisation trunkierter RGS2 Mutanten

Um zu untersuchen, welcher Teil von RGS2 wichtig für die subzelluläre Lokalisation ist, wurden HEK 293T Zellen mit den verschiedenen RGS2-Deletions-Konstrukten transfiziert und deren Lokalisation im konfokalen Mikroskop analysiert. Alle Konstrukte tragen ein EGFP-Tag am N-Terminus (grün), die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Abbildung 5.14 zeigt die konfokalen Aufnahmen der verschiedenen trunkierten RGS2-Konstrukte.

Wie bereits zuvor gezeigt, ist EGFP-RGS2 vornehmlich im Nukleus der Zellen lokalisiert, während EGFP eine gleichmäßige Färbung der gesamten Zelle zeigt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Verlust der N-terminalen Region von RGS2 (im Konstrukt RGS2 del N79) zu einer Umverteilung von RGS2 vom Zellkern in das Zytoplasma führt.

Gleiches gilt auch für die Deletion des C-Terminus in den Konstrukten RGS2 del C116 sowie RGS2 del C83. Das Konstrukt RGS2 83-199, das ausschließlich aus der konservierten RGS-Domäne besteht, zeigt ebenfalls keine exklusive nukleäre Lokalisation mehr, sondern eine gleichmäßige Verteilung über die gesamte Zelle.

Ist jedoch nur ein kleiner Teil des C-Terminus deletiert, wie im Konstrukt RGS2 del C199, so wird die vorwiegend nukleäre Lokalisation von RGS2 beibehalten. Interessanterweise reicht die N-terminale Aminosäuresequenz von RGS2 alleine aber auch nicht aus, die nukleäre Lokalisation zu vermitteln.

Aus diesen Analysen lässt sich schließen, dass der N-Terminus von RGS2 in Kombination mit dem C-terminalen Teil der RGS Domäne eine wichtige Funktion für die vorwiegend nukleäre Lokalisation des Proteins hat.

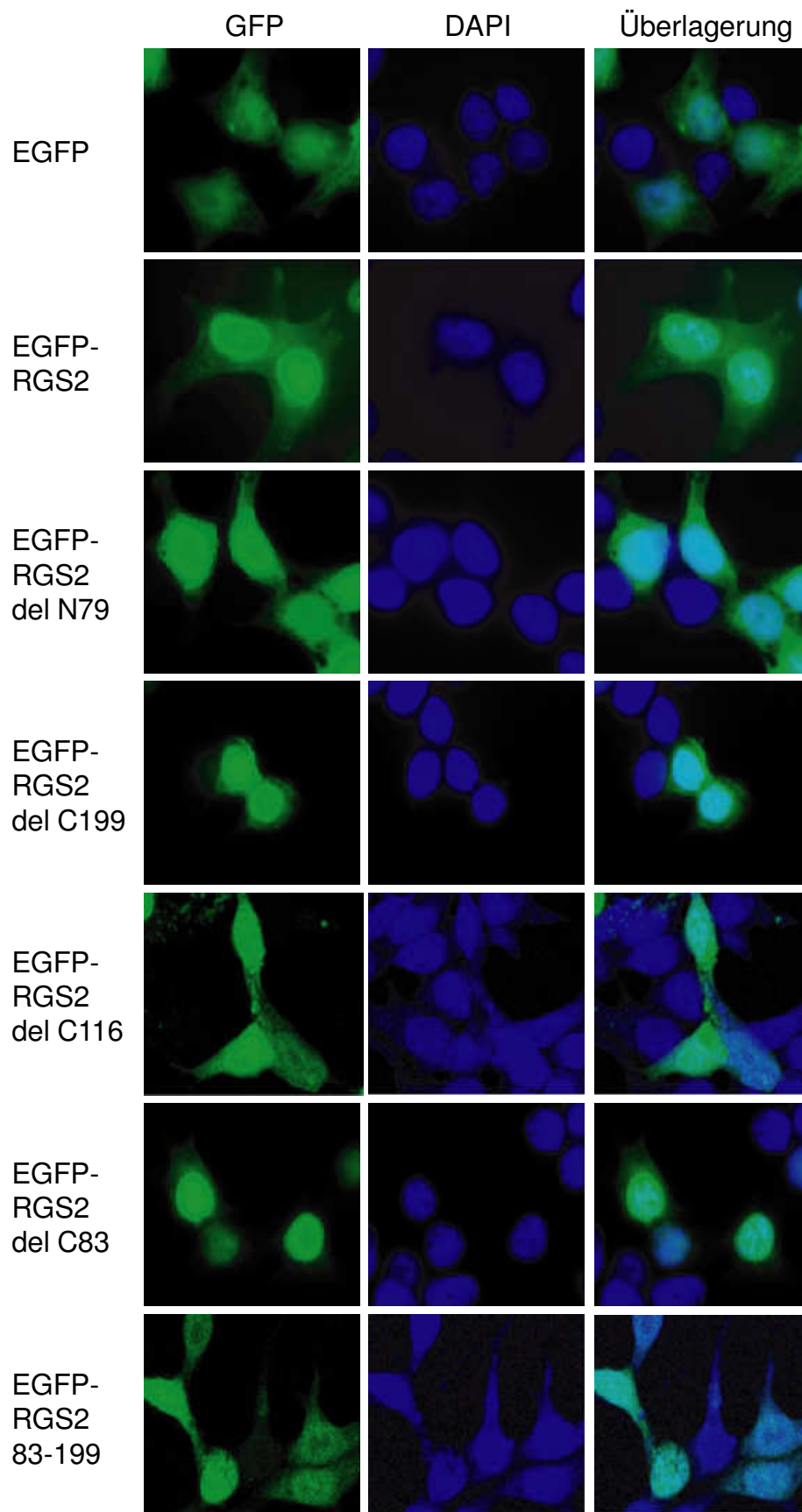


Abbildung 5.14: Subzelluläre Lokalisation der RGS2-Deletionsmutanten

Konfokale Aufnahmen transient transfizierter 293T Zellen: EGFP bzw. EGFP-RGS2 und verschiedene EGFP-RGS2-Deletionsmutanten (grün), DAPI (blau) zur Gegenfärbung der Zellkerne sowie Überlagerung beider Bilder.

5.6.2 DNA Bindungsfähigkeit trunkierter RGS2 Mutanten

Nach Eingrenzung der Anteile der RGS2-Proteinsequenz, die für die nukleäre Lokalisation verantwortlich sind, wurde anhand derselben Deletionsmutanten untersucht, welcher Bereich von RGS2 für die Interaktion mit DNA verantwortlich ist.

Zu diesem Zweck wurden GST-Fusionsproteine der einzelnen Mutationen in BL21 Bakterien exprimiert und aus diesen aufgereinigt. Abbildung 5.15 zeigt die Aufreinigung der Deletionsmutationen. Im oberen Teil der Abbildung ist ein Coomassie-Blau gefärbtes Gel der aufgereinigten Proteine dargestellt, der untere Teil der Abbildung zeigt den entsprechenden Westernblot für RGS2. Der RGS2-Antikörper kann die Konstrukte RGS2 del C116 sowie RGS2 del C83 nicht nachweisen, da das für die Bindung erforderlich Epitop in diesen Deletionsmutanten entfernt wurde.

Anhand des Coomassie gefärbten Gels lässt sich jedoch erkennen, dass alle Konstrukte in ausreichenden Konzentrationen aufgereinigt werden konnten.

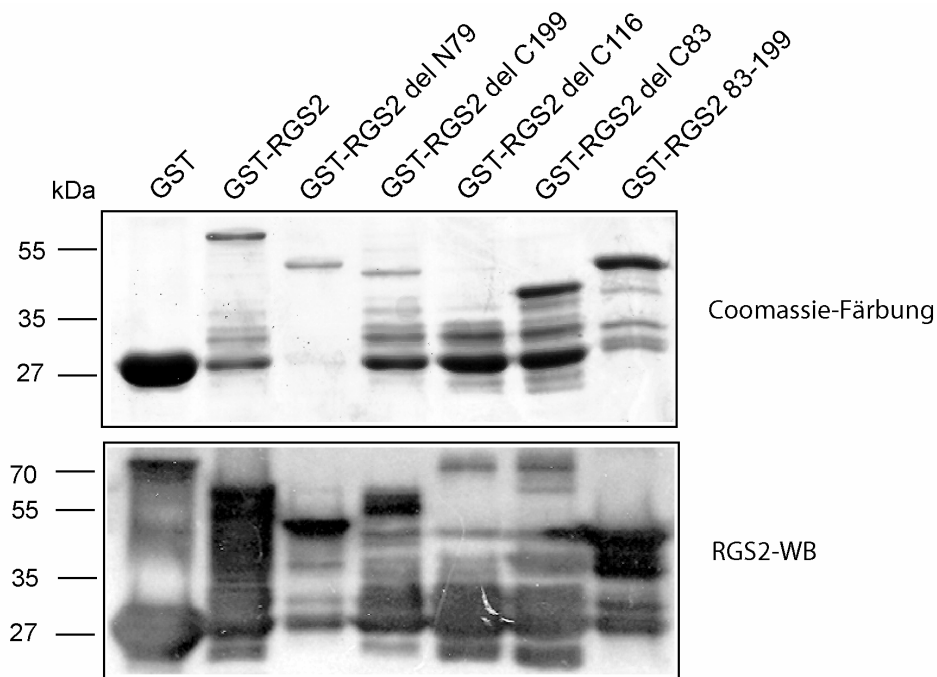


Abbildung 5.15: GST-Präparation der RGS2 Deletionsmutanten

Dargestellt sind ein Coomassie-blau gefärbtes Gel, sowie ein Westernblot gegen RGS2 der aus BL21 aufgereinigten RGS2-Deletionsmutanten.

Die Bindung der verschiedenen RGS2-Mutanten an genomische DNA wurde mittels Dot-Blots analysiert. Dafür wurden Digoxigenin-markierte Fragmente genomischer DNA mit GST-RGS2 sowie den verschiedenen Deletionsmutationen und GST als Negativkontrolle inkubiert und die Versuchsansätze im Sinne eines GST-Pulldown-Experiments gewaschen. Die gebundene DNA wurde mittels Dot-Blot quantifiziert (Abbildung 5.16).

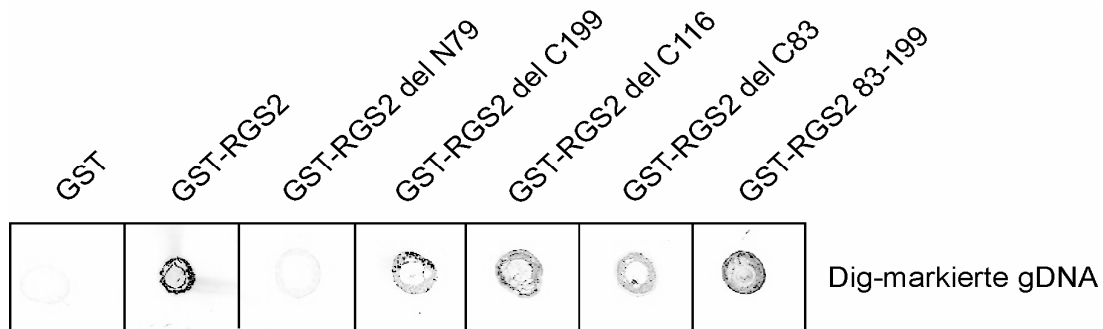


Abbildung 5.16: Dot Blot Assay mit RGS2-Deletionsmutationen

Dot-Blot Analyse zur Untersuchung der DNA-Bindungsfähigkeit von RGS2 Deletionsmutationen. GST dient als Negativkontrolle.

Wie bereits in vorherigen Experimenten zeigte sich hier die DNA-Bindung von RGS2. Ferner sind bei allen Deletionen des C-Terminus (del C199, del C116, del C83) deutliche Signale im Dot-Blot zu sehen. Fehlen jedoch die ersten 79 Aminosäuren des N-Terminus von RGS2 (del N79), so verliert das Protein seine DNA-Bindungsfähigkeit. Daraus lässt sich schließen, dass insbesondere die ersten 80 Aminosäuren von RGS2 essentiell für die DNA-Bindung sind. Das Konstrukt RGS2 83-199 zeigt eine DNA Bindung, obwohl C- und N-Terminus des Proteins fehlen. Dies ist in der Zusammenschau mit dem DNA-Bindungsverhalten der anderen RGS2 Deletionsmutanten nur schwer erklärbar und vermutlich auf eine Änderung der Tertiärstruktur des trunkierten Proteins zurückzuführen. Im Coomassie-Gel lässt sich bei allen Konstrukten, außer bei der Mutation RGS2-del N79, unterhalb der Banden mit den verschiedenen GST-RGS2 Fusionsproteinen eine weitere kleinere Bande bei etwa 27 kDalton erkennen. Bei dieser Bande handelt es sich vermutlich um GST, das bei der Aufreinigung der Proteine zu einem gewissen Anteil abgespalten wurde. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass das Signal in den Dot-Blots von diesem Protein erzeugt wird, da GST auch als Negativ-Kontrolle verwendet wurde und sich hier keine DNA-Bindung zeigt.

5.6.3 Bindung und Aktivierung des C/EBP α -Promotors durch trunkierte RGS2 Mutanten

Um die DNA-Bindung der einzelnen RGS2-Deletionsmutanten genauer zu charakterisieren, wurde im Folgenden mittels ABCD-Assay die Bindung an das oben beschriebene E-Box Motiv im C/EBP α -Promotor untersucht.

Die Durchführung des ABCD-Assays erfolgte wie bereits zuvor geschildert, und die Ergebnisse sind in Abbildung 5.17 dargestellt. Für diesen Versuch wurden nukleäre Extrakte aus transient transfizierten 293T Zellen verwendet. Die Zellen exprimierten

RGS2 sowie die Deletionsmutationen RGS2 del N79, RGS2 del C199 und RGS2 83-199. Als Kontrolle wurden mit dem pCDNA3-Leervektor transfizierte Zellen verwendet. Ein Einsatz der Deletionsmutationen RGS2 del C116 und RGS2 del C83 ist in diesem Versuch nicht möglich, da der zur Detektion verwendete RGS2- Antikörper an ein Epitop im C-Terminus des Proteins bindet, das bei diesen Mutationen deletiert ist.

Als Ladekontrolle wurden jeweils 2% des für den Oligo-Pulldown eingesetzten Extraktes aufgetragen. Für den Oligo-Pulldown selbst wurden 200µg Zelllysate eingesetzt. Das doppelsträngige DNA-Oligonukleotid, das für den Pulldown eingesetzt wird, enthält das bereits beschriebene E-Box Motiv aus dem C/EBP α - Promotor an Position -275 (Timchenko et al. 1995). Die Detektion des Westernblots erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen RGS2.

Anhand der Ladekontrolle lässt sich erkennen, dass sowohl Wildtyp-RGS2 als auch alle RGS2-Mutationen exprimiert werden, jedoch die Mutationen del N79 und 83-199 in deutlich geringerem Ausmaß als die anderen Deletionsmutanten.

Wie erwartet, lässt sich Wildtyp-RGS2 mit dem das E-Box Motiv enthaltenden Oligo aus dem C/EBP α -Promotor präzipitieren. Die Probe, die den Leervektor enthält, zeigt erwartungsgemäß keine Bande für RGS2.

Des Weiteren ist ebenfalls eine Präzipitation von RGS2 del C199 mit dem verwendeten Oligo möglich. Demzufolge ist der C-terminale Teil von RGS2, der hier deletiert wurde, für die Bindung an den C/EBP α -Promotor nicht bedeutsam. Die beiden weiteren hier verwendeten Deletionsmutation RGS2 del N79 (Deletion des N-Terminus) sowie RGS2 83-199 (nur RGS-Domäne), zeigen keine Bindung an das für den ABCD-Assay verwendete Oligo aus dem C/EBP α -Promotor. Da diese beiden Deletionsmutanten deutlich schwächer exprimiert wurden, erfolgte eine Belichtung des Blots von bis zu 60 Minuten. Auch bei dieser sehr langen Exposition zeigen sich keine Signale, was darauf hindeutet, dass diese Mutanten tatsächlich nicht an diesen Bereich des C/EBP α -Promotors binden. Beiden Deletionsmutanten fehlt der N-terminale Anteil von RGS2, woraus sich schließen lässt, dass dieser Bereich des Proteins für die Bindung an den C/EBP α -Promotor verantwortlich ist.

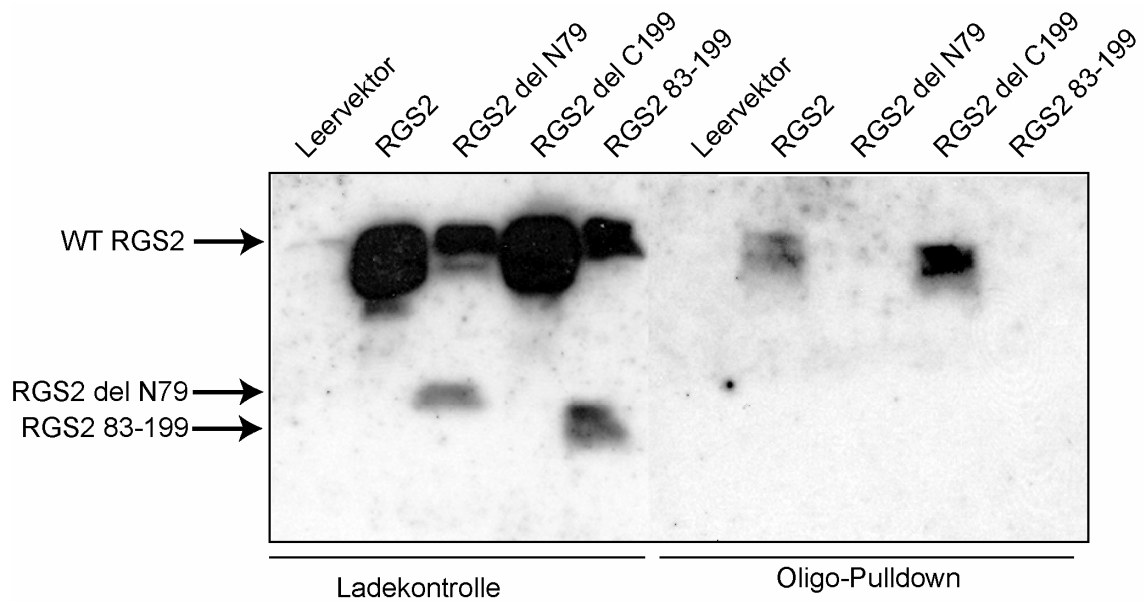


Abbildung 5.17 Bindung von RGS2-Deletionsmutanten an das E-Box Motiv im C/EBP α - Promotor

ABCD-Assay mit nukleären Extrakten von 293T Zellen mit Überexpression der angegebenen Konstrukte. Zur Detektion wurde ein anti-RGS2 Antikörper verwendet. Der linke Teil der Abbildung zeigt die Ladekontrolle, während der Pulldown auf der rechten Seite zu sehen ist.

Zuvor konnte mit Hilfe von Deletionsmutationen der N-terminale Bereich als ein für die Bindung an den C/EBP α -Promotor wichtiges Motiv von RGS2 eingegrenzt werden.

Um weitergehend zu untersuchen, ob dieser Bereich von RGS2 auch funktionell für die Aktivierung des C/EBP α -Promotors verantwortlich ist, wurde diese in Luciferase-Assays nach Koexpression der oben angegebenen trunkierten RGS2-Konstrukten untersucht (Abbildung 5.18). Alle Konstrukte besitzen ein N-terminales EGFP-Tag und wurden zusammen mit einem Luciferase-Konstrukt, das 2120bp des C/EBP α - Promotors enthält, sowie dem Renilla-Konstrukt zur Normalisierung, in Hek 293T Zellen transfiziert. Als Kontrolle für die RGS2-Expressionskonstrukte dient ein EGFP exprimierender Leervektor (pcDNA3.1-EGFP). Die RGS2-Deletionskonstrukte wurden als EGFP-Fusionsproteine in diesen Vektor kloniert und für den Luziferase-Assay eingesetzt. Wie erwartet, führt die Expression von RGS2 zu einem signifikanten Anstieg der C/EBP α -Promotoraktivität. Fehlen die ersten 79 Aminosäuren von RGS2, so geht die Fähigkeit, den C/EBP α -Promotor zu aktivieren, verloren. Auch die N-terminale Region von RGS2 ist alleine nicht in der Lage, den C/EBP α -Promotor zu aktivieren (RGS2 del C83). Bei diesem Konstrukt fehlt die komplette RGS-Domäne.

Fehlt jedoch nur der C-terminale Teil von RGS2 (RGS2 del C199) bzw. der C-terminale Teil sowie die Hälfte der RGS-Domäne (RGS2 del C116), so hat dies keinen Einfluss auf die Aktivierung des C/EBP α -Promotors. Ebenso ist die konservierte RGS-Domäne von RGS2 alleine (RGS2 83-199) in der Lage, den C/EBP α -Promotor zu aktivieren.

Diese Ergebnisse bestätigen die Relevanz des N-terminalen Bereichs von RGS2, zusammen mit anderen Anteilen des Proteins, für die funktionelle Interaktion mit DNA.

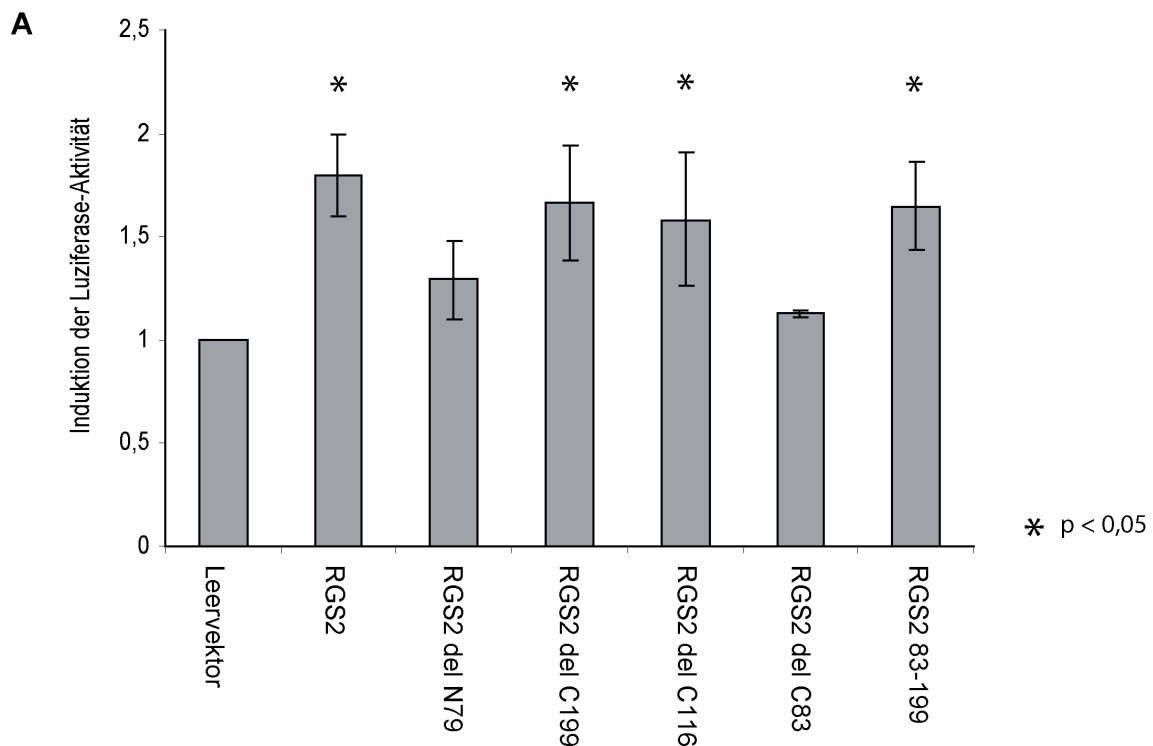


Abbildung 5.18: Bindung und Aktivierung des C/EBP α -Promotors durch RGS2-Deletionsmutanten

Luziferase-Assay mit einem 2120bp Fragment des C/EBP α - Promotors in 293T Zellen mit Überexpression der angegebenen RGS2- Deletionsmutanten.

5.6.4 Interaktion der trunkierten RGS2 Mutanten mit C/EBP α

Um den Bereich von RGS2, der für die Interaktion mit C/EBP α verantwortlich ist, zu ermitteln, wurden im Folgenden GST-Pulldown-Experimente mit den bereits oben beschriebenen RGS2 - Deletionsmutanten durchgeführt.

Alle hier eingesetzten RGS2 - Deletionsmutanten besitzen ein GST-Tag. Die Expression der Proteine erfolgte in BL21 Bakterien, hier wurden die gleichen Fusionsproteine verwendet, wie bereits zuvor für die Dot Blot Versuche. Ein Coomassie-blau gefärbtes Gel der aufgereinigten Proteine ist in Abbildung 5.15 dargestellt. Die Konzentrationen der einzelnen GST-Fusionsproteine wurden mit Hilfe einer BSA-Verdünnungsreihe abgeschätzt und für den Pulldown-Assay angeglichen.

In den GST-Pulldown Experimenten wurde GST als Negativkontrolle, GST-RGS2 sowie die jeweiligen RGS2-Deletionsmutationen mit Proteinlysate aus C/EBP α -transfizierten

293T Zellen inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und ein Westernblot für C/EBP α durchgeführt.

In Abbildung 5.19 ist ein repräsentatives Ergebnis des GST-Pulldowns mit den RGS2-Deletionsmutanten gezeigt. In der Input-Kontrolle lässt sich die Expression von C/EBP α erkennen. Zur Kontrolle der Expression der RGS2-Deletionsmutanten wurde der Blot zusätzlich mit einem GST-Antikörper gefärbt (Abbildung 5.19 b). Der verwendete GST-Antikörper zeigt viele unspezifische Banden, deshalb wurden die Banden in der jeweilig zu erwartenden Größe rot markiert. Alle Deletionsmutanten können nachgewiesen werden, jedoch ist die Expression der Mutationen del C116 und del C83 nur relativ gering. Wie bereits in vorangegangenen Experimenten gezeigt, kann auch hier die Interaktion von Wildtyp-RGS2 und C/EBP α bestätigt werden. Die Negativkontrolle GST zeigt erwartungsgemäß keine Bindung von C/EBP α .

Außerdem zeigen sich Interaktionen von C/EBP α mit den drei RGS2-Deletionsmutationen del N79, del C199 sowie 83-199, diese sind jedoch deutlich schwächer als die Interaktion mit dem Wildtyp-Protein. Die Mutationen del C116 und del C83 zeigen keine Interaktion mit C/EBP α , was jedoch, zumindest im Fall von del C116, auch auf die Expressionsstärke des eingesetzten GST-Fusionsproteins zurückzuführen sein kann.

Die Banden, die im Pulldown mit den RGS2-Mutationen del N79 sowie 83-199 detektierbar sind, laufen erkennbar niedriger als die C/EBP α -Banden in den anderen Proben. Dies ist durch die Größe der entsprechenden GST-Fusionsproteine bedingt. Beide Konstrukte haben eine Größe von etwa 40 kd. Die größere Bande für C/EBP α läuft normalerweise im Westernblot bei 42 kd. Da die GST-Fusionsproteine in den Versuchsansätzen in hoher Konzentration vorliegen, wird die Bande für C/EBP α im Gel durch das GST-Protein verdrängt und läuft etwas niedriger als erwartet. Dies gilt nicht für die Mutation RGS2 del C199. Diese hat wie Wildtyp-RGS2 eine Größe von etwa 50 kd, was deutlich größer als C/EBP α ist und die entsprechende Bande im Gel deswegen nicht beeinflusst.

Aus diesem Experiment lässt sich schließen, dass sich ein für die Interaktion mit C/EBP α essentieller Bereich von RGS2 innerhalb der RGS Domäne befindet. Die beiden RGS2-Konstrukte, denen der C-terminale Anteil der RGS-Domäne oder die ganzen RGS-Domäne fehlt, zeigen keine Bindung von C/EBP α , während die Deletionsmutante 83-199, die im Wesentlichen aus der RGS-Domäne besteht, eine Interaktion mit C/EBP α zeigt. Jedoch ist für das volle Ausmaß der Interaktion mit C/EBP α das komplette RGS2-Protein notwendig, denn auch die anderen Deletionsmutationen (del N79, del C199, 83-199),

denen nur kurze Anteile am N- oder C-Terminus fehlen, zeigen eine verminderte Affinität zu C/EBP α . Möglicherweise ist die Tertiärstruktur von RGS2 durch die Deletion dieser Proteinsequenzen in einem Maße verändert, dass es zwar noch zu einer Bindung von C/EBP α kommen kann, diese aber deutlich schwächer ist als an Wildtyp RGS2.

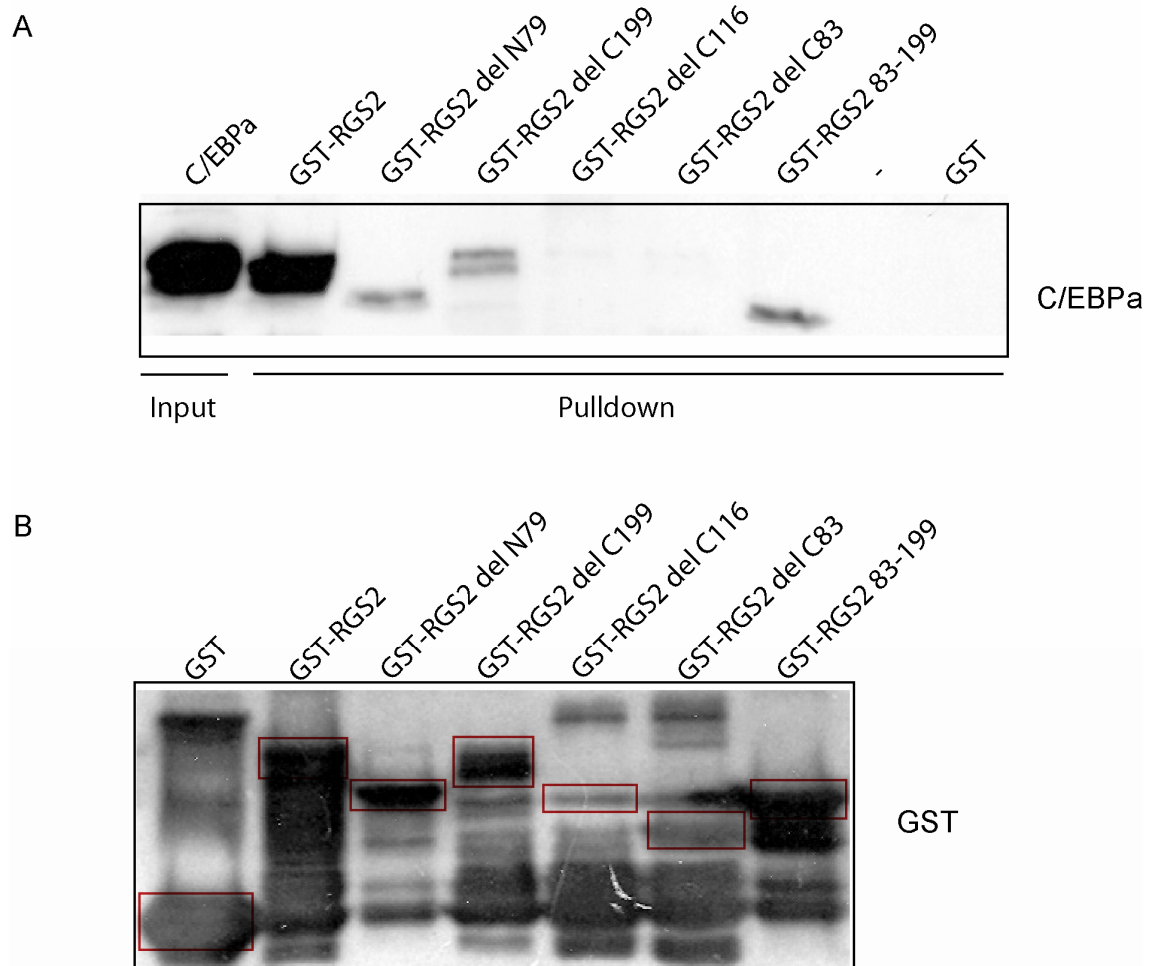


Abbildung 5.19: GST-Pulldown mit RGS2-Deletionsmutanten

A: Für den Pulldown wurden rekombinant exprimierte und aufgereinigte GST-Fusionsproteine der RGS2-Deletionsmutanten eingesetzt. Die Proteine wurden mit Lysat aus C/EBP α überexprimierenden 293T Zellen inkubiert, gewaschen und es erfolgte ein Westernblot für C/EBP α . B: Aufreinigung der verschiedenen GST-RGS2 Fusionsproteine. Dargestellt ist ein Westernblot mit anti-GST Antikörper zur Überprüfung der Expression der einzelnen Konstrukte. Zur Verdeutlichung wurden die Banden in der erwarteten Größe für die einzelnen Konstrukte rot markiert.

5.6.5 Einfluss der verschiedenen RGS2-Deletionsmutanten auf das Flt3-ITD vermittelte klonale Wachstum in Methylzellulose

In früheren Studien unserer Gruppe konnte ein hemmender Effekt von RGS2 auf die FLT3-ITD vermittelte Transformation gezeigt werden (Schwable et al. 2005). Wird RGS2 in FLT3-ITD transfizierten 32D Zellen überexprimiert, so führt dies zu einer Verminderung des klonalen Wachstums in Methylzellulose. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, welcher Teil von RGS2 bedeutend für die Hemmung der Flt3-ITD vermittelten Transformation ist. Dafür wurden 32D Zellen transient mit Flt3-ITD und den bereits zuvor beschriebenen RGS2-Deletionsmutanten transfiziert. Für diesen Versuch wurden die verschiedenen Deletionsmutanten im pcDNA3.1-Vektor ohne Tag exprimiert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen in Methylzellulose ausplattiert und die Kolonien wurden nach 10 Tagen gezählt (Abbildung 5.20).

Es zeigte sich, wie erwartet, eine deutliche Reduktion des Kolonienwachstums infolge der Koexpression von RGS2. Zellen, die nur mit Flt3-ITD und einem Leervektor transfiziert wurden, bilden bis zu 3000 Kolonien, wird Wildtyp-RGS2 koexprimiert, reduziert sich das Kolonienwachstum um etwa 80%.

Die Koexpression der einzelnen RGS2-Deletionsmutanten hatte hingegen nur eine Reduktion der Kolonienzahl von maximal 20-30% zur Folge, unabhängig vom Ort der Deletion. Die Mutante del C83, die nur den N-terminalen Anteil von RGS2 enthält, zeigte so gut wie keinen hemmenden Einfluss auf die Flt3-ITD induzierte Kolonienbildung.

Daraus lässt sich schließen, dass für die transformationshemmende Wirkung von RGS2 mehrere biologische Funktionen verantwortlich sind, die von verschiedenen Anteilen des Proteins vermittelt werden. Somit ist für den maximalen transformationshemmenden Effekt das komplette RGS2-Protein ohne Deletionen erforderlich. Dasselbe gilt für die direkte Interaktion mit C/EBP α .

Die nukleären Funktionen von RGS2, insbesondere diejenigen, die eine Interaktion mit DNA voraussetzen, werden hingegen im Wesentlichen durch den N-terminalen Anteil von RGS2 vermittelt.

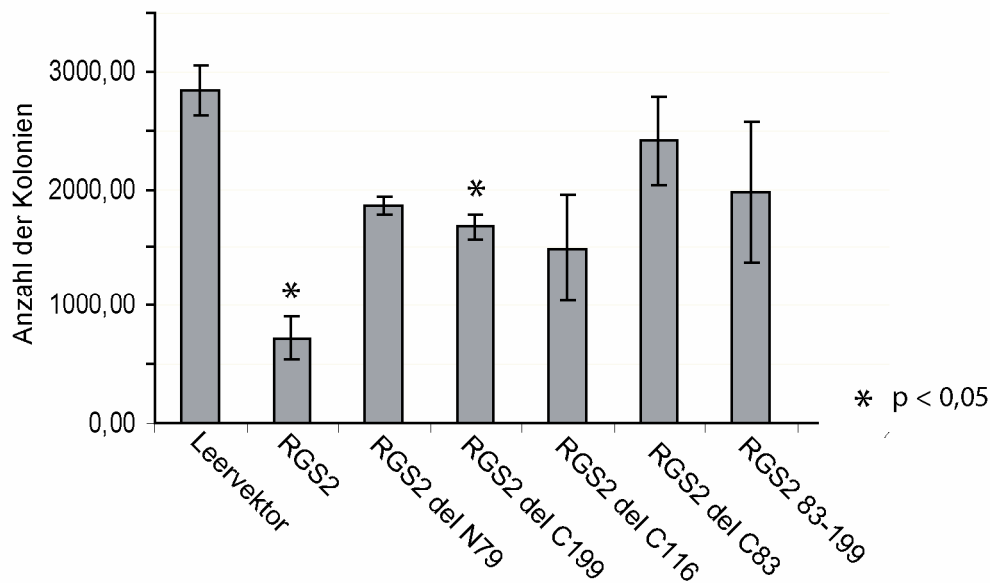


Abbildung 5.20: Colony Assay mit RGS2 Deletionsmutationen.

32D Zellen wurden transient mit Flt3-ITD und den angegebenen RGS2-Konstrukten transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Colony-Assays in Methylzellulose ausplattiert und die Kolonien wurden nach 10 Tagen gezählt.

5.6.6 Zusammenfassung der untersuchten Eigenschaften der RGS2-Deletionsmutanten

Die Ergebnisse zur Relevanz verschiedener Anteile von RGS2 bei verschiedenen, insbesondere nukleären, Funktionen, die mit den verschiedenen RGS2-Deletionsmutanten gezeigt wurden, sind zusammenfassend in Abbildung 5.21 dargestellt.

Konstrukt	nukleäre Lokalisation (konfokale Mikroskopie)	DNA - Bindung (Dot Blot)	Aktivierung des C/EBPalpha Promoters (Luciferase-Assay)	Bindung an E-Box Motiv im C/EBPalpha Promoter (ABCD-Assay)	Interaktion mit C/EBPalpha (GST-Pulldown)	Inhibierung von Flt3-ITD induziertem klonalem Wachstum in Methylzellulose
RGS2 (1-211)	+	+	+	+	+	+
RGS2 del N79 (83-211)	-	-	-	-	(+)	-
RGS2 del C199 (1-83)	+	+	+	+	(+)	-
RGS2 del C116 (1-116)	-	+	+	n.d.	-	-
RGS2 del C83 (1-83)	-	+	-	n.d.	-	-
RGS2 83-199	-	+	+	-	(+)	-

Abbildung 5.21: Übersicht der untersuchten Eigenschaften von RGS2-Deletionsmutationen

6 DISKUSSION

RGS2 spielt eine zentrale Rolle in der Transformation und Differenzierung myeloischer Zellen. Einige dieser Funktionen, insbesondere die differenzierende Wirkung und die Induktion der C/EBP α -Expression, können nur unzureichend alleine mit der hemmenden Wirkung von RGS2 auf G α q erklärt werden. Bislang nicht publizierte Daten unserer Gruppe zeigen, dass die Aktivität von G α q bzw. die daraus resultierende Aktivierung der Phospholipase C- β keinen Einfluss auf die Expression von C/EBP α hat.

Da bereits aus Untersuchungen in nicht-hämatopoetischen Zelllinien eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation von RGS2 bekannt ist und RGS2 als potentielles „basic Helix-Loop-Helix-Protein“ beschrieben wurde, ist eine nukleäre Funktion des Proteins, möglicherweise sogar in der Regulation der transkriptionellen Prozesse, gut denkbar. Da die Kenntnis der nukleären Funktionen von RGS2 das Verständnis der Pathogenese insbesondere maligner hämatopoetischer Erkrankungen wesentlich verbessern wird und eventuell die Entwicklung neuartiger therapeutischer Ansätze ermöglicht, wurde die Untersuchung dieser Mechanismen zum zentralen Thema dieser Arbeit gemacht.

6.1 RGS2 ist ein nukleäres Protein

Von anderen Arbeitsgruppen wurde bereits gezeigt, dass einige RGS-Proteine, so auch RGS2, größtenteils im Zellkern lokalisiert sind (Chatterjee et al. 2000a; Heximer et al. 2001; Roy et al. 2003; Gu et al. 2007). Diese Arbeiten basieren meist auf Untersuchungen an Fibroblastenzelllinien wie Hek293T oder NIH-3T3. Die Lokalisation von RGS2 in anderen Zelltypen ist weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte die nukleäre Lokalisation von RGS2 zunächst in Hek293T Zellen bestätigt werden. Ebenso zeigte sich in Cos7 Zellen (Daten nicht gezeigt) eine vorwiegend nukleäre Lokalisation von RGS2.

Zur Untersuchung der Lokalisation von RGS2 in hämatopoetischen Zellen wurden 32D Zellen sowie NB4 Zellen verwendet. Die Lokalisation wurde sowohl immunfluoreszenzmikroskopisch (32D) als auch durch Zellfraktionierung und anschließende Analyse mittels Westernblot untersucht (NB4).

Die Auswertung von immunfluoreszenzmikroskopischen Lokalisationsstudien in hämatopoetischen Zellen ist meist schwierig, da diese Zellen sich morphologisch durch einen großen Nukleus und nur wenig Zytoplasma auszeichnen. Oftmals lässt sich das Zytoplasma zwischen Membran und Zellkern nur schlecht abgrenzen, und es entstehen nur wenig eindruckliche Aufnahmen. Die in dieser Arbeit gezeigten

immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von 32D Zellen zeigen jedoch eine deutliche Färbung für RGS2 im Zellkern, die räumlich mit der DAPI-Färbung sehr gut übereinstimmt. Der Zytoplasmasaum der Zellen ist gut abgrenzbar und zeigt eine deutlich schwächere Färbung für RGS2. Um die immunfluoreszenzmikroskopischen Daten zu bestätigen, wurden Zellfraktionierungen mit anschließendem Westernblot für RGS2 in den getrennten Lysaten aus den verschiedenen Zellkompartimenten durchgeführt. Auch hier konnte eine nukleäre Akkumulation von RGS2 in hämatopoetischen (NB4 Zellen) bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigte sich, dass RGS2 auch in myeloischen Zellen vorwiegend im Zellkern lokalisiert ist.

Die verschiedenen RGS-Proteine zeigen völlig unterschiedliche zelluläre Lokalisationen, die zudem in vielen Fällen dynamisch gesteuert werden. Die genaue Regulation der Lokalisation verschiedener RGS-Proteine wird viel diskutiert, jedoch sind die dafür verantwortlichen Mechanismen bislang nur bruchstückhaft aufgeklärt. Während RGS2 und RGS10 vorwiegend im Zellkern zu finden sind, zeigen RGS4 und RGS16 eine zytoplasmatische Lokalisation (Chatterjee et al. 2000a).

Alle diese RGS-Proteine bestehen fast ausschließlich aus der RGS-Domäne, die zwischen den unterschiedlichen Proteinen homolog ist. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Domäne in den genannten RGS-Proteinen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Lokalisation ausübt. Zusätzlich müssen die weniger konservierten Aminosäureabschnitte außerhalb der RGS-Domäne eine grundlegende Rolle bei der Lokalisation der RGS-Proteine spielen. Für die nukleär lokalisierten RGS-Proteine RGS2 und RGS10 lassen sich keine Homologien in Aminosäureabschnitten außerhalb der RGS-Domäne feststellen. Dagegen besitzen die vorwiegend zytoplasmatisch lokalisierten Proteine RGS4 und RGS16 eine Homologie im N-Terminus, die sich außerhalb der RGS-Domäne befindet. Deletiert man diese Aminosäuresequenz, so akkumulieren die Proteine im Nukleus (Chatterjee et al. 2000a). Möglicherweise enthält diese konservierte Sequenz ein Signal, das die Proteine in das Zytoplasma leitet oder sie dort hält. Dies könnte z.B. ein nukleäres Export-Signal sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass dieses Signal den Transport der Proteine in den Zellkern hemmt.

Tatsächlich konnten Chatterjee und Fisher zeigen, dass ein Leucin-reiches nukleäres Export-Signal für die zytoplasmatische Lokalisation von RGS4 und RGS16 verantwortlich ist. RGS2 hingegen besitzt kein solches Signal und ist vermutlich deswegen vorwiegend im Nukleus lokalisiert.

Weiterhin befindet sich innerhalb der konservierten RGS-Domäne eine nukleäre Lokalisations-Sequenz mit dem Motiv Lys-Xaa-(Lys/Arg). Diese ist wahrscheinlich auch bei RGS2 für die vorwiegend nukleäre Lokalisation verantwortlich. Da es sich um eine nukleäre Lokalisations-Sequenz und nicht um eine nukleäres Import- Signal handelt, erfolgt die Akkumulation von RGS2 wahrscheinlich nicht durch einen aktiven Mechanismus, sondern das Protein wird nach passiver Diffusion durch die Membranporen im Zellkern zurückgehalten. Es ist gut denkbar, dass das N-terminale nukleäre Export-Signal einiger RGS-Proteine einen stärkeren Einfluss hat als die nukleäre Lokalisations-Sequenz innerhalb der RGS-Domäne und so zu einer zytoplasmatischen Lokalisation dieser RGS-Proteine führt.

Die Lokalisation von RGS-Proteinen in bestimmten Zellkompartimenten ist ein dynamischer Prozess. Es konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von konstitutiv aktivem $G\alpha_q$, einem RGS2-Substrat, zur Translokation von RGS2 aus dem Nukleus an die Zellmembran führt (Heximer et al. 2001). Daraus lässt sich schließen, dass RGS2 infolge der Aktivierung seines Substrats aus dem Zellkern transloziert wird und an der Plasmamembran seine klassische Funktion im G-Protein-Signalweg übernimmt. Der Mechanismus, dem die Translokation zugrunde liegt, konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden.

Eine wichtige Rolle bei der dynamischen Steuerung der Lokalisation scheint dem N-terminalen Anteil von RGS2 zuzukommen. Dabei sind die bislang publizierten Daten zum Einfluss dieses Anteils von RGS2 auf die Lokalisation teilweise widersprüchlich und nur durch die Annahme recht komplexer Vorgänge erklärbar: Werden die Aminosäuren 1 bis 67 deletiert, so ist die durch $G\alpha_q$ -Aktivierung bedingte Membranlokalisation von RGS2 aufgehoben (Heximer et al. 2001; Roy et al. 2003). Des Weiteren konnte in derselben Arbeit wie auch in weiteren Studien (Gu et al. 2007) gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne ebenfalls die Akkumulation von RGS2 im Zellkern vermittelt. Die Steuerung der Lokalisation des Proteins in unterschiedliche Zellkompartimente durch dieselbe Domäne ist nur schwer zu erklären. Es wurde bereits gezeigt, dass eine amphipatische α -helikale Domäne im N-Terminus von RGS2 die Translokation an die Plasmamembran vermittelt (Heximer et al. 2001). Das Lokalisationsmuster von Deletionsmutanten von RGS2 lässt darauf schließen, dass sich ein Signal für die nukleäre Akkumulation in unmittelbarer Nähe des Plasmamembran-Targeting-Signals im N-terminalen Bereich des Proteins befindet. Es wurden einzelne Aminosäuren identifiziert, die für die Plasmamembranbindung verantwortlich sind, während die Steuerung der Lokalisation in den Zellkern bislang nur größeren Bereichen des N-Terminus des Proteins zugeschrieben werden konnte.

Möglicherweise dient der N-Terminus auch als „Scaffold“, mit dem RGS2 an Rezeptoren, Signalproteine oder nukleäre Komponenten bindet und dadurch die jeweilige Lokalisation vermittelt wird. Auf diese Weise ließe sich erklären, warum der N-Terminus sowohl die nukleäre Akkumulation als auch die Lokalisation an der Plasmamembran vermitteln kann.

Für RGS10 konnte gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen, Einfluss auf den Transport in den Zellkern nehmen können (Burgon et al. 2001). Möglicherweise unterliegt die Lokalisation von RGS2 ähnlichen Effekten.

Eine weitere Möglichkeit, die bislang noch nicht genauer untersucht wurde, ist die Vermittlung der nukleären Lokalisation durch Bindung an bestimmte Adapter- oder Anker-Proteine. RGS2 könnte durch Interaktion mit nukleären Transportproteinen, Proteinen innerhalb der nukleären Membran oder durch Bildung von Komplexen mit anderen nukleären Proteinen in den Zellkern gelangen oder dort zurückgehalten werden.

Ähnliches konnte für die Interaktion mit der Plasmamembran gezeigt werden, mit der RGS2 assoziiert ist, wenn es seine klassische Funktion als Aktivator der intrinsischen GTPase-Aktivität von G α -Untereinheiten ausübt. So wurde gezeigt, dass RGS2 an die Phospholipid-Doppelschicht der Membran (Gu et al. 2007) und die dritte intrazelluläre Schleife des M1-muskarinergen-Rezeptor bindet (Bernstein et al. 2004) und somit die notwendige Lokalisation an der Plasmamembran vermittelt wird. Bei der Interaktion von RGS2 mit der Zellmembran spielt unter anderem das Scaffold-Protein Spinophilin eine wichtige Rolle. Dieses bindet einerseits an den N-Terminus von RGS2 und andererseits an einen intrazellulären Teil verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Wang et al. 2005). Dieser Mechanismus erhöht die Spezifität der Funktion von RGS2, da er garantiert, dass RGS2 spezifisch zu dem Rezeptor, an dem es agieren soll, geleitet wird.

Auf ähnliche Art und Weise könnte auch die nukleäre Lokalisation von RGS2 über bestimmte Adapter- und Helfer-Proteine vermittelt werden.

Eine bereits beschriebene Regulation der Lokalisation ist über das Adapterprotein 14-3-3 möglich. RGS2 besitzt wie auch weitere RGS-Proteine ein mutmaßliches 14-3-3 Bindemotiv (Benzing et al. 2000). 14-3-3 ist dafür bekannt, an phosphorylierte Proteine zu binden und diese in einem bestimmten Zellkompartiment festzuhalten (Dougherty et al. 2004). Dadurch werden die Proteine sequestriert, der Zugang zu den Zielproteinen wird unterbunden und die Aktivität der Proteine somit reguliert. Diese Art der Regulation könnte möglicherweise auch für RGS2 zutreffen. Durch eine Speicherung im Nukleus wird es durch das Fernhalten von den Zielproteinen an der Plasmamembran in seiner klassischen Funktion inhibiert.

Es ist jedoch recht unwahrscheinlich, dass die Sequestrierung von RGS2 der einzige Grund für die Lokalisation im Zellkern ist.

Mögliche nukleäre Funktionen von RGS-Proteinen wurden in einigen Arbeiten diskutiert, diese sind jedoch bislang nicht abschließend geklärt. Nukleäre RGS-Proteine könnten z.B. einen Einfluss auf die Regulation der Apoptose nehmen (Dulin et al. 2000). Des Weiteren könnten sie auch durch ihre GTPase verstärkende Aktivität eine Rolle im nukleären Transportsystem spielen (Burchett 2003). Eine weitere mögliche nukleäre Funktion liegt in der klassischen Aufgabe von RGS-Proteinen, denn auch im Nukleus befinden sich G α -Untereinheiten, die durch die vorhandenen RGS-Proteine reguliert werden könnten (Willard et al. 2000). Weiterhin gibt es einige Hinweise, dass nukleäre RGS-Proteine Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus (Irvine 2003) sowie pre-mRNA Splicing haben (Osborne et al. 2001).

Interessanterweise wird außerdem eine mögliche Funktion, zumindest indirekt, in der Regulation der Transkription vorgeschlagen (Burchett 2003). So wurde z.B. ein Steroidrezeptor-bindendes Protein mit einer RGS-Domäne (SRB-RGS) entdeckt, das die transkriptionelle Aktivität des Östrogen-Rezeptors- α inhibiert. Die Repression der Aktivität ist dabei von der RGS-Domäne von SRB-RGS abhängig (Ikeda et al. 2001). Auch eine transkriptionelle Variante von RGS12 (RGS12TS-S) hat einen negativen Einfluss auf die Transkription *in situ* und hemmt DNA-Synthese in Tumor-Zellen (Chatterjee et al. 2002). Da sich RGS-Proteine außerhalb der konservierten RGS-Domäne strukturell sehr voneinander unterscheiden, kann letztlich von den nukleären Funktionen anderer RGS-Proteine kein Rückschluss auf eine Funktion von RGS2 im Zellkern erfolgen. Deshalb wurde die nukleäre Funktion von RGS2 in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

6.2 RGS2 ist ein DNA-bindendes Protein

Bei seiner Entdeckung wurde RGS2 als mutmaßliches basic Helix-Loop-Helix-Protein beschrieben (Siderovski et al. 1994). Proteine mit dieser Domäne sind DNA-bindende Proteine und bilden eine Klasse von Transkriptionsfaktoren. Mitglieder der bHLH-Transkriptionsfaktor-Familie sind durch zwei hoch konservierte Domänen charakterisiert, die zusammen eine Region von etwa 60 Aminosäuren umfassen. Am aminoterminalen Ende der Sequenz befindet sich die basische Domäne, die die Bindung von DNA an eine hexanukleotid Sequenz, die sogenannte E-Box, vermittelt. Dieses Motiv hat die Sequenz „CANNTG“, wobei unterschiedliche bHLH-Proteine auch unterschiedliche E-Box-

Sequenzen erkennen. Am carboxyterminalen Ende befindet sich die Helix-Loop-Helix-Domäne, die die Interaktionen mit anderen Proteinuntereinheiten für die Bildung von Homo- oder Heterodimeren vermittelt (Jones 2004). Bislang gibt es nur wenige Daten über die genaue Struktur von bHLH- Proteinen. Typisch für viele Proteine dieser Klasse sind zwei lange α -Helices, die durch eine kürzere Schleife miteinander verbunden sind.

Analysiert man die Sekundärstruktur von RGS2 mit dem Chou-Fasman Algorithmus (Chou et al. 1974; Chou et al. 1978a; Chou et al. 1978b), so zeigt sich eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von mehreren α -Helices mit Schleifen in den Übergängen von einer Helix zur nächsten. Bei der ersten und zweiten Helix (Aminosäure 1-20 und 24-46) handelt es sich um amphipathische Helices. Ein weiteres amphipathisches mögliches basic Helix-Loop-Helix-Motiv befindet sich zwischen den Aminosäuren 138-151 und 158-170. Des Weiteren findet man ein QTK-Motiv, das 66 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt liegt (Siderovski et al. 1994). Ein solches Motiv wird typischerweise in der Schleifenregion vieler bHLH-Proteine gefunden. Zudem befindet sich in der Mitte des RGS2-Proteins eine leicht hydrophobe Sequenz mit 4 Leucin-Resten, die jeweils durch 7 bzw. 6 andere Aminosäuren unterbrochen werden. Diese Region besitzt das Potential in Form eines Leucin-Zippers zu dimerisieren (Murre et al. 1989), was eine typische Fähigkeit von basic Helix-Loop-Helix-Proteinen darstellt. Vergleicht man die Aminosäuresequenz von RGS2 mit anderen Proteinen, so zeigt sich eine hohe Ähnlichkeit zu bereits beschriebenen bHLH- Proteinen (Siderovski et al. 1994). Diese strukturellen Gemeinsamkeiten lassen vermuten, dass RGS2 zur Klasse der basic Helix-Loop-Helix-Proteine gehört. Ob dies tatsächlich der Fall ist und RGS2 regulatorisch mit E-Box-Sequenzen interagiert, müssen jedoch funktionelle Untersuchungen zeigen.

Aufgrund der nukleären Lokalisation und des Vorhandenseins einer potentiellen DNA-Bindedomäne liegt die Vermutung nahe, dass RGS2 DNA binden und mit dieser interagieren kann. Diese Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. In einem einfachen Dot Blot Assay mit rekombinant aufgereinigten Proteinen konnte zunächst eindeutig gezeigt werden, dass RGS2 grundsätzlich in der Lage ist, an genomische DNA zu binden. Als Positivkontrolle wurde der Transkriptionsfaktor bMyb eingesetzt, bei dem sich eine deutliche Bindung an DNA zeigte. Die beiden Negativkontrollen GST sowie GST-Rhotekin zeigten erwartungsgemäß keine Bindung an DNA. Für RGS- Proteine ist eine Bindung an DNA in der Literatur bislang noch nicht beschrieben worden. RGS2 scheint also das erste RGS-Protein zu sein, für das die Interaktion mit DNA gezeigt werden kann.

Es stellte sich daraufhin die Frage, welche spezifischen DNA-Zielsequenzen RGS2 erkennt und bindet. Um diese zu identifizieren, wurde eine Bindungsstellen-Selektion (Pollock et al. 1990) für RGS2 durchgeführt. Für diesen Versuch wurden rekombinant aufgereinigte Proteine verwendet. Die Selektion wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt, bei denen das Protein auf unterschiedliche Weise aufgereinigt wurde, um möglichst zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Zum einen erfolgte die Bindungsstellen-Selektion mit aus Bakterien (*E. coli* BL21) aufgereinigtem GST-RGS2. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde zusätzlich eine Bindungsstellen-Selektion mit aus Sf9-Insektenzellen aufgereinigtem FLAG-RGS2 durchgeführt. Da es sich bei Insektenzellen um eukaryotische Zellen handelt, werden die hergestellten Proteine wie in Eukaryoten gefaltet und mit allen posttranslationalen Modifikationen versehen. Dies ist bei einer Aufreinigung aus Bakterien unter Umständen nicht gegeben. Somit sind Versuchsergebnisse mit aus Sf9- Zellen aufgereinigten Proteinen grundsätzlich verlässlicher, weil das Protein in einem physiologischeren Zustand vorliegt. In jedem Versuch wurden die entsprechenden Kontrollproteine (GST bzw. FLAG) ebenfalls in der Selektion eingesetzt, um unspezifische Bindungen erkennen zu können.

Die hier durchgeführte Bindungsstellen- Selektion wurde somit mehrfach kontrolliert, zum einen durch den Einsatz zweier verschiedener Versionen von rekombinantem RGS2 sowie zum anderen durch den Einsatz von entsprechenden Kontrollproteinen. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die angereicherten DNA-Sequenzen spezifisch an RGS2 binden.

Tatsächlich wurden in der Selektion mit GST-RGS2 und FLAG-RGS2 vergleichbare Bindungssequenzen angereichert. Für die weiteren Auswertungen wurden nur Sequenzen berücksichtigt, die in beiden Selektionen gefunden wurden.

Mit Hilfe der Bindungsstellen-Selektion wurde eine Sequenz angereichert, die fast ausschließlich aus Thymin-Nukleotiden und einigen Guanin-Nukleotiden besteht. Ein Vergleich mit der Transfac Datenbank (Matys et al. 2006), welche Promotorsequenzen sämtlicher Säugetiere enthält, zeigte, dass ein Teil dieser Sequenz (GTTTGTGTTT) eine Signal-Sequenz im Promotor des Hepatocyte-nuclear factor 3 beta ist (Tabelle 5.1). Dies trifft sowohl für das murine als auch für das humane Gen zu. Der Hepatocyte-nuclear factor 3 beta (HNF3- β) wird auch als Forkheadbox A2 (Foxa2) bezeichnet. Ferner bindet HNF3- β als Transkriptionsfaktor selbst an diese DNA-Sequenz (bindet also u.a. an seinen eigenen Promotor).

Interessanterweise wurden außerdem zahlreiche Sequenzen mit einem E-Box-Motiv (CANNTG) gefunden. E-Box-Motive sind die Zielsequenzen von basic Helix-Loop-Helix

Transkriptionsfaktoren. Da RGS2 möglicherweise ein Mitglied dieser Transkriptionsfaktor-Gruppe ist (Siderovski et al. 1994), ist eine Bindung an diese spezifischen Motive plausibel.

6.2.1 RGS2 bindet an eine Zielsequenz im Foxa2-Promotor

Foxa2 gehört zur Familie der Winged-Helix / Forkhead- Transkriptionsfaktoren. Proteine dieser Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Metabolismus und bei der Differenzierung metabolischer Gewebe, wie z.B. Pankreas und Leber (Friedman et al. 2006). Foxa-Transkriptionsfaktoren binden an Cis-regulatorische Elemente in verschiedenen Genen und regulieren so deren Expression. Es handelt sich dabei um monomere Transkriptionsfaktoren mit einer 100-Aminosäuren-langen DNA-Bindedomäne. Diese besteht aus einem Helix-Turn-Helix Motiv, welches aus drei alpha Helices sowie zwei großen Schleifen („Wings“) zusammengesetzt ist (Kaestner 2000). Des Weiteren besitzt Foxa2 vier Transaktivierungsdomänen sowie ein zweigeteiltes nukleäres Lokalisations-Signal und zwei Serin-Phosphorylierungsstellen für die Casein-Kinase (Qian et al. 1995).

Foxa-Transkriptionsfaktoren gelten als sogenannte „Pionier-Transkriptionsfaktoren“, da sie in der Lage sind, kompaktes Chromatin zu binden und in den offenen Zustand zu überführen. Dadurch können sekundäre Transkriptionsfaktoren binden und die Transkription von Zielgenen regulieren (Cirillo et al. 2002).

Um die spezifische Bindung von RGS2 an die selektierte Zielsequenz im Foxa2-Promotor zu bestätigen, wurden zunächst wiederum Dot Blot Assays durchgeführt, in denen die spezifische Bindung von RGS2 an die selektierte Zielsequenz untersucht wurde. Dafür wurde die in der Bindungsstellen-Selektion gefundene Sequenz eingesetzt. Es zeigt sich, dass ausschließlich RGS2, im Gegensatz zu den eingesetzten Kontrollproteinen (GST und GST-bMyb), in der Lage ist, an die Zielsequenz im Foxa2-Promotor zu binden. Eine weitere Bestätigung für die Spezifität der Bindung zeigte ein Kompetitions-Experiment: Hier wurde als unspezifische Ziel-DNA die DNA-Bibliothek, die zuvor für die Bindungsstellen-Selektion verwendet worden war, eingesetzt. Durch Zugabe der spezifischen selektierten Sequenz lässt sich die Bindung von RGS2 an die Bibliothek deutlich verringern. Diese Konkurrenz funktioniert nur bei RGS2, nicht aber beim Kontrollprotein bMyb. Diese Versuche zeigen, dass die in der Bindungsstellen-Selektion gefundene Sequenz eine spezifische Zielsequenz von RGS2 ist.

Um die Spezifität der Bindung von RGS2 an die selektierte Sequenz zu bestätigen, wurden Gel Shift Assays unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt (Abbildung 5.7): Es

wurden nukleäre Extrakte aus RGS2 überexprimierender 32D Zellen, Hek293T Zellen sowie Sf9 Zellen eingesetzt. RGS2 war dabei mit EGFP- oder FLAG markiert oder wurde ohne Markierung eingesetzt. In allen Versuchen konnte gezeigt werden, dass RGS2 mit der 32P-markierten Sonde, die die selektierte Signal-Sequenz im Foxa2-Promotor umfasst, einen Komplex bildet. Durch spezifische Kompetition verschwindet dieser Komplex dosisabhängig. Unspezifische Kompetition hat keinen Einfluss auf die Bildung des Komplexes, woraus sich schließen lässt, dass es sich um eine spezifische Interaktion mit der Sonde handelt. Um zu bestätigen, dass der gebildete Komplex tatsächlich RGS2 enthält, sollte mittels Zugabe von spezifischen Antikörpern gegen RGS2 bzw. gegen das GFP- oder FLAG-Tag die Masse des Protein/DNA-Komplexes erhöht und somit ein Supershift erreicht werden. Dies gelang in den vorliegenden Versuchen leider nicht. Jedoch lässt sich mit dem Antikörper gegen EGFP eine diskrete Abschwächung des Signals erkennen. Die für die Supershift-Analyse benutzten Antikörper binden die DNA-Protein-Komplexe nicht. Möglicherweise sind die Antikörper für die Durchführung eines Gelshifts unter den spezifischen Bedingungen des durchgeführten Experimentes nicht geeignet. Insgesamt ist die Interaktion von Antikörpern mit dem DNA/Protein-Komplex in Gel Shift Assays ein hochkomplexes Geschehen und unterliegt einer Vielzahl von Faktoren. Zwar ist ein Supershift nach Antikörper-Zugabe ein relativ sicheres Zeichen, dass das untersuchte Protein mit der markierten DNA-Sonde interagiert, jedoch beweist die fehlende Größenzunahme des DNA-Protein-Komplexes nicht das Gegenteil. Eine denkbare Erklärung für das Fehlen eines Supershifts wäre, dass RGS2 in einem Komplex mit weiteren Proteinen an die DNA-Sonde bindet, und die verwendeten Antikörper unter den angewendeten nicht-denaturierenden Bedingungen in diesem Protein-Komplex keinen Zugang zu ihrem Epitop finden.

Die Abschwächung des Signals durch Zugabe des EGFP-Antikörpers lässt sich dadurch erklären, dass der Antikörper durch die Bindung an EGFP-RGS2 durch sterische Beeinflussung die Bindung von RGS2 an DNA inhibiert. Dies wäre ein Hinweis, dass tatsächlich RGS2 in dem gebildeten DNA-Proteinkomplex vorhanden ist. Schließlich kann der eingesetzte Antikörper auch unter den in-vitro verwendeten Pufferbedingungen seine Funktionalität einbüßen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse aus dem Gel Shift Assay für sich alleine gesehen, aufgrund des fehlenden Supershifts, nicht zwingend eine Bindung von RGS2 an die selektierte Sequenz beweisen. Jedoch spricht das Fehlen eines DNA-Protein-Komplexes mit Lysaten aus Zellen, in denen nur das Tag (ohne RGS2) exprimiert wurde, massiv für eine spezifische Bindung von RGS2 an die markierte DNA-Sonde. Im

Zusammenhang mit den Kompetitions-Experimenten im Gelshift sowie den zusätzlichen Dot Blot Assays kann davon ausgegangen werden, dass RGS2 spezifisch an die in der Bindungsstellen-Selektion gefundene Sequenz innerhalb des Foxa2-Promotors bindet.

In der Literatur ist bislang noch nichts über eine mögliche Bindung von RGS2 an den Foxa2-Promotor beschrieben. Auch gibt es keine Informationen über ein mögliches funktionelles Zusammenspiel oder eine Interaktion zwischen Foxa2 und RGS2.

Foxa2 ist in der Lage an seinen eigenen Promotor zu binden und diesen durch Autoaktivierung zu induzieren (Odom et al. 2006). Diese Bindestelle stimmt mit der in der vorliegenden Arbeit identifizierten RGS2- Zielsequenz überein. Möglicherweise ist RGS2 also in der Lage direkt an dieselbe Sequenz zu binden wie Foxa2.

Foxa2 könnte ferner als früher Transkriptionsfaktor das Chromatin für die Bindung von RGS2 öffnen und dadurch erst den Zugang von RGS2 ermöglichen. Eine weitere nicht auszuschließende Möglichkeit wäre auch, dass RGS2 an Foxa2 bindet und beide Proteine in einem Komplex an die DNA binden und dadurch gleiche Bindesequenzen besitzen.

Denkbar wäre auch eine Bedeutung der Interaktion von Foxa2 und RGS2 beispielsweise in der Entwicklung oder Regulation von Pankreas-Zellen, da beide Proteine in diesen Zellen überdurchschnittlich hoch exprimiert werden (<http://biogps.gnf.org>).

Um zu untersuchen, ob RGS2 und Foxa2 miteinander interagieren, wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt, aber es konnte in ersten Versuchen bislang keine Interaktion beider Proteine festgestellt werden. Die Versuche stehen jedoch noch am Anfang, und unter Umständen sind die Bedingungen noch nicht ausreichend etabliert, um vorhandene Interaktionen detektieren zu können.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob RGS2 durch die potentielle Bindung des Foxa2-Promotors in der Lage ist, die Expression von Foxa2 zu regulieren. Dies wurde auf mRNA- sowie auf Proteinebene untersucht.

Transfiziert man 293T Zellen transient mit RGS2 so zeigt sich nach 48h eine moderate Induktion von Foxa2 etwa um den Faktor 1,5. Dieser nur schwach ausgeprägte Effekt spricht gegen eine direkte Induktion von Foxa2 durch RGS2 ohne weitere Faktoren.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass RGS2 in der granulozytären Differenzierung eine wichtige Rolle spielt und nach der Behandlung von NB4 Zellen mit ATRA induziert wird (Schwable et al. 2005). Infolge der granulozytären Differenzierung von NB4 Zellen mit ATRA konnte in dieser Arbeit eine bis zu achtfache Induktion von RGS2 auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Für Foxa2 zeigt sich sogar eine noch deutlichere Induktion um den Faktor 25, was vermuten lässt, dass auch Foxa2 eine Bedeutung in der granulozytären Differenzierung hat. Wie im Westernblot gezeigt werden

konnte, ist auch auf Proteinebene für RGS2 und Foxa2 eine deutliche Induktion erkennbar. Der enge zeitliche Zusammenhang zwischen der RGS2- und Foxa2-Expression in der granulozytären Differenzierung deuten auf eine gemeinsame wichtige Rolle beider Proteine bei diesem Vorgang hin. Da sich die Foxa2-Expression jedoch nicht unmittelbar durch eine RGS2- Überexpression in signifikantem Ausmaß induzieren lässt, ist von einer komplexeren Regulation der Expression dieses Proteins in der myeloischen Differenzierung auszugehen.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Foxa2 ein Zielgen von C/EBP α ist (Halmos et al. 2004) und als Tumorsuppressor bei Lungenkarzinomen wirkt.

Zudem induziert RGS2 C/EBP α in 32D-Flt3 ITD exprimierenden Zelllinien und zeigt in diesem Modell ebenfalls Tumorsuppressor-Eigenschaften (Schwable et al. 2005). Möglicherweise erfolgt eine Interaktion von RGS2 und Foxa2 also im Zusammenhang mit C/EBP α .

6.2.2 RGS2 bindet an eine Zielsequenz im C/EBP α -Promotor und interagiert mit C/EBP α

In der DNA-Bindungsstellen Selektion für RGS2 wurde eine Anreicherung verschiedener E-Box-Motive gefunden. Im C/EBP α -Promotor befinden sich mehrere solcher Motive, die eine wichtige Rolle bei der Regulation des Promotors spielen.

Da bereits in vorangegangenen Studien ein Einfluss von RGS2 auf die Expression von C/EBP α gezeigt werden konnte, wurde zur Bestätigung der Bindung von RGS2 an E-Box-Motive im Gelshift eine E-Box-Motiv enthaltende Sequenz aus dem C/EBP α -Promotor verwendet. Es wurde ein DNA-Abschnitt aus dem CEBP α -Promotor 275bp aufwärts von der Transkriptions-Startstelle gewählt, der ein bereits gut charakterisiertes Promotorfragment enthält, mit einem E-Box-Motiv, das erwiesenermaßen essenziell für die Expression von CEBP α ist (Timchenko et al. 1995).

In Gel Shift Assays mit nukleären Extrakten aus EGFP-RGS2 transfizierten 293T Zellen zeigte sich die Bildung eines Protein-DNA-Komplexes, dessen Signal durch spezifische Kompetition mit der unmarkierten Sonde deutlich verringert werden konnte. Durch Zugabe des EGFP-Antikörpers lässt sich zwar kein Supershift erreichen, jedoch verschwindet der Komplex. Dies lässt darauf schließen, dass der Antikörper im Protein-DNA-Komplex an RGS2 bindet und die weitere Bindung von DNA verhindert. Diese Tatsache lässt einen recht sicheren Schluss zu, dass tatsächlich EGFP-RGS2 an der Bildung des Komplexes beteiligt ist.

Es ist bekannt, dass C/EBP α an seinen eigenen Promotor binden kann und diesen durch Autoaktivierung induziert (Christy et al. 1991). Denkbar wäre also, dass sowohl RGS2 als auch C/EBP α in einem gemeinsamen Komplex an das E-Box-Motiv binden. Um dies zu untersuchen, wurden nukleäre Extrakte aus EGFP-RGS2 und C/EBP α transfizierten 293T Zellen hergestellt und im Gel Shift untersucht. Auch hier zeigt sich deutlich die Bildung eines Protein-DNA-Komplexes, dessen Signal sowohl durch Zugabe des EGFP-Antikörpers als auch durch Zugabe des C/EBP α -Antikörpers erkennbar reduziert wird. Offensichtlich sind sowohl RGS2 als auch C/EBP α an der Bildung dieses Protein-DNA-Komplexes beteiligt. Beide Proteine interagieren offenbar bei der DNA-Bindung miteinander. Die Interaktion zwischen RGS2 und C/EBP α wird weiter unten im Detail diskutiert.

Da im Gel Shift Assay die Zugabe von spezifischen Antikörpern nicht zum Supershift des DNA-Protein-Komplexes führte, wurde die Bindung von RGS2 an das E-Box-Motiv im C/EBP α -Promotor durch weitere Methoden verifiziert. Dafür wurden ABCD-Assays sowie Chromatin-IPs mit einem das E-Box-Motiv enthaltenden Oligonukleotid aus dem C/EBP α -Promotor durchgeführt. Mit den Chromatin-IP-Versuchen konnten die Ergebnisse aus den Gel Shift Assays bestätigt werden: In Lysaten aus RGS2 transfizierten 32D Zellen zeigt sich deutlich eine Bindung von RGS2 an die untersuchte Sequenz des C/EBP α -Promotors.

Im ABCD-Assay erfolgt der Nachweis des Proteins im Komplex mit einem Antikörper im Western-Blot und ist somit relativ spezifisch. ABCD-Assays mit dem oben beschriebenen Oligo aus dem C/EBP α -Promotor mit der Detektion von RGS2 und C/EBP α führten zu vergleichbaren Ergebnissen wie zuvor im Gel Shift: Eingesetzt wurden hierfür nukleäre Extrakte aus 293T Zellen die mit RGS2, C/EBP α oder RGS2 und C/EBP α transfiziert worden waren. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl RGS2 als auch C/EBP α an das untersuchte Oligonukleotid aus dem C/EBP α -Promotor bindet. Damit konnten die Ergebnisse aus den Gel Shift Assays mit alternativen Methoden bestätigt werden. Ebenso wurde in diesem Experiment, durch die Detektion der Proteine im Protein-DNA-Komplex mit spezifischen Antikörpern, die Anwesenheit von RGS2 bzw. C/EBP α im Komplex nachgewiesen. Auffällig ist, dass sich aus Zellen, die RGS2 und C/EBP α koexprimieren, weniger RGS2 präzipitieren lässt als aus Zellen, die nur mit RGS2 transfiziert wurden. Gleichzeitig kann aber aus demselben Lysat mehr C/EBP α präzipitiert werden als aus Lysaten von Zellen, die nur C/EBP α exprimieren. Dies war eine reproduzierbare Beobachtung. Das Ergebnis deutet möglicherweise auf eine Konkurrenz beider Proteine bei der Bindung an die eingesetzte DNA-Sequenz und auf eine Verdrängung von RGS2

vom C/EBP α -Promotor im Beisein von C/EBP α hin. Die Möglichkeit einer Interaktion von RGS2 und C/EBP α im Allgemeinen, sowie im Speziellen bei der Bindung an DNA wird im Folgenden diskutiert.

Es gibt verschiedene vorstellbare Möglichkeiten, wie eine solche Interaktion aussehen könnte. Denkbar wäre, dass RGS2 und C/EBP α einen Komplex bilden und gemeinsam als Heterodimer an die DNA binden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass eines der beiden Proteine initial an die DNA bindet, um z.B. das Chromatin zu öffnen, und erst danach der zweite Partner zur Regulation der Transkription rekrutiert wird. Diese Hypothesen lassen sich mittels der Gel Shift Experimente und ABCD-Assays jedoch nicht eindeutig belegen.

In der Literatur ist eine direkte Interaktion der beiden Proteine bislang nicht beschrieben, jedoch gibt es eine Publikation über die Interaktion von C/EBP α mit dem Transkriptionsfaktor HNF1 bei der Aktivierung des Albumin-Promotors (Wu et al. 1994). Werden beide Transkriptionsfaktoren koexprimiert, so kommt es zu einer stärkeren Aktivierung des Promotors als mit nur einem der Faktoren. Es ist denkbar, dass RGS2 und C/EBP α ebenfalls auf eine synergistische Art und Weise bei der DNA-Bindung interagieren und einen Komplex bilden.

Zur Untersuchung, ob RGS2 und C/EBP α direkt miteinander interagieren, wurden GST-Pulldown-Versuche sowie Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. In diesen Untersuchungen zeigt sich eine Kopräzipitation von RGS2 und C/EBP α , so dass von einer direkten Interaktion beider Proteine auszugehen ist. Auffällig ist, dass RGS2 anscheinend nur mit der größeren Isoform von C/EBP α (p42), jedoch nicht bzw. nur in geringerem Ausmaß mit der kleineren (p30) interagiert. Die beiden C/EBP α -Isoformen besitzen den gleichen C-Terminus, jedoch fehlen der kürzeren Form die ersten 117 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs. Möglicherweise befindet sich das für die Interaktion mit RGS2 wichtige Motiv von C/EBP α im N-terminalen Bereich des Proteins. Die Transaktivierungsdomänen, die mit der Translationsmaschinerie interagieren, sind nur in der p42 Isoform enthalten (Friedman et al. 1990). Denkbar wäre, dass die Komplexbildung von RGS2 und C/EBP α eine Funktion bei der Transaktivierung hat und deshalb keine Interaktion von RGS2 mit der Transaktivierungsdomänen-defizienten p30 Isoform erfolgt. Des Weiteren ist bekannt, dass nur die p42 Form von C/EBP α in der Lage ist, die Differenzierung von Adipozyten und Granulozyten zu induzieren (Ossipow et al. 1993; Pabst et al. 2001b). RGS2 spielt während der granulozytären Differenzierung eine bedeutende Rolle. Ein Synergismus oder gar eine direkte Interaktion zwischen RGS2 und der p42 Isoform von C/EBP α liegen deshalb nahe.

Die ABCD-Assays deuten auf eine schwächere Bindung von RGS2 im Beisein von C/EBP α an das E-Box-Motiv im C/EBP α -Promotor hin. Diese Tatsache lässt sich durch verschiedene Hypothesen für die Art und Weise der Interaktion beider Proteine erklären.

Es lässt sich spekulieren, dass RGS2 und C/EBP α bei der Bindung von DNA einen Komplex eingehen, in dem beide Proteine in unterschiedlichen Anteilen enthalten sind. Möglicherweise ist RGS2 in diesem Komplex weniger stark repräsentiert als C/EBP α und wird deswegen auch zu geringeren Anteilen präzipitiert.

Des Weiteren wäre es möglich, dass die Bindung von RGS2 an die DNA indirekt über C/EBP α erfolgt. Dieser Hypothese zufolge bindet C/EBP α direkt an die DNA und RGS2 interagiert mit C/EBP α . In einem solchen Szenario könnte RGS2 möglicherweise durch die Waschschriffe während des Versuches weggewaschen werden, wodurch C/EBP α in größeren Anteilen präzipitiert wird. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch die gezeigten Daten, die eine direkte Interaktion von RGS2 mit DNA zeigen. Außerdem zeigt RGS2 ohne C/EBP α -Überexpression eine höhere Affinität zu der untersuchten DNA-Sequenz.

Aufgrund der hier gezeigten Daten erscheint die Möglichkeit, dass beide Proteine um die Bindung an das E-Box-Motiv konkurrieren, am wahrscheinlichsten. Es ist denkbar, dass in der *in vivo* Situation je nach Expressionsmenge oder gewebespezifisch entweder das eine oder das andere Protein präferentiell an den C/EBP α -Promotor bindet. Ferner ist denkbar, dass in einer zeitlichen Sequenz zunächst RGS2 an den C/EBP α -Promotor bindet und die Expression von C/EBP α induziert und anschließend das neu gebildete C/EBP α -Protein an seinen eigenen Promotor bindet und RGS2 verdrängt. Bei den hier untersuchten *in vitro* Bedingungen könnte es sich um eine relativ unphysiologische Situation handeln, in der beide Proteine vorhanden sind und gleichzeitig die Möglichkeit haben, an die Zielsequenz zu binden. Offensichtlich besitzt C/EBP α jedoch die größere Affinität zur untersuchten Zielsequenz, so dass es vorrangig daran bindet, während RGS2 von C/EBP α verdrängt wird.

Um zu überprüfen, ob RGS2 auch einen funktionellen Einfluss auf die Regulation des C/EBP α -Promotors hat, wurden Luziferase-Assays mit einem C/EBP α -Promotor-Konstrukt durchgeführt. Dieses Konstrukt enthält 562 Nukleotide 5'-aufwärts von der C/EBP α -Transkriptions-Startstelle und enthält die in den Gel Shift Experimenten und ABCD-Assays als Oligo eingesetzte DNA-Sequenz. Dieser Sequenz folgt ein Luziferase-Gen, dessen Aktivität im Luziferase-Assay gemessen werden kann (Pabst et al. 2001a). Bei diesem Versuch zeigt sich eine bis zu dreifache Aktivierung des Promotors durch RGS2. Generell zeigt sich bei Promotoren myeloischer Transkriptionsfaktoren nur eine

verhältnismäßig moderate Aktivierung im Rahmen von etwa zwei- bis fünffacher Induktion (Tenen et al. 1997). Für die Aktivierung des C/EBP α -Promotors sind in der Literatur vergleichbare Werte angegeben wie sie in der vorliegenden Arbeit gemessen wurden (Pabst et al. 2001b; Behre et al. 2002). Demzufolge erscheint die hier gemessene Promotoraktivierung plausibel und es lässt sich daraus schließen, dass RGS2 die Expression von C/EBP α transkriptionell durch die Aktivierung seines Promotors induziert.

In den klassischen Chromatin-IPs konnte eine direkte Bindung von RGS2 an die bereits beschriebene E-Box-Sequenz im C/EBP α -Promotor gezeigt werden. Untersucht man die 5'-upstream Sequenz im Bereich des C/EBP α -Genlocus auf mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, so zeigt sich, dass neben dem klassischen E-Box-Motiv an Position -275 noch mindestens fünf weitere dieser Motive auftreten. Möglicherweise besitzt RGS2 also nicht nur eine Bindungsstelle im C/EBP α -Promotor sondern bindet unter Umständen auch noch an weitere Positionen. Um dies zu überprüfen, wurde mittels Chromatin-IP und anschließender Real-Time PCR mit verschiedenen Primer-Paaren die Promotorregion von C/EBP α von der Transkriptionsstartstelle bis zur Position -3948 auf die Bindung von RGS2 untersucht. Entsprechend der Signalstärke in der PCR zeigen sich weitere potentielle Bindungsstellen für RGS2 an den Positionen -2056 bis -1666 sowie an der Position -698. Interessanterweise liegen im Bereich von -2056 bis -1666 fünf verschiedene Motive mit der klassischen E-Box-Sequenz CANNTG, weshalb eine erhöhte Bindung von RGS2 an dieser Position durchaus plausibel ist. An der Position -698 lässt sich kein E-Box-Motiv finden. Eventuell bindet RGS2 an dieser Stelle an eine andere, noch nicht identifizierte Zielsequenz. Um die Bindung von RGS2 an die hier gefundenen Promotor-Bereiche genauer zu untersuchen, müssten wiederum Gel Shift- oder ABCD-Assays durchgeführt werden, was über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgegangen wäre.

Möglicherweise ist das volle Ausmaß der Aktivierung des C/EBP α -Promotors durch RGS2 im Luziferase-Assay nur detektierbar, wenn ein Promotor-Konstrukt eingesetzt wird, welches auch die hier gefundenen potentiellen weiteren Bindungsstellen für RGS2 einschließt. Das für die Luziferase-Assays verwendete C/EBP α -Promotorkonstrukt beinhaltet nur etwa -300 Nukleotide der 5'-vorgelagerten Sequenz. Eventuell erfolgt die volle physiologische Aktivierung des Promotors jedoch erst infolge einer Bindung von RGS2 an weitere Positionen, die das Konstrukt nicht mehr beinhaltet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier gezeigten Daten der erste Nachweis einer nukleären und transkriptionsregulierenden Funktion von RGS2 sind. Mit Hilfe dieser Daten kann die in vorangegangenen Arbeiten gezeigte Induktion der C/EBP α -Expression und die Differenzierung myeloischer Zellen durch RGS2 sehr gut erklärt werden.

6.3 Charakterisierung funktionell wichtiger Bereiche von RGS2

Nachdem eine nukleäre und die transkriptionsregulierende Funktion von RGS2 gezeigt werden konnten, sollte nun untersucht werden, welche Anteile des Proteins die nukleäre Lokalisation bzw. die DNA-Bindung sowie die Aktivierung des C/EBP α -Promotors vermitteln. Es wurden verschiedene RGS2-Deletionsmutationen hergestellt, deren Design zum Teil aus publizierten Arbeiten mit nachgewiesenen Effekten dieser Mutationen übernommen wurde (Abbildung 5.13).

Zum einen wurde ein Konstrukt verwendet, in dem ein Teil des N-Terminus von RGS2 fehlt (RGS2 del N79). Dieses Konstrukt wurde bereits in verschiedenen Arbeiten publiziert (Heximer et al. 2001; Bernstein et al. 2004), in denen gezeigt werden konnte, dass der N-Terminus von RGS2 einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins hat. Der N-Terminus scheint für verschiedene Funktionen von RGS-Proteinen, wie die Interaktion mit dem muskarinergen Acetylcholinrezeptor M1 (Bernstein et al. 2004) sowie die nukleäre Lokalisation (Heximer et al. 2001) von Bedeutung zu sein, und sollte deshalb auch in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden. Auch hier konnte ein Einfluss der Deletion des N-Terminus auf die Lokalisation von RGS2 in HEK293T Zellen gezeigt werden. Fehlt der N-Terminus, so ist RGS2 nicht mehr nur im Nukleus lokalisiert, sondern über die gesamte Zelle verteilt. Das gleiche gilt auch für das Konstrukt, das lediglich aus dem mittleren Teil von RGS2, der RGS-Domäne, besteht (RGS2 83-199). Auch hier ist RGS2 gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt, was darauf schließen lässt, dass der N-Terminus eine wichtige Funktion für die nukleäre Lokalisation von RGS2 vermittelt. Das Konstrukt RGS2 del C199, bei dem lediglich der kurze C-terminale Teil außerhalb der RGS-Domäne deletiert ist, zeigt eine nukleäre Lokalisation, ebenso wie Wildtyp-RGS2. Demzufolge scheint der kurze Teil am C-Terminus des Proteins keinen Einfluss auf die Lokalisation zu haben.

Bemerkenswert ist, dass neben dem N-Terminus auch der C-terminale Anteil der RGS-Domäne einen Einfluss auf die Lokalisation von RGS2 hat. So zeigen die Konstrukte del C116, bei dem ein Teil der RGS-Domäne sowie der komplette C-Terminus deletiert ist, sowie das Konstrukt del C83, das lediglich aus dem N-terminalen Teil von RGS2 besteht,

ebenfalls keine exklusiv nukleäre Lokalisation mehr. Somit sind sowohl der N-Terminus von RGS2 als auch der C-terminale Anteil der RGS-Domäne für eine vorwiegend nukleäre Lokalisation notwendig, aber alleine nicht ausreichend.

Die Bedeutung des N-Terminus für die nukleäre Lokalisation von RGS2 wurde bereits zuvor beschrieben und steht im Einklang mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten. So weist bereits eine Publikation aus dem Jahr 2001 daraufhin, dass infolge der Deletion des N-Terminus (RGS2 AS 78-211) die nukleäre Akkumulation des Proteins deutlich reduziert wird (Heximer et al. 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus keinen aktiven Transport in den Zellkern vermittelt, sondern vermutlich eher als nukleäres Rückhaltesignal fungiert, und RGS2 durch passive Diffusion in den Nukleus gelangen kann (Heximer et al. 2001). Im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten steht jedoch die Erkenntnis, dass der N-Terminus von RGS2 alleine (AS 1-67) an der Plasmamembran sowie im Nukleus lokalisiert ist (Heximer et al. 2001; Burchett 2003; Gu et al. 2007). Diese Daten ließen sich mit dem vergleichbaren hier verwendeten Deletionskonstrukt RGS2 AS 1-83 nicht bestätigen, denn dieses Konstrukt zeigt keine exklusiv nukleäre Lokalisation mehr, sondern ist im Zytoplasma und im Nukleus gleichmäßig verteilt. Das hier verwendete Fragment des N-Terminus ist einige Aminosäuren länger als das bereits zuvor publizierte. Möglicherweise führen diese zusätzlichen Aminosäuren zu dem abweichenden Verhalten bezüglich der Lokalisation. Denkbar wäre, dass dieser Teil des N-Terminus neben der nukleären Lokalisationssequenz auch eine Sequenz enthält, die die Lokalisation an der Plasmamembran vermittelt, und das deletierte Protein somit gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt vorliegt.

Eine eindeutige Lokalisation an der Plasmamembran konnte in der vorliegenden Arbeit mit keinem der verwendeten Konstrukte gezeigt werden. Möglicherweise ist diese Lokalisation vom Zellkontext abhängig.

Gleicht man die Aminosäuresequenz von RGS2 mit einer Datenbank ab, die verschiedene nukleäre Signalsequenzen erkennt (Nair et al. 2003), so finden sich keine bekannten Sequenzen, die eine nukleäre Lokalisation vermitteln. Beschrieben wurde in einer Arbeit jedoch eine nukleäre Lokalisationssequenz (Lys-Lys-Xaa-Lys/Arg) innerhalb der konservierten RGS-Domäne (Chatterjee et al. 2000a). Fusioniert man die RGS-Domänen von RGS4 sowie RGS16 an GFP, so zeigt sich eine nukleäre Lokalisation dieser Domänen. Dies ist, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, bei RGS2 nicht der Fall, weshalb bei diesem Protein der N-Terminus anscheinend einen essenziellen Einfluss auf die nukleäre Lokalisation hat und für diese notwendig ist. Dennoch zeigt sich auch bei RGS2 ein Effekt der beschriebenen nukleären Lokalisationssequenz innerhalb der RGS-Domäne: Diese

Sequenz liegt im Bereich der Aminosäuren 120-123. Die Deletionsmutanten, denen die RGS-Domäne ab den Aminosäuren 116 fehlt, zeigen eine verminderte nukleäre Lokalisation. Ein weiterer Grund für den Einfluss des C-terminalen Bereichs der RGS-Domäne von RGS2 auf die nukleäre Lokalisation könnte in der dort lokalisierten Bindungssequenz für 14-3-3 Proteine liegen, die ihrerseits Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von RGS2 haben könnten. In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass neben dem N-Terminus auch der C-terminale Bereich der RGS-Domäne von RGS2 einen Einfluss auf dessen Lokalisation nimmt.

Den deutlichsten Einfluss auf die nukleäre Lokalisation hat jedoch der N-Terminus von RGS2. Über den Mechanismus, wie genau diese Lokalisation hervorgerufen wird, lässt sich nur spekulieren. Denkbar wäre, dass Konstrukte, denen der C-terminale Teil der RGS-Domäne fehlt, schon initial gar nicht in den Nukleus gelangen. In diesem Bereich besitzt RGS2 vermutlich eine nukleäre Lokalisations-Sequenz (NLS). Konstrukte, bei denen dieser Bereich vorhanden ist, die jedoch eine Deletion des N-Terminus aufweisen, befinden sich zunächst eventuell noch im Nukleus, können aber dort nicht gehalten werden und verteilen sich demzufolge auch im Zytoplasma.

Aus diesen Daten ergibt sich folgende Theorie für die Vermittlung der nukleären Lokalisation von RGS2: Im C-terminalen Bereich der RGS-Domäne befindet sich ein nukleäres Lokalisations-Signal (NLS), das die Lokalisation in den Nukleus vermittelt. Des Weiteren befindet sich möglicherweise im N-terminalen Teil von RGS2 ein weiteres Signal („nuclear retention signal“), welches dafür sorgt, dass RGS2 im Nukleus verbleibt.

In der Literatur gibt es derzeit keine Angaben zur Interaktion von RGS2 mit DNA. Um einzugrenzen, welcher Bereich von RGS2 für die DNA-Bindung verantwortlich ist, wurde ein Dot Blot Assay mit rekombinanten GST-RGS2 Fusionsproteinen durchgeführt. Dafür wurden die bereits oben beschriebenen trunkierten RGS2-Konstrukte eingesetzt. Die Konstrukte wurden umklont, so dass die einzelnen Deletionsmutanten mit einem GST-Tag in *E. coli* BL21 Bakterien exprimiert und aufgereinigt werden konnten.

Zunächst wurde die Aufreinigung der einzelnen Konstrukte im Coomassie-gefärbten Gel sowie im Westernblot überprüft. Hier zeigt sich, dass alle Konstrukte erfolgreich exprimiert und aufgereinigt wurden. Im Westernblot konnten die Konstrukte RGS2 del C116 sowie RGS2 del C83 nicht nachgewiesen werden, da der RGS2-Antikörper an ein Epitop bindet, das in diesen Mutanten deletiert ist.

Im Dot Blot Assay wurden die Konzentrationen der aufgereinigten Konstrukte angeglichen, so dass in jeder Probe die gleiche Menge an Protein eingesetzt wurde. Um die

generelle Bindungsfähigkeit der einzelnen Deletionsmutationen an DNA zu untersuchen, wurden Digoxigenin-markierte Fragmente genomischer DNA verwendet und mit den rekombinanten Proteinen inkubiert.

Mit diesem Versuch ließ sich zeigen, dass durch die Deletion des N-Terminus von RGS2 (RGS2 del N79) die Bindung an DNA verloren geht. Die Deletion unterschiedlich großer Abschnitte des C-Terminus (RGS2 del C199, del C116, del C83) hat hingegen keinen Einfluss auf die DNA-Bindungsfähigkeit von RGS2. Diese Daten lassen darauf schließen, dass der N-Terminus von RGS2 eine große Bedeutung für die Bindung an DNA hat. Im Coomassie-Gel ist erkennbar, dass das Konstrukt RGS2 del C116 eine deutlich geringere Konzentration aufweist als die anderen Mutanten. Dennoch sollte die Menge für eine Analyse mittels Dot Blot Assay ausreichend sein und zu verlässlichen Ergebnissen führen, denn obwohl diese Mutante eine geringere Expression aufweist, ist das Signal im Dot Blot mit dem von Wildtyp-RGS2 vergleichbar. So lässt sich ausschließen, dass diese Mutation zu einer Verringerung der DNA-Bindung führt. Widersprüchlich ist jedoch, dass das Konstrukt RGS2 83-199, welches ausschließlich aus der RGS-Domäne besteht, während N-Terminus und C-Terminus deletiert sind, eine deutliche Bindung von DNA zeigt. Da hier ebenfalls der N-Terminus deletiert ist, wäre zu erwarten gewesen, dass, sofern die DNA-bindende Domäne im N-Terminus lokalisiert ist, auch dieses Konstrukt nicht mehr in der Lage ist, an DNA zu binden. Eine mögliche Erklärung ist, dass der C-Terminus von RGS2 eine inhibitorische Funktion auf die DNA-Bindung von Bereichen des RGS2-Proteins außerhalb des N-Terminus besitzt. Da der C-terminale Teil bei der Mutation RGS2 83-199 deletiert ist, ist diese inhibitorische Funktion nicht mehr vorhanden, und diese Mutante ist demzufolge in der Lage, unabhängig vom N-Terminus an DNA zu binden.

Zuvor konnte in Gel Shift Experimenten sowie in ABCD-Assays gezeigt werden, dass RGS2 an ein E-Box-Motiv im C/EBP α -Promotor bindet. Die Bindung der einzelnen RGS2- Deletionsmutationen an dieses Motiv wurde daraufhin mittels ABCD-Assays genauer untersucht. Eingesetzt wurde dafür ein biotinyliertes DNA-Oligo mit der im C/EBP α -Promotor vorhandenen E-Box-Sequenz an Position -275. Da der RGS2-Antikörper nicht alle Deletionsmutationen erkennt, wurden für diesen Versuch nur Wildtyp-RGS2, RGS2 del N79, RGS2 del C199 und RGS2 83-199 eingesetzt. In der Ladekontrolle lässt sich erkennen, dass die beiden kleineren Deletionsmutationen del N79 und del 83-199 deutlich schwächer exprimiert werden als Wildtyp-RGS2 und die Mutation del C199.

Im Oligo-Pulldown zeigte sich, dass nur das Wildtyp-RGS2 sowie die Mutation del C199 an die untersuchte Oligo-Sequenz binden kann. Die beiden Deletionsmutationen del N79 und 83-199 zeigen hingegen keine Bindung. Da diese beiden Konstrukte im Vergleich zu den anderen eingesetzten Proteinen eine schwächere Expression zeigten, wurden die Filme sehr stark überbelichtet (Daten nicht gezeigt). Jedoch auch bei sehr langer Exposition des Filmes lassen sich keine Signale erkennen, so dass diese Konstrukte wahrscheinlich nicht an den untersuchten DNA-Abschnitt binden. Bei beiden Konstrukten fehlt der N-terminale Teil des Proteins. Demzufolge scheint dieser Bereich des Proteins essenziell für die Bindung an den untersuchten Bereich im C/EBP α -Promotor zu sein. Deletiert man einen Teil des C-Terminus wie im Konstrukt del C199, so hat dies keinen Einfluss auf die Bindung an die untersuchte Oligo-Sequenz. Der N-terminale Anteil von RGS2 ist somit sowohl für die nukleäre Lokalisation als auch für die Bindung an den C/EBP α -Promotor ausschlaggebend. Da es sich hier um einen *in vitro* durchgeführten Versuch handelt, bei dem zunächst die nukleären Extrakte hergestellt werden und danach die DNA *in vitro* hinzugegeben wird, kann die subzelluläre Lokalisation der Deletionsmutanten von RGS2 für dieses Ergebnis nicht verantwortlich sein. Demzufolge ist der N-terminale Bereich von RGS2, unabhängig von seinem Einfluss auf die Lokalisation des Proteins, für die Bindung an den C/EBP α -Promotor essenziell.

Der N-terminale Anteil von RGS2 scheint demnach sowohl für die nukleäre Lokalisation, als auch für die Bindung von RGS2 an den C/EBP α -Promotor von essenzieller Bedeutung zu sein. Vergleichbare bereits publizierte Daten gibt es dazu bislang noch nicht.

Neben dem Einfluss auf die Lokalisation und DNA-Bindung wurde die Relevanz der verschiedenen Bereiche des RGS2-Proteins für die in dieser Arbeit gefundenen nukleären Funktionen von RGS2 untersucht. Mit den bereits zuvor beschriebenen Deletionsmutanten von RGS2 wurde in Luziferase-Assays untersucht, welche Abschnitte des RGS2-Proteins für die Aktivierung des C/EBP α -Promotors ausschlaggebend sind.

Auch bei diesen funktionellen Daten zeigt sich ein deutlicher Einfluss des N-terminalen Anteils von RGS2: Durch Deletion der ersten 78 Aminosäuren von RGS2 (del N79) verliert das Protein seine Fähigkeit, den C/EBP α -Promotor zu aktivieren. Auch nach Deletion der kompletten RGS-Domäne und des C-Terminus (del C83) ist die Aktivierung des C/EBP α -Promotors durch RGS2 nicht mehr möglich. Die anderen drei untersuchten Deletionskonstrukte zeigen, verglichen mit Wildtyp-RGS2, keine Veränderung der Aktivierung des C/EBP α -Promotors. Die verringerte Fähigkeit zur Aktivierung des Promotors infolge der Deletion des N-terminalen Bereiches von RGS2 lässt sich sehr gut

mit dem Einfluss dieses Bereichs auf die intrazelluläre Lokalisation und die Bindung an DNA im Allgemeinen und an den C/EBP α -Promotor im Speziellen erklären.

Die verringerte Aktivierung der Luziferase-Aktivität durch das Fehlen der RGS-Domäne sowie des kompletten C-Terminus im Konstrukt RGS2 del C83 könnte zum einen durch eine verminderte nukleäre Lokalisation erklärt werden, denn auch dieses Konstrukt zeigt eine zytoplasmatische Verteilung, zum anderen ist in diesem Konstrukt nur noch ein N-terminales Fragment von RGS2 erhalten, was vermutlich zur Aktivierung des Promotors nicht mehr ausreicht.

Die Konstrukte del C116 sowie del 83-199 zeigen eine Aktivierung der Luziferase-Aktivität, obwohl sie sich nicht ausschließlich im Nukleus befinden. Somit scheint eine verminderte Lokalisation des Proteins im Nukleus für diese Funktion zweitrangig und eine geringe Konzentration der Proteine im Nukleus ausreichend für die Funktion zu sein. Für eine Aktivierung des C/EBP α -Promotors sind somit der N-Terminus und der N-terminale Anteil der RGS-Domäne von RGS2 notwendig.

Erklären ließe sich dies dadurch, dass insbesondere der N-terminale Anteil von RGS2 die DNA-Bindung vermittelt und weitere wichtige Funktionen für die Aktivierung der Transkription vom N-terminalen Anteil der RGS-Domäne übernommen werden. Die oben gezeigten Untersuchungen zur DNA-Bindung der einzelnen Abschnitte von RGS2 unterstützen diese Hypothese.

Warum das Konstrukt, das ausschließlich aus der RGS-Domäne besteht, eine Aktivierung des C/EBP α -Promotors zur Folge hat, lässt sich nur schwer erklären. Da der N-Terminus hier fehlt, wäre eigentlich ein Verlust von DNA-Bindung und transkriptioneller Aktivität zu erwarten gewesen. Jedoch zeigt sich bei der DNA-Bindung der Deletionsmutanten ein ähnliches Bild: nach Deletion des C-Terminus ist die DNA-Bindung auch ohne den N-terminalen Anteil möglich. Möglicherweise besitzt der C-terminale Teil von RGS2 eine inhibitorische Wirkung auf die DNA-Bindung und die promotoraktivierende Funktion des Proteins. Das Fehlen eines solchen inhibitorischen Bereiches könnte dann die aktivierende Wirkung des aus der RGS-Domäne bestehenden Konstruktes erklären.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass unmittelbar für die Aktivierung des C/EBP α -Promotors insbesondere die N-terminale Hälfte von RGS2 von großer Relevanz ist. Auch wenn in den Luziferase-Assays die C/EBP α -Promotor-Aktivierung mit den trunkierten RGS2 Mutanten del C116 und 83-199, die eine verminderte nukleäre Lokalisation zeigen, nicht beeinträchtigt war, ist es gut möglich, dass unter Bedingungen, in denen RGS2 nicht überexprimiert wird, die Lokalisation limitierend für die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von RGS2 ist.

Des Weiteren wurde mit Hilfe der rekombinant aufgereinigten RGS2-Deletionsmutationen untersucht, welcher Teil des Proteins die zuvor in GST-Pulldowns und Koimmunpräzipitationen gezeigte Interaktion mit C/EBP α vermittelt. Hierzu wurden die mit dem GST-Tag versehenen RGS2-Deletionsmutanten im GST-Pulldown mit Lysat aus C/EBP α überexprimierenden HEK293T Zellen eingesetzt. Die Expression der einzelnen Mutanten wurde mittels eines Westernblots für GST überprüft und die Konzentration der einzelnen Proteine für den Pulldown aneinander angeglichen.

Hier konnte die zuvor gezeigte Interaktion zwischen C/EBP α und Wildtyp-RGS2 noch einmal bestätigt werden. Deletionen eines größeren Teils des C-Terminus bzw. der gesamten RGS-Domäne (RGS2 del C116 und RGS2 del C83) führen zu einem Verlust der Interaktion mit C/EBP α . Deletiert man nur den kurzen Teil des N-Terminus (del N79), bzw. einen kurzen Teil des C-Terminus (del C199) oder benutzt man ausschließlich die RGS-Domäne (83-199), so zeigt sich eine schwache Bindung des C/EBP α -Proteins. Demzufolge scheint eine Interaktion mit diesen Deletionsmutationen noch möglich zu sein. Diese ist jedoch im Vergleich zu der Interaktion mit Wildtyp-RGS2 deutlich abgeschwächt. Auffällig ist, dass die Banden für C/EBP α in den Proben mit RGS2 del N79 und RGS2 83-199 im Gel deutlich niedriger laufen als die Bande mit Wildtyp-RGS2. Da der Antikörper für C/EBP α sehr spezifisch ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Banden tatsächlich um C/EBP α handelt. Vermutlich kommt der Unterschied in der Laufhöhe dadurch zustande, dass die eingesetzten GST-RGS2-Konstrukte sehr hoch konzentriert sind und dadurch im Gel andere, schwächere Banden verdrängen. Die Konstrukte GST-RGS2 del N79 und GST-RGS2 83-199, bei denen die Bande für C/EBP α deutlich niedriger läuft, sind in etwa gleich groß wie C/EBP α , so dass diese Bande im Gel von den hoch konzentrierten Fusionsproteinen nach unten gedrückt wird.

Anhand der GST-Pulldowns lässt sich kein eng umschriebener Bereich von RGS2 abgrenzen, der isoliert die Interaktion mit C/EBP α vermittelt. Ein für die Interaktion mit C/EBP α wichtiger Abschnitt könnte im Bereich des C-terminalen Anteils der RGS-Domäne liegen, da das Konstrukt del C199 noch eine schwache Bindung an C/EBP α zeigt, die Konstrukte del C116 und del C83 diese jedoch komplett verloren haben. Jedoch scheint auch der N-terminale Teil von RGS2 einen Einfluss auf die Interaktion mit C/EBP α zu haben, da diese durch Deletion der ersten 78 Aminosäuren deutlich verringert wird. Für eine vollständige Interaktion mit C/EBP α ist das komplette RGS2-Protein ohne jegliche Deletionen erforderlich. Vermutlich entsteht erst durch komplexe Proteinfaltung von RGS2 die Interaktionsfläche mit C/EBP α . In den Deletionsmutanten könnte die

Ausbildung dieser Interaktionsflächen durch eine veränderte Sekundärstruktur von RGS2 eingeschränkt sein.

In einer weiteren funktionellen Untersuchung sollte der Einfluss der verschiedenen Bereiche von RGS2 auf die Flt3-ITD vermittelte Transformation untersucht werden. Die Hemmung der Flt3-ITD vermittelten Transformation hämatopoetischer Zellen durch RGS2 ist bereits gut beschrieben und publiziert (Schwable et al. 2005), der zugrunde liegende Mechanismus jedoch unklar. In der vorliegenden Arbeit wurden die RGS2-Deletionsmutanten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das Flt3-ITD vermittelte klonale Wachstum von 32D Zellen zu hemmen. Dafür wurden 32D Zellen mit Wildtyp-RGS2 bzw. den verschiedenen Mutanten und Flt3-ITD kotransfiziert und in Methylzellulose in Abwesenheit von Interleukin-3 ausplattiert. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich Wildtyp-RGS2 in der Lage ist, das Flt3-ITD vermittelte klonale Wachstum der Zellen in vollem Ausmaß zu antagonisieren. Die RGS2-Deletionsmutanten zeigen nur einen schwachen inhibitorischen Einfluss auf die Kolonienbildung in Methylzellulose. Die Deletionsmutante del C83, die nur aus dem N-terminalen Anteil von RGS2 besteht, zeigt keinen inhibitorischen Einfluss auf das Flt3-ITD vermittelte klonale Wachstum. Offensichtlich ist das komplette RGS2-Protein ohne Deletionen für diese biologische Funktion erforderlich. Denkbar wäre, dass für die Vermittlung dieser Funktion von RGS2 auch die klassische Aufgabe in der Aktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheiten von Bedeutung ist. Bislang noch nicht publizierte Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass die Aktivierung von $G\alpha_q$ für die Flt3-ITD vermittelte Transformation notwendig ist. Wie bereits gezeigt werden konnte, ist der N-terminale Bereich von RGS2 für die Translokation an die Plasmamembran und somit für die Interaktion mit $G\alpha_q$ wichtig (Heximer et al. 2001). Kann die Translokation aufgrund des fehlenden N-Terminus wie bei den Konstrukten RGS2 del N79 und RGS2 83-199 nicht erfolgen, so erfolgt keine Bindung von RGS2 an aktiviertes $G\alpha_q$, da beide Proteine sich nicht in räumlicher Nähe befinden. Dies könnte den Verlust der transformationshemmenden Wirkung von RGS2 nach Deletion des N-Terminus erklären. Auch durch die partielle oder komplette Deletion der RGS-Domäne in den Konstrukten del C116 und del C83 ist die Bindung von $G\alpha_q$ und die Aktivierung der intrinsischen GTPase Aktivität nicht mehr möglich. Demzufolge wären diese Konstrukte nicht mehr in der Lage, einen antagonisierenden Einfluss auf das Flt3-ITD vermittelte klonale Wachstum auszuüben, wenn dieses von einer $G\alpha_q$ -Aktivierung abhängig ist. Für die hier untersuchte Funktion von RGS2 in der Flt3-ITD vermittelten Transformation ist also das komplette RGS2-Protein ohne Deletionen erforderlich. Die Tatsache, dass die meisten Deletionsmutanten in der Lage sind, die Flt3-ITD vermittelte

Transformation myeloischer Zellen partiell zu hemmen, spricht hingegen dafür, dass RGS2 die Transformation über mehrere verschiedene Wege hemmt, zu deren Beeinflussung die Deletionsmutanten teilweise nicht mehr in der Lage sind. Die genaue Aufschlüsselung dieser Mechanismen bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, die über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgehen.

Zusammenfassend lässt sich aus allen Experimenten mit den RGS2-Deletionsmutationen der Schluss ziehen, dass die N-terminale Domäne von RGS2 für diverse Funktionen des Proteins von großer Wichtigkeit ist. Sie vermittelt die nukleäre Lokalisation, die Bindung an DNA, sowie die Bindung und Aktivierung des C/EBP α -Promotors und scheint somit ein oder auch mehrere wichtige strukturelle Motive zu enthalten. Wie genau diese Motive aussehen könnten, ist bislang noch ungeklärt.

Während der N-Terminus von RGS2 für fast alle hier untersuchten Funktionen von Bedeutung zu sein scheint, konnten die anderen Domänen von RGS2 spezifischer der Regulation bestimmter Funktionen von RGS2 zugeordnet werden: Die C-terminale Hälfte der RGS-Domäne hat einen Einfluss auf die nukleäre Lokalisation, denn alle Mutanten mit einer Deletion dieses Bereiches (RGS2- del C116 und -del C83) zeigen keine ausschließlich nukleäre Lokalisation mehr. Im Gegensatz dazu sind aber alle diese Mutanten in der Lage, in einem *in vitro* Assay an DNA zu binden. Die DNA-bindende Funktion wird also durch die Deletion dieses Bereiches im Gegensatz zur nukleären Lokalisation nicht eingeschränkt. Somit werden die intrazelluläre Lokalisation und die DNA-Bindung von unterschiedlichen Bereichen des Proteins vermittelt.

Dies gilt ebenso für die Aktivierung des C/EBP α -Promotors. Auch hier hat die Deletion des C-Terminus keine Verringerung der Fähigkeit zur Aktivierung des Promotors zur Folge. Einzige Ausnahme ist dabei die Mutation RGS2 del C83, die ausschließlich aus den N-terminalen 83 Aminosäuren besteht. Vermutlich verliert diese Mutante durch den Verlust weiter Teile der Proteinsequenz wichtige für RGS2 beschriebene Funktionen. Die Fähigkeit zur Bindung an das E-Box-Motiv im C/EBP α -Promotor scheint wiederum hauptsächlich durch den N-Terminus des Proteins vermittelt zu werden. Allerdings konnten die C-terminalen Deletionen del C116 und del C83 im ABCD-Assay nicht untersucht werden, da sie durch den RGS2-Antikörper nicht im Westernblot nachgewiesen werden können. Demzufolge lässt sich der Einfluss des C-Terminus auf die Bindung an das E-Box-Motiv nicht mit Sicherheit bestimmen. Da diese beiden Mutanten, wie in den Dot Blot Assays gezeigt, jedoch grundsätzlich die Fähigkeit zur DNA-Bindung besitzen,

lässt sich spekulieren, dass auch der C-Terminus von RGS2 bei der Interaktion mit DNA eine gewisse Rolle spielt.

Der C-terminale Teil von RGS2 einschließlich der zweiten Hälfte der RGS-Domäne ist für die Vermittlung der Interaktion mit C/EBP α von Bedeutung, denn diese ist in Folge einer Deletion dieser Bereiche nicht mehr nachweisbar. Für diese Funktion scheint der N-Terminus von RGS2 im Gegensatz zu anderen Funktionen von geringerer Bedeutung zu sein. Die Interaktion ist zwar abgeschwächt, ist jedoch immer noch nachweisbar.

Die einzige hier untersuchte Funktion von RGS2, die nur schwer bestimmten Bereichen von RGS2 zugeordnet werden kann, ist die Inhibierung des Flt3-ITD vermittelten klonalen Wachstums von 32D Zellen in Methylzellulose. Hier ist keine der verschiedenen Deletionsmutationen in der Lage, das klonale Wachstum im gleichen Maße wie das Wildtyp-RGS2 zu antagonisieren. Demzufolge ist für diese Funktion das komplette RGS2 ohne jegliche Mutationen erforderlich.

Eine schematische Übersicht über die Funktionen verschiedener Bereiche von RGS2 ist in Abbildung 6.1 dargestellt.

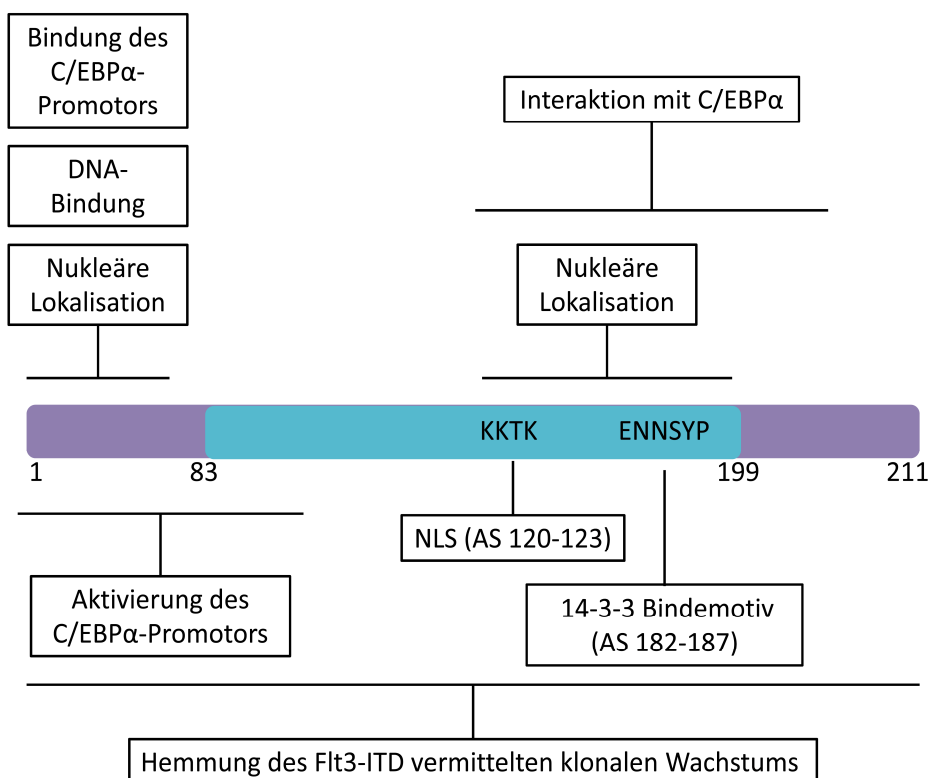


Abbildung 6.1: Übersicht über die Funktionen verschiedener Bereiche von RGS2

Vergleicht man die verschiedenen Deletionsmutanten mit bekannten Daten zur Struktur von RGS2 so zeigt sich, dass Bereiche des Proteins, die in der linearen Sequenz weit voneinander entfernt liegen, aufgrund der dreidimensionalen Faltung des Proteins in räumliche Nähe kommen. Somit lässt sich erklären, warum z.B. sowohl ein Teil des N-Terminus als auch ein Teil innerhalb der RGS-Domäne bzw. des C-Terminus an der nukleären Lokalisation oder der Promotor-Aktivierung beteiligt sein können.

Tikhonova et al. modellierten in ihrer Publikation von 2006 die dreidimensionale Struktur von RGS2 (Tikhonova et al. 2006). Hier zeigt sich, dass der N-Terminus von RGS2 in der Region von Aminosäure 1 bis 71 aus einer helikalen Domäne sowie mehreren Windungen („coils“) und Drehungen („loops“) besteht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus amphipatische Eigenschaften besitzt und dass hydrophobe Aminosäurereste an den Außenseiten des Proteins orientiert sind. Diese können mit Phospholipiden z.B. in der Zellmembran interagieren. Im Übergang zwischen dem N-terminalen Bereich und der RGS-Domäne macht das Protein eine Drehung („loop“). In dieser Region befinden sich viele basische Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich von RGS2 wichtig für die Bindung an den entsprechenden G-Protein-gekoppelten Rezeptor ist. Ist der Bereich zwischen den Aminosäuren 54 und 80 deletiert, so zeigt sich kein inhibitorischer Effekt auf die CCKR2-vermittelte Inositolphosphat-Akkumulation. Dieser Effekt ist auf eine verminderte Bindung an den Rezeptor zurückzuführen.

Die RGS-Box wird von den Aminosäuren 71 bis 205 gebildet und besteht aus neun alpha-Helices, welche wiederum zwei Lappen („lobes“) ausbilden (Soundararajan et al. 2008).

Der Bedeutung des N-Terminus wurde bereits zuvor für verschiedene Funktionen, wie die Interaktion mit anderen Proteinen (Wang et al. 2005; Schoeber et al. 2006) oder der Plasmamembran wie auch der nukleären Lokalisation (Burchett 2003), gezeigt. Übereinstimmend damit zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass der N-Terminus für diverse Funktionen des Proteins, wie nukleäre Lokalisation, DNA-Bindung sowie Bindung und Aktivierung des C/EBP α -Promotors von Bedeutung ist. Des Weiteren scheint auch innerhalb des C-terminalen Bereichs der RGS-Domäne ein für die nukleäre Lokalisation wichtiges Signal zu liegen. Aufgrund der Faltung des Proteins kommen N-Terminus und die C-terminale Hälfte der RGS-Domäne in räumliche Nähe, wodurch der gemeinsame Einfluss dieser beiden Bereiche auf die nukleäre Lokalisation erklärt werden könnte. Das Gleiche gilt ebenso für die Vermittlung der Aktivierung des C/EBP α -Promotors. In Folge der Deletion des N-Terminus wie auch durch die Deletion des kompletten C-terminalen Bereichs einschließlich der RGS-Domäne, erfolgt keine Aktivierung des C/EBP α -Promotors mehr. Auch hier kommen die dafür wichtigen

Domänen von RGS2 vermutlich durch die dreidimensionale Struktur des Proteins in räumliche Nähe und sind aufgrund dessen gemeinsam für diese Funktionen von RGS2 von Bedeutung.

Bei der Betrachtung der Daten, die mit Hilfe verschiedener Deletionsmutationen gewonnen wurden, sollte also auch immer die räumliche Struktur und Faltung des Proteins beachtet werden, um die Ergebnisse interpretieren zu können.

Im Rahmen vorangegangener Projekte konnte die Rolle von RGS2 als Transformation hemmendes und Differenzierung induzierendes Protein in myeloischen Zellen etabliert werden. Auf welchen Mechanismen diese Fähigkeiten von RGS2 basieren, wurde bislang noch nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine nukleäre und transkriptionsregulierende Funktion von RGS2 nachgewiesen werden. Insbesondere die Regulation des Promotors des myeloischen Transkriptionsfaktors C/EBP α durch RGS2 zeigt die zentrale Rolle dieses neu entdeckten Mechanismus in der myeloischen Differenzierung. Mit Hilfe der hier vorliegenden Daten können die Induktion der C/EBP α -Expression sowie die Differenzierung durch RGS2 sehr gut erklärt werden.

6.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse führen zu weiteren, interessanten Fragestellungen, welche Gegenstand zukünftiger Forschung sein sollten.

Hier konnte gezeigt werden, dass RGS2 ein nukleäres Protein ist und dass offensichtlich der N-Terminus sowie der C-terminale Bereich der RGS-Domäne wichtig für die Lokalisation im Zellkern sind. Der genaue Mechanismus, der zur nukleären Lokalisation führt, konnte jedoch bislang nicht geklärt werden und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Die Lokalisation von RGS2 scheint ein dynamischer Prozess zu sein, wobei es zur Translokation aus dem Nukleus in das Cytoplasma bzw. an die Plasmamembran kommt. Bekannt ist bislang, dass diese Translokation durch bestimmte Stimuli, wie z.B. die Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren oder die Expression aktivierter G α -Untereinheiten induziert wird (Heximer et al. 2001; Roy et al. 2003). Wie der genaue Mechanismus der Translokation abläuft und wodurch diese gesteuert wird, ist bislang noch nicht geklärt und sollte in Zukunft näher untersucht werden. Diese Dynamik sollte auch aufgrund sich daraus ergebender therapeutischer Perspektiven insbesondere im Kontext hämatopoetischer Zellen weiter untersucht werden.

Auch der Nachweis der Bindung von RGS2 an DNA ist eine Grundlage für weitere Untersuchungen. Hier sollte die Bedeutung der Bindung von RGS2 an die gefundenen Zielsequenzen im Foxa2-Promotor sowie im C/EBP α -Promotor genauer untersucht werden. Die mögliche Rolle von RGS2 bei der Aktivierung des Foxa2-Promotors wurde in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zum C/EBP α -Promotor noch nicht genauer analysiert. Auch dafür ist RGS2 jedoch möglicherweise von Bedeutung, denn die vorliegenden Daten zeigen eine Induktion von Foxa2 infolge einer erhöhten Expression von RGS2 auf RNA- und Proteinebene. Ein Einfluss von Foxa2 auf die Differenzierung myeloischer Zellen wurde bislang noch nicht genauer untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Steigerung der Foxa2-Expression während der granulozytären Differenzierung von NB4 Zellen gezeigt werden. Ob das Protein für die Differenzierung eine essenzielle Rolle spielt, müssen weitere Studien zeigen.

Die Aktivierung des C/EBP α -Promotors durch RGS2 konnte in der vorliegenden Arbeit bereits mittels Luziferase-Assays nachgewiesen werden. Von Interesse wäre, welche Signalsequenzen für die Bindung und Aktivierung durch RGS2 von essenzieller Bedeutung sind. Der C/EBP α -Promotor enthält mehrere potentielle Bindungstellen für RGS2 in Form von E-Box-Motiven. Um zu untersuchen, welche dieser Motive zur vollständigen Aktivierung des Promotors notwendig sind, könnten Deletionen oder Mutationen des C/EBP α -Promotor-Konstruktes erstellt werden und anschließend mittels Luziferase-Assay die Aktivierung durch RGS2 untersucht werden.

Weitere Untersuchungen könnten sich auf die genauere Analyse der Aktivierung des C/EBP α -Promotors konzentrieren. Interessant wäre in diesem Zusammenhang ein Screening für Interaktionspartner von RGS2. Es ist anzunehmen, dass RGS2 in einem Komplex mit anderen Bindungspartnern oder Kofaktoren an die DNA bindet und dies zur Aktivierung bestimmter Promotoren führt. Um welche Interaktionspartner es sich dabei handelt, könnte mittels eines Yeast-two-hybrid Assays untersucht werden. Erste Daten in der vorliegenden Arbeit lassen erkennen, dass RGS2 und C/EBP α miteinander interagieren. Möglicherweise ist dies eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung des C/EBP α -Promotors. Eventuell liegt RGS2 als Heterodimer mit C/EBP α vor und dieser Komplex bindet und aktiviert den C/EBP α -Promotor. Diese Hypothese müsste in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

Weiterhin ist eine genauere Charakterisierung der biologischen Funktionen der einzelnen RGS2-Deletionsmutationen anzustreben. Die hier durchgeführten Untersuchungen mit trunkierten RGS2-Proteinen vermitteln einen ersten groben Eindruck der Funktionen der einzelnen Abschnitte des Proteins. Um die Funktionen der einzelnen Bereiche von RGS2

besser zuordnen zu können, sollten weitere Deletionsmutanten generiert werden, in denen beispielsweise kleinere Anteile des N-Terminus deletiert sind. Somit ließe sich die Vielzahl der Funktionen des N-Terminus noch genauer bestimmten Bereichen zuweisen. Ferner sollten trunkeerte RGS2-Proteine, bei denen gezielt einzelne Bereiche der RGS-Domäne deletiert sind, in die Untersuchungen mit eingeschlossen werden. Die Auswirkungen der verschiedenen Konstrukte auf Differenzierung, Proliferation und klonales Wachstum myeloischer Zellen könnten genauer untersucht werden. Da RGS2 in der Lage ist, den durch Flt3-ITD vermittelten Differenzierungsblock zu antagonisieren, wäre es außerdem interessant zu untersuchen, welcher Teil des Proteins für die Vermittlung dieser Funktion essenziell ist. Demzufolge könnten die RGS2-Deletionsmutationen in Flt3-ITD exprimierende 32D Zellen eingebracht werden und der Einfluss auf die oben genannten Prozesse untersucht werden. Des Weiteren könnte zusätzlich analysiert werden, welche Domäne von RGS2 wichtig ist, um die durch Flt3-ITD induzierten Signalwege, wie PI3-Kinase/GSK3 β und AKT, zu antagonisieren. Auf diese Art und Weise können die für unterschiedliche Funktionen von RGS2 wichtigen Domänen kartiert werden. Interessant wäre dabei vor allem die Untersuchung, ob die Differenzierung sowie die antitransformierenden Eigenschaften von RGS2 eventuell von unterschiedlichen Arealen des Proteins vermittelt werden.

Ein weiteres interessantes Thema für zukünftige Untersuchungen wäre eine genauere Analyse der bereits beschriebenen RGS2-knockout Mäuse (Oliveira-Dos-Santos et al. 2000). Diese Mäuse zeigen Defekte in der T-Zell Aktivierung sowie zentralnervöse Störungen, das hämatopoetische System wurde jedoch noch nicht weitergehend analysiert. Um herauszufinden, welche Rolle RGS2 bei der Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Zellen spielt, wäre eine Untersuchung dieser Mäuse erstrebenswert. Sofern es kein redundant funktionierendes RGS-Protein gibt, sind diese Mäuse ein exzellentes Modell, um den Einfluss von RGS2 auf die Hämatopoese zu untersuchen. Die Effekte der Deletionsmutanten könnten durch Reexpression in primären hämatopoetischen Zellen untersucht werden. Unter Umständen könnte dieser Ansatz jedoch Schwierigkeiten aufwerfen, da vermutlich für eine gesunde Hämatopoese die RGS2-Expression transkriptionell sehr fein gesteuert sein muss. Dies wäre nach viraler Reexpression der entsprechenden Konstrukte nicht mehr gegeben.

Letztlich könnten auch posttranslationale Effekte wie Phosphorylierung, Glykosylierung, Palmitoylierung etc. einen Einfluss auf die Lokalisation, DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität von RGS2 haben. Diese verschiedenen Effekte sind bislang noch

nicht eingehend untersucht worden, bieten aber unter Umständen Perspektiven zur Beeinflussung der Funktion von RGS2.

Ein interessanter Punkt für zukünftige Untersuchungen ist außerdem die Frage, ob sich die hier gewonnenen Erkenntnisse über die nukleäre Funktion von RGS2 therapeutisch nutzen lassen. Dazu müsste zunächst die Relevanz der zellulären Lokalisation und der nukleären Funktionen von RGS2 bei der Leukämieentstehung untersucht werden. Sofern sich zudem die genauen zellulären Mechanismen, die zur nukleären Lokalisation des Proteins führen, aufklären lassen, ist dies grundsätzlich denkbar. Möglicherweise könnte eine medikamentöse Beeinflussung der subzellulären Lokalisation von RGS2 in Kombination mit einer Chemotherapie oder Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren als differenzierende Therapie bei Leukämie-Patienten eingesetzt werden.

7 LITERATUR

- Adamson, R. H. and S. M. Seiber (1981). "Chemically induced leukemia in humans." Environ Health Perspect **39**: 93-103.
- Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I. L. Weissman (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-197.
- Antonson, P. and K. G. Xanthopoulos (1995). "Molecular cloning, sequence, and expression patterns of the human gene encoding CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP alpha)." Biochem Biophys Res Commun **215**(1): 106-113.
- Appleton, C. T., C. G. James and F. Beier (2006). "Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins differentially control chondrocyte differentiation." J Cell Physiol **207**(3): 735-745.
- Back, J., D. Allman, S. Chan and P. Kastner (2005). "Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis." Exp Hematol **33**(4): 395-402.
- Ballou, L. M., H. Y. Lin, G. Fan, Y. P. Jiang and R. Z. Lin (2003). "Activated G alpha q inhibits p110 alpha phosphatidylinositol 3-kinase and Akt." J Biol Chem **278**(26): 23472-23479.
- Bansal, G., K. M. Druey and Z. Xie (2007). "R4 RGS proteins: regulation of G-protein signaling and beyond." Pharmacol Ther **116**(3): 473-495.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., C. Erpelinck, J. Meijer, S. van Oosterhoud, W. L. van Putten, P. J. Valk, H. Berna Beverloo, D. G. Tenen, B. Lowenberg and R. Delwel (2003). "Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML." Hematol J **4**(1): 31-40.
- Bauer, P. H., S. Muller, M. Puzicha, S. Pippig, B. Obermaier, E. J. Helmreich and M. J. Lohse (1992). "Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator." Nature **358**(6381): 73-76.
- Beadling, C., K. M. Druey, G. Richter, J. H. Kehrl and K. A. Smith (1999). "Regulators of G protein signaling exhibit distinct patterns of gene expression and target G protein specificity in human lymphocytes." J Immunol **162**(5): 2677-2682.
- Becker, W. (1997). "Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland / Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany 1981-1990." Springer Verlag.
- Behre, G., S. M. Singh, H. Liu, L. T. Bortolin, M. Christopheit, H. S. Radomska, J. Rangatia, W. Hiddemann, A. D. Friedman and D. G. Tenen (2002). "Ras signaling enhances the activity of C/EBP alpha to induce granulocytic differentiation by phosphorylation of serine 248." J Biol Chem **277**(29): 26293-26299.
- Bennett, J. M., R. D. Brunning and J. W. Vardiman (2002). "Myelodysplastic syndromes: from French-American-British to World Health Organization: a commentary." Blood **99**(8): 3074-3075.
- Benzing, T., M. B. Yaffe, T. Arnould, L. Sellin, B. Schermer, B. Schilling, R. Schreiber, K. Kunzelmann, G. G. Leparc, E. Kim and G. Walz (2000). "14-3-3 interacts with regulator of G protein signaling proteins and modulates their activity." J Biol Chem **275**(36): 28167-28172.
- Bereshchenko, O., E. Mancini, S. Moore, D. Bilbao, R. Mansson, S. Luc, A. Grover, S. E. Jacobsen, D. Bryder and C. Nerlov (2009). "Hematopoietic stem cell expansion precedes the generation of committed myeloid leukemia-initiating cells in C/EBPalpha mutant AML." Cancer Cell **16**(5): 390-400.
- Berman, D. M., Y. Wang, Z. Liu, Q. Dong, L. A. Burke, L. A. Liotta, R. Fisher and X. Wu (2004). "A functional polymorphism in RGS6 modulates the risk of bladder cancer." Cancer Res **64**(18): 6820-6826.

- Bernstein, L. S., S. Ramineni, C. Hague, W. Cladman, P. Chidiac, A. I. Levey and J. R. Hepler (2004). "RGS2 binds directly and selectively to the M1 muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop to modulate Gq/11alpha signaling." *J Biol Chem* **279**(20): 21248-21256.
- Bhatia, S. and J. P. Neglia (1995). "Epidemiology of childhood acute myelogenous leukemia." *J Pediatr Hematol Oncol* **17**(2): 94-100.
- Birkenmeier, E. H., B. Gwynn, S. Howard, J. Jerry, J. I. Gordon, W. H. Landschulz and S. L. McKnight (1989). "Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein." *Genes Dev* **3**(8): 1146-1156.
- Burchett, S. A. (2003). "In through the out door: nuclear localization of the regulators of G protein signaling." *J Neurochem* **87**(3): 551-559.
- Burchett, S. A., M. L. Volk, M. J. Bannon and J. G. Granneman (1998). "Regulators of G protein signaling: rapid changes in mRNA abundance in response to amphetamine." *J Neurochem* **70**(5): 2216-2219.
- Burton, P. G., W. L. Lee, A. B. Nixon, E. G. Peralta and P. J. Casey (2001). "Phosphorylation and nuclear translocation of a regulator of G protein signaling (RGS10)." *J Biol Chem* **276**(35): 32828-32834.
- Caioli, R., A. Beghini, G. Grillo, G. Nadali, F. Elice, C. B. Ripamonti, P. Colapietro, M. Nichelatti, L. Pezzetti, M. Lunghi, A. Cuneo, A. Viola, F. Ferrara, M. Lazzarino, F. Rodeghiero, G. Pizzolo, L. Larizza and E. Morra (2006). "Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor leukemias: an Italian retrospective study." *Blood* **107**(9): 3463-3468.
- Calkhoven, C. F., C. Muller and A. Leutz (2000). "Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression." *Genes Dev* **14**(15): 1920-1932.
- Cammenga, J., S. Horn, U. Bergholz, G. Sommer, P. Besmer, W. Fiedler and C. Stocking (2005). "Extracellular KIT receptor mutants, commonly found in core binding factor AML, are constitutively active and respond to imatinib mesylate." *Blood* **106**(12): 3958-3961.
- Cancelas, J. A. and D. A. Williams (2009). "Rho GTPases in hematopoietic stem cell functions." *Curr Opin Hematol* **16**(4): 249-254.
- Cao, X., J. Qin, Y. Xie, O. Khan, F. Dowd, M. Scofield, M. F. Lin and Y. Tu (2006). "Regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) inhibits androgen-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells." *Oncogene* **25**(26): 3719-3734.
- Cao, Z., R. M. Umek and S. L. McKnight (1991). "Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells." *Genes Dev* **5**(9): 1538-1552.
- Care, R. S., P. J. Valk, A. C. Goodeve, F. M. Abu-Duhier, W. M. Geertsma-Kleinekoort, G. A. Wilson, M. A. Gari, I. R. Peake, B. Lowenberg and J. T. Reilly (2003). "Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias." *Br J Haematol* **121**(5): 775-777.
- Chan, R. K. and C. A. Otte (1982). "Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones." *Mol Cell Biol* **2**(1): 21-29.
- Chatterjee, T. K. and R. A. Fisher (2000a). "Cytoplasmic, nuclear, and golgi localization of RGS proteins. Evidence for N-terminal and RGS domain sequences as intracellular targeting motifs." *J Biol Chem* **275**(31): 24013-24021.
- Chatterjee, T. K. and R. A. Fisher (2000b). "Novel alternative splicing and nuclear localization of human RGS12 gene products." *J Biol Chem* **275**(38): 29660-29671.
- Chatterjee, T. K. and R. A. Fisher (2002). "RGS12TS-S localizes at nuclear matrix-associated subnuclear structures and represses transcription: structural requirements

- for subnuclear targeting and transcriptional repression." Mol Cell Biol **22**(12): 4334-4345.
- Chatterjee, T. K., Z. Liu and R. A. Fisher (2003). "Human RGS6 gene structure, complex alternative splicing, and role of N terminus and G protein gamma-subunit-like (GGL) domain in subcellular localization of RGS6 splice variants." J Biol Chem **278**(32): 30261-30271.
- Chen, C., H. Wang, C. W. Fong and S. C. Lin (2001). "Multiple phosphorylation sites in RGS16 differentially modulate its GAP activity." FEBS Lett **504**(1-2): 16-22.
- Chen, C., B. Zheng, J. Han and S. C. Lin (1997). "Characterization of a novel mammalian RGS protein that binds to Galpha proteins and inhibits pheromone signaling in yeast." J Biol Chem **272**(13): 8679-8685.
- Chen, C. K., J. Inglese, R. J. Lefkowitz and J. B. Hurley (1995). "Ca(2+)-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase." J Biol Chem **270**(30): 18060-18066.
- Cheng, Y. S., T. S. Lee, H. C. Hsu, Y. R. Kou and Y. L. Wu (2008). "Characterization of the transcriptional regulation of the regulator of G protein signaling 2 (RGS2) gene during 3T3-L1 preadipocyte differentiation." J Cell Biochem **105**(3): 922-930.
- Chou, P. Y. and G. D. Fasman (1974). "Prediction of protein conformation." Biochemistry **13**(2): 222-245.
- Chou, P. Y. and G. D. Fasman (1978a). "Empirical predictions of protein conformation." Annu Rev Biochem **47**: 251-276.
- Chou, P. Y. and G. D. Fasman (1978b). "Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **47**: 45-148.
- Christophe, D., C. Christophe-Hobertus and B. Pichon (2000). "Nuclear targeting of proteins: how many different signals?" Cell Signal **12**(5): 337-341.
- Christy, R. J., K. H. Kaestner, D. E. Geiman and M. D. Lane (1991). "CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(6): 2593-2597.
- Ciccarone, V. C., D. A. Polayes and V. A. Luckow (1998). "Generation of Recombinant Baculovirus DNA in E.coli Using a Baculovirus Shuttle Vector." Methods Mol Med **13**: 213-235.
- Cirillo, L. A., F. R. Lin, I. Cuesta, D. Friedman, M. Jarnik and K. S. Zaret (2002). "Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4." Mol Cell **9**(2): 279-289.
- Cunningham, M. L., G. L. Waldo, S. Hollinger, J. R. Hepler and T. K. Harden (2001). "Protein kinase C phosphorylates RGS2 and modulates its capacity for negative regulation of Galpha 11 signaling." J Biol Chem **276**(8): 5438-5444.
- D'Alo, F., L. M. Johansen, E. A. Nelson, H. S. Radomska, E. K. Evans, P. Zhang, C. Nerlov and D. G. Tenen (2003). "The amino terminal and E2F interaction domains are critical for C/EBP alpha-mediated induction of granulopoietic development of hematopoietic cells." Blood **102**(9): 3163-3171.
- Dahl, R., J. C. Walsh, D. Lancki, P. Laslo, S. R. Iyer, H. Singh and M. C. Simon (2003). "Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor." Nat Immunol **4**(10): 1029-1036.
- Dakic, A., D. Metcalf, L. Di Rago, S. Mifsud, L. Wu and S. L. Nutt (2005). "PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis." J Exp Med **201**(9): 1487-1502.
- Daub, H., F. U. Weiss, C. Wallasch and A. Ullrich (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." Nature **379**(6565): 557-560.
- Day, P. W., C. V. Carman, R. Sterne-Marr, J. L. Benovic and P. B. Wedegaertner (2003). "Differential interaction of GRK2 with members of the G alpha q family." Biochemistry **42**(30): 9176-9184.

- DeKoter, R. P. and H. Singh (2000). "Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1." *Science* **288**(5470): 1439-1441.
- Derrien, A. and K. M. Druey (2001). "RGS16 function is regulated by epidermal growth factor receptor-mediated tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* **276**(51): 48532-48538.
- Derrien, A., B. Zheng, J. L. Osterhout, Y. C. Ma, G. Milligan, M. G. Farquhar and K. M. Druey (2003). "Src-mediated RGS16 tyrosine phosphorylation promotes RGS16 stability." *J Biol Chem* **278**(18): 16107-16116.
- Dhanasekaran, N., S. T. Tsim, J. M. Dermott and D. Onesime (1998). "Regulation of cell proliferation by G proteins." *Oncogene* **17**(11 Reviews): 1383-1394.
- Ding, L., J. C. Mychaleckyj and A. N. Hegde (2007). "Full length cloning and expression analysis of splice variants of regulator of G-protein signaling RGS4 in human and murine brain." *Gene* **401**(1-2): 46-60.
- Dohlman, H. G. and J. Thorner (1997). "RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins." *J Biol Chem* **272**(7): 3871-3874.
- Dohner, K., R. F. Schlenk, M. Habdank, C. Scholl, F. G. Rucker, A. Corbacioglu, L. Bullinger, S. Frohling and H. Dohner (2005). "Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations." *Blood* **106**(12): 3740-3746.
- Dougherty, M. K. and D. K. Morrison (2004). "Unlocking the code of 14-3-3." *J Cell Sci* **117**(Pt 10): 1875-1884.
- Downing, J. R. (2003). "The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models." *Curr Opin Genet Dev* **13**(1): 48-54.
- Downward, J. (2004). "PI 3-kinase, Akt and cell survival." *Semin Cell Dev Biol* **15**(2): 177-182.
- Driggers, P. H., D. L. Ennist, S. L. Gleason, W. H. Mak, M. S. Marks, B. Z. Levi, J. R. Flanagan, E. Appella and K. Ozato (1990). "An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon-inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(10): 3743-3747.
- Druey, K. M., K. J. Blumer, V. H. Kang and J. H. Kehrl (1996). "Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family." *Nature* **379**(6567): 742-746.
- Dulin, N. O., P. Pratt, C. Tiruppathi, J. Niu, T. Voino-Yasenetskaya and M. J. Dunn (2000). "Regulator of G protein signaling RGS3T is localized to the nucleus and induces apoptosis." *J Biol Chem* **275**(28): 21317-21323.
- Falini, B., C. Mecucci, E. Tiacci, M. Alcalay, R. Rosati, L. Pasqualucci, R. La Starza, D. Diverio, E. Colombo, A. Santucci, B. Bigerna, R. Pacini, A. Pucciarini, A. Liso, M. Vignetti, P. Fazi, N. Meani, V. Pettrossi, G. Saglio, F. Mandelli, F. Lo-Coco, P. G. Pelicci and M. F. Martelli (2005). "Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype." *N Engl J Med* **352**(3): 254-266.
- Faurobert, E., C. K. Chen, J. B. Hurley and D. H. Teng (1996). "Drosophila neurocalcin, a fatty acylated, Ca²⁺-binding protein that associates with membranes and inhibits in vitro phosphorylation of bovine rhodopsin." *J Biol Chem* **271**(17): 10256-10262.
- Ferguson, S. S., W. E. Downey, 3rd, A. M. Colapietro, L. S. Barak, L. Menard and M. G. Caron (1996). "Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization." *Science* **271**(5247): 363-366.
- Friedman, A. D. and S. L. McKnight (1990). "Identification of two polypeptide segments of CCAAT/enhancer-binding protein required for transcriptional activation of the serum albumin gene." *Genes Dev* **4**(8): 1416-1426.

- Friedman, J. R. and K. H. Kaestner (2006). "The Foxa family of transcription factors in development and metabolism." *Cell Mol Life Sci* **63**(19-20): 2317-2328.
- Frohling, S., R. F. Schlenk, J. Breitruck, A. Benner, S. Kreitmeier, K. Tobis, H. Dohner and K. Dohner (2002). "Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm." *Blood* **100**(13): 4372-4380.
- Frohling, S., C. Scholl, D. G. Gilliland and R. L. Levine (2005). "Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications." *J Clin Oncol* **23**(26): 6285-6295.
- Germing, U., N. Gattermann, C. Strupp, M. Aivado and C. Aul (2000). "Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients." *Leuk Res* **24**(12): 983-992.
- Gilman, A. G. (1987). "G proteins: transducers of receptor-generated signals." *Annu Rev Biochem* **56**: 615-649.
- Gilman, A. G. (1995). "Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase." *Biosci Rep* **15**(2): 65-97.
- Gold, S. J., Y. G. Ni, H. G. Dohlman and E. J. Nestler (1997). "Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain." *J Neurosci* **17**(20): 8024-8037.
- Gombart, A. F., W. K. Hofmann, S. Kawano, S. Takeuchi, U. Krug, S. H. Kwok, R. J. Larsen, H. Asou, C. W. Miller, D. Hoelzer and H. P. Koeffler (2002). "Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias." *Blood* **99**(4): 1332-1340.
- Gottesman, M. M. and R. D. Fleischmann (1986). "The role of cAMP in regulating tumour cell growth." *Cancer Surv* **5**(2): 291-308.
- Grant, S. L., B. Lassegue, K. K. Griendling, M. Ushio-Fukai, P. R. Lyons and R. W. Alexander (2000). "Specific regulation of RGS2 messenger RNA by angiotensin II in cultured vascular smooth muscle cells." *Mol Pharmacol* **57**(3): 460-467.
- Gu, S., A. Anton, S. Salim, K. J. Blumer, C. W. Dessauer and S. P. Heximer (2008). "Alternative translation initiation of human regulators of G-protein signaling-2 yields a set of functionally distinct proteins." *Mol Pharmacol* **73**(1): 1-11.
- Gu, S., J. He, W. T. Ho, S. Ramineni, D. M. Thal, R. Natesh, J. J. Tesmer, J. R. Hepler and S. P. Heximer (2007). "Unique hydrophobic extension of the RGS2 amphipathic helix domain imparts increased plasma membrane binding and function relative to other RGS R4/B subfamily members." *J Biol Chem* **282**(45): 33064-33075.
- Guibal, F. C., M. Alberich-Jorda, H. Hirai, A. Ebralidze, E. Levantini, A. Di Ruscio, P. Zhang, B. A. Santana-Lemos, D. Neuberg, A. J. Wagers, E. M. Rego and D. G. Tenen (2009). "Identification of a myeloid committed progenitor as the cancer initiating cell in acute promyelocytic leukemia." *Blood*.
- Gurevich, V. V., S. B. Dion, J. J. Onorato, J. Ptasienski, C. M. Kim, R. Sterne-Marr, M. M. Hosey and J. L. Benovic (1995). "Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors." *J Biol Chem* **270**(2): 720-731.
- Haferlach, T., S. Schnittger, W. Kern, W. Hiddemann and C. Schoch (2004). "Genetic classification of acute myeloid leukemia (AML)." *Ann Hematol* **83 Suppl 1**: S97-100.
- Halmos, B., D. S. Basseres, S. Monti, F. D'Alo, T. Dayaram, K. Ferenczi, B. J. Wouters, C. S. Huettner, T. R. Golub and D. G. Tenen (2004). "A transcriptional profiling study of CCAAT/enhancer binding protein targets identifies hepatocyte nuclear

- factor 3 beta as a novel tumor suppressor in lung cancer." *Cancer Res* **64**(12): 4137-4147.
- Hart, M. J., X. Jiang, T. Kozasa, W. Roscoe, W. D. Singer, A. G. Gilman, P. C. Sternweis and G. Bollag (1998). "Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13." *Science* **280**(5372): 2112-2114.
- Hendricks-Taylor, L. R., L. L. Bachinski, M. J. Siciliano, A. Fertitta, B. Trask, P. J. de Jong, D. H. Ledbetter and G. J. Darlington (1992). "The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NF-IL6 (C/EBP beta) gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1." *Genomics* **14**(1): 12-17.
- Heo, K., S. H. Ha, Y. C. Chae, S. Lee, Y. S. Oh, Y. H. Kim, S. H. Kim, J. H. Kim, A. Mizoguchi, T. J. Itoh, H. M. Kwon, S. H. Ryu and P. G. Suh (2006). "RGS2 promotes formation of neurites by stimulating microtubule polymerization." *Cell Signal* **18**(12): 2182-2192.
- Heximer, S. P., A. D. Cristillo and D. R. Forsdyke (1997a). "Comparison of mRNA expression of two regulators of G-protein signaling, RGS1/BL34/1R20 and RGS2/G0S8, in cultured human blood mononuclear cells." *DNA Cell Biol* **16**(5): 589-598.
- Heximer, S. P., R. H. Knutsen, X. Sun, K. M. Kaltenbronn, M. H. Rhee, N. Peng, A. Oliveira-dos-Santos, J. M. Penninger, A. J. Muslin, T. H. Steinberg, J. M. Wyss, R. P. Mecham and K. J. Blumer (2003). "Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice." *J Clin Invest* **111**(8): 1259.
- Heximer, S. P., H. Lim, J. L. Bernard and K. J. Blumer (2001). "Mechanisms governing subcellular localization and function of human RGS2." *J Biol Chem* **276**(17): 14195-14203.
- Heximer, S. P., N. Watson, M. E. Linder, K. J. Blumer and J. R. Hepler (1997b). "RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gqalpha function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26): 14389-14393.
- Heyssel, R., A. B. Brill, L. A. Woodbury, E. T. Nishimura, T. Ghose, T. Hoshino and M. Yamasaki (1960). "Leukemia in Hiroshima atomic bomb survivors." *Blood* **15**: 313-331.
- Hock, H., M. J. Hamblen, H. M. Rooke, J. W. Schindler, S. Saleque, Y. Fujiwara and S. H. Orkin (2004). "Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells." *Nature* **431**(7011): 1002-1007.
- Hock, H., M. J. Hamblen, H. M. Rooke, D. Traver, R. T. Bronson, S. Cameron and S. H. Orkin (2003). "Intrinsic requirement for zinc finger transcription factor Gfi-1 in neutrophil differentiation." *Immunity* **18**(1): 109-120.
- Hock, H. and S. H. Orkin (2006). "Zinc-finger transcription factor Gfi-1: versatile regulator of lymphocytes, neutrophils and hematopoietic stem cells." *Curr Opin Hematol* **13**(1): 1-6.
- Hoffman, G. A., T. R. Garrison and H. G. Dohlman (2000). "Endoproteolytic processing of Sst2, a multidomain regulator of G protein signaling in yeast." *J Biol Chem* **275**(48): 37533-37541.
- Hollinger, S., J. B. Taylor, E. H. Goldman and J. R. Hepler (2001). "RGS14 is a bifunctional regulator of Galphai/o activity that exists in multiple populations in brain." *J Neurochem* **79**(5): 941-949.
- Holtshcke, T., J. Lohler, Y. Kanno, T. Fehr, N. Giese, F. Rosenbauer, J. Lou, K. P. Knobloch, L. Gabriele, J. F. Waring, M. F. Bachmann, R. M. Zinkernagel, H. C. Morse, 3rd, K. Ozato and I. Horak (1996). "Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene." *Cell* **87**(2): 307-317.

- Hong, J. X., G. L. Wilson, C. H. Fox and J. H. Kehrl (1993). "Isolation and characterization of a novel B cell activation gene." *J Immunol* **150**(9): 3895-3904.
- Howes, A. L., J. F. Arthur, T. Zhang, S. Miyamoto, J. W. Adams, G. W. Dorn, 2nd, E. A. Woodcock and J. H. Brown (2003). "Akt-mediated cardiomyocyte survival pathways are compromised by G alpha q-induced phosphoinositide 4,5-bisphosphate depletion." *J Biol Chem* **278**(41): 40343-40351.
- Hurowitz, E. H., J. M. Melnyk, Y. J. Chen, H. Kouros-Mehr, M. I. Simon and H. Shizuya (2000). "Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes." *DNA Res* **7**(2): 111-120.
- Hurst, J. H., N. Mendpara and S. B. Hooks (2009). "Regulator of G-protein signalling expression and function in ovarian cancer cell lines." *Cell Mol Biol Lett* **14**(1): 153-174.
- Ikeda, M., M. Hirokawa, N. Satani, T. Kinoshita, Y. Watanabe, H. Inoue, S. Tone, T. Ishikawa and Y. Minatogawa (2001). "Molecular cloning and characterization of a steroid receptor-binding regulator of G-protein signaling protein cDNA." *Gene* **273**(2): 207-214.
- Imagawa, M., T. Tsuchiya and T. Nishihara (1999). "Identification of inducible genes at the early stage of adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells." *Biochem Biophys Res Commun* **254**(2): 299-305.
- Ingi, T., A. M. Krumins, P. Chidiac, G. M. Brothers, S. Chung, B. E. Snow, C. A. Barnes, A. A. Lanahan, D. P. Siderovski, E. M. Ross, A. G. Gilman and P. F. Worley (1998). "Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity." *J Neurosci* **18**(18): 7178-7188.
- Inoue-Mochita, M., T. Inoue, D. L. Epstein, K. J. Blumer and P. V. Rao (2009). "RGS2-deficient mice exhibit decreased intraocular pressure and increased retinal ganglion cell survival." *Mol Vis* **15**: 495-504.
- Irvine, R. F. (2003). "Nuclear lipid signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(5): 349-360.
- Ishimaru, T., M. Otake and M. Ischimaru (1979). "Dose-response relationship of neutrons and gamma rays to leukemia incidence among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki by type of leukemia, 1950-1971." *Radiat Res* **77**(2): 377-394.
- Iwasaki, H., C. Somoza, H. Shigematsu, E. A. Duprez, J. Iwasaki-Arai, S. Mizuno, Y. Arinobu, K. Geary, P. Zhang, T. Dayaram, M. L. Fenyus, S. Elf, S. Chan, P. Kastner, C. S. Huettner, R. Murray, D. G. Tenen and K. Akashi (2005). "Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation." *Blood* **106**(5): 1590-1600.
- James, C. G., C. T. Appleton, V. Ulici, T. M. Underhill and F. Beier (2005). "Microarray analyses of gene expression during chondrocyte differentiation identifies novel regulators of hypertrophy." *Mol Biol Cell* **16**(11): 5316-5333.
- Jiang, Z., Z. Wang, Y. Xu, B. Wang, W. Huang and S. Cai (2010). "Analysis of RGS2 expression and prognostic significance in stage II and III colorectal cancer." *Biosci Rep* **30**(6): 383-390.
- Johansen, L. M., A. Iwama, T. A. Lodie, K. Sasaki, D. W. Felsher, T. R. Golub and D. G. Tenen (2001). "c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis." *Mol Cell Biol* **21**(11): 3789-3806.
- Johnson, P. F. (2005). "Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors." *J Cell Sci* **118**(Pt 12): 2545-2555.
- Jones, S. (2004). "An overview of the basic helix-loop-helix proteins." *Genome Biol* **5**(6): 226.
- Kaestner, K. H. (2000). "The hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3 or FOXA) family in metabolism." *Trends Endocrinol Metab* **11**(7): 281-285.

- Kalinec, G., A. J. Nazarali, S. Hermouet, N. Xu and J. S. Gutkind (1992). "Mutated alpha subunit of the Gq protein induces malignant transformation in NIH 3T3 cells." *Mol Cell Biol* **12**(10): 4687-4693.
- Karsunky, H., I. Mende, T. Schmidt and T. Moroy (2002). "High levels of the onco-protein Gfi-1 accelerate T-cell proliferation and inhibit activation induced T-cell death in Jurkat T-cells." *Oncogene* **21**(10): 1571-1579.
- Kelly, L. M. and D. G. Gilliland (2002). "Genetics of myeloid leukemias." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**: 179-198.
- Kimple, R. J., M. E. Kimple, L. Betts, J. Sondek and D. P. Siderovski (2002). "Structural determinants for GoLoco-induced inhibition of nucleotide release by Galpha subunits." *Nature* **416**(6883): 878-881.
- Klemsz, M. J., S. R. McKercher, A. Celada, C. Van Beveren and R. A. Maki (1990). "The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene." *Cell* **61**(1): 113-124.
- Knuppel, R., P. Dietze, W. Lehnberg, K. Frech and E. Wingender (1994). "TRANSFAC retrieval program: a network model database of eukaryotic transcription regulating sequences and proteins." *J Comput Biol* **1**(3): 191-198.
- Koelle, M. R. and H. R. Horvitz (1996). "EGL-10 regulates G protein signaling in the C. elegans nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins." *Cell* **84**(1): 115-125.
- Kottaridis, P. D., R. E. Gale, M. E. Frew, G. Harrison, S. E. Langabeer, A. A. Belton, H. Walker, K. Wheatley, D. T. Bowen, A. K. Burnett, A. H. Goldstone and D. C. Linch (2001). "The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials." *Blood* **98**(6): 1752-1759.
- Kozasa, T., X. Jiang, M. J. Hart, P. M. Sternweis, W. D. Singer, A. G. Gilman, G. Bollag and P. C. Sternweis (1998). "p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13." *Science* **280**(5372): 2109-2111.
- Lantz, K. A., M. Z. Vatamaniuk, J. E. Brestelli, J. R. Friedman, F. M. Matschinsky and K. H. Kaestner (2004). "Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion." *J Clin Invest* **114**(4): 512-520.
- Lee, C. S., J. R. Friedman, J. T. Fulmer and K. H. Kaestner (2005a). "The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors." *Nature* **435**(7044): 944-947.
- Lee, C. S., N. J. Sund, R. Behr, P. L. Herrera and K. H. Kaestner (2005b). "Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic alpha-cells." *Dev Biol* **278**(2): 484-495.
- Legraverend, C., P. Antonson, P. Flodby and K. G. Xanthopoulos (1993). "High level activity of the mouse CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene promoter involves autoregulation and several ubiquitous transcription factors." *Nucleic Acids Res* **21**(8): 1735-1742.
- Leone, G., L. Mele, A. Pulsoni, F. Equitani and L. Pagano (1999). "The incidence of secondary leukemias." *Haematologica* **84**(10): 937-945.
- Leroy, H., C. Roumier, P. Huyghe, V. Biggio, P. Fenaux and C. Preudhomme (2005). "CEBPA point mutations in hematological malignancies." *Leukemia* **19**(3): 329-334.
- Lin, F. T., O. A. MacDougald, A. M. Diehl and M. D. Lane (1993). "A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9606-9610.
- Luckow, V. A., S. C. Lee, G. F. Barry and P. O. Olins (1993). "Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion

- of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*." J Virol **67**(8): 4566-4579.
- Lutz, S., A. Shankaranarayanan, C. Coco, M. Ridilla, M. R. Nance, C. Vettel, D. Baltus, C. R. Evelyn, R. R. Neubig, T. Wieland and J. J. Tesmer (2007). "Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs." Science **318**(5858): 1923-1927.
- Matys, V., O. V. Kel-Margoulis, E. Fricke, I. Liebich, S. Land, A. Barre-Dirrie, I. Reuter, D. Chekmenev, M. Krull, K. Hornischer, N. Voss, P. Stegmaier, B. Lewicki-Potapov, H. Saxel, A. E. Kel and E. Wingender (2006). "TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D108-110.
- McCulloch, E. A. (1985). "Normal stem cells and the clonal hemopathies." Prog Clin Biol Res **184**: 21-38.
- McKercher, S. R., B. E. Torbett, K. L. Anderson, G. W. Henkel, D. J. Vestal, H. Baribault, M. Klemsz, A. J. Feeney, G. E. Wu, C. J. Paige and R. A. Maki (1996). "Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities." Embo J **15**(20): 5647-5658.
- Michels, S. D., R. W. McKenna, D. C. Arthur and R. D. Brunning (1985). "Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a clinical and morphologic study of 65 cases." Blood **65**(6): 1364-1372.
- Mikkola, H. K., J. Klintman, H. Yang, H. Hock, T. M. Schlaeger, Y. Fujiwara and S. H. Orkin (2003). "Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene." Nature **421**(6922): 547-551.
- Miller, J. R., A. M. Hocking, J. D. Brown and R. T. Moon (1999). "Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways." Oncogene **18**(55): 7860-7872.
- Mizuki, M., R. Fenski, H. Halfter, I. Matsumura, R. Schmidt, C. Muller, W. Gruning, K. Kratz-Albers, S. Serve, C. Steur, T. Buchner, J. Kienast, Y. Kanakura, W. E. Berdel and H. Serve (2000). "Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways." Blood **96**(12): 3907-3914.
- Mizuki, M., J. Schwable, C. Steur, C. Choudhary, S. Agrawal, B. Sargin, B. Steffen, I. Matsumura, Y. Kanakura, F. D. Bohmer, C. Muller-Tidow, W. E. Berdel and H. Serve (2003). "Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations." Blood **101**(8): 3164-3173.
- Mrozek, K., K. Heinonen, A. de la Chapelle and C. D. Bloomfield (1997). "Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia." Semin Oncol **24**(1): 17-31.
- Mrozek, K., G. Marcucci, P. Paschka, S. P. Whitman and C. D. Bloomfield (2007). "Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification?" Blood **109**(2): 431-448.
- Mueller, B. U. and T. Pabst (2006). "C/EBPalpha and the pathophysiology of acute myeloid leukemia." Curr Opin Hematol **13**(1): 7-14.
- Muller, C., C. F. Calkhoven, X. Sha and A. Leutz (2004). "The CCAAT enhancer-binding protein alpha (C/EBPalpha) requires a SWI/SNF complex for proliferation arrest." J Biol Chem **279**(8): 7353-7358.
- Murre, C., P. S. McCaw and D. Baltimore (1989). "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins." Cell **56**(5): 777-783.
- Nair, R., P. Carter and B. Rost (2003). "NLSdb: database of nuclear localization signals." Nucleic Acids Res **31**(1): 397-399.

- Neer, E. J. (1995). "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals." Cell **80**(2): 249-257.
- Nerlov, C. (2004). "C/EBPalpha mutations in acute myeloid leukaemias." Nat Rev Cancer **4**(5): 394-400.
- Nerlov, C. and E. B. Ziff (1995). "CCAAT/enhancer binding protein-alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells." Embo J **14**(17): 4318-4328.
- Neubig, R. R. and D. P. Siderovski (2002). "Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets." Nat Rev Drug Discov **1**(3): 187-197.
- Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar (2002). "G protein pathways." Science **296**(5573): 1636-1639.
- Nguyen, C. H., H. Ming, P. Zhao, L. Hugendubler, R. Gros, S. R. Kimball and P. Chidiac (2009). "Translational control by RGS2." J Cell Biol **186**(5): 755-765.
- Nishizuka, M., K. Honda, T. Tsuchiya, T. Nishihara and M. Imagawa (2001). "RGS2 promotes adipocyte differentiation in the presence of ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma." J Biol Chem **276**(32): 29625-29627.
- Nosslinger, T., R. Reisner, E. Koller, H. Gruner, H. Tuchler, H. Nowotny, E. Pittermann and M. Pfeilstocker (2001). "Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization: comparison of classifications on 431 unselected patients from a single institution." Blood **98**(10): 2935-2941.
- Nunn, C., M. X. Zou, A. J. Sobiesiak, A. A. Roy, L. A. Kirshenbaum and P. Chidiac "RGS2 inhibits beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy." Cell Signal **22**(8): 1231-1239.
- Nutt, S. L., D. Metcalf, A. D'Amico, M. Polli and L. Wu (2005). "Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors." J Exp Med **201**(2): 221-231.
- Odom, D. T., R. D. Dowell, E. S. Jacobsen, L. Nekludova, P. A. Rolfe, T. W. Danford, D. K. Gifford, E. Fraenkel, G. I. Bell and R. A. Young (2006). "Core transcriptional regulatory circuitry in human hepatocytes." Mol Syst Biol **2**: 2006 0017.
- Ogier-Denis, E., S. Pattingre, J. El Benna and P. Codogno (2000). "Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells." J Biol Chem **275**(50): 39090-39095.
- Okuda, T., J. van Deursen, S. W. Hiebert, G. Grosveld and J. R. Downing (1996). "AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis." Cell **84**(2): 321-330.
- Oliveira-Dos-Santos, A. J., G. Matsumoto, B. E. Snow, D. Bai, F. P. Houston, I. Q. Whishaw, S. Mariathasan, T. Sasaki, A. Wakeham, P. S. Ohashi, J. C. Roder, C. A. Barnes, D. P. Siderovski and J. M. Penninger (2000). "Regulation of T cell activation, anxiety, and male aggression by RGS2." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12272-12277.
- Osborne, S. L., C. L. Thomas, S. Gschmeissner and G. Schiavo (2001). "Nuclear PtdIns(4,5)P2 assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing." J Cell Sci **114**(Pt 13): 2501-2511.
- Ossipow, V., P. Descombes and U. Schibler (1993). "CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 8219-8223.
- Pabst, T., B. U. Mueller, N. Harakawa, C. Schoch, T. Haferlach, G. Behre, W. Hiddemann, D. E. Zhang and D. G. Tenen (2001a). "AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia." Nat Med **7**(4): 444-451.

- Pabst, T., B. U. Mueller, P. Zhang, H. S. Radomska, S. Narravula, S. Schnittger, G. Behre, W. Hiddemann and D. G. Tenen (2001b). "Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia." *Nat Genet* **27**(3): 263-270.
- Passegue, E., W. Jochum, M. Schorpp-Kistner, U. Mohle-Steinlein and E. F. Wagner (2001). "Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage." *Cell* **104**(1): 21-32.
- Patel, T. B. (2004). "Single transmembrane spanning heterotrimeric G protein-coupled receptors and their signaling cascades." *Pharmacol Rev* **56**(3): 371-385.
- Patel, T. B., Z. Du, S. Pierre, L. Cartin and K. Scholich (2001). "Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function." *Gene* **269**(1-2): 13-25.
- Pedersen, T. A., E. Kowenz-Leutz, A. Leutz and C. Nerlov (2001). "Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation." *Genes Dev* **15**(23): 3208-3216.
- Penta, K. and S. T. Sawyer (1995). "Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation, nuclear translocation, and DNA binding of STAT1 and STAT5 in erythroid cells." *J Biol Chem* **270**(52): 31282-31287.
- Pobel, D. and J. F. Viel (1997). "Case-control study of leukaemia among young people near La Hague nuclear reprocessing plant: the environmental hypothesis revisited." *Bmj* **314**(7074): 101-106.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." *Genes Dev* **14**(15): 1837-1851.
- Pollock, R. and R. Treisman (1990). "A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities." *Nucleic Acids Res* **18**(21): 6197-6204.
- Porse, B. T., D. Bryder, K. Theilgaard-Monch, M. S. Hasemann, K. Anderson, I. Damgaard, S. E. Jacobsen and C. Nerlov (2005). "Loss of C/EBP alpha cell cycle control increases myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage." *J Exp Med* **202**(1): 85-96.
- Porse, B. T., T. A. Pedersen, X. Xu, B. Lindberg, U. M. Wewer, L. Friis-Hansen and C. Nerlov (2001). "E2F repression by C/EBPalpha is required for adipogenesis and granulopoiesis in vivo." *Cell* **107**(2): 247-258.
- Premont, R. T., J. Inglese and R. J. Lefkowitz (1995). "Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors." *FASEB J* **9**(2): 175-182.
- Preudhomme, C., C. Sagot, N. Boissel, J. M. Cayuela, I. Tigaud, S. de Botton, X. Thomas, E. Raffoux, C. Lamandin, S. Castaigne, P. Fenaux and H. Dombret (2002). "Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA)." *Blood* **100**(8): 2717-2723.
- Prosper, F. and C. M. Verfaillie (2001). "Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors." *J Leukoc Biol* **69**(3): 307-316.
- Pruitt, K. and C. J. Der (2001). "Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis." *Cancer Lett* **171**(1): 1-10.
- Qian, X. and R. H. Costa (1995). "Analysis of hepatocyte nuclear factor-3 beta protein domains required for transcriptional activation and nuclear targeting." *Nucleic Acids Res* **23**(7): 1184-1191.
- Radeff-Huang, J., T. M. Seasholtz, R. G. Matteo and J. H. Brown (2004). "G protein mediated signaling pathways in lysophospholipid induced cell proliferation and survival." *J Cell Biochem* **92**(5): 949-966.
- Radomska, H. S., C. S. Huettner, P. Zhang, T. Cheng, D. T. Scadden and D. G. Tenen (1998). "CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors." *Mol Cell Biol* **18**(7): 4301-4314.

- Reddy, V. A., A. Iwama, G. Iotzova, M. Schulz, A. Elsassner, R. K. Vangala, D. G. Tenen, W. Hiddemann and G. Behre (2002). "Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions." Blood **100**(2): 483-490.
- Rosenbauer, F., B. M. Owens, L. Yu, J. R. Tumang, U. Steidl, J. L. Kutok, L. K. Clayton, K. Wagner, M. Scheller, H. Iwasaki, C. Liu, B. Hackanson, K. Akashi, A. Leutz, T. L. Rothstein, C. Plass and D. G. Tenen (2006). "Lymphoid cell growth and transformation are suppressed by a key regulatory element of the gene encoding PU.1." Nat Genet **38**(1): 27-37.
- Rosenbauer, F. and D. G. Tenen (2007). "Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation." Nat Rev Immunol **7**(2): 105-117.
- Rosenbauer, F., K. Wagner, J. L. Kutok, H. Iwasaki, M. M. Le Beau, Y. Okuno, K. Akashi, S. Fiering and D. G. Tenen (2004). "Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1." Nat Genet **36**(6): 624-630.
- Rosenwald, I. B., D. B. Rhoads, L. D. Callanan, K. J. Isselbacher and E. V. Schmidt (1993). "Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6175-6178.
- Ross, E. M. and T. M. Wilkie (2000). "GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins." Annu Rev Biochem **69**: 795-827.
- Rowley, J. D. (1998). "The critical role of chromosome translocations in human leukemias." Annu Rev Genet **32**: 495-519.
- Roy, A. A., K. E. Lemberg and P. Chidiac (2003). "Recruitment of RGS2 and RGS4 to the plasma membrane by G proteins and receptors reflects functional interactions." Mol Pharmacol **64**(3): 587-593.
- Roy, A. A., C. Nunn, H. Ming, M. X. Zou, J. Penninger, L. A. Kirshenbaum, S. J. Dixon and P. Chidiac (2006). "Up-regulation of endogenous RGS2 mediates cross-desensitization between Gs and Gq signaling in osteoblasts." J Biol Chem **281**(43): 32684-32693.
- Saitoh, O., Y. Murata, M. Odagiri, M. Itoh, H. Itoh, T. Misaka and Y. Kubo (2002). "Alternative splicing of RGS8 gene determines inhibitory function of receptor type-specific Gq signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10138-10143.
- Salim, S., S. Sinnarajah, J. H. Kehrl and C. W. Dessauer (2003). "Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites." J Biol Chem **278**(18): 15842-15849.
- Sambrook, T. D. (1998). "Does visual perspective matter in imitation?" Perception **27**(12): 1461-1473.
- Scheller, M., J. Foerster, C. M. Heyworth, J. F. Waring, J. Lohler, G. L. Gilmore, R. K. Shadduck, T. M. Dexter and I. Horak (1999). "Altered development and cytokine responses of myeloid progenitors in the absence of transcription factor, interferon consensus sequence binding protein." Blood **94**(11): 3764-3771.
- Schnittger, S., T. M. Kohl, T. Haferlach, W. Kern, W. Hiddemann, K. Spiekermann and C. Schoch (2006). "KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival." Blood **107**(5): 1791-1799.
- Schnittger, S., C. Schoch, W. Kern, C. Mecucci, C. Tschulik, M. F. Martelli, T. Haferlach, W. Hiddemann and B. Falini (2005). "Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype." Blood **106**(12): 3733-3739.
- Schoch, C., T. Haferlach, D. Haase, C. Fonatsch, H. Löffler, B. Schlegelberger, P. Staib, M. C. Sauerland, A. Heinecke, T. Buchner and W. Hiddemann (2001a). "Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor

- prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients." *Br J Haematol* **112**(1): 118-126.
- Schoch, C., W. Kern, P. Krawitz, M. Dugas, S. Schnittger, T. Haferlach and W. Hiddemann (2001b). "Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype." *Blood* **98**(12): 3500.
- Schoch, C., W. Kern, S. Schnittger, T. Buchner, W. Hiddemann and T. Haferlach (2004). "The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups." *Haematologica* **89**(9): 1082-1090.
- Schoeber, J. P., C. N. Topala, X. Wang, R. J. Diepens, T. T. Lambers, J. G. Hoenderop and R. J. Bindels (2006). "RGS2 inhibits the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6." *J Biol Chem* **281**(40): 29669-29674.
- Schramm, M. and Z. Selinger (1984). "Message transmission: receptor controlled adenylate cyclase system." *Science* **225**(4668): 1350-1356.
- Schwable, J., C. Choudhary, C. Thiede, L. Tickenbrock, B. Sargin, C. Steur, M. Rehage, A. Rudat, C. Brandts, W. E. Berdel, C. Muller-Tidow and H. Serve (2005). "RGS2 is an important target gene of Flt3-ITD mutations in AML and functions in myeloid differentiation and leukemic transformation." *Blood* **105**(5): 2107-2114.
- Scott, E. W., M. C. Simon, J. Anastasi and H. Singh (1994). "Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages." *Science* **265**(5178): 1573-1577.
- Semplicini, A., L. Lenzini, M. Sartori, I. Papparella, L. A. Calo, E. Pagnin, G. Strapazzon, C. Benna, R. Costa, A. Avogaro, G. Ceolotto and A. C. Pessina (2006). "Reduced expression of regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) in hypertensive patients increases calcium mobilization and ERK1/2 phosphorylation induced by angiotensin II." *J Hypertens* **24**(6): 1115-1124.
- Severson, R. K., S. Davis, L. Heuser, J. R. Daling and D. B. Thomas (1990). "Cigarette smoking and acute nonlymphocytic leukemia." *Am J Epidemiol* **132**(3): 418-422.
- Shen, W., L. M. Scarce, J. E. Brestelli, N. J. Sund and K. H. Kaestner (2001). "Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3gamma) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast." *J Biol Chem* **276**(46): 42812-42817.
- Shivdasani, R. A., E. L. Mayer and S. H. Orkin (1995). "Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncogene tal-1/SCL." *Nature* **373**(6513): 432-434.
- Siderovski, D. P., M. Diverse-Pierluissi and L. De Vries (1999). "The GoLoco motif: a Galphai/o binding motif and potential guanine-nucleotide exchange factor." *Trends Biochem Sci* **24**(9): 340-341.
- Siderovski, D. P., S. P. Heximer and D. R. Forsdyke (1994). "A human gene encoding a putative basic helix-loop-helix phosphoprotein whose mRNA increases rapidly in cycloheximide-treated blood mononuclear cells." *DNA Cell Biol* **13**(2): 125-147.
- Siderovski, D. P. and F. S. Willard (2005). "The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits." *Int J Biol Sci* **1**(2): 51-66.
- Sinnarajah, S., C. W. Dessauer, D. Srikumar, J. Chen, J. Yuen, S. Yilma, J. C. Dennis, E. E. Morrison, V. Vodyanoy and J. H. Kehrl (2001). "RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III." *Nature* **409**(6823): 1051-1055.
- Smalley, M. J., M. Iravani, M. Leao, A. Grigoriadis, H. Kendrick, T. Dexter, K. Fenwick, J. L. Regan, K. Britt, S. McDonald, C. J. Lord, A. Mackay and A. Ashworth (2007). "Regulator of G-protein signalling 2 mRNA is differentially expressed in mammary epithelial subpopulations and over-expressed in the majority of breast cancers." *Breast Cancer Res* **9**(6): R85.

- Snow, B. E., A. M. Krumins, G. M. Brothers, S. F. Lee, M. A. Wall, S. Chung, J. Mangion, S. Arya, A. G. Gilman and D. P. Siderovski (1998). "A G protein gamma subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding to Gbeta5 subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13307-13312.
- Soundararajan, M., F. S. Willard, A. J. Kimple, A. P. Turnbull, L. J. Ball, G. A. Schoch, C. Gileadi, O. Y. Fedorov, E. F. Dowler, V. A. Higman, S. Q. Hutsell, M. Sundstrom, D. A. Doyle and D. P. Siderovski (2008). "Structural diversity in the RGS domain and its interaction with heterotrimeric G protein alpha-subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(17): 6457-6462.
- Stryer, L. and H. R. Bourne (1986). "G proteins: a family of signal transducers." *Annu Rev Cell Biol* **2**: 391-419.
- Su, A. I., M. P. Cooke, K. A. Ching, Y. Hakak, J. R. Walker, T. Wiltshire, A. P. Orth, R. G. Vega, L. M. Sapinoso, A. Moqrich, A. Patapoutian, G. M. Hampton, P. G. Schultz and J. B. Hogenesch (2002). "Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4465-4470.
- Suzuki, T., H. Kiyoi, K. Ozeki, A. Tomita, S. Yamaji, R. Suzuki, Y. Kodera, S. Miyawaki, N. Asou, K. Kuriyama, F. Yagasaki, C. Shimazaki, H. Akiyama, M. Nishimura, T. Motoji, K. Shinagawa, A. Takeshita, R. Ueda, T. Kinoshita, N. Emi and T. Naoe (2005). "Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia." *Blood* **106**(8): 2854-2861.
- Tallman, M. S., D. G. Gilliland and J. M. Rowe (2005). "Drug therapy for acute myeloid leukemia." *Blood* **106**(4): 1154-1163.
- Tamirisa, P., K. J. Blumer and A. J. Muslin (1999). "RGS4 inhibits G-protein signaling in cardiomyocytes." *Circulation* **99**(3): 441-447.
- Tamura, T., T. Nagamura-Inoue, Z. Shmeltzer, T. Kuwata and K. Ozato (2000). "ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages." *Immunity* **13**(2): 155-165.
- Tang, K. M., G. R. Wang, P. Lu, R. H. Karas, M. Aronovitz, S. P. Heximer, K. M. Kaltenbronn, K. J. Blumer, D. P. Siderovski, Y. Zhu and M. E. Mendelsohn (2003). "Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure." *Nat Med* **9**(12): 1506-1512.
- Tenen, D. G. (2003). "Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way." *Nat Rev Cancer* **3**(2): 89-101.
- Tenen, D. G., R. Hromas, J. D. Licht and D. E. Zhang (1997). "Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia." *Blood* **90**(2): 489-519.
- Thiede, C., C. Steudel, B. Mohr, M. Schaich, U. Schakel, U. Platzbecker, M. Wermke, M. Bornhauser, M. Ritter, A. Neubauer, G. Ehninger and T. Illmer (2002). "Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis." *Blood* **99**(12): 4326-4335.
- Thirunavukkarasu, K., D. L. Halladay, R. R. Miles, C. D. Geringer and J. E. Onyia (2002). "Analysis of regulator of G-protein signaling-2 (RGS-2) expression and function in osteoblastic cells." *J Cell Biochem* **85**(4): 837-850.
- Tikhonova, I. G., C. Boulegue, I. Langer and D. Fourmy (2006). "Modeled structure of the whole regulator G-protein signaling-2." *Biochem Biophys Res Commun* **341**(3): 715-720.
- Timchenko, N., D. R. Wilson, L. R. Taylor, S. Abdelsayed, M. Wilde, M. Sawadogo and G. J. Darlington (1995). "Autoregulation of the human C/EBP alpha gene by stimulation of upstream stimulatory factor binding." *Mol Cell Biol* **15**(3): 1192-1202.

- Timchenko, N. A., M. Wilde and G. J. Darlington (1999). "C/EBPalpha regulates formation of S-phase-specific E2F-p107 complexes in livers of newborn mice." Mol Cell Biol **19**(4): 2936-2945.
- Timchenko, N. A., M. Wilde, M. Nakanishi, J. R. Smith and G. J. Darlington (1996). "CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein." Genes Dev **10**(7): 804-815.
- Traver, S., C. Bidot, N. Spassky, T. Baltauss, M. F. De Tand, J. L. Thomas, B. Zalc, I. Janoueix-Lerosey and J. D. Gunzburg (2000). "RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of galphao." Biochem J **350 Pt 1**: 19-29.
- Tseng, C. C. and X. Y. Zhang (1998). "Role of regulator of G protein signaling in desensitization of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor." Endocrinology **139**(11): 4470-4475.
- Umek, R. M., A. D. Friedman and S. L. McKnight (1991). "CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch." Science **251**(4991): 288-292.
- Valk, P. J., D. T. Bowen, M. E. Frew, A. C. Goodeve, B. Lowenberg and J. T. Reilly (2004). "Second hit mutations in the RTK/RAS signaling pathway in acute myeloid leukemia with inv(16)." Haematologica **89**(1): 106.
- Vara Prasad, M. V., S. K. Shore and N. Dhanasekaran (1994). "Activated mutant of G alpha 13 induces Egr-1, c-fos, and transformation in NIH 3T3 cells." Oncogene **9**(8): 2425-2429.
- Vardiman, J. W., N. L. Harris and R. D. Brunning (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." Blood **100**(7): 2292-2302.
- Verhaak, R. G., C. S. Goudswaard, W. van Putten, M. A. Bijl, M. A. Sanders, W. Hagens, A. G. Uitterlinden, C. A. Erpelinck, R. Delwel, B. Lowenberg and P. J. Valk (2005). "Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance." Blood **106**(12): 3747-3754.
- von Blume, J., U. Knippschild, F. Dequiedt, G. Giamas, A. Beck, A. Auer, J. Van Lint, G. Adler and T. Seufferlein (2007). "Phosphorylation at Ser244 by CK1 determines nuclear localization and substrate targeting of PKD2." Embo J **26**(22): 4619-4633.
- Wan, H., S. Dingle, Y. Xu, V. Besnard, K. H. Kaestner, S. L. Ang, S. Wert, M. T. Stahlman and J. A. Whitsett (2005). "Compensatory roles of Foxa1 and Foxa2 during lung morphogenesis." J Biol Chem **280**(14): 13809-13816.
- Wang, H., P. Iakova, M. Wilde, A. Welm, T. Goode, W. J. Roesler and N. A. Timchenko (2001). "C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4." Mol Cell **8**(4): 817-828.
- Wang, X., W. Zeng, A. A. Soyombo, W. Tang, E. M. Ross, A. P. Barnes, S. L. Milgram, J. M. Penninger, P. B. Allen, P. Greengard and S. Muallem (2005). "Spinophilin regulates Ca²⁺ signalling by binding the N-terminal domain of RGS2 and the third intracellular loop of G-protein-coupled receptors." Nat Cell Biol **7**(4): 405-411.
- Weinstein, H. J. (1978). "Congenital leukaemia and the neonatal myeloproliferative disorders associated with Down's syndrome." Clin Haematol **7**(1): 147-154.
- Wettschureck, N. and S. Offermanns (2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." Physiol Rev **85**(4): 1159-1204.
- Whitman, S. P., K. J. Archer, L. Feng, C. Baldus, B. Becknell, B. D. Carlson, A. J. Carroll, K. Mrozek, J. W. Vardiman, S. L. George, J. E. Kolitz, R. A. Larson, C. D. Bloomfield and M. A. Caligiuri (2001). "Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study." Cancer Res **61**(19): 7233-7239.

- Willard, F. S. and M. F. Crouch (2000). "Nuclear and cytoskeletal translocation and localization of heterotrimeric G-proteins." *Immunol Cell Biol* **78**(4): 387-394.
- Willars, G. B. (2006). "Mammalian RGS proteins: multifunctional regulators of cellular signalling." *Semin Cell Dev Biol* **17**(3): 363-376.
- Wingender, E., P. Dietze, H. Karas and R. Knuppel (1996). "TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites." *Nucleic Acids Res* **24**(1): 238-241.
- Wingo, P. A., T. Tong and S. Bolden (1995). "Cancer statistics, 1995." *CA Cancer J Clin* **45**(1): 8-30.
- Wu, H. K., H. H. Heng, X. M. Shi, D. R. Forsdyke, L. C. Tsui, T. W. Mak, M. D. Minden and D. P. Siderovski (1995). "Differential expression of a basic helix-loop-helix phosphoprotein gene, G0S8, in acute leukemia and localization to human chromosome 1q31." *Leukemia* **9**(8): 1291-1298.
- Wu, K. J., D. R. Wilson, C. Shih and G. J. Darlington (1994). "The transcription factor HNF1 acts with C/EBP alpha to synergistically activate the human albumin promoter through a novel domain." *J Biol Chem* **269**(2): 1177-1182.
- Yamanaka, R., C. Barlow, J. Lekstrom-Himes, L. H. Castilla, P. P. Liu, M. Eckhaus, T. Decker, A. Wynshaw-Boris and K. G. Xanthopoulos (1997). "Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 13187-13192.
- Yang, J., K. Kamide, Y. Kokubo, S. Takiuchi, C. Tanaka, M. Banno, Y. Miwa, M. Yoshii, T. Horio, A. Okayama, H. Tomoike, Y. Kawano and T. Miyata (2005). "Genetic variations of regulator of G-protein signaling 2 in hypertensive patients and in the general population." *J Hypertens* **23**(8): 1497-1505.
- Yokota, S., H. Kiyoi, M. Nakao, T. Iwai, S. Misawa, T. Okuda, Y. Sonoda, T. Abe, K. Kahsima, Y. Matsuo and T. Naoe (1997). "Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines." *Leukemia* **11**(10): 1605-1609.
- Yoshida, T., S. Y. Ng, J. C. Zuniga-Pflucker and K. Georgopoulos (2006). "Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros." *Nat Immunol* **7**(4): 382-391.
- Zeng, H., R. Yucel, C. Kosan, L. Klein-Hitpass and T. Moroy (2004). "Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells." *Embo J* **23**(20): 4116-4125.
- Zeng, W., X. Xu, S. Popov, S. Mukhopadhyay, P. Chidiac, J. Swistok, W. Danho, K. A. Yagaloff, S. L. Fisher, E. M. Ross, S. Muallem and T. M. Wilkie (1998). "The N-terminal domain of RGS4 confers receptor-selective inhibition of G protein signaling." *J Biol Chem* **273**(52): 34687-34690.
- Zhang, D. E., P. Zhang, N. D. Wang, C. J. Hetherington, G. J. Darlington and D. G. Tenen (1997). "Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2): 569-574.
- Zhang, P., J. Iwasaki-Arai, H. Iwasaki, M. L. Fenyus, T. Dayaram, B. M. Owens, H. Shigematsu, E. Levantini, C. S. Huettner, J. A. Lekstrom-Himes, K. Akashi and D. G. Tenen (2004). "Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha." *Immunity* **21**(6): 853-863.
- Zheng, B., L. De Vries and M. Gist Farquhar (1999). "Divergence of RGS proteins: evidence for the existence of six mammalian RGS subfamilies." *Trends Biochem Sci* **24**(11): 411-414.
- Zhu, Y., J. Hollmen, R. Raty, Y. Aalto, B. Nagy, E. Elonen, J. Kere, H. Mannila, K. Franssila and S. Knuutila (2002). "Investigatory and analytical approaches to

- differential gene expression profiling in mantle cell lymphoma." Br J Haematol **119**(4): 905-915.
- Zohn, I. M., S. L. Campbell, R. Khosravi-Far, K. L. Rossman and C. J. Der (1998). "Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested." Oncogene **17**(11 Reviews): 1415-1438.

